

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jana ERJAVEC

**VPLIV PROTEINSKIH EKSTRAKTOV IN ČISTIH PROTEINOV
IZOLIRANIH IZ GLIV (BASIDIOMYCOTA) TER NJIHOVI UČINKI
NA RASTLINSKO PATOGENO BAKTERIJO *RALSTONIA*
*SOLANACEARUM***

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INFLUENCE OF PROTEIN EXTRACTS AND PURE PROTEINS
ISOLATED FROM FUNGI (BASIDIOMYCOTA) AND THEIR
ACTIVITY AGAINST PLANT PATHOGENIC BACTERIUM
*RALSTONIA SOLANACEARUM***

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2015

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepa 20. seje Komisije za doktorski študij UL z dne 21. 9. 2011 (po pooblastilu Senata Univerze z dne 20. 1. 2009) je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposredni prehod na doktorski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti na področju biotehnologije. Hkrati se sprejme tudi tema doktorske disertacije. Za mentorja je imenovana prof. dr. Maja Ravnikar.

Doktorsko delo je bilo opravljeno na Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo Nacionalnega inštituta za biologijo (NIB) v Ljubljani ter na Oddelku za Biotehnologijo Inštituta Jožef Stefan (IJS) v Ljubljani. Za finančno podporo se zahvaljujemo Javnim agencijam za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije, ki je podprla delo v okviru financiranja mladih raziskovalcev (pogodba št. 1000-08-310193).

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ines Mandić-Mulec
Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Samo Kreft,
Fakulteta za farmacijo

Član: prof. dr. Franc Pohleven,
Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo

Datum zagovora: 22. 5. 2015

Podpisana izjavljam, da je disertacija rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jana Erjavec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	UDK 561.29:543.384:579.61(043.3)=163.6
KG	<i>Ralstonia solanacearum/Basidiomycetes/Ascomycetes/goba/protein/ekstrakt/paradižnik/krompir/test patogenosti</i>
AV	ERJAVEC, Jana, univ. dipl. mikr.
SA	RAVNIKAR, Maja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti s področja biotehnologije
LI	2014
IN	VPLIV PROTEINSKIH EKSTRAKTOV IN ČISTIH PROTEINOV IZOLIRANIH IZ GLIV (BASIDIOMYCOTA) TER NJIHOVI UČINKI NA RASTLINSKO PATOGENO BAKTERIJO <i>RALSTONIA SOLANACEARUM</i>
TD	Doktorska disertacija
OP	XVIII, 113 str., 7 pregl., 25 sl., 15 pril., 170 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Iskanje novih protibakterijskih učinkovin je še posebej pomembno v primeru rastlinskih patogenih bakterij, proti katerim še niso razvili učinkovitih fitofarmacevtskih sredstev. V naši raziskavi smo testirali 150 proteinских ekstraktov iz 94 različnih vrst višjih gliv, nabranih v Sloveniji (bazidiomicet in askomicet), proti karantenski rastlinski patogeni bakteriji <i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith, Yabuuchi in sod. 1996). Identificirali smo 15 ekstraktov s srednjo ali močno protibakterijsko aktivnostjo. V <i>in vitro</i> testu na mikrotitrski ploščici je 11 ekstraktov popolnoma inhibiralo rast bakterij, širje pa so kazali delno inhibicijo. Poleg tega smo testirali <i>in vitro</i> tudi proteinske frakcije ekstraktov <i>Amanita phalloides</i> in <i>Clitocybe geotropa</i> ter <i>in vitro</i> gojenega micelija <i>C. geotropa</i> , ki so prav tako popolnoma inhibirali <i>R. solanacearum</i> . Od vseh ekstraktov, ki so kazali <i>in vitro</i> inhibitorno aktivnost, smo izbrali 6 ekstraktov za oceno njihovega vpliva na razvoj bolezenskih znamen pri umetno okuženih rastlinah krompirja in paradižnika v testih patogenosti. Ugotovili smo da ekstrakti <i>C. geotropa</i> , <i>Suillus variegatus</i> in <i>Tricholoma saponaceum</i> zavirajo pojavo bolezenskih znamen in upočasnijo bakterijsko venenje tako na rastlinah paradižnika kot krompirja. Vendar se aktivnost ekstraktov <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> nista vedno ujemali, kar še dodatno poudarja pomen zgodnje vključitve <i>in vivo</i> presejalnih testov. Prav tako je kvantifikacija bakterij v rastlinskem tkivu z metodo real-time PCR pokazala, da se koncentracija bakterij ne ujema vedno s stopnjo bolezni. Poleg tega smo 10 izbranih aktivnih ekstraktov testirali proti 12 sevom <i>R. solanacearum</i> in <i>Ralstonia mannitolilytica</i> . 6 ekstraktov je popolnoma inhibiralo vse seve <i>R. solanacearum</i> , kar odpira možnosti za različne komercialne aplikacije. Biokemijske analize so pokazale, da so v ekstraktih <i>A. phalloides</i> in <i>C. geotropa</i> prisotni proteini ki so oksidaze L-amino kislin (LAO) in so najverjetnejši razlog za inhibicijo rasti <i>R. solanacearum</i> . Njihova LAO aktivnost je namreč sovpadala s protibakterijsko. Analiza z masno spektrometrijo je LAO iz <i>A. phalloides</i> identificirala kot toksofalin, najbližji zadetek za LAO iz <i>C. geotropa</i> pa je bil falvoprotein, dihidrolipoamid dehidrogenaza. Naša raziskava je tudi prva <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> študija, ki potrjuje, da so proteinски ekstrakti višjih gliv obetavni za obvladovanje bakterijskega venenja rastlin, ki ga povzroča <i>R. solanacearum</i> .

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Dd

DC UDK 561.29:543.384:579.61(043.3)=163.6

CX *Ralstonia solanacearum/Basidiomycetes/Ascomycetes/mushroom/protein/extract, tomato/potato/pathogenicity test*

AU ERJAVEC, Jana

AA RAVNIKAR, Maja (mentor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Biotechnology

PY 2014

TI INFLUENCE OF PROTEIN EXTRACTS AND PURE PROTEINS ISOLATED FROM FUNGI (BASIDIOMYCOTA) AND THEIR ACTIVITY AGAINST PLANT PATHOGENIC BACTERIUM *RALSTONIA SOLANACEARUM*

DT Doctoral Dissertation

NO XVIII, 113 p., 7 tab., 25 fig., 15 ann., 170 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Searching for new antibacterial substances is especially important in case of plant pathogenic bacteria, against which there is no chemical or biological agent available for plant protection. In our research we have tested 150 wild-mushroom protein extracts from 94 different Basidiomycetes and Ascomycetes species were tested for antibacterial activity against quarantine plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. Fifteen extracts with moderate to high antibacterial activities were identified. In *in vitro* microtitre plate assays, 11 extracts completely inhibited bacterial growth, while four showed partial inhibition. In addition, protein fractions obtained from *Amanita phalloides* and *Clitocybe geotropa* extracts and *C. geotropa* mycelium extract were also tested. All three have completely inhibited *R. solanacearum* *in vitro*. Of those with *in vitro* inhibitory activity, five were selected for evaluation of their effects on disease development on artificially inoculated potato and tomato plants. *In vivo* testing of 6 selected extracts on tomato and potato plants lead to a conclusion, that *C. geotropa*, *Suillus variegatus* and *Tricholoma saponaceum* extracts lower disease occurrence and delay bacterial wilting on both tomato and potato plants. However, the *in vitro* activities did not always correlate with the *in vivo* activities, which emphasises the importance of performing early screening tests also *in vivo*. Quantification of the bacteria in host plant tissue using real-time PCR showed that bacterial concentration did not always correlate with severity of symptoms. Furthermore, testing of 10 selected active extracts against 12 *R. solanacearum* strains and against *Ralstonia mannitolilytica* identified six mushroom protein extracts with the potential of a broader applicability. Biochemical analyses of *C. geotropa* and *A. phalloides* extracts have revealed that both extracts contain an L-amino acid oxidase proteins which may be responsible for *R. solanacearum* inhibition. Namely, the enzyme activity correlated with antibacterial activity. Mass spectrometry analysis identified *A. phalloides* LAO as toxophallin, while the closest score for *C. geotropa* LAO was flavoprotein, dihydrolipoamide dehydrogenase. To our knowledge, this is the first *in vitro* and *in vivo* study to show that protein extracts of higher fungi may be promising for treatment of bacterial wilt caused by *R. solanacearum*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO SLIK	XI
KAZALO PRILOG	XIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XV
SLOVARČEK.....	XVIII

1 UVOD	1
1.1 Cilji raziskave	2
1.2 Raziskovalne hipoteze	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 <i>Ralstonia solanacearum</i>	4
2.1.1 Biologija	4
2.1.2 Raznolikost <i>R. solanacearum</i>	5
2.1.3 Virulenčni faktorji <i>R. solanacearum</i>	5
2.1.4 Gospodarski pomen in nadzor bolezni	7
2.1.5 Diagnosticiranje <i>R. solanacearum</i>	7
2.2 Naravne snovi kot sredstva za varstvo rastlin	9
2.2.1 Glive iz debel prostotrosnic in zaprtotrosnic so vir biološko aktivnih proteinov	11

2.2.2	Proteini in polipeptidi iz višjih gliv	12
2.2.3	Uporaba proteinov iz višjih gliv	18
2.2.4	Metode testiranja protibakterijskih proteinov iz gob	23
3	MATERIAL IN METODE	31
3.1	Gojenje bakterij in priprava glivnih ekstraktov	31
3.1.1	Bakterijska kultura in priprava inokuluma	31
3.1.2	Glivna kultura	31
3.1.3	Priprava ekstraktov	32
3.2	Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti ekstraktov iz GOB <i>in vitro</i>	33
3.2.1	<i>In vitro</i> presejalni test v mikrotitrskih ploščicah	33
3.2.2	Določanje baktericidnega in bakteristatičnega učinka ekstrakta	34
3.2.3	Testiranje specifičnosti inhibicije ekstraktov iz gob proti različnim sevom <i>R. solanacearum</i>	34
3.2.4	Vpliv temperature na protibakterijsko aktivnost ekstraktov	35
3.3	Ugotavljanje vpliva ekstraktov in frakcij iz gob ali micelija na razvoj bolezenskih znamenj in koncentracijo bakterij v rastlinah okuženih z <i>R. solanacearum</i>	35
3.3.1	Test patogenosti na rastlinah paradižnika	35
3.3.2	Test patogenosti na rastlinah krompirja	36
3.3.3	Kvantifikacija bakterij <i>R. solanacearum</i> v rastlinah z uporabo PCR v realnem času	36
3.3.4	Primerjava ocene koncentracije <i>R. solanacearum</i>, ki smo jo določili s štetjem na ploščah in štetjem pod mikroskopom s tistimi, ki smo jih določili s qPCR	38
3.3.5	Analiza podatkov	38
3.4	Biokemijske analize aktivnih proteinov in izbranih ekstraktov iz gob	39

3.4.1	Izolacija biološko aktivnih proteinov	39
3.4.2	Karakterizacija protibakterijskih proteinov	39
3.4.3	Analiza L-aminokislinske oksidazne aktivnosti	40
3.4.4	Primerjava protibakterijske in L-amino oksidazne aktivnosti <i>C. geotropa</i> in <i>A. phalloides</i>	40
3.4.5	Vpliv ekstraktov in očiščenih frakcij na gibeljivost <i>R. solanacearum</i>	40
4	REZULTATI.....	41
4.1	Ugotavljanje protibakterijske aktivnosti ekstraktov iz gob <i>in vitro</i>	41
4.1.1	Presejalni test – testiranje v mikrotitrskih ploščicah	41
4.1.2	Gojenje micelija <i>Clitocybe geotropa</i>	45
4.1.3	Preverjanje protibakterijske aktivnosti micelija <i>C. geotropa</i>	47
4.1.4	Preverjanje specifičnosti inhibicije proti različnim filotipom <i>R. solanacearum</i> in drugim bakterijam <i>in vitro</i>	48
4.1.5	Temperaturna stabilnost protibakterijske aktivnosti ekstraktov	54
4.2	Ugotavljanje vpliva ekstraktov in frakcij iz gob ali micelija na razvoj bolezenskih znamenj in koncentracijo bakterij v rastlinah okuženih z <i>R. solanacearum</i>	55
4.2.1	Test patogenosti na rastlinah paradižnika	55
4.2.2	Preverjanje vpliva ekstraktov iz gob in očiščenih frakcij na rastline paradižnika	59
4.2.3	Test patogenosti na rastlinah krompirja	59
4.2.4	Kvantifikacija <i>R. solanacearum</i> v rastlinah paradižnika z uporabo real-time PCR	61
4.2.5	Primerjava ocene koncentracije <i>R. solanacearum</i>, ki smo jo določili s štetjem na ploščah s tistimi, ki smo jih določili s qPCR	66

4.3	biokemijske analize aktivnih proteinov iz izbranih ekstraktov iz gob in micelija	69
4.3.1	Izolacija biološko aktivnih proteinov iz <i>Clitocybe geotropa</i>	69
4.3.2	Izolacija biološko aktivnih proteinov iz ekstrakta micelija <i>Clitocybe geotropa</i>	72
4.3.3	Izolacija biološko aktivnih proteinov iz <i>Amanita phalloides</i>	73
4.3.4	Masna spektrometrija proteinov <i>Clitocybe geotropa</i> in <i>Amanita phalloides</i>	74
4.3.5	Analiza L-amino oksidazne (LAO) aktivnosti ekstraktov <i>C. geotropa</i> in <i>A. phalloides</i>	74
4.3.6	Primerjava protibakterijske in LAO aktivnosti	76
4.3.7	Vpliv ekstraktov in frakcij <i>A. phalloides</i> in <i>C. geotropa</i> na gibeljivost <i>R. solanacearum</i>	78
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	80
5.1	RAZPRAVA	80
5.1.1	Višje glive so slabo raziskan, a pomemben vir protimikrobnih snovi	80
5.1.2	Presejalni testi so ključni za hiter in učinkovit nabor biološko aktivnih ekstraktov in proteinov	81
5.1.3	Ekstrakt micelija gob kot vir protibakterijskih proteinov	81
5.1.4	Prisotnost različnih inhibitornih molekul je odvisna od načina priprave ekstrakta	82
5.1.5	Ekstrakti iz gob inhibirajo različne filotipe <i>R. solanacearum</i>	83
5.1.6	Ekstrakti in proteini s protibakterijsko aktivnostjo izhajajo iz užitnih in strupenih vrst bazidiomicet	85
5.1.7	Testi patogenosti so pomembni za razumevanje vpliva protibakterijskih učinkovin na rastline	86

5.1.8	PCR v realnem času omogoča spremeljanje koncentracije <i>R. solanacearum</i> v različnih delih rastlin paradižnika	87
5.1.9	Ekstrakti iz gob in micelija gob vsebujejo protibakterijske proteine	89
5.1.10	Ekstrakti in frakcije iz gob vplivajo na gibljivost <i>R. solanacearum</i>	91
5.2	SKLEPI	92
6	POVZETEK (SUMMARY)	94
6.1	POVZETEK	94
6.2	SUMMARY	95
7	VIRI	96

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Izbrani biološko aktivni proteini in proteiniki ekstrakti iz višjih gliv, razvrščeni glede na njihovo biološko aktivnost	13
Pregl. 2: Seznam proteininskih ekstraktov iz trošnjakov (prostotrosnic in zaprtotrosnic), ki smo jih testirali proti <i>R. solanacearum</i> <i>in vitro</i> v mikrotitskih ploščicah	42
Pregl. 3: Specifičnost inhibicije ekstraktov iz gob proti različnim filotipom <i>R. solanacearum</i> in drugim bakterijam <i>in vitro</i>	51
Pregl. 4: Seznam in inhibitorna aktivnost ekstraktov in frakcij izbranih gob pred in po kuhanju.....	54
Pregl. 5: Primerjava <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> inhibitorne aktivnosti ekstraktov in frakcij iz gob ali micelija.....	56
Pregl. 6: Primerjava koncentracije <i>R. solanacearum</i> v tkivu paradižnika določene s qPCR, štetjem na gojiščih in štetjem pod mikroskopom (BacLight) vzorčenem 10 in 22 dpi	67
Pregl. 7: Primerjava LAO in protibakterijske aktivnosti izbranih ekstraktov in frakcij	76

KAZALO SLIK

Sl. 1: Vrsta <i>R. solanaceum</i> je sestavljena iz različnih filotipov, ki jih najdemo na različnih geografskih področjih po svetu.....	6
Sl. 2: <i>R. solanacearum</i> povzroča obročasto gnilobo na gomoljih krompirja (A).....	8
Sl. 3: Postopek pridobitve novega biološko aktivnega proteina iz gob.....	25
Sl. 4: Postopek gojenja micelija <i>Clitocybe geotropa</i> v laboratoriju na trdnem (A) in v tekočem gojišču (D).....	32
Sl. 5: Rastline krompirja, ki kažejo različne stopnje bolezenskih znamenj ocenjene po lestvici od 0 do 5 (Winstead in Kelman, 1952).	36
Sl. 6: Inhibitorni učinek izbranih ekstraktov na rast bakteirje <i>R. solanacearum</i> NIB Z30 v <i>in vitro</i> testu na mikrotitrski ploščici.....	45
Sl. 7: Micelij <i>C. geotropa</i> na (A) PDA gojišču, (B) SMY gojišču in (C) v tekočem SMY gojišču.....	46
Sl. 8: Primerjava premera kolonij micelija <i>C. geotropa</i> na trdnem (neredčenem) SMY gojišču, ki smo ga redčili 2-krat, 4-krat in 6-krat.	47
Sl. 9: Analiza protibakterijske aktivnosti ekstrakta micelija <i>C. geotropa</i> , frakcije micelija po gelski kromatografiji ter gojišča SMY v katerem je micelij rastel.....	48
Sl. 10: Spektrofotometrično merjenje rasti posameznih sevov (filotipov) <i>R. solanaceum</i> ter <i>E. coli</i> in <i>R. mannitolilytica</i> v mikrotitrski ploščici po 24ih urah.	49
Sl. 11: Test baktericidnosti in bakteristatičnosti.....	53
Sl. 12: Vpliv izbranih ekstraktov iz gob na napredovanje bakterijskega venenja na rastlinah paradižnika cv. “Moneymaker”.....	57
Sl. 13: Vpliv izbranih ekstraktov iz gob na napredovanje bakterijskega venenja na rastlinah paradižnika cv. ‘Désirée’.....	60
Sl. 14: Koncentracija <i>R. solanacearum</i> v rastlinah paradižnika.....	62

Sl. 15: Korelacija med stopnjo bolezenskih znamenj in koncentracijo <i>R. solanacearum</i> v steblu umetno okuženih rastlin paradižnika z in brez ekstraktov iz gliv.....	64
Sl. 16: Primerjava koncentracije <i>R. solanacearum</i> v različnih delih rastline paradižnika 10 dpi in 22 dpi, določene z qPCR [celic/mL] in štetjem kolonij na YPGA gojišču [cfu/mL].	68
Sl. 17: Primerjava koncentracije <i>R. solanacearum</i> v različnih delih rastline paradižnika 22 dpi.....	68
Sl. 18: Rezultati NaDS-PAGE in nativna PAGE za ekstrakt <i>C. geotropa</i> in nekaterih frakcij.	70
Sl. 19: Rezultati NaDS-PAGE za frakcije <i>C. geotropa</i>	70
Sl. 20: Protibakterijska aktivnost 180 - 200 kDa proteinskega kompleksa <i>C. geotropa</i> izrezanega iz nativne PAGE	71
Sl. 21: Rezultati NaDS-PAGE ekstrakta micelija <i>C. geotropa</i> in nekaterih frakcij barvanega s Comassie modrim (levo) in s srebrom (desno).	72
Sl. 22: Rezultati NaDS-PAGE in nativna PAGE za <i>Amanita phalloides</i>	73
Sl. 23: Prikaz analize specifičnosti L-amino oksidazne aktivnosti (LAO) proteinskih frakcij <i>Amanita phalloides</i> (A) in <i>Clitocybe geotropa</i> (B).	75
Sl. 24: Primerjava LAO in protibakterijske aktivnosti izbranih frakcij.	77
Sl. 25: Gibljivost <i>R. solanacearum</i> v prisotnosti ekstraktov in frakcij <i>A. phalloides</i> in <i>C. geotropa</i>	79

KAZALO PRILOG

Pril. A: Viri, ki so citirani v Tabeli 1.....	115
Pril. B: Inokulacija rastlin paradižnika cv. ‘Moneymaker’ z različnimi koncentracijami <i>R. solanacearum</i> Ugotovili smo, da koncentracija 10^5 cfu/ml, povzroča značilne simptome na vseh rastlinah. Zato smo to koncentracijo uporabili v vseh naslednjih testih patogenosti ..	120
Pril. C: Inhibitorna aktivnost <i>R. solanacearum</i> NIB Z 30 izbranih ekstraktov iz gob.	121
Pril. D: Kontrola sterilnosti ekstraktov, ki smo jo preverjali v vsakem <i>in vitro</i> testu na mikrotitrski ploščici. Krivulje ekstraktov so ravne, vendar nekoliko nad negativno kontrolo, ker ekstrakti obarvajo suspenzijo. Ker vrednosti A_{595} ne naraščajo pomeni, da so ekstrakti sterilni	122
Pril. E: Preverjanje <i>in vitro</i> inhibicije ekstrakta <i>B. nigrescens</i> (redčen 10-krat, 100-krat, 1000-krat) proti različnim koncentracijam <i>R. solanacearum</i> (10^9 , 10^8 , 10^7 in 10^6 celic/mL). 10-krat redčen ekstrakt je popolnoma inhibiral <i>R. solanacearum</i> v koncentraciji 10^6 in 10^7 celic/mL	123
Pril. F: Rezultati inhibitorne aktivnosti ekstraktov ter frakcij gob in micelija <i>C. geotropa</i> pred in po kuhanju.	124
Pril. G: Pri okuženih rastlinah paradižnika (cv. Roma in cv. ‘Moneymaker’) in krompirja cv. ‘Désirée’, smo izračunali površino območja pod krivuljo napredovanja bolezni (AUDPC), s katero izrazimo intenziteto bolezni po času, ki smo jo izrazili relativno glede na pozitivno kontrolo (% PC).	125
Pril. H: Lizin oksidaza iz <i>T. viride</i> v koncentraciji 0,6 mg/mL, uniči velik delež celic <i>R. solanacearum</i> takoj ko pride z njimi v stik.	126
Pril. I: Ponovitev testa patogenosti na paradižniku cv. ‘Moneymaker’. Poleg ekstraktov <i>C. geotropa</i> in <i>A. phalloides</i> smo testirali tudi ekstrakt in frakcijo micelija <i>C. geotropa</i> ter frakcijo <i>A. phalloides</i> . Kot kontrolo LAO aktivnosti smo uporabili lizin oksidazo iz <i>T. viride</i>	127

Pril. J: Rastline paradižnika inokulirane samo z ekstrakti iz gob <i>A. phalloides</i> (Ap), <i>B. nigrescens</i> (Bn), <i>Suillus variegatus</i> (Sv) in <i>Tricholoma saponaceum</i> (Ts).....	128
Pril. K: Koncentracija <i>R. solanacearum</i> v rastlinah paradižnika cv. Roma	129
Pril. L: Podatki in prikaz umeritvene krivulje <i>R. solanacearum</i> analizirane s PCR v realnem času. Umeritvene krivulje smo poleg vzorcev, nanesli na vsako ploščico s 384 luknjicami in jih uporabili kot osnovo za izračun koncentracij <i>R. solanacearum</i> v vzorcih paradižnika.	
.....	130
Pril. M: Primer zadetkov iskanja po bazah podatkov na podlagi analize masne spektrometrije pik (proteinov) <i>C. geotropa</i> izrezanih iz 2DE gela (A) in lis izrezanih iz NaDS-PAGE (B). MS analizo sta opravila M. Fonović in J. Pohleven, IJS.....	131
Pril. N: Podatki merjenja premora kolonij <i>R. solanacearum</i> za oceno gibljivosti na mehkem agarju z dodanim triptonom.....	133
Pril. O: Primer vspodbujanja bakterijske rasti. Rast <i>R. solanacearum</i> je v prisotnosti ekstrakta <i>Amanita vaginata</i> prvih 48 h hitrejša kot pri pozitivni kontroli.....	134

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AUDPC	območje pod krivuljo napredovanja bolezni; angl. area under the disease progress curve
cfu/mL	število bakterij v mililitru iz katerih na ustreznem gojišču zrastejo kolonije; angl. colony forming unit per milliliter
<i>cox</i>	citokrom oksidaza
Ct	rezultat qPCR, mejni cikel označuje cikel, pri katerem je prvič opaženo povečanje fluorescence preko določenega praga
ddH ₂ O	dvakrat destilirana voda
dpi	dnevi po inokulaciji
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	2'-deoksinukleozid trifosfat
EPPO A2	seznam škodljivih organizmov, ki so lokalno prisotni in organizacija EPPO priporoča njihovo nadzorovanje
EPPO	Organizacija za varstvo rastlin v Evropi; angl. European and Mediterranean Plant Protection Organization
EU I.A.I	seznam nadzorovanih škodljivih organizmov rastlin Evropske Unije, katerih vnos in širjenje v državah članicah je prepovedano; ti organizmi niso prisotni v območju Evropske Unije.
F	smiseln začetni oligonukleotid; forward primer
FAM	6-karboksi-fluorescein
FFS	fitofarmacevtska sredstva
FIP	angl. fungal immunomodulatory protein; protein iz gliv, ki vpliva na imunski sistem človeka
GRAS	snov ali organizem za katere je splošno prepoznano da so varni; ang. generally recognized as safe

IF	imunofluorescencija
<i>in vitro</i>	pomeni biološke postopke, ki jih napravimo eksperimentalno v nadzorovanem okolju (na primer v mikrotitrskih ploščicah)
<i>in vivo</i>	pomeni biološke postopke, ki jih napravimo na živih organizmih v naravnih razmerah (npr. v rastlinjaku na rastlinah paradižnika, krompirja, itn.)
LAO	oksidaza L-amino kislin
MIC	metoda minimalne inhibitorne koncentracije
MS	masna spektrometrija
NaDS PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata
nativna PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza brez dodatka NaDS
DEAE-sefaroza	dietilaminoetanol kovalentno vezan na sepharozu, ki je polisaharidni polimer
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, FERA, York, United Kingdom
NGS	sekvenciranje (določanje nukleotidnega zaporedja) naslednje generacije; angl. next generation sequencing
NK	negativna kontrola
NKI	negativna kontrola izolacije nukleinskih kislin
NTC	negativna kontrola PCR; angl. no template control
NTP	nukleozid trifosfat
PBS	fosfatni pufer z dodanim NaCl; angl. phosphate buffer saline
PK	pozitivna kontrola
qPCR	verižna reakcija s polimerazo v realnem času; angl. quantitative real-time PCR

R	protismiseln začetni oligonukleotid; angl. reverse primer
SMSA	modificirano semiselektivno gojišče iz južne Afrike
TAMRA	6-karboksi-tetrametilrodamin
TTC	Kelmanovo tetrazolijevi gojišče
VBNC	žive bakterijske celice, ki jih ne moremo gojiti <i>in vitro</i> (ang. viable but not culturable)
YPGA	trdno gojišče (za gojenje bakterij) s kvasnim ekstraktom, peptonom in glukozo; angl. yeast peptone glucose agar

SLOVARČEK

Višje glive (podkraljestvo Dikarya) so zgrajene iz nitastih celičnih struktur, hif. Hife pravih gliv se združujejo v večje preplete, ki jih imenujemo podgobje ali micelij. Večina višjih gliv v času razmnoževanja razvije posebno kompaktnejšo strukturo iz hif, v kateri nastajajo in zorijo spore. Imenujemo ga trosnjak. Med višje glive uvrščamo dve debli, in sicer zaprtotrošnice in prostotrošnice.

Zaprtotrošnice (Ascomycota) so najštevilčnejše deblo v kraljestvu gliv, saj vsebuje več kot 64 000 vrst. Mednje sodijo tartufi, smrčki, številne plesni in kvasovke, med drugim tudi pivske in pekovske kvasovke.

Prostotrošnice (Basidiomycota) so drugo večje deblo višjih gliv. Mednje sodi večina gob, ki jih nabiramo v gozdovih, vključno z jurčki, lisičkami, golobicami, prašnicami, itn.

Celuloza je molekula, ki v največji meri sestavlja rastlinsko celično steno. Razgrajujejo jo encimi celulaze.

Defenzini so majhni kationski polipeptidi, sestavljeni iz 18-45 amino kislin. V splošnem delujejo proti bakterijam, pa tudi proti drugim mikroorganizmom. Večina defenzinov se veže na celično membrano, bakterijsko plazmalemo ali celično steno, kjer tvori kanale oz. pore, skozi katere začnejo izhajati iz bakterij pomembni ioni in hrnilne molekule.

Flavoprotein je protein, ki vsebuje flavin adenine dinukleotid (FAD) ali flavin mononukleotid (FMN). Flavoproteini so udeleženi v številnih bioloških procesih, na primer bioluminiscenci, fotosintezi, popravljanju poškodb na DNA verigi, oksidaciji in apoptozi.

Goba (trosnjak) je s prostim očesom viden del glive oziroma organiziran splet hif, v katerem se razvijajo trosi. Gobe tvorijo višje glive, torej tako zaprtotrošnice kot prostotrošnice.

Hemiceluloza: heterogen polimer, ki je v lesu sestavljen iz pentoz in sladkornih kislin. Največji delež predstavlja ksilan. Razgrajujejo jo hemicelulaze oziroma ksilanaze.

Lakaza: encim oksidaza, ki katalizira redukcijo kisika v vodo.

Lektin: protein, ki povezuje ogljikove hidrate z visoko specifičnostjo, ne da bi jih spremenil; najpogosteje ga povezujemo s fukcijami prepoznavnih molekul in medceličnih interakcij.

Ligin: kompleksni visokomolekularni polimer, ki daje rastlinam oporo in jih ščiti. Razgradnja lignina je zahtevna, saj ni mogoča z običajnimi hidrolitičnimi encimi, temveč morajo biti prisotni tudi oksidativni encimi in/ali radikali.

Micelij ali podgobje je vegetativno telo glice, ki je sestavljeno iz hif. Hifa zraste iz spore, se razveji in takrat nastane micelij.

Oksidaza je encim, ki kot sprejemnik elektronov katalizira kemijsko reakcijo v kateri poteče oksidacija in redukcija. V teh reakcijah poteče redukcija kisika v vodo H_2O ali vodikov peroksid H_2O_2 .

Tirozinaza je encim, ki katalizira postopno oksidacijo različnih fenolnih substratov; je ključni encim pri biosintezi melanina hkrati pa tudi povzroča neželjeno rjavenje gob, sadja in zelenjave med skladiščenjem.

Proteaza je (proteolitični encim, peptidaza, proteinaza) encim, ki katalizira hidrolizo peptidnih vezi; glede na katalitični tip jih razdelimo na aspartatne, cisteinske, glutaminske, serinske, treoninske in metalo-peptidaze (vir IUBMB Enzyme Nomenclature system).

Proteazni inhibitor: majhna molekula ali protein, ki inhibira proteolitično aktivnost proteaz.

1 UVOD

Rastlinske bolezni, vključno s tistimi, ki jih povzročajo bakterije, so med najbolj omejujočimi dejavniki kmetijske proizvodnje. Težave pri zatiranju povzročiteljev so pogosto posledica odsotnosti ustreznih fitofarmacevtskih pripravkov za njihovo zatiranje.

Po Gramu negativna bakterija *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi in sod. 1996) je talna patogena bakterija, ki povzroča bakterijsko venenje več kot 200 rastlinskih vrst, vključno s številnimi agronomsko pomembnimi rastlinami kot sta npr. krompir in paradižnik. Pomen bolezni je povezan z geografsko razširjenostjo bakterije v toplem podnebnem pasu, ki se v zadnjih desetletjih razširja tudi v zmernejša podnebna območja Evrope. V primeru okužbe, so posledice za pridelovalce hude, saj se več let ne sme na istem mestu saditi katerekoli od gostiteljskih rastlin, izguba pridelka pa je lahko tudi 100 %. Ker ne poznamo učinkovitega protibakterijskega sredstva za zatiranje *R. solanacearum*, širjenje okužb večinoma omejujemo s strogim nadzorom sadilnega materiala ter preprečevanjem širjenja z obdelovalnim orodjem.

Glede na vse večje zahteve po razvoju okoljsko trajnostnih sistemov pri nadzoru povzročiteljev rastlinskih bolezni, ki bi bili manj odvisni od sintetičnih pesticidov, iskanje naravnih učinkovin s protimikrobnim delovanjem pridobiva na pomeu. Protimikroben delovanje so že pokazali za številne snovi iz bakterij, protozojev in gliv. V smislu raziskovanja virov protimikrobnih učinkovin, so še zlasti slabo zastopane višje glice iz debla prostotrosnic. Med predvidenimi 140000 vrstami višjih gliv na Zemlji jih poznamo največ 20000. Tudi če bi bil delež vrst višjih gliv z uporabnimi aktivnimi snovmi zelo majhen, višje glice še vedno predstavljajo velikansko zalogo potencialnih protimikrobnih snovi (Hawksworth, 2001). Do sedaj se je v tradicionalni medicini, prehrani in za druge namene uporabljalo le okrog 200 vrst višjih gliv. V zadnjih letih pa se, na podlagi identifikacije novih biološko aktivnih snovi iz višjih gliv, to znanje prenaša v moderno tehnologijo in biotehničke procese. Večino do sedaj raziskanih učinkovin iz višjih gliv so pridobili iz trosnjakov (80 %) preostanek pa iz micelija z gojenjem v fermentorjih (20 %) (Lindequist in sod., 2005). Nekatere raziskave tudi kažejo, da so številne protibakterijske snovi iz višjih gliv proteini (Lam in Ng, 2010; Wong in sod., 2010; Erjavec in sod., 2012). V preglednem

članku Erjavec in sodelavci (2012) smo pripravili celovit pregled znanih proteinov iz višjih gliv, saj imajo številni proteini, vključno z lektini, lignocelulitičnimi encimi, inhibitorji proteaz in hidrofobini, posebne lastnosti, na primer: protibakterijske, protivirusne, imunosupresivne, protitumorske, protivnetne in druge lastnosti. Proteini iz višjih gliv tako lahko predstavljajo rešitve za nekatere težave, kot so mikrobna odpornost na zdravila, varstvo rastlin pred škodljivci in zahteve po obnovljivih virih energije.

Na trgu je registriranih že kar nekaj naravnih sredstev za varstvo rastlin, ki nadomeščajo ali dopolnjujejo FFS in s tem ščitijo rastline na naraven ter okolju prijazen način. Razvoj naravnih sredstev za varstvo rastlin je še posebej pomemben v primeru, ko ne poznamo učinkovitega sredstva za zatiranje patogenih mikrobov oz. škodljivcev ali pa so ti razvili odpornost na že obstoječe pesticide. Do sedaj je bilo z namenom varstva rastlin pred povzročitelji bolezni raziskanih le malo proteinov iz gliv. Eden od njih je tamavidfin, protein, ki veže biotin. Tamavidin, izražen v transgenem rižu, ščiti pridelek pred patogeno glivo *Magnaphorte oryzae* (Takakura in sod., 2012). Nekateri lektini in proteinazni inhibitorji so kazali tudi insekticidne lastnosti. Eden od njih je makrocipin, cisteinski proteinazni inhibitor iz gobe *Macrolepiota procera*, ki inhibira razvoj koloradskega hrošča (Šmid in sod., 2013; Šmid in sod., 2015). Insekticidne učinke so kazali tudi lektini iz bazidiomicete *Clitocybe nebularis* (Pohleven in sod., 2011; Pohleven in sod., 2012). Prav tako so iz gobe *Clitocybe geotropa* izolirali insekticidni in nematicidni protein (Šmid in sod., 2011). Edini primer proteina iz višjih gliv, ki so ga testirali proti rastlinskim patogenim bakterijam, so objavili Zheng in sodelavci, vendar pa inhibtorski lastnosti proteina iz *Clitocybe sinopica* niso testirali na rastlinah (Zheng in sod., 2010).

Naša raziskava je tako prva, ki proučuje *in vitro* in *in vivo* vpliv proteinskih ekstraktov in frakcij iz višjih gliv na *R. solanacearum*.

1.1 CILJI RAZISKAVE

- Ugotoviti ali imajo ekstrakti iz gob (trošnjakov) ali micelija in čisti proteini, protibakterijske učinke proti rastlinski patogeni bakteriji *R. solanacearum*

- Testirati protibakterijsko aktivnost ekstraktov iz gob v presejalnem testu v mikrotitrskih ploščah
- Testirati učinkovitost izbranih ekstraktov iz gob na rastlinah paradižnika in krompirja umetno okuženih z *R. solanacearum* ter oceniti ali ekstrakti iz gob lahko zavirajo pojav bolezenskih znamenj in/ali potek bolezni pri okuženih rastlinah
- Z analizo vzorcev rastlinskega tkiva z metodo PCR v realnem času ugotoviti ali obstaja povezava med koncentracijo *R. solanacearum* in stopnjo bolezenskih znamenj ter kakšen vpliv na koncentracijo bakterij v rastlinah imajo ekstrakti iz gob
- Iz izbranih ekstraktov pridobiti aktivne proteine v čistejši obliki in ugotoviti njegove biokemijske lastnosti ter oceniti protibakterijsko aktivnost

Izsledki predlagane doktorske disertacije bodo prispevali k razvoju novih ukrepov za varstvo rastlin, saj bomo z raziskavo novih naravnih spojin s protibakterijskimi učinki lahko pripravili temelje za razvoj novih sredstev za zatiranje teh pomembnih rastlinskih patogenih bakterij.

1.2 RAZISKOVALNE HIPOTEZE

- S testiranjem velikega števila ekstraktov gob (trošnjakov) bomo lahko izbrali nekaj takšnih, ki bodo imeli protibakterijski učinek na rastlinsko patogeno bakterijo *Ralstonia solanacearum*.
- Z uporabljenimi metodami bomo dokazali ali gre za baktericiden ali bakteristatičen učinek.
- Z gojenjem bakterij v tekoči kulturi in testa patogenosti na rastlinah paradižnika in krompirja bomo primerjali učinke protibakterijskih snovi v *in vivo* in *in vitro* sistemu ter ugotovili ali imajo proteini ekstrakti višjih gliv vpliv na napredovanje okužbe rastlin v testih patogenosti.
- Iz aktivnih glivnih ekstraktov bomo z različnimi biokemijskimi tehnikami izolirali aktivno substanco ali skupino aktivnih substanc proteinskega izvora.

2 PREGLED OBJAV

2.1 RALSTONIA SOLANACEARUM

2.1.1 Biologija

Ralstonia solanacearum (Smith, 1896) Yabuuchi in sod. 1996, predhodno znana kot *Pseudomonas solanacearum* (Smith, 1896) Smith 1914, je po Gramu negativna bakterija, ki jo taksonomsko uvrščamo k betaproteobakterijam, red *Burkholderiales*, družino *Burkholderiaceae* in rod *Ralstonia*. Celice so v obliki palčk, velikosti $0,5 \times 2,0 \mu\text{m}$. Bakterije so obligatni aerobi, gibljive z enim do štirimi polarnimi flageli (Fegan in Prior, 2005a).

Bakterija *R. solanacearum* ima zelo širok krog gostiteljev, ki obsega preko 200 vrst rastlin, in povzroča rjavo gnilobo krompirja, Moko bolezen banan ter bakterijsko venenje mnogih drugih rastlin, npr. tobaka, ingverja, paradižnika, pelargonij in številnih plevelnih vrst (Fegan in Prior, 2005a). *R. solanacearum* rasa 3, biovar 2A je pomembna v Evropi, saj lahko preživi v nekoliko hladnejših podnebnih razmerah, kar pa ne velja za druge rase. V Evropi je najpomembnejši gostitelj na poljih krompir, v rastlinjakih pa so to paradižnik, jajčevci ter pelargonije.

Bakterija ob okužbi vstopi v ksilem gostiteljske rastline skozi razpoke ali rane, ki jih povzročijo insekti, ogorčice ter obdelovalno orodje (Fegan in Prior, 2005a). Ker je *R. solanacearum* gibljiva bakterija, lahko potuje po ksilemu, kjer se namnoži in na ta način še bolj ovira pretok vode in hranil v zgornje dele rastline. Posledica je postopno venenje listov ter stebla. Običajno so posledice okužbe najprej vidne v najtoplejšem delu dneva, ponoči pa si rastline opomorejo. Z napredovanjem okužbe so boleznska znamenja vidna tudi ponoči. Značilno je rjavkasto obarvanje stebla ter rahlo rumenenje listov. Sčasoma celotna rastlina oveni in propade. Običajno so posledice okužbe hujše pri mlajših rastlinah, še posebno pri bolezni Moko na bananah je značilno, da so okužbi podvržene mlajše ter hitro rastoče rastline (Fegan in Prior, 2005a).

Običajne so tudi latentne okužbe z *R. solanacearum*, in sicer ta okuži rastlino *Solanum dulcamara*, ki ima korenine v vodi, nadzemni del pa nad vodo. Ker lahko *R. solanacearum* dolgo časa preživi v vodi, se lahko z njo širi na druge rastline ter polja. Latentne okužbe se

lahko pojavljajo tudi pri krompirju (*Solanum tuberosum*). Prav tako se bakterija prenaša z orodjem ob mehanski obdelavi, z okuženimi semenji, dežjem, žuželkami ter stiki med koreninami. Optimalna temperatura za rast bakterije je okoli 28 °C, število bakterij pa se občutno zmanjša pri temperaturi pod 4 °C. Obsežnejše okužbe se zato pojavljajo predvsem v tropskem in subtropskem pasu ter nekaterih toplejših predelih (Fegan in Prior, 2005a).

V primeru okužbe, so na polju posledice tako hude, da se več let ne sme na istem mestu saditi katerekoli od gostiteljskih rastlin. Ker ne poznamo učinkovitega protibakterijskega sredstva za zatiranje *R. solanacearum*, širjenje okužb večinoma omejujemo s strogim nadzorom sadilnega materiala ter preprečevanjem širjenja z obdelovalnim orodjem. Zaradi tega je nujen poseben fitosanitarni nadzor, ki preprečuje vnos *R. solanacearum* na karantenska območja.

2.1.2 Raznolikost *R. solanacearum*

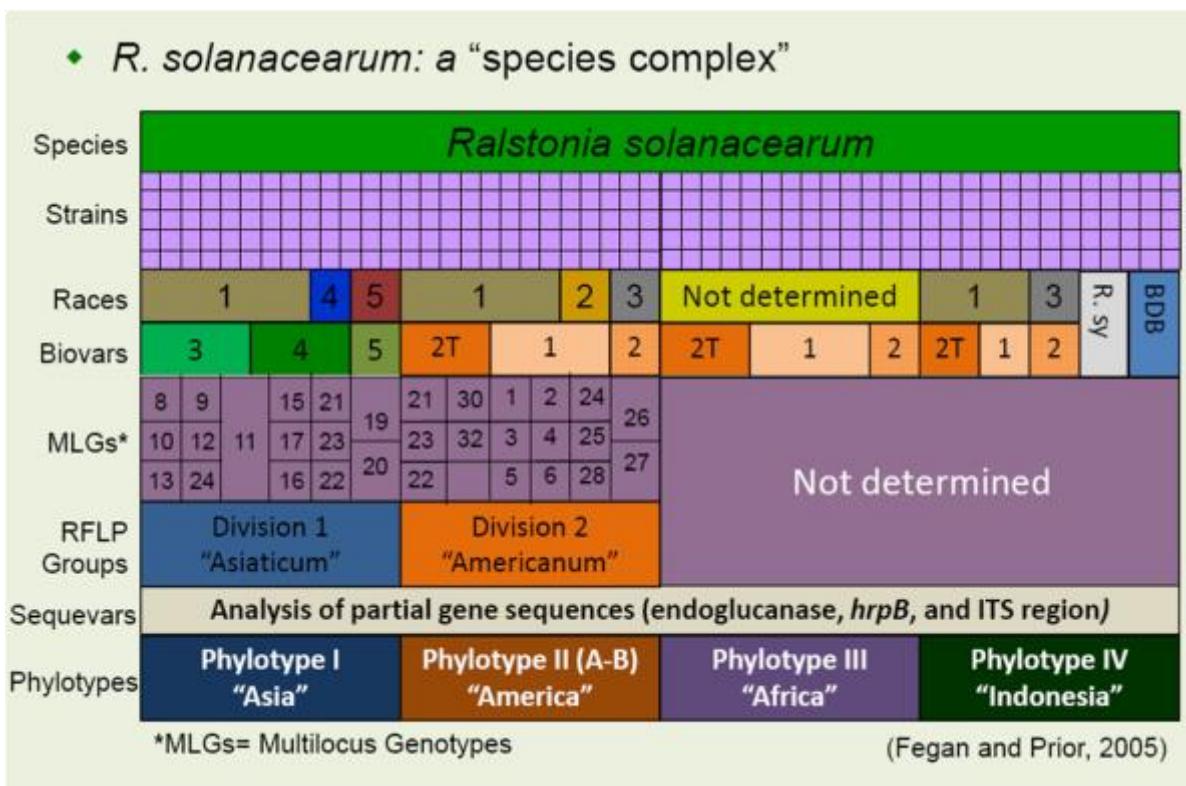
Bakterijska vrsta *R. solanacearum* sestavlja kompleks, ki zajema štiri filotipe (I do IV), ki ustrezajo geografskim poreklom (Slika 1). Filotipi so določeni s filogenetsko analizo nukleotidnih sekvenc. Vsaka filogenetska skupina vsebuje več biovarjev glede na njihove biokemične lastnosti in pet ras določenih na podlagi razlik v gostiteljskih rastlinah. Vsak filotip vsebuje več skupin sevov z visoko ohranjenimi zaporedji znotraj območja genoma (Buddenhagen in sod., 1962; Fegan in Prior, 2005b).

2.1.3 Virulenčni faktorji *R. solanacearum*

Z različnimi biokemijskimi, genetskimi in molekulskimi pristopi so znanstveniki že proučili osnovne mreže virulenčnih dejavnikov *R. solanacearum* (Meng, 2013; Poueymiro in Genin, 2009), objava celotnega genomskega zaporedja seva GMI1000 (Salanoubat s sod., 2002) pa je široko odprla vrata nadaljnjam analizam patogenosti bakterije in njene biološke raznovrstnosti.

V 5.8 Mb velikem genomu *R. solanacearum*, s približno 5000 geni (Salanoubat in sod., 2002), velik delež predstavlja geni, ki sodelujejo v procesu adaptacije in okužbe gostiteljske rastline. Bakterija prepoznavata signale, ki jih oddaja rastlina iz rane prek PrhA

receptorja v zunanjih membranah bakterijske celice. Ta nato preko kaskade proteinov aktivira izražanje Hrp genov, ki sprožijo hipersensitivno reakcijo (PopA, PopC, PopH, in HrpY). Na ta način bakterije premagajo prvo linijo rastlinskega obrambnega sistema (Aldon in sod., 2000).



Slika 1: Vrsta *R. solanacearum* je sestavljena iz različnih filotipov, ki jih najdemo na različnih geografskih področjih po svetu.

Glede na biokemijske teste *R. solanacearum* razdelimo na različne biovarje, medtem ko je razdelitev na rase odvisna od gostiteljev, ki jih različni sevi *R. solanacearum* okužujejo (Prior in Fegan, 2005: 135) .

Figure 1: *R. solanacearum* species comprises of phylotypes that can be found in different geographical regions around the world.

R. solanacearum is further divided to biovars according to biochemical characteristics and races, according to their host range (Prior in Fegan, 2005: 135).

Da bakterija pride do ranjenega dela rastline in potem uspešno prodre do žilnega tkiva, je potrebna sinteza zgodnjih virulenčnih faktorjev, to je regulacija genov za trzajoče in plavajoče gibanje proti mestu okužbe ter sinteza pektinaz (Peh A,B,C) za razgradnjo celične stene (Tans-Kersten in sod., 2001, 2004). Eden najpomembnejših regulatornih signalov poznih virulenčnih faktorjev je celična gostota. Ko bakterijska populacija v rastlini doseže koncentracijo višjo kot 10^8 cfu/g, se prek »quorum sensing« signala 3-OH-PAME aktivira

prepis gena *phcA*, ki se prevede v globalni regulatorni protein PhcA (Nakaho in sod., 2004). Ta aktivira številne virulenčne faktorje kot so pektinaze in endoglukanaze, ki razgrajujejo celično steno, regulatorje gibljivosti bakterije in sintezo eksopolisaharida (EPS). Slednji fizično zamaši žile in s tem prepreči dotok vode in hrani v zgornje dele rastline, kar opazimo kot venenje (Genin in sod., 2005; Gonzalez in sod., 2007). Bakterija znotraj rastline večinoma ni gibljiva (giblje se pasivno s tokom hrani), ko pa na določenem mestu populacija doseže koncentracijo višjo od 10^8 cfu/g, približno 5 % celic ponovno pridobi gibljivost in se giblje proti delom rastline, ki še niso kolonizirani (Tans-Kersten in sod., 2004).

2.1.4 Gospodarski pomen in nadzor bolezni

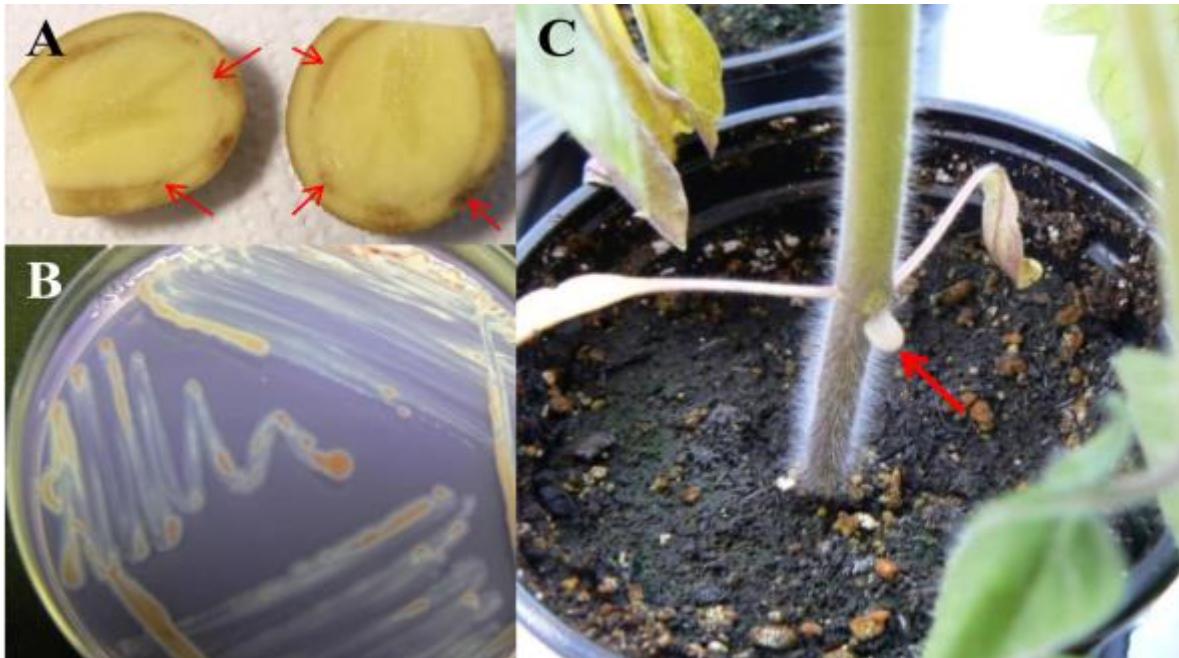
Izgube pridelka so odvisne od več dejavnikov: gostitelja, podnebja, tipa prsti, načina kmetovanja in seva *R. solanacearum*. Po dosedanjih poročilih je bolezen prizadela okrog 1,5 milijona hektarjev krompirjevih polj, vsakoletno škodo, ki jo povroča *R. solanacearum* na gospodarsko pomembnih poljšinah pa je ocenjena na 950 milijonov dolarjev (Elphinstone, 2005). Med najbolj prizadetimi deželami so Kitajska, Bangladeš, Uganda in Bolivija, kjer je izpad pridelka na polju med 30 % do 90 %, izguba med skladiščenjem pa je lahko kar 98 %. V Bangladešu so poročali, da je okuženih 30 % vseh polj krompirja, kar skupno pomeni 14 % zmanjšanje pridelka (Elphinstone, 2005). Leta 1998 je rjava gniloba krompirja prizadela Nizozemsko, škodo so ocenili na 2.7 milijona ameriških dolarjev (Meiners, 2000). Bakterije povzroča veliko gospodarsko škodo tudi na paradižniku, tobaku, bananah in ingverju (Floyd, 2008).

2.1.5 Diagnosticiranje *R. solanacearum*

Hitre in zanesljive diagnostične metode so nujne za spremljanje pojavljanja bolezni, ki jih povzroča *R. solanacearum*, kar nam tudi omogoči zmanjšanje tveganja širjenja bolezni na nova, še neokužena območja.

Okužbo z *R. solanacearum* lahko včasih posumimo, če prerežemo steblo ali gomolj rastline in ko obe polovici počasi ločimo, lahko opazimo sivkasto bel, lepljiv izcedek, ki se počasi ločuje od obeh polovic tkiva (Slika 2). Še lažje lahko opazujemo, če obe polovici tkiva potopimo v vodo in nato opazujemo kako bakterijski izcedeh izhaja iz tkiva (EPPO, 2004;

Fegan in Prior, 2005a).



Slika 2: *R. solanacearum* povzroča obročkasto gnilobo na gomoljih krompirja (A).

Ob prerezu gomolja lahko včasih opazimo kapljice čiste bakterijske kulture, prav tako jih lahko opazimo na okuženih rastlinah (C). V tem primeru lahko s sterilno cepilno zanko kulturo nanesemo na selektivno gojišče z antibiotikom (SMSA), kjer opazujemo tipično morfologijo kolonij (B).

Figure 2: *R. solanacearum* causes bacterial brown rot of potato (A).

When the tubers are cut, bacteria may ooze out of the infected parts of the tuber as well as out of the infected green parts of the plants (C). Sterile inoculation loop is then used to spread bacterial culture on the selective SMSA medium, where typical morphology can be observed (B).

Za dokazovanje prisotnosti bakterije so predpisane številne diagnostične metode. Bolezen rastlin diagnosticiramo na osnovi značilnih bolezenskih znamenj in izolacije čiste bakterijske kulture na gojiščih. Temu sledi karakterizacija z morfološkimi, fiziološkimi, biokemijskimi in molekularnimi testi (Council Directive 98/57/EC, 1998).

Za izolacijo *R. solanacearum* iz rastlinskega materiala pri katerem so vidna bolezenska znamenja, lahko uporabimo neselektivno YPGA gojišče ali pa Kelmanovo TTC gojišče, ki vsebuje trifeniltetrazolijev klorid. S pomočjo slednjega lahko tudi ločimo med virulentnimi in avirulentnimi sevi *R. solanacearum* (EPPO, 2004). Za izolacijo bakterije iz zemlje ali latentno okuženega rastlinskega materiala so večinoma uporablja selektivno SMSA gojišče (Elphinstone in sod., 1996).

Za določanje *R. solanacearum* so zelo uporabne serološke metode, mednje sodi tudi test

indirektne imunofluorescence (Stead, 1992), kjer v reakciji uporabimo bodisi poliklonska bodisi monoklonska protitelesa. Pri poliklonskih protitelesih lahko pride do neželenih navzkrižnih reakcij, monoklonska pa so v primerjavi s poliklonskimi manj občutljiva in ne zaznajo vseh sevov *R. solanacearum*. *R. solanacearum* lahko določimo tudi s pomočjo profila maščobnih kislin (Stead, 1992).

Danes imajo v diagnostiki zelo pomembno vlogo molekularne metode. Ena izmed njih je gotovo verižna reakcija s polimerazo v realnem času (qPCR, ang. real-time PCR), ki se je poleg PCR izkazala za uporabno tudi pri diagnosticiranju *R. solanacearum*. Weller in sodelavci (Weller in sod., 2000) so oblikovali visoko specifične začetne oligonukleotide in sonde, ki se specifično vežejo na DNA večine sevov *R. solanacearum*, ne vežejo pa se na DNA sorodnih *Pseudomonas spp.* Prednost metode je poleg hitrega diagnosticiranja tudi visoka občutljivost, saj lahko zaznamo že 100 celic/mL oziroma 1 celico v reakcijski mešanici. Z metodo qPCR lahko, tako kot z metodo ddPCR (ang. digital droplet PCR), tudi uspešno kvantificiramo bakterije v vzorcu (Dreo in sod., 2014).

Zelo pomemben test, ki potrjuje patogenost, je gojenje bakterije na gostiteljskih rastlinah. Za namnoževanje *R. solanacearum* se uporablja rastline paradižnika *Lycopersicon esculentum* sorte ‘Moneymaker’, ki so na okužbo z *R. solanacearum* zelo občutljive. Rastline, ki jih uporabimo za inokulacijo, so v fazi, ko imajo razvite tri prave liste, lahko tudi nekoliko starejše. Za inokulacijo se uporablja koncentracija bakterij v suspenziji 10^6 cfu/mL. Najprimernejše se je za inokulacijo izkazalo steblo, saj mora bakterija priti v stik s ksilemom, kjer se lahko razmnožuje (EPPO, 2004).

2.2 NARAVNE SNOVI KOT SREDSTVA ZA VARSTVO RASTLIN

Glede na vse večje zahteve po razvoju okoljsko trajnostnih sistemov pri nadzoru povzročiteljev rastlinskih bolezni, ki bi nadomestili ali dopolnjevali FFS za varstvo rastlin, postaja iskanje naravnih učinkovin s protimikrobnim delovanjem vedno bolj aktualno. Vir protimikrobnih snovi so lahko kar mikroorganizmi sami. Presejalne analize mikrobnih izolatov so v zadnjih 50 letih vodile do številnih tržno dosegljivih bioloških molekul. Poleg

tega raziskave v mikrobeni ekologiji kažejo, da je mikroben raznolikost v naravi mnogo večja od tiste zbrane v laboratorijskih zbirkah mikroorganizmov.

Poleg mikroorganizmov so potencialen vir naravnih protimikrobnih snovi tudi rastline. Večina je sekundarnih metabolitov, nekateri dajejo rastlinam značilen vonj ali okus, hkrati pa služijo tudi kot del obrambnega sistema proti fitopatogenim mikroorganizmom in rastlinskim škodljivcem. Rastlinske protimikrobne snovi lahko razdelimo v nekaj večjih skupin, in sicer fenolne spojine ter njihove derivate, terpenoide in eterična olja, alkaloide, beljakovine in polipeptide, poliacetilene in mešanice, kot so na primer mlečki (Cowan, 1999). Alicin, ki se sintetizira v strokih česna, je že dalj časa znan po širokem spektru delovanja na različne encime rastlinskih povzročiteljev bolezni. Inhibira lahko številne encime, kot so holin esteraza, glioksilaza, alkohol dehidrogenaza in druge (Curtis in sod., 2004).

Pomembne rastlinske inhibitorne substance so tudi lektini, to so beljakovine, ki povratno vežejo specifičen monosaharid oziroma oligosaharid. Ker so slednji običajno prisotni v membranah različnih mikrobenih celic, se lektini na njih vežejo in povzročijo aglutinacijo celic. Posebno pri gibljivih bakterijah je aglutinacija pomemben obrambni mehanizem, saj se s tem njihova gibljivost močno zmanjša, posledično pa tudi patogenost (Peumans in Van Damme, 1995).

Pradhanang in sodelavci (Pradhanang in sod., 2003; Ji in sod., 2005) so preverjali učinek eteričnih olj na fitopatogeno bakterijo *R. solanacearum*. Za najbolj učinkovitega se je v testu patogenosti izkazal timol pridobljen iz eteričnega olja timijana, saj po aplikaciji timola v kontaminirano zemljo iz rastlin paradižnika niso izolirali bakterij *R. solanacearum*, kljub temu, da je bil začetni inokulum bakterij v zemlji skoraj 10^9 CFU/mL. Zaradi inhibitorne aktivnosti timola so preverjali tudi njegovo učinkovitost v poljskih poskusih (biofumigacija), v katerih je bil odstotek uvelikih rastlin precej nižji v primerjavi s pozitivno kontollo (Ji in sod., 2005). Biofumigacija zemlje je eden od možnih načinov preprečitev okužbe z *R. solanacearum*, saj bi jo na ta način uničili že v zemlji, preden bi pridelek posadili.

Obetavne rezultate za nadzor bakterijskega venenja, ki ga povzroča *R. solanacearum*, so dobili tudi z biokontrolnimi bakterijami in glivami. Glive, kot je na primer *Phytium*

oligandrum (Hase in sod., 2008) in bakterije iz rodov *Acinetobacter* in *Enterobacter* (Xue in sod., 2009), *Bacillus amyloliquefaciens* (Wei in sod., 2011; Tan in sod., 2013) in druge bakterije, ki jih najdemo v rizosferi (Aliye in sod., 2008) so zmanjšale pojav bolezni na rastlinah paradižnika in krompirja, medtem ko je *B. amyloliquefaciens* tudi vzpodbujoč rast rastlin (Wei in sod., 2011; Tan in sod., 2013). Vendar pa so poljski poskusi v več sezонаh pokazali, da se populacija biokontrolnega agensa kot tudi *R. solanacearum* med sezonomi spreminja in sta odvisni od okoljskih dejavnikov, predvsem temperature in padavin (Pal in sod., 2006; Sundin in sod., 2009). Posledično še ni na voljo učinkovitega biološkega sredstva za zatiranje *R. solanacearum*.

2.2.1 Glive iz debel prostotrošnic in zaprtotrošnic so vir biološko aktivnih proteinov

(*Povzeto po Erjavec in sod., 2012*)

Biološko aktivne snovi izolirane iz višjih gliv razdelimo v sekundarne metabolite, (gliko)proteine in polisaharide z visoko molekulsko maso. Še zlasti dobro raziskani so polisaharidi višjih gliv, npr. β -glukani, zaradi njihovih protitumoskih lastnosti in krepitve imunskega sistema in se že uporablajo za zdravljenje (Lindequist in sod., 2005; Wasser, 2011). Botič in sodelavci (2009) so tako potrdili protibakterijske in antioksidativne lastnosti iz komercialno kupljenih pripravkov gob, ki se sicer uporablajo v kitajski tradicionalni medicini. Z uporabnega stališča so še posebej zanimive take učinkovine, ki sočasno delujejo proti bakterijam odpornim proti več antibiotikom in tiste, ki delujejo proti več vrstam bakterij (Sivakumar in sod., 2006; Albino Smania in sod., 2007; Pandey, 2013). V eni redkih presejalnih analiz, v katero so bili vključeni ekstrakti iz 84 brazilskih vrst višjih gliv, so odkrili, da je njihova protibakterijska aktivnost pogosteješa od protiglivne (Rosa in sod., 2003).

V zadnjem desetletju se je povečalo zanimanje za proteine iz višjih gliv, saj se njihove lastnosti precej razlikujejo od proteinov, ki jih najdemo v drugih organizmih. Tako so na primer bolj obstojni (pri različni temperaturi in pH), bolj specifični ali imajo druge lastnosti, ki lahko izboljšajo številne biotehnološke procese ali pripomorejo k zdravljenju različnih

obolenj (Sabotič in sod., 2009; Zhang in sod., 2010; Shokribousjein in sod., 2011; Essig in sod., 2014).

2.2.2 Proteini in polipeptidi iz višjih gliv

Čeprav so višje glive bogat vir raznolikih proteinov, je zelo malo proteinov iz višjih gliv identificiranih in še manj karakteriziranih. Preglednica 1 povzema znane proteine iz višjih gliv in proteinske ekstrakte, ki so razvščeni glede na njihove biološke aktivnosti, v Erjavec s sodelavci (2012) smo jih razvrstili tudi glede na njihove biokemijske lastnosti.

Ena od najbolj raziskanih skupin proteinov iz višjih gliv so encimi vpleteni v razgradnjo lignoceluloze. Mednje uvrščamo lakaze, peroksidaze, (hemi)celulaze in različne glikozidaze (Baldrian in Valaskova, 2008; Hatakka in Hammel, 2010). Dobro poznane so tudi tirozinaze, predvsem tiste iz dvotrosnega kukmaka (*Agaricus bisporus*), saj so ključni encimi v biosintezi melanina, uporabne pa so na primer tudi pri biosintezi L-DOPA, pomembnega zdravila, ki se uporablja za zdravljenje Parkinsonove bolezni (Halaouli in sod., 2006). Primer encima iz višjih gliv, ki je že v industrijski uporabi je 6-fitaza *Peniophora lycii* in se uporablja kot krmni dodatek pri monogastričnih živalih (npr. konjih, prašičih), saj poveča privzem mineralov (Pontoppidan in sod., 2007).

Zelo raziskani so tudi lektini iz višjih gliv. Marsikateri so namreč imeli posebne lastnosti v strukturi molekule, glikozilaciji in specifičnosti vezave na sladkorno molekulo. Posledično je njihova uporaba možna v številnih medicinskih in biotehnoloških aplikacijah (Goldstein in Winter, 2007; Singh in sod., 2010; Khan in Khan, 2011). Še posebej zanimivi so lektini FIPs (ang. fungal immunomodulatory proteins), ki pozitivno vplivajo na celice imunskega sistema in s tem na primer povečajo uspešnost zdravljenja raka (Singh in sod., 2010).

Višje glive so tudi pomemben vir novih proteaz ter proteinaznih inhibitorjev. Pregled proteolitičnih encimov iz gob (trošnjakov) višjih gliv, ki rastejo v naravi, je pokazal veliko raznovrstnost proteolitične aktivnosti, številne proteaze pa so imele posebne značilnosti, ki so jih zaenkrat našli samo pri prostotrosnicah (Sabotič in sod., 2007).

Preglednica 1: Izbrani biološko aktivni proteini in proteinski ekstrakti iz višjih gliv, razvrščeni glede na njihovo biološko aktivnost.**Table 1:** Selected biologically active proteins and protein extracts of higher fungi, grouped according to their biological activity.

aktivnost	protein/ekstrakt	molekulska masa (kDa)	sekvenca	3D struktura	vrsta višje glive	tarča	viri (Priloga A)
protiglivna	alveolarin	14	N-terminal	ne	<i>Polyporus avleolaris</i>	<i>Mycosphaerella. arachidicola, Physalospora piricola, Fusarium. oxysporum, Botrytis cinerea</i>	1
	agrocybin	9	N-terminal	ne	<i>Agrocybe cylindracea</i>	<i>M. arachidicola</i>	2
	CMP	12	N-terminal	ne	<i>Cordyceps militaris</i>	<i>F. oxysporum</i>	3
	cordymin	10.9	N-terminal	ne	<i>Cordyceps militaris</i>	<i>Bipolaris maydis, M. arachidicola, Rhizoctonia solani, Candida albicans</i>	4
	erygin	10	N-terminal	ne	<i>Pleurotus erygii</i>	<i>F. oxysporum, M. arachidicola</i>	5
	ganodermin	15	N-terminal	ne	<i>Ganoderma lucidum</i>	<i>B. cinerea, F. oxysporum, P. piricola</i>	6
	hypsin	20	N-terminal	ne	<i>Hypsizigus marmoreus</i>	<i>M. arachidicola, P. piricola, F. oxysporum, B. cinerea</i>	7
	lentin	27.5	N-terminal	ne	<i>Lentinus edodes</i>	<i>P. piricola, B. cinerea, M. arachidicola</i>	8
	lyophyllin	20	N-terminal	ne	<i>Lyophyllum shimeiji</i>	<i>P. piricola, M. arachidicola</i>	9
	pleurostrin	7	N-terminal	ne	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>F. oxysporum, M. arachidicola, P. piricola</i>	10
	RNaza	12	N-terminal	ne	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>F. oxysporum, M. arachidicola</i>	11
	trichogin	27	N-terminal	ne	<i>Tricholoma giganteum</i>	<i>F. oxysporum, M. arachidicola, P. piricola</i>	12
	ekstrakt	/	/	/	<i>Ganoderma pfeifferi</i>	<i>Pityrosporum ovale</i>	13
	ekstrakt	/	/	/	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	14

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 1: Izbrani biološko aktivni proteini in proteinski ekstrakti iz višjih gliv, razvrščeni glede na njihovo biološko aktivnost.

aktivnost	protein/ekstrakt	molekulska masa (kDa)	sekvenca	3D struktura	vrsta višje glive	tarča	viri (Priloga A)
protibakterijska	<i>C. sinopica</i> protibakterijski protein	22	N-terminal	ne	<i>Clitocybe sinopica</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i> , <i>A. tumefaciens</i> , <i>A. vitis</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i> , <i>X. malvacearum</i>	15
	copsin	6,1	da	da	<i>Coprinopsis cinerea</i>	grampozitivne bakterije	Essig
	RNaza	12	N-terminal	ne	<i>Pleurotus sajor-caju</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	11
protivirusna	ekstrakt	/	/	/	<i>Ganoderma pfeifferi</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Propionibacterium acnes</i>	13
	cordymin	10.9	N-terminal	ne	<i>Cordyceps militaris</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	4
	GFAHP	29.5	N-terminal	ne	<i>Grifola frondosa</i>	herpes simplex virus-1	16
	polisaharidni peptid (PSP)	/	ne		<i>Trametes versicolor</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza, glikozilacija virusa	17
	shizolizin	29	N-terminal	ne	<i>Schizophyllum commune</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	18
	trichogin	27	N-terminal	ne	<i>Tricholoma giganteum</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	12
	<i>T. giganteum</i> lakaza	43	N-terminal	ne	<i>Tricholoma giganteum</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	19
	velutin	13.8	N-terminal	ne	<i>Flammulina velutipes</i>	HIV-1 reverzna transkriptaza	20
ekstrakti micelija	metaloproteaza	21	N-terminal	ne	<i>Lepista nuda</i>	celice hepatoma Hep G2, levkemije L1210	21
	ekstrakti micelija	/	/	/	<i>Kuehneromyces mutabilis</i>	virus influence tipa A in B	22

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 1: Izbrani biološko aktivni proteini in proteinski ekstrakti iz višjih gliv, razvrščeni glede na njihovo biološko aktivnost.

aktivnost	protein/ekstrakt	molekulska masa (kDa)	sekvenca	3D struktura	vrsta višje glive	tarča	viri (Priloga A)
protitumorska	calvacin	16.9	ne	ne	<i>Calvatia gigantea</i>		23
	CMP	12	N-terminal	ne	<i>Cordyceps militaris</i>		3
	cordymin	10.9	N-terminal	ne	<i>Cordyceps militaris</i>		4
	Flo, Flo-A FIII-1-a/b, FIII-2-a/b, PCP-3A and KS-2 glikoproteini	400-2000	ne	ne	<i>Pleurotus citrinopileatus, Ganoderma tsugae, Lentinus edodes</i>		24-26
	Gl-PP	512.5	ne		<i>Ganoderma lucidum</i> <i>A. bisporus, Agrocybe aegerita, Amanita pantherina, Boletus satanas, C. geotropa, Coprinus cinereus, Ganoderma carpense G. lucidum, G. frondosa, F. velutipes, Hericium erinaceum Inocybe umbrinella, Ischnoderma resinosum, Lactarius deterrimus, Laetiporus sulphureus, Tricholoma mongolicum P. ostreatus, Pholiota adiposa</i>	različne rakave in tumorske celice	27
	lektini	12-190	da ^a	da ^b			28-33
	PSP kompleks (PSPC)	/	ne	ne	<i>Tricholoma</i> sp.		34
	Rnaza						11,35
	ubikvitinu podoben peptid	9	N-terminal	ne	<i>Cantharellus cibarius</i>		36
	ekstrakt	/	/	/	<i>Calvatia lilacina</i>	različne rakave in tumorske celice	
	ekstrakt	/	/	/	<i>Pleurotus ostreatus</i>		37
	ekstrakt	/	/	/	<i>Volvariella volvacea</i>		
	metaloproteaza	21	N-terminal	ne	<i>Lepista nuda</i>	celice hepatoma Hep G2, levkemije L1210	21

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 1: Izbrani biološko aktivni proteini in proteinski ekstrakti iz višjih gliv, razvrščeni glede na njihovo biološko aktivnost.

aktivnost	protein/ekstrakt	molekulska masa (kDa)	sekvenca	3D struktura	vrsta višje glive	tarča	viri (Priloga A)
	ubikvitinu podoben peptid	9.5	N-terminal	ne	<i>Agrocybe cylindracea</i>		38
	MLP frakcija	/	/	/	<i>Grifola frondosa</i>		39
	Proteinska frakcija	/	/	/	<i>Volvariella volvacea, Ganoderma lucidum</i>		40
vpliv na imunski sistem	LZ-8, FIP-fve, FIP-vvo, FIP-gts, FIP-gja, GMI, ACA	12-16	da ^a	yes ^b	<i>Ganoderma lucidum, Flammulina velutipes, Volvariella volvacea, Ganoderma tsugae, Ganoderma japonicum, Ganoderma microsporum, Antrodia camphorata</i>	celice imunskega sistema	41-46
proteini, ki deaktivirajo ribosome	adustin	13.8	N-terminal	ne	<i>Polyporus adusta</i>		47
	calcaelin	16	N-terminal	ne	<i>Calvatia caelata</i>		48
	flammin	30	N-terminal	ne	<i>Flammulina velutipes</i>		49
	flammulin	40	da	ne	<i>Flammulina velutipes</i>		50
	hypsin	20	N-terminal	ne	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	ribosomi, proces translacije	7
	lyophyllin	20	N-terminal	ne	<i>Lyophyllum shimeiji</i>		9
	pleuturegin	38	N-terminal	ne	<i>Pleurotus tuber-regium</i>		51
	velin	19	N-terminal	ne	<i>Flammulina velutipes</i>		49
	velutin	13.8	N-terminal	ne	<i>Flammulina velutipes</i>		20

^a N-terminal ali znana celotna proteinska sekvenca (dodatne informacije na voljo na: <http://www.uniprot.org/uniprot/>).

^b znana 3D struktura za nekatere navedene proteine (dodatne informacije na voljo na: <http://www.uniprot.org/uniprot/>).

Poleg proteaz med pomembne inhibitorne proteine spadajo tudi inhibitorji proteaz. Njihove tarče predstavljajo proteolitični virulenčni faktorji rastlinskih patogenih bakterij, gliv, parazitov in virusov ter tako preprečijo delovanje mikrobnih proteaz pri pridobivanju hranil in izogibanju rastlinskemu obrambnemu sistemu. Poleg tega rastlinski proteazni inhibitorji delujejo tudi na prebavne encime drugih škodljivcev (npr. žuželk, pršic, polžev) in tako negativno vplivajo na njihovo rast in razvoj (Sabotič in Kos, 2012). V številnih raziskavah so uporabili rastlinske gene, ki nosijo zapis za proteazne inhibitorje za transformacijo v nove rastline. Dobili so transgene rastline, ki so izražale proteazni inhibitor z instektidnim učinkom (Ussuf in sod., 2001). Podobno so transgene rastline, ki so izražale različne proteazne inhibitorje pokazale negativne učinke na rast pršic, polžev, ogorčic, ter fitopatogenih gliv, bakterij in virusov (Sabotič in Kos, 2012). Primera biološko aktivnih proteinov iz gob sta na primer klitocipin, cisteinski proteinazni inhibitor, ki ga sintetizira gliva *Clitocybe nebularis* (Brzin in sod., 2000; Sabotič in sod., 2007) in makrocipini, nova družina cisteinskih proteinaznih inhibitorjev iz gobe *Macrolepiota procera* (Sabotič in sod., 2009).

Drugi komercialno zanimivi proteini so še RNaze, ki so zanimive predvsem v medicini, saj imajo močne protitumorske učinke, ki bi jih lahko izkoriščali za zdravljenje raka. Poleg tega so potrdili tudi protivirusne aktivnosti, s katerimi bi lahko pomagali obolenim za AIDSom (Fang in Ng, 2011). Prav tako so protivirusne in protitumorske lastnosti dokazali za proteine, ki inaktivirajo ribosome (RIPs, ang. Ribosome-inactivating proteins) (Stirpe, 2004).

Številne proteine z nizko molekulsko maso iz višjih gliv so preučevali z vidika njihovih protibakterijskih, protiglivnih, protivirsunih in drugih lastnosti (Wong in sod., 2010). Medenje sodijo tudi proteini, ki delujejo kot toksini in v membranah povzročajo pore (Berne in sod., 2009). Prav tako so zanimivi proteini, ki vežejo biotin, predvsem tamavidini iz *Pleurotus cornucopiae*, ki bolje vežejo biotin v primerjavi s proteini iz drugih virov (Takakura in sod., 2009; Takakura in sod., 2011). Zelo pomembni so tudi hidrofobini, proteini ki jih najdemo samo v kraljestvu gliv. So majhne amfipatične molekule, ki se razporedijo v enojni molekulski sloj ter s tem spreminjajo hidrofobnost različnih površin. Zaradi te lastnosti so uporabni v številnih biotehnoloških in medicinskih aplikacijah (Hektor in Scholtmeijer, 2005).

V nadaljevanju so povzete aktualne ali možne aplikacije proteinov iz višjih gliv, s poudarkom na uporabi v kmetijstvu in biotehnologiji.

2.2.3 Uporaba proteinov iz višjih gliv

2.2.3.1 Uporaba proteinov iz višjih gliv v kmetijstvu

Višje glice ali njihove encime lahko uporabljamo za izboljšanje prebavljivosti krme za živali. Višje glice lahko rastejo na različnih lignoceluloznih substratih, ki jih uporabljamo za gojenje gob, hkrati pa micelij preraste substrat, ki je na ta način obogaten s proteini in razkrojijo lignin, zato je substrat lažje prebavljen za prežvekovalec (Okano in sod., 2006; Philippoussis, 2009). Prebavljenost krme se lahko izboljša tudi z dodajanjem encimov, na primer ksilanaz, β -glukanaz ali fitaz, ki so vse glivnega izvora in so že na voljo na trgu (Ostergaard in Olsen, 2010).

Parazitski nematodi povzročajo veliko gospodarsko škodo v poljedeljstvu in živinoreji. Številni lektini so pokazali toksične učinke proti nematodam, ki temeljijo na prepoznavanju specifičnih glikanov (Zhao in sod., 2009; Bleuler-Martinez in sod., 2011). Uporabljajo se za prepoznavanje specifičnih antigenov, na podlagi katerih bi razvili ustrezna cepiva, ki bi preprečila okužbo s paraziti, med katere sodi tudi *Haemonchus contortus*, ki okužuje manjše prežvekovalec. Enak princip razvoja cepiv bi bil uporaben tudi proti drugim parazitom, ko so trakulje in ploski črvi (Bleuler-Martinez in sod., 2011).

Proteini iz gob bi bili lahko uporabni tudi za varstvo rastlin pred patogenimi bakterijami. Tako so Zheng in sodelavci (2010) ugotovili, da ima protein iz gobe *Clitocybe sinopica* protibakterijske učinke na bakterije iz rodu *Xanthomonas sp.* in *Agrobacterium sp.*. Zaradi širokega spektra delovanja, bi bil lahko uporaben za varstvo rastlin, na primer z uporabo gensko spremenjenih rastlin. S tem bi tudi zmanjšali uporabo sintetičnih pesticidov (Zheng in sod., 2010).

Tamavidin je protein, ki veže biotin in izražen v transgenem rižju, je uspešno ščitil rastline pred okužbo z glivo *Magnaporthe oryzae*, ki je biotinski avksotrof (Takakura in sod., 2009). Prav tako so bile opravljene številne študije na transgenih rastlinah, ki so izražale proteinazne inhibitorje ali lektine iz različnih organizmov. Transgene rastline so bile zelo odporne proti žuželkam, bakterijam in glivam (Gatehouse, 2008). Prvi protein iz višjih gliv, ki je kazal insekticido aktivnost primerljivo z rastlinskimi lektini, je bil XCL lektin iz *Xerocomellus chrysenteron* (Trigueros in sod., 2003). Pred kratkim pa so raziskovalci pokazali, da ima goba

Clitocybe nebularis lektine z insekticidnimi učinki, ki bi jih prav tako lahko uporabljali za varstvo rastlin (Šmid in sod., 2011; Pohleven in sod., 2011). Poleg tega imajo tudi cisteinski proteinazni inhibitorji iz gobe *Macrolepiota procera* (Sabotič in sod., 2009) zaviralen učinek na pomembnega škodljivca, koloradskega hrošča (Šmid in sod., 2013, 2015).

Do sedaj še niso izolirali proteinov iz gob oziroma višjih gliv, ki bi inhibirali *R. solanacearum* ali zavirali bakterijsko venenje, ki ga povzroča na rastlinah. Naša raziskava je prva, ki proučuje proteinske ekstrakte in frakcije iz gob kot potencialno sredstvo za zaščito rastlin pred okužbo z *R. solanacearum*.

2.2.3.2 Uporaba proteinov iz višjih gliv v biotehnologiji

Sposobnost nekaterih prostotrosnic, da lahko rastejo na lignocelulozni biomasi je posledica njihovega širokega spektra encimov, ki omogočajo učinkovito razgradnjo in mineralizacijo vseh komponent rastlinske biomase – lignina, celuloze in hemiceluloze (Baldrian in Valaskova, 2008; Dashtban in sod., 2009; Arora in Sharma, 2010; Hatakka in Hammel, 2010). V zadnjih desetih letih so bile opravljene številne raziskave, ki proučujejo gojenje gob ali micelija na biološko razgradljivih odpadkih iz kmetijstva, gozdarstva in industrije z namenom predelave odpadnega materiala in pridobivanja gob za prehrano in krmo ter za pridobivanje encimov, proteinov in drugih pomembnih snovi (Rani in sod., 2008; Philippoussis, 2009; Upadhyay in Singh, 2010). Višje glive so lahko pomemben vir pridobivanja energije iz obnovljivih virov. Tako so nekateri encimi že del postopkov pridobivanja biodizelskega goriva in bioetanola (FAO, 2008; Dashtban in sod., 2009; Philippoussis, 2009; Hatakka in Hammel, 2010). Biološka delignifikacija ima veliko prednosti, saj je za razgradnjo potrebno malo energije, proizvede se malo odpadka in ni obremenjujoče za okolje. To lahko dosežemo s fermentacijo na trdnih nosilcih, na primer z vrstami *Pleurotus* sp. in *Lentinus* sp. ter *Phanerochaete chrysosporium* ali pa z encimi, na primer z lakazami iz *Trametes versicolor* (Rani in sod., 2008; Dashtban in sod., 2009; Arora in Sharma, 2010).

Pomembno je tudi pridobivanje industrijsko pomembnih encimov. Na primer lakaze gliv bele trohnobe so uporabne v papirni industriji, saj lahko zagotovijo okoljsko sprejemljive postopke delignifikacije in beljenja (Arora in Sharma, 2010; Hatakka in Hammel, 2010). Vendar pa je proizvodnja lakaz z glivami bele trohnobe draga, naravnii encimi pa pogosto niso dovolj

robustni, da bi ohranili aktivnost na nivoju industrijskega procesa, kjer so izpostavljeni ekstremnim biološkim, kemičnim in fizikalnim dejavnikom. Zato so številne raziskave usmerjene k razvoju stabilnejših encimov kot tudi iskanju heterolognih ekspresijskih sistemov (Hilden in sod., 2009; Rodgers in sod., 2010). Ksilanaze, lipaze in amilaze so sicer že na voljo za potrebe papirne industrije, vendar pa bi raznolikost proteinov iz višjih gliv lahko te procese še dodatno izboljšala in jih naredila bolj učinkovite (Gutierrez in sod., 2010; Ostergaard in Olsen, 2010).

Številne hidrolaze se že uporablajo v organski sintezi, vendar zaenkrat še nobena iz višjih gliv (Ostergaard in Olsen, 2010). Po drugi strani se oksidoreduktaze višjih gliv, na primer lakaze, peroksidaze in tirozinaze, že uporablajo v biosintezi, (Kunamneni in sod., 2008; Jeon in sod., 2011). Poleg tega tirozinaze pretvarjajo monofenole v difenole, kar se uporablja pri proizvodnji antioksidantov, ki se dodajajo hrani in zdravilom. Tirozinaze iz gliv rodu *Aspergillus* sp. pa se uporablajo v proizvodnji L-DOPA iz L-tirozina, ki se uporablja za zdravljenje Parkinsonove bolezni. Tirozinaze iz višjih gliv bi bile lahko tudi uporabne za encimsko povezovanje različnih molekul, na primer pri proizvodnji proteinskih-polisaharidnih hidrogelov, ki bi se uporabljali pri izdelovanju tkiv, nadomestkih kože in matrik za sisteme dostave zdravil (ang. »drug delivery systems«) (Halaouli in sod., 2006; de Faria in sod., 2007). V več študijah so tirozinazo iz *A. bisporus* uporabili kot del biosenzorja za zaznavanje dopamina v diagnostiki (Min in Yoo, 2009) in fenolnih onesnaževalcev okolja (Yin in sod., 2010). Za bioremediacijo vode so razvili biosenzor s tirozinazo, ki simultano odstranjuje razgrajene komponente tako, da se z njimi veže (Ispas in sod., 2010). Poznamo tudi biosenzorje z lakazo, ki na primer zaznavajo kisik in glukozo (Arora in Sharma, 2010), biosenzorje z lektini, ki se uporablajo za monitoringe v okoljski in prehrambeni industriji (Rahaie in Kazemi, 2010). Biosenzorje pa lahko še dodatno izboljšamo z uporabo sloja hidrofobinov, ki prepreči denaturacijo vezanih proteinov in stabilizira delce v suspenziji. To je še posebej uporabno v nanotehnologiji, kjer so pokazali, da hidrofobin iz *Grifola frondosa* izboljša topnost ogljikovih nanocevk in vezavo protiteles (Wang in sod., 2010). Hidrofobini se lahko uporablajo tudi za zaščito večjih površin pred umazanjem (okna, avtomobili, ladje,...), stabilizacijo emulzij v farmaciji in kozmetični industriji in proizvodnji hrane z manj maščobami v prehrambeni industriji, za kar pa so potrebne velike količine hidrofobinov in posledično visoki stroški (Hektor in Scholtmeijer, 2005; Cox in Hooley, 2009).

Encimi višjih gliv bi se lahko uporabljali tudi v kozmetični industriji, na primer lakaze in peroksidaze za barvanje las (Michan in sod., 2010). V proizvodnji detergentov se že uporablajo mikrobne hidrolaze, vendar pa bi ti encimi iz višjih gliv (proteaze, lipaze, amilaze, aminaze) lahko še dodatno izboljšali te procese, zaradi njihovih posebnih karakteristik, kot so: robustnost, temperaturna in pH obstojnost in učinkovita vezava substrata (Ostergaard in Olsen, 2010). V tekstilni industriji se zaenkrat tudi že uporablajo mikrobne α -amilaze in celulaze, medtem ko se peroksidaze in lakaze iz višjih gliv že uporablajo v procesih beljenja in razbarvanja. Zaradi široke substratne specifičnosti, je lakaza iz *Pleurotus sajor-caju* bolj primerna za razbarvanje tekstilnih barv kot drugi encimi (Casieri in sod., 2010; Ostergaard in Olsen, 2010). Prav tako so proteaze in lipaze uporabne v industriji usnja, kjer pa so številni postopki še vedno odvisni od kemične obdelave, s čimer se onesnažuje okolje. Zato so številne raziskave usmerjene v iskanje novih industrijskih encimov, katerih proizvodnja ne bi bila draga in bi nadomestili kemične postopke ter s tem zmanjšali okoljsko breme (Thanikaivelan in sod., 2004).

V prehrambeni industriji se že uporablajo številni encimi, na primer glikozidaze za proizvodnjo sladil pri proizvodnji pijač in v pekovski industriji. V mlečni industriji se preverja uporabo proteaz iz višjih gliv za sirjenje mleka in izdelavo sira, lipaze pa bi bile prav tako lahko uporabne v pekovski in mlečni industriji (Arora in Sharma, 2010; Ostergaard in Olsen, 2010).

2.2.3.3 Uporaba proteinov iz višjih gliv v medicini

Višje glice so že stoletja znane po njihovih zravnih učinkih. Predvsem njihovi ekstrakti so znani po protivirusnih, protibakterijskih, protiglivnih, protiparazitskih protivnetnih, protitumorskih učinkih, lastnostih zniževanja holesterola, vpliva na imunskega sistema, zniževanja sladkorja v krvi in drugih učinkih (Preglednica 1) (Lindequist in sod., 2005; Wasser, 2011). Ötzi, kot so poimenovali mumijo staro dobrih 5000 let, ki so jo odkrili v tiropskih Alpah, je imela poleg rastlin še dve gobi: brezovo odpadljivko, *Piptoporus betulinus* in kresilno gobo *Fomes fomentarius*. Obe imata zdravilne učinke (Patel in Goyal, 2012), Ötzi pa je *F. fomentarius* verjetno uporabljal kot kresilo (<http://en.wikipedia.org/wiki/%C3%96tzi>). Večino teh biološko aktivnih učinkov lahko pripisemo tudi proteinom višjih gliv, še zlasti lektinom in proteinom, ki vplivajo na imunski sistem človeka (FIP) (Zhao in sod., 2009; Singh in sod., 2010; Wong in sod., 2010; Xu in sod., 2011).

Trametes versicolor (pisana ploskocevka) je pri nas pogosta lesna goba. Na Japonskem se uporablja kot eno najbolj pogostih imunostimulacijskih sredstev proti raku. Za proučevanje beljakovinsko vezanega polisaharida (PSK®, Krestin®) namenijo približno četrtina japonskih nacionalnih izdatkov za raziskave sredstev proti raku. Kaže, da PSK deluje tako neposredno na rakaste celice, kot tudi posredno, s krepitvijo celične imunosti. Poleg tega blaži tudi stranske učinke kemo- in radioterapije. Njegova protitumorska dejavnost se poveča v kombinaciji z obsevanjem, kemoterapijo ali imunoterapijo (Standish in sod., 2008).

Lektine se prav tako lahko uporablja v medicinski diagnostiki, na primer pri analizi spremenjenega vzorca glikozilacije pri malignih tumorjih, metastaziranju, nevrodegenerativnih boleznih ter okužbah z bakterijami in paraziti. Lektine lahko vežemo tudi kot ligande pri afinitetni kromatografiji z namenom čiščenja glikokonjugatov različnih izvorov, na primer plazemske glikoproteine, terapevtske glikoproteine itn. Zaradi prepoznavanja različnih glikanskih oznak med zdravimi in rakavimi celicami pa so lahko tudi del dostavnih sistemov za različna zdravila (Rahaie in Kazemi, 2010).

Zaradi dokazov, da so proteaze vpletene v številne bolezenske procese, bi se tudi proteazni inhibitorji izolirani iz višjih gliv uporabljali v različnih medicinskih aplikacijah, na primer nadzor tarčnih proteaz brez učinka na netarčne proteaze. Eden od primerov so mikocipini, ki jih najdemo samo v glivah, lahko blokirajo aktivno mesto proteaz na tak način, kot noben inhibitor izoliran iz mikrobov, rastlin ali živali (Renko in sod., 2010). Ribonukleaze, ki različno specifično kazalizirajo hidrolizo RNA, imajo protitumorske in protivirusne lastnosti in so pomembna skupina potencialnih terapeutikov (Fang in Ng, 2011).

Hidrofobini se, zaradi lastnosti razporeditve v monosloj, lahko uporabljajo pri prekrivanju operacijskih inštrumentov, medicinskih vsadkov in katetrov, saj bi se s tem izboljšala njihova biokompatibilnost. Tako so na primer za hidrofobin Sc3 izoliran iz *Schizophyllum commune* pokazali, da se površina obdana s hitrofobinom izboljša rast fibroblastov. Poleg tega hidrofobini zmanjšajo možnost nespecifične vezave proteinov, zato bi jih lahko skupaj s protibakterijskimi snovmi uporabljali za preprečevanje vezave bakterij na medicinske vsadke in transplantante (Hektor in Scholtmeijer, 2005; Linder in sod., 2005).

Tirozinaze se prav tako povezuje s številnimi boleznimi kot so vitiligo, albinizem, glavkom in maligni melanom. Za slednjega se išče zdravilo na osnovi tirozinaznega inhibitorja, zato

tirozinaze iz višjih gliv, na primer iz *Agaricus bisporus*, zaradi visoke homologije z encimi iz sesalcev, služijo kot substrati pri iskanju novih tirozinaznih inhibitorjev (de Faria in sod., 2007; Jawaid in sod., 2009; Matos in sod., 2011).

Kljub izjemno pozitivnim učinkom proteinov iz višjih gliv, pa njihovo delovanje ni nujno usmerjeno samo proti tarčnim molekulam ali celicam, ki jih želimo uničiti. Ugotovljena protimikrobnna aktivnost proteina iz višje gline še ne pomeni, da bo uporabna tudi pri zdravljenju okužb pri človeku ali živalih. Mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin iz višjih gliv so lahko namreč zelo splošni, kar pomeni, da ne bodo uničili samo nevarnih bakterij, ampak tudi tiste koristne (v črevesju, na površini kože, itn.). Enako velja tudi za učinkovine iz strupenih vrst, ki imajo na primer negativne učinke na rakaste celice, vendar pa ubijejo tudi zdrave celice. Zato že obstajajo nekatere rešitve, kot je na primer uporaba t.i. dostavnih sistemov. Pri tem uporabimo prenašalno molekulo (na primer protitelo), ki specifično prepozna samo določen tip celic. To pomeni, da loči med rakavo in zdravo celico ali da prepozna samo škodljive bakterije in viruse ter se nanje veže. Na prenašalno molekulo nato vežemo učinkovino, ki to celico uniči. V eni izmed raziskav so Moldenhauer in sodelavci pokazali, da lahko na specifično protitelo, ki prepozna samo rakave celice, vežejo 4 do 8 molekul α -amanitina, smrtonosnega strupa izoliranega iz zelene mušnice (*Amanita phalloides*). Pripravek so vbrizgali miškam, ki so imele rak trebušne slinavke ali prostate ali črevesja, itn. in pri vseh so se tumorji zmanjšali ali izginili. Negativnega vpliva na druge celice in telesne organe ni bilo (Moldenhauer in sod., 2012). Ta in številne podobne raziskave potrjujejo dejstvo, da tako z vidika zdravja človeka, kot uporabe molekul iz višjih gliv v drugih panogah, niso uporabne samo užitne vrste, ampak tudi strupene.

2.2.4 Metode testiranja protibakterijskih proteinov iz gob

2.2.4.1 Ekstrakcija proteinov

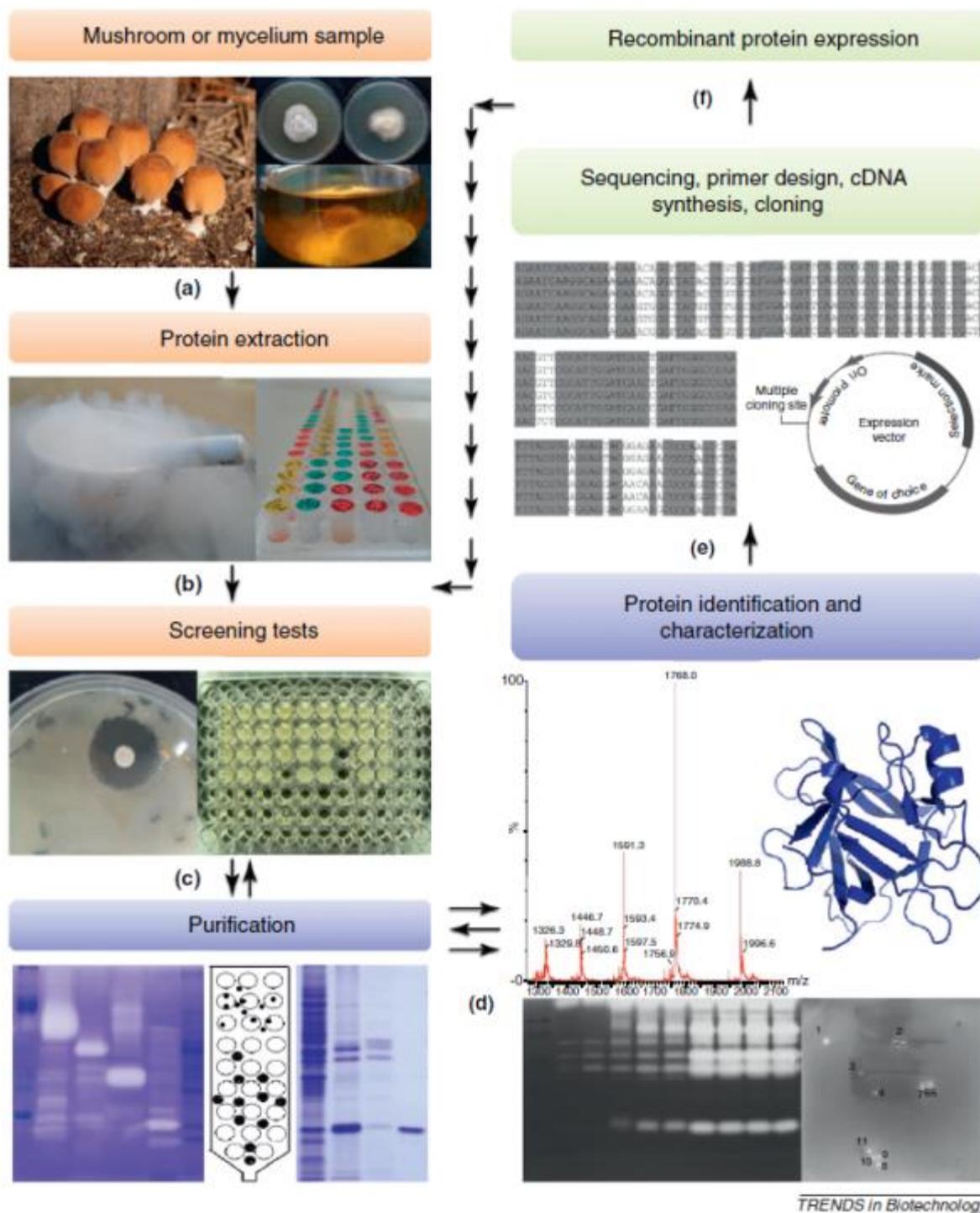
Poznamo različne načine ekstrakcije proteinov, ki jih izberemo glede na tip tkiva. To so osmotska liza (inkubacija celic v hipotonični raztopini); razgradnja celične stene z lizocimom; mehansko razbijanje celic (mletje s peskom ali aluminijem, homogenizacija, preša) in sonifikacija. Lizat nato filtriramo in centrifugiramo z namenom, da odstranimo večje delce, tarčni protein pa ostane v supernatantu (Voet in Voet, 1995). V primeru rastlin, gob in bakterij

postopek ekstrakcije najpogosteje vključuje maceracijo tkiva v ustreznem pufru, nekajkratno centrifugiranje in odstranjevanje večjih delcev ter shranjevanje pri ustrejni temperaturi. Ekstrakte iz gob pripravimo iz trosnjakov ali micelija (Slika 3). Ob ekstrakciji se protein sprosti iz celice, pri tem pa ga moramo zaščititi pred proteolizo, inhibicijo in denaturacijo. Proteini so občutljivi na spremembe pH vrednosti, zato jih raztapljam v pufrih. Prav tako lahko pride do denaturacije pri višjih temperaturah, zato se čiščenje proteinov običajno izvaja pri 0 °C. Stabilnost pri visokih temperaturah je lahko tudi prednost, saj na ta način s segrevanjem uničimo vse neželene proteine, razen tarčnega. Večji delež proteina lahko izgubimo tudi, če se ta adsorbira na površine, zato je pomembno, da ohranjamo protein v čim bolj koncentrirani obliki, na primer z obarjanjem in/ali dializo, s katerima odstranimo substance z nizko molekulsko maso in pridobimo proteinski ekstrakt.

Ob ekstrakciji se poleg tarčnega proteina iz celice sprostijo tudi proteaze, ki cepijo peptidne vezi v proteinih. Nevrataliziramo jih z uravnnavanjem temperature ali pH vrednosti, lahko pa tudi dodajanjem proteinaznih inhibitorjev s širokim spektrom delovanja. Proteini so občutljivi tudi na oksidacijo cisteinskih ostankov, pri čemer nastajajo disulfidne vezi; kontaminacijo s težkimi kovinami, ki se lahko irreverzibilno vežejo na protein; koncentracijo soli in polarnost raztopine, ki ju moramo ustrezeno uravnavati v mejah stabilnosti proteina. Nekateri proteini so lahko nestabilni in denaturirajo, še posebno v pri nizkih koncentracijah in v čisti obliki. Nativno strukturo lahko ohranimo tako, da shranimo protein v 50 % glicerolu ali 1% serumskem albuminu ali amonijevem sulfatu (Voet in Voet, 1995).

Erjavec J. Vpliv proteinskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015



Slika 3: Postopek pridobitve novega biološko aktivnega proteina iz gob.

Iz trosnjaka ali micelija (a) pripravimo proteinski ekstrakt, ki je primeren za testiranje s presejalnim testom (b). Če aktivnost proteina potrdimo, ga čistimo (c), identificiramo in okarakteriziramo (d). rekombinantni protein pridobimo s sekvenciranjem tarčnega proteina in kloniranjem cDNA v primeren ekspresijski vektor (e). Slednjega uporabimo v kombinaciji s primernim produkcijskim organizmom v optimiziranem bioprocесu proizvodnje rekombinantnega proteina (f). Aktivnost rekombinantnega proteina se preverja z enakimi metodami, kot pri presejalnih testih (b).

Figure 3: The path to novel biologically active proteins from higher fungi.

From mushroom tissue or mycelium (a) a protein extract is obtained and prepared according to requirements of screening tests (b). If protein activity is confirmed, the protein is purified (c), identified and characterized (d). In order to obtain a recombinant protein, the protein is sequenced, its nucleotide sequence obtained and the cDNA cloned into an appropriate expression vector (e). The latter is then used, in combination with a suitable production organism in an optimized bioprocess, to produce the target recombinant protein (f). The activity of the recombinant protein is tested using the same methods as in screening tests (b).

2.2.4.2 Presejalni testi

Presejalni test izberemo glede na iskano biološko aktivnost. S spremeljanjem biološke aktivnosti v ekstraktu zagotavljamo, da se tekom postopkov čiščenja aktivna substanca ne izgubi. Encimski testi so odvisni od tarčne molekule in običajno vključujejo spektrometrično in fluorometrično analizo nastajanja produkta. Testiranje protimikrobnene aktivnosti vključuje še dodaten postopek sterilizacije ekstrakta s filtriranjem.

Osnovna metoda za testiranje ekstraktov je metoda minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) (EUCAST, 2003), ki je pogosto uporabljen v biotehnoloških, medicinskih in raziskavah na področju varstva rastlin.

V mikrotitrsko ploščico nanesemo suspenzijo bakterij, katere koncentracijo poznamo (običajno 10^5 cfu/mL) ter različne koncentracije ustreznega redčenega protimikrobnega sredstva. Poleg MIC se pogosto uporablja tudi test cone inhibicije, pri katerem na sterilne diske iz filter papirja nanesemo znano koncentracijo inhibitorne substance in merimo premer cone inhibicije v primerjavi s tisto, ki nastane po nanosu znane koncentracije antibiotika (EUCAST, 2003). Prav tako je zanimiv test vpliva na membrano s pomočjo liposomov, ki so ga naredili na protimikrobnih snoveh glive *Verticillium kibisci*. Uporabili so liposome v katerih je bilo fluorescentno barvilo. Če je substanca tvorila pore v membrani, se je fluorescentno barvilo sprostilo. Fluorescenco so nato merili spektrofotometrično ozziroma opazovali pod fluorescentnim mikroskopom (Nishikawa in sod., 2004). Druge pogosto uporabljeni metodi so: test živosti celic (MTT test), pretočna citometrija, test transformacije limfocitov (LTT) in drugi. Ker testiranje poteka v mikrotitrskih ploščicah, jih lahko uporabimo v visoko zmogljivih metodah in na ta način zmanjšamo čas in strošek testiranja.

Pri iskanju naravnih snovi za varstvo rastlin je zelo pomembno, da se aktivne substance testira na rastlinah že v zgodnji fazi raziskav. Znano je namreč, da *in vitro* inhibitorna aktivnost še ne pomeni, da bo substanca enako učinkovita tudi *in vivo* (Lemessa in Zeller, 2007). Zgodnje

vključevanje presejalnih testov patogenosti na gostiteljskih rastlinah je zato nujno, da izločimo neučinkovite substance ali substance, ki imajo negativen vpliv na rast rastlin.

2.2.4.3 Čiščenje proteinov

V raziskavah bioloških molekul se izbere najprimernejši način ločevanja glede na lastnosti in tip biološke molekule, ki jo želimo ločiti. Običajen postopek čiščenja proteinov poteka po posameznih korakih, pri čemer ni nujno, da želimo ohraniti visoko koncentracijo proteina, temveč se želimo odstraniti ostale snovi v vzorcu. Tekom postopkov je pomembno, da sledimo prisotnost in koncentracijo tarčnega proteina z dovolj občutljivo metodo, saj se protein v vzorcu običajno nahaja v nizkih koncentracijah. Če metoda ne bi bila dovolj občutljiva, proteina, ki bi bil prisoten v nizki koncentraciji, ne bi zaznali in bi ga na ta način tekom postopkov lahko tudi izgubili. Detekcija proteinov s serološkimi testi je ustaljen postopek. Eden izmed njih je test ELISA (ang. »enzyme linked immunosorbent assay«), pri katerem se protein specifično veže na primarno protitelo, nato pa še sekundarno protitelo, ki je označeno z barvnim označevalcem. Na podlagi intenzitete barvne reakcije, običajno z merjenjem absorbance, določimo količino tarčnega proteina v vzorcu (Voet in Voet, 1995).

Karakteristike tarčnega proteina izkorisčamo v različnih postopkih v procesu čiščenja. To so: topnost, naboj, velikost, adsorpcijske lastnosti in specifična vezava z drugimi biološkimi molekulami. Metode, ki ločujejo proteine po naboju, so: ionska izmenjevalna kromatografija, elektroforeza in izoelektrično fokusiranje. Glede na polarnost, proteine lahko ločimo s kromatografijo z reverzno fazo in hidrofobno kromatografijo. Na podlagi velikosti jih ločimo z dializo in ultrafiltracijo, gelsko elektroforezo, gelsko filtracijo ter ultracentrifugiranjem. Po specifični vezavi na drugo biološko molekulo pa jih ločimo z afinitetno kromatografijo (Voet in Voet, 1995). Zelo pogosto se torej uporablja različne kromatografije, pri katerih separacijski proces poteka tako, da komponente vzorca potujejo z mobilno fazo skozi stacionarno fazo. Glede na stacionarne in mobilne faze, jo razdelimo na plinsko in tekočinsko kromatografijo. Plinsko kromatografijo naprej razdelimo na porazdelitveno kromatografijo plin-tekoče in adsorpcijsko kromatografijo na trdnih nosilcih.

Po drugi strani razdelimo tekočinsko kromatografijo na adsorpcijsko, porazdelitveno, ionsko kromatografijo in izločitveno kromatografijo (gelska filtracija) (Aguilar, 2004). Posamezne

kromatografije imajo tako prednosti, kot tudi slabosti. Prednosti ionsko-izmenjevalne kromatografije so hitro ločevanje, ohranitev aktivnosti je visoka, uporablja se pufre, ki ne povzročajo denaturacij, uporabimo jo lahko tudi kot metodo za koncentriranje. Po drugi strani je ena od slabosti ta, da vzorec nanašamo pri pogojih nizke ionske moči in uravnanim pH, kar včasih posledično zahteva dodaten korak menjave pufra. Poleg tega je lahko posledica post kromatografskega koncentriranja visoka koncentracija soli v vzorcu, kar pomeni, da vzorec ni primeren za uporabo v bioloških testiranjih (Aguilar, 2003). Poleg gelske filtracije se lahko za ločevanje molekul na podlagi velikosti uporablja tudi SDS PAGE in ultracentrifugiranje. Gelska filtracija ima kar nekaj prednosti pred ostalima dvema metodama, na primer je cenovno ugodna in dostopna oprema, predvsem pa omogoča analizo tako majhnih, kot večjih količin vzorca v nativnih pogojih, pri čemer je vzorec primeren za nadaljnje procesiranje (drugi kromatografski koraki, biološki testi). Glavne slabosti gelske filtracije so relativno slaba ločljivost, analiziramo lahko samo en vzorec naenkrat in končni vzorec je bolj razredčen kot na začetku (Aguilar, 2003). Po drugi strani je prednost afinitetne kromatografije možnost razlikovanja proteinov na podlagi njihovih biokemijskih lastnosti in ne na podlagi majhnih razlik v fizikalno-kemijskih lastnostih kot pri ostalih kromatografijah (Voet in Voet, 1995).

2.2.4.4 Identifikacija in karakterizacija proteinov

Identifikacija proteinov je možna s prekrivanjem slik gelov dvodimenzionalne gelske elektroforeze (2-DE) z obstoječo 2-DE bazo podatkov. Ločevanje proteinov z 2-DE vključuje izoelektrično fokusiranje (IEF), ki ločuje proteine glede na njihovo izoelektrično točko ter poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), ki ločuje proteine glede na njihovo molekulsko maso v območju od 10 do 300 kDa (Kuiper in sod., 2003). V tem primeru moramo uporabljati izključno standardizirane metode in protokole, trenutno pa je na voljo le nizko število 2-DE baz podatkov o rastlinskih proteinih (Corpillo in sod., 2004). Glavna metoda za identifikacijo proteinov je masna spektrometrija (MS). Pri tej metodi se meritve izvajajo z ioniziranimi molekulami v plinski fazi. Obstaja več načinov identifikacije proteinov z MS. Zelo pogosto se uporablja t.i. peptidno mapiranje, saj v izhodišču zahteva homogen neznani protein, ki ga lahko izoliramo iz 2-DE gela. Metoda temelji na razgradnji proteina s specifično proteazo, najpogosteje s tripsinsko proteazo ali endoproteinazo Lys-C ter na masni analizi dobljene peptidne zmesi. Na ta način proteinu priredimo značilni masni spekter

ali »prstni odtis« (Huynh in sod., 2009). Protein nato z orodji bioinformatike identificiramo na podlagi mas peptidov in sicer s pomočjo eksperimentalno pridobljenih proteinskih podatkovnih baz ali pa teoretično iz zaporedja genoma (Cellini in sod., 2004) (Slika 3).

2.2.4.5 Rekombinantni proteini iz višjih gliv in ekspresijski sistemi

Rekombinantne proteine naredimo na osnovi sekvenc, ki jih najdemo v podatkovnih bazah oziroma s pomnoževanjem z degeneriranimi oligonukleotidnimi začetniki za proteine, ki niso sekvencirani. Običajno kloniramo cDNA, saj večina glivnih genov vsebuje introne. Sledi izbira primerenega ekspresijskega sistema na podlagi karakteristik proteina, želenega donosa in funkcionalnosti proteina.

Številni proteini iz višjih gliv so bili izraženi v bakterijah. Tako so dosegli visoke donose lektinov in proteinaznih inhibitorjev izraženih v *Escherichia coli*. Nekateri lektini so bili izraženi kot topni proteini (Bleuler-Martinez in sod., 2011), nekateri proteinazni inhibitorji pa so bili izraženi kot netopna inkluzijska telesca, ki so jih uspešno očistili in dosegli visoke donose med 20 in 200 mg/L (Sabotič in sod., 2007; Sabotič in sod., 2009). Visoke donose hidrofobina (merjeno v kilogramih) iz *Aspergillus* sp. so dosegli z ekspresijo v *E. coli*, kar je vspodbudno za proizvodnjo teh glivnih proteinov tudi v prihodnje (Wohlleben in sod., 2010). Uspešna je bilo tudi izvencelično izražanje LZ-8 proteina, ki vpliva na imunski sistem, in sicer v *Bacillus subtilis* in *Lactococcus lactis*, vendar pa so bili izkoristki nizki (1-18 mg/L) (Yeh in sod., 2008).

Za ekspresijo proteinov iz višjih gliv so pomembne tudi kvasovke, na primer *Saccharomyces cerevisiae* so uporabili za znotrajcelično izražanje CGL2 lektina (Walser in sod., 2004) in proteina LZ-8 (Yeh in sod., 2008). Metilotrofno kvasovko *Pichia pasotris* so uporabili za izvencelično ekspresijo več proteinov iz višjih gliv, na primer lakaze (Rodgers in sod., 2010), fitaze (Promdonkoy in sod., 2009) in več lektinov (Singh in sod., 2010), z donosi med 1 do 190 mg/L za lektine in nekaj gram za fitaze.

Pomemben ekspresijski sistem proteinov iz višjih gliv so tudi filamentozne glive. Najpogosteje so uporabljene *Aspergillus niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae* in *Trichoderma reesei*, saj lahko izločajo velike količine proteinov in so splošno znane kot varne (GRAS, ang. generally recognized as safe). Vendar pa so donosi izraženih heterolognih proteinov trenutno še prenizki za komercialno uporabo (Sharma in Sharma, 2003; Nevalainen in sod., 2005; Fleissner in

Erjavec J. Vpliv proteinskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

Dersch, 2010). Kljub temu, pa so se filamentozne glice izkazale za dobre ekspresijske sisteme lignocelulolitičnih encimov, lakaz in peroksidaz (Fleissner in Dersch, 2010; Rodgers in sod., 2010).

Eden od možnih ekspresijskih sistemov za proteine, ki bi jih uporabili za zdravljenje, so tudi trošnjaka užitnih vrst višjih gliv. Do sedaj so v *Coprinopsis cinerea* izrazili fluorescentne markerske proteine (Collins in sod., 2010) in protein FIP-gsi (Han in sod., 2010).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 GOJENJE BAKTERIJ IN PRIPRAVA GLIVNIH EKSTRAKTOV

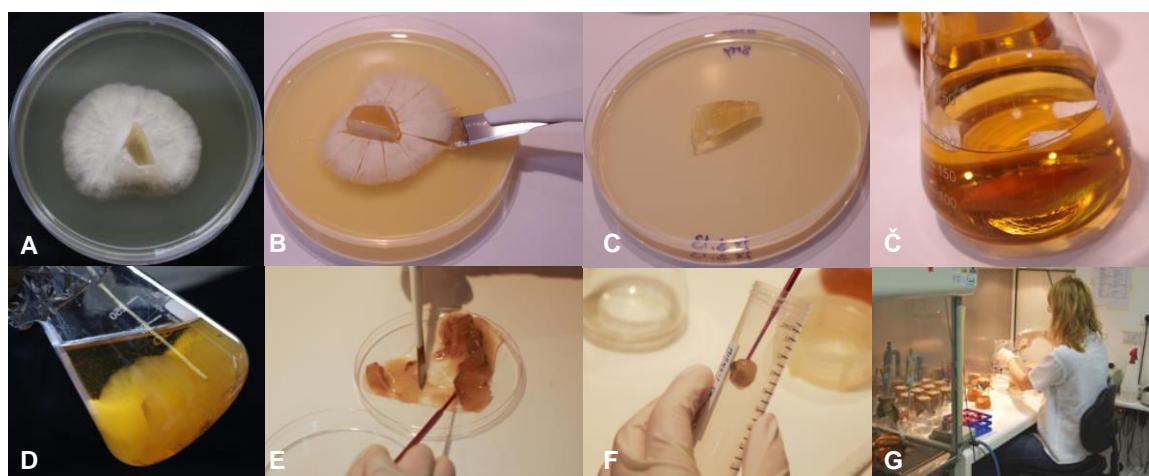
3.1.1 Bakterijska kultura in priprava inokuluma

V pokusih smo uporabili bakterijo *Ralstonia solanacearum* (Smith, 1896) Yabuuchi in sod. 1996 (rasa 3, biovar 2), sev NCPBB 4156 (NIB Z30), kakor tudi druge seve *R. solanacearum* ter *Escherichia coli* in *Ralstonia mannitolilytica* (Preglednica 3, str. 50). Bakterije smo gojili pri 28 °C na trdnem gojišču YPGA, ki v 1 L vsebuje: 5 g kvasnega ekstrakta, 5 g proteaznega peptona, 10 g glukoze in 12 g agarja, pH 7,2-7,4. *R. solanacearum* smo gojili tudi na Kelmanovem tetrazolijevem gojišču (Kelman, 1954) z namenom opazovanja tipične morfologije kolonij. Bakterijska suspenzija, ki smo jo uporabili v *in vitro* testih na mikrotitski ploščici je bila pripravljena v 0,01 M fosfatnem pufru s soljo (PBS), ki v 1 L vsebuje: 1,071 g Na₂HPO₄, 0,4 g NaH₂PO₄ × 7H₂O, 8 g NaCl, pH 7,2. Koncentracija bakterij v *in vitro* in *in vivo* testih je bila ocenjena z merjenjem absorbance pri 595 nm z uporabo McFarland standarda. Koncentracija živih bakterij (CFU/mL) je bila določena s štetjem kolonij (CFU) po 48 urah na gojišču YPGA.

3.1.2 Glivna kultura

Micelij glive *Clitocybe geotropa* smo izolirali iz svežih trosnjakov nabranih v naravi. Micelij smo gojili v tekočem gojišču SMY, ki v 1 L vsebuje: 10 g saharoze, 10 g sladnega ekstrakta in 4 g kvasnega ekstrakta, brez uravnavanja pH. Koščke micelija, ki so zrasli na trdnem gojišču SMY (poleg ostalih sestavin v 1 L vsebuje še 10 g agarja), smo prenesli v 200 ml tekočega gojišča SMY v stekleni erlenmajerici. Inkubirali smo jih 6 tednov pri sobni temperaturi, v temi in brez stresanja. Micelij smo zbrali in shranili pri -20 °C do uporabe.

Rast na gojišču SMY smo primerjali z rastjo na gojišču PDA, ki v 1 L vsebuje: 24 g krompirjeve dekstroze in 10 g agarja, pH uravnjan na 6,3. Gojišča smo nacepili v štirih paralelkah in spremljali rast in morfologijo kolonij 2 do 5 tednov po inokulaciji (Slika 4). Poleg tega smo spremljali rast tudi na redčenem gojišču SMY, saj je lahko rast micelija nekaterih gliv hitrejša na redčenem oziroma revnem gojišču (Shrestha in sod., 2006).



Slika 4: Postopek gojenja micelija *Clitocybe geotropa* v laboratoriju na trdnem (A) in v tekočem gojišču (D). Micelij na trdnem gojišču razrežemo s skalpelom (B) in posamezne koščke nacepimo na sveže trdno gojišče (C) in v tekoče gojišče (Č). Po nekaj tednih v tekočem gojišču zraste puhat micelij (D), ki ga nežno ločimo od koščkov gojišča (E) in shranimo pri -20 °C v sterilnih plastičnih posodicah. Celoten postopek poteka v sterilni komori (G). (Avtorici fotografij: Jana Erjavec (A-D) in Tina Naglič (E-G)).

Figure 4: Culturing of *Clitocybe geotropa* mycelium on a solid (A) and in a liquid (D) medium. Scalpel is used to cut the mycelium on solid medium (B), then individual pieces are transferred onto fresh plate (C) or into liquid medium (Č). Mycelium grows after several weeks in liquid medium (D) then it is separated from pieces of solid medium (E) and stored at -20 °C in sterile tubes. The entire procedure is done in a sterile hood (G). (Photography: Jana Erjavec (A-D) and Tina Naglič (E-G)).

3.1.3 Priprava ekstraktov

Vse gobe (trosnjake različnih vrst zaprtotrosnic in prostotrosnic) smo nabrali v naravi, označili in zamrznili pri -20 °C ali -80 °C. Od 150 vrst višjih gliv, je bilo 141 identificiranih do vrste in 9 do rodu (Preglednica 2, str. 41-43). Gobe sta nabrala in identificirala dr. Jože Brzin z Inštituta Jožef Stefan (IJS) in dr. Tine Grebenc iz Gozdarskega inštituta Slovenije. Ekstrakte iz gob smo pripravili s homogenizacijo trosnjakov v tekočem dušiku. S centrifugiranjem 5 min pri 16000 g smo odstranili netopne snovi. Ekstrakcijo proteinov iz grobega ekstrakta smo izvedli z obarjanjem z acetonom, in sicer z dodatkom 4 volumnov hladnega (-20 °C) acetona in 40 minutno inkubacijo na ledu. Po centrifugiraju pri 10 000 g in 4 °C smo pelet posušili na zraku pri 4 °C in ga shranili pri -20 °C. Ekstrakt *in vitro* gojenega micelija *Clitocybe geotropa* smo pripravili na enak način kot ekstrakte trosnjakov. Pred uporabo smo proteinske ekstrakte raztopili v 0,05 M Tris - HCl pufri, ki v 1 L vsebuje 0,1 M NaCl, pH 7,4, in mešanico centrifugirali 5 min pri 16000 g, da smo odstranili netopne snovi. Ekstrakte smo nato filtrirali preko sterilnega 0,20 µm filtra (Millex®-LG) in zamrznili pri -20 °C za kratkoročno

shranjevanje ali -80 °C za dolgotrajno shranjevanje. Ekstrakte so na IJS pripravili dr. Jerica Sabotič, dr. Jože Brzin in Mateja Želko Gosak.

3.2 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKTOV IZ GOB IN *VITRO*

3.2.1 *In vitro* presejalni test v mikrotitrskih ploščicah

Testirali smo ekstrakte iz 94 različnih vrst višjih gliv, skupaj 149 ekstraktov gob in 1 ekstrakt *in vitro* gojenega micelija. Ekstrakt in bakterijsko suspenzijo smo zmešali v razmerju 1:10 v vseh *in vitro* kot tudi *in vivo* eksperimentih. Prav tako smo v raziskavo vključili ekstrakt micelija *C. geotropa*, zaradi njegove dokazane proteolitične aktivnosti (Sabotic in sod. 2007).

Za opazovanje vpliva ekstraktov gob na *R. solanacearum* NIB Z30 v tekočem gojišču, smo prilagodili test minimalne inhibitorne koncentracije (MIC, EUCAST, 2003). Medtem ko v testu MIC testiramo znane koncentracije inhibitorne snovi proti znani koncentraciji tarčnega mikroorganizma, pa v našem primeru koncentracije inhibitornih proteinov v ekstraktih ne poznamo. Zato smo testirali neredčene ekstrakte proti znani koncentraciji *R. solanacearum*. Za kvalitativno oceno prisotnosti inhibitornih snovi v ekstraktih smo po potrebi redčili ekstrakt in ga testirali proti različnim koncentracijam *R. solanacearum*. V preliminarnih raziskavah smo prav tako preverjali ali *R. solanacearum* uspešno raste v tekočem gojišču, katero gojišče je najprimernejše in koliko časa spremljamo rast, da zanesljivo ocenimo prisotnost ali odsotnost inhibicije (Erjavec, 2007; Želko Gosak, 2010). Na podlagi teh rezultatov smo bakterije gojili v tekočem YPG gojišču, 24 h pri 28 °C v mikrotitrskih ploščicah s 96 luknjicami (dno U oblike, Golias, Labortechnika). Bakterijsko rast smo spremljali z merjenjem A₅₉₅. Presejalni test je omogočal dobro rast bakterij in je razlikoval med ekstrakti, ki so inhibirali rast *R. solanacearum* in tistimi, ki je niso.

V vsaki luknjici na ploščici, je bilo 200 µL mešanice, ki je vsebovala: gojišče YPG (75 µL), suspenzijo *R. solanacearum* (10^7 cells/mL, 75 µL), 0.01 M PBS (42.5 µL) in ekstrakt (7.5 µL). Na vsaki ploščici smo vključili naslednje kontrole: pozitivna kontrola (bakterija, brez ekstrakta), negativna kontrola (brez ekstrakta in *R. solanacearum*) in kontrola sterilnosti ekstrakta (ekstrakt, brez dodane *R. solanacearum*). Zato, da smo ohranili skupen volumen 200

μL v vsaki ploščici, so nekatere kontrolne luknjice vsebovale več 0,01 M PBS, s katerim smo nadomestili ekstrakt ali suspenzijo *R. solanacearum*.

Vsak vzorec smo testirali v vsaj dveh vzporednih luknjicah. Pri *in vitro* presejalnem testu smo uporabili 2 paralelki, medtem ko smo pri oceni specifičnosti inhibicije uporabili 3 paralelke. Plošče smo inkubirali v stresalniku (PST-60HL-4, Biosan, Latvia), 24 h, pri 400 rpm in 28 °C. Bakterijsko rast smo spremljali sprekrofotometrično (A_{595} ; Tecan Genios, Magellan, v. 6.2 software) in v 24ih urah opravili vsaj 4 meritve.

Inhibicijo *R. solanacearum* smo definirali z odstotki rasti pozitivne kontrole (A_{595} ; % PK) po 24 urah inkubacije. Rast <15% PK je pomenila popolno inhibicijo, medtem ko je rast v mejah variacije pozitivne kontrole ($\geq 85\%$ PK) pomenila, da ekstrakti niso inhibirali bakterij. Delno inhibicijo smo definirali rastjo bakterij med 15% PK in 60% PK (močna inhibicija) in med 61 % PK in 84 % (šibka inhibicija) PK.

3.2.2 Določanje baktericidnega in bakteristatičnega učinka ekstrakta

Po 24ih urah inkubacije ekstrakta in bakterije v mikrotitrskih ploščicah, smo iz vsake luknjice odvzeli 30 μL suspenzije in jo prenesli na sveže gojišče YPGA. Na ta način smo lahko ocenili ali je učinek ekstrakta baktericiden (bakterije ne rastejo po prenosu na sveže gojišče) ali pa bakteristatičen (bakterije rastejo po prenosu na sveže gojišče).

3.2.3 Testiranje specifičnosti inhibicije ekstraktov iz gob proti različnim sevom *R. solanacearum*

Izbrane ekstrakte, ki so kazali popolno, močno ali šibko inhibicijo *R. solanacearum* NIB Z30 smo testirali proti dodatnim 11 sevom *R. solanacearum*, ki predstavljajo različne filotipe in biovarje. Prav tako smo zaradi genetske podobnosti v testiranje vključili tudi bakterijo *Ralstonia mannitolilytica* (Coenye in sod. 2003) ter *Escherichia coli*, kot nesorodno Gram negativno bakterijo in potencialni proizvodni organizem proteinov iz gob. Zaradi omejene količine, ekstraktov *Suillus variegatus* in *Bovista nigrescens* nismo testirali proti različnim bakterijskim sevom.

3.2.4 Vpliv temperature na protibakterijsko aktivnost ekstraktov

Izbrane ekstrakte iz gob, ki so inhibirali *R. solanacearum* *in vitro*, smo segrevali 10 min pri temperaturah 40 °C, 60 °C, 80 °C in 95 °C, ohladili na ledu in ponovno testirali protibakterijsko aktivnost *in vitro*. Pri testiranju smo sledili protokolu opisanem v točki 3.2.1. S tem smo želeli preveriti ali so protibakterijske snovi v ekstraktih protein.

3.3 UGOTAVLJANJE VPLIVA EKSTRAKTOV IN FRAKCIJ IZ GOB ALI MICELIJA NA RAZVOJ BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN KONCENTRACIJO BAKTERIJ V RASTLINAH OKUŽENIH Z *R. SOLANACEARUM*

3.3.1 Test patogenosti na rastlinah paradižnika

Za *in vivo* testiranje protibakterijske aktivnosti ekstraktov iz gob, smo uporabili rastline paradižnika (*Lycopersicon esculentum* cv. ‘Moneymaker’). Teste patogenosti smo izvajali v karantenskem rastlinjaku. Pred inokulacijo smo rastline posadili v substrat, kjer so rasle pri 21 °C v svetlobi z $90 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fotonskega obsevanja (L36W/77 luč, Osram, Nemčija) in 16h fotoperiodi. Rastline smo inokulirali v fazi dveh do treh razvitih pravih listov in z mešanicami *R. solanacearum* in ekstrakti gob. Rastline smo inokulirali s koncentracijo bakterij 10^5 cfu/ml , ki smo jo v prejšnjih poskusih potrdili kot najnižjo koncentracijo, ki povzroča značilne simptome na vseh rastlinah (Priloga B). Ekstrakti gob, ki so zavirali rast *R. solanaceraum* *in vitro* so bili dodani *R. solanacearum* suspenziji v razmerju 1:10. Rastline negativne kontrole smo inokulirali z 0,01 M PBS, rastline pozitivne kontrole pa samo s suspenzijo *R. solanacearum* v 0,01 M PBS, brez ekstrakta. Z uporabo sterilne igle (Icogamma plus 0.6mm x 25mm, Novico, Italija) smo steblo vsake rastline inokulirali med kličnima listoma po naslednjem postopku: na konici sterilne igle smo izbrizgali kapljico in prebodli steblo. Ko je igla prebodla steblo, smo na drugi strani iz igle iztisnili še eno kapljico suspenzije in iglo izvlekli. Tak način inokulacije preprečuje vdor zraka v žilno tkivo rastlin. Z vsako suspenzijo bakterije in ekstrakta smo inokulirali vsaj 40 rastlin, 42 rastlin smo uporabili za pozitivno kontrolo in 20 rastlin za negativno kontrolo. Rastline, smo gojili pri 28 °C dnevni temperaturi in 20 °C nočni temperaturi, pri $90 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fotonskega obsevanja in 16h fotoperiodi. Rastline smo spremljali vsaj 14 dni. Stopnjo bolezenskih znamenj (simptomov) smo ocenjevali po številčni

lestvici Winsteada in Kelmana (1952), in sicer: 0 (ni bolezenskih znamenj), 1 (en list uvel), 2 (2-3 listi uveli), 3 (vsi listi razen vrha rastline uveli), 4 (vsi listi in vrh uvel), 5 (rastlina odmrla).

3.3.2 Test patogenosti na rastlinah krompirja

Mikropropagirane rastline krompirja *Solanum tuberosum* (cv. ‘Désirée’) smo gojili v tkivni kulturi 4 tedne, preden smo jih posadili v lončke z zemljo. Po 14 dneh v zemlji pri 22 °C dnevne temperature, 20 °C nočne temperature in pri osvetlitvi 90 pmol m⁻² s⁻¹ fotonskega obsevanja in 16-h fotoperiodi, smo rastline inokulirali s suspenzijo bakterije in ekstraktov 1 cm nad podlago (zemljo) in gojili pri 25 °C dnevni in nočni temperaturi ter osvetlitvi 90 pmol m⁻² s⁻¹ fotonskega obsevanja in 16-h fotoperiodi. Z vsako suspenzijo bakterij in ekstraktov smo inokulirali 42 rastlin, prav tako 42 rastlin pozitivne kontrole (samo *R. solanacearum*) in 20 rastlin negativne kontrole (samo 0.01 M PBS). Rastline smo spremljali vsaj 14 dni, stopnjo bolezenskih znamenj pa smo ocenjevali po številčnih ocenah Winsteada in Kelmana (1952), in sicer: 0 (ni bolezenskih znamenj), 1 (en list uvel), 2 (2-3 listi uveli), 3 (vsi listi razen vrha rastline uveli), 4 (vsi listi in vrh uvel), 5 (rastlina odmrla).



Slika 5: Rastline krompirja, ki kažejo različne stopnje bolezenskih znamenj ocenjene po lestvici od 0 do 5 (Winstead in Kelman, 1952).

Figure 5: Potato plants – different stages of disease progress, evaluated according to numerical grades of Winstead and Kellman (Winstead in Kelman, 1952).

3.3.3 Kvantifikacija bakterij *R. solanacearum* v rastlinah z uporabo PCR v realnem času

Koncentracijo *R. solanacearum* smo spremljali z metodo PCR v realnem času. Rastlinsko tkivo smo vzorčili pred in po pojavu bolezenskih znamenj. Tkivo stebla paradižnika smo vzorčili

tako, da smo odrezali 5 mm dolge odseke nad točko inokulacije pri prvem in drugem nodiju. Vzorčili smo rastline, ki so kazale različne stopnje bolezenskih znamenj, in sicer najmanj 3 rastline na bolezensko znamenje. Če so samo 3 rastline ali manj kazale določeno stopnjo bolezenskega znamenja, jih nismo vzorčili in vključili v qPCR analizo. Čeprav so bile rastline, ki prikazujejo različne stopnje bolezenskih znamenj, vzorčene enakomerno med skupinami, lahko rastline, ki niso bile vzorčene, zaradi nižjega skupnega števila rastlin, povzročijo manj kot 5 % odstopanja v odstotkih uvelikih rastlin.

Vzorce rastlinskega tkiva smo vzdolžno prepolovili in shranili v 1,5 ml Eppendorf mikrocentrifugirkah. V sterilnih pogojih smo dodali 500 µL 0,01 M PBS, zmešali in inkubirali 10 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo 400 µL suspenzije shranili v mikrocentrifugirkah pri -20 °C do uporabe. V teh vzorcih smo nato ugotavljali prisotnost DNA *R. solanacearum* z uporabo PCR v realnem času. Protokol, ki smo ga uporabili v našem poskusu, vključno z začetnimi oligonukleotidi in sondami, so razvili Weller in sodelavci (2000). Reakcijske mešanice v skupnem volumnu 10 mL so bile nanešene v ploščice s 384 luknjicami (MicroAmp, Applied Biosystems). Sestava PCR reakcijske mešanice je bila enaka za detekcijo DNA v realnem času tako *R. solanacearum* (pomnoževanje 16S rDNA gena) in pomnoževanje kontrolnega gena citokrom oksidaze (*cox*), in je vsebovala 5,0 µL TaqMan master mixa JP6251 (Applied Biosystems, 2002), 0,9 µL 10 pmol / µL parov začetnih oligonukleotidov (RS- IF, RS - II – R za pomnoževanje DNA *R. solanacearum* ali COX - F, COX – R za pomnoževanje *cox*) ter 0,2 µL 10 pmol / µL, s fluoropori označene probe (RS- P ali COX – P), 1 µL deionizirane vode in 2 µL vzorca. Poleg vzorcev iz testa patogenosti, smo na vsako ploščico nanesli standardne krivulje *R. solanacearum* in *cox* ter kontrole NTC (kontrola brez tarče). Za pomnoževanje in merjenje fluorescence smo uporabili aparaturo ABI Prism Sequence Detection System 7900 HT. Cikli so potekali po naslednjem protokolu: 2 min pri 50 °C, 10 min pri 95 °C, čemur je sledilo 45 dvostopenjskih ciklov 15 sekund pri 95 °C in 1 minuto pri 60 °C. Podatki so bili zbrani s programsko opremo SDS 2.2.3, ter izvoženi in analizirani s programom Microsoft Excel. Bakterijska koncentracija je bila določena z uporabo *R. solanacearum* standardne krivulje v koncentracijah 100 celic/ml do 10⁸ celic/ml.

3.3.4 Primerjava ocene koncentracije *R. solanacearum*, ki smo jo določili s štetjem na ploščah in štetjem pod mikroskopom s tistimi, ki smo jih določili s qPCR

S primerjavo različnih metod za oceno koncentracije bakterij v rastlini, smo žeeli preveriti ali je qPCR primerna metoda za oceno koncentracije *R. solanacearum* v rastlinah paradižnika in ali je *R. solanacearum* prisotna v VBNC obliku, kot sta opisala že Grey in Steck (Grey in Steck, 2001). V ta namen smo inokulirali 2 rastlini paradižnika cv. 'Moneymaker' z *R. solanacearum* v koncentraciji 10^5 celic/mL. Odseke tkiva v dolžini 0,5 cm smo vzorčili 10 dpi (1 rastline) in 22 dpi (1 rastlina), in sicer na naslednjih delih rastline: konica korenine, listni pecelj prvega pravega lista, steblo med obema nodijema in listni pecelj terminalnega lista. Vzorce tkiva paradižnika smo pripravili v pufru kot je opisano v točki 3.3.3. 30 µL suspenzij smo v treh paralelkah nanesli za štetje cfu na gojišče YPGA, preostanek suspenzije pa shranili pri -20 °C za štetje pod mikroskopom in analizo qPCR. Za štetje pod mikroskopom (Axioskop 2 Plus, Karl Zeiss) smo uporabili LIVE/DEAD® BacLight™ bacterial viability kit (Life Technologies), ki loči med živimi in mrtvimi celicami. Za vsak vzorec smo prešteli 10 vidnih polj na stekelcu in izračunali koncentracijo živih in mrtvih celic *R. solanacearum*. Analizo PCR v realnem času smo opravili kot opisuje protokol pod točko 3.3.3.

3.3.5 Analiza podatkov

Za primerjavo stopnje bolezenskih znamenj pri rastlinah okuženih z mešanico ekstrakta iz gob in *R. solanacearum* z rastlinami pozitivne kontrole, smo uporabili hi-kvadrat preizkus hipoteze neodvisnosti. Za ovrednotenje napredka bolezni na rastlinah, smo izračunali AUDPC vrednost (ang. Area Under Disease Progress Curve, območje pod krivuljo napredovanja bolezni) z uporabo statističnega programa R (Agricolae paket, Madden in sod., 2007). Postopek izračuna povprečno intenziteto bolezni med vsakim parom sosednjih časovnih točk in tako celotno intenzitetu bolezni po času. Druge podatke smo analizirali z uporabo bodisi Microsoft Excel ali statističnega programa R (R Development Core Team, 2008). Pri analizi in prikazu podatkov smo uporabili Daniel's XL Toolbox dodatek za MS Excel, verzija 6.5.3, Daniel Kraus, Würzburg, Nemčija.

3.4 BIOKEMIJSKE ANALIZE AKTIVNIH PROTEINOV IN IZBRANIH EKSTRAKTOV IZ GOB

3.4.1 Izolacija biološko aktivnih proteinov

Biološko aktivno proteinsko frakcijo smo izolirali iz *A. phalloides* in *C. geotropa* z uporabo gelske in ionsko-izmenjalne kromatografije. Ekstrakt smo pripravili kot je opisano v točki 3.1.3. Za čiščenje smo uporabili Sephadryl S-200 kolono, uravnovezeno z 0,02 M Tris-HCl, pH 7,5 z 0,3 M NaCl. Frakcije, ki so kazale protibakterijsko delovanje smo zbrali, skoncentrirali z ultrafiltracijo, pri čemer je bila mejna vrednost molekulske mase 10 kDa. Vzorce smo nato dializirali proti 0,03 M BisTris, pH 6,5 ter jih nanesli na DEAE-Sephadex ionsko izmenjalno kolono, uravnovezeno v 0,03 M BisTris, pH 6,5. Vezane proteine smo eluirali z gradientom 0-0,4 M NaCl v istem pufru.

3.4.2 Karakterizacija protibakterijskih proteinov

Analiza proteinskih frakcij *A. phalloides* in *C. geotropa*, ki so inhibirale bakterije, je bila narejena z NaDS-PAGE, BlueNative PAGE (Novex NativePAGE), Bis-Tris Gel sistem (Invitrogen) in izolelektričnim fokusiranjem (Phast sistem, predpripravljeni pH 3-9 gradient geli - GE Healthcare ter Novex pH 3-7 IEF Gel sistem (Invitrogen). Analiza N-terminalnega zaporedja je bila izvedena na posameznih lisah z Edmanovo razgradnjo in uporabo avtomatiziranega sekvenatorja aminokislinskega zaporedja s tekočim impulzom Procise (Applied Biosystems). Za identifikacijo posameznih lis smo proteine analizirali s SDS-PAGE, lise izrezali, jih razgradili s tripsinom in analizirali maso peptidov s pomočjo masne spektrometrije (ESI-MS/MS). Iskanje po podatkovnih bazah smo izvedli z Mascot interno uporabo strežnika MS/MS Ion Search. Potencialno N-glikozilacijo proteinskih frakcij smo analizirali s pomočjo rekombinantne N-glycolidase F (Roche), po priporočilih proizvajalca.

Biološko aktivne proteine sta izolirala in karakterizirala dr. Jerica Sabotič in dr. Jože Brzin z Odseka za Biotehnologijo, Inštituta Jožef Stefan. Analizo z masno spektrometrijo pa sta naredila dr. Jure Pohleven (ESI-MS/MS) z Odseka za Biotehnologijo in doc. dr. Marko Fonović (LC-MS) z Odseka za molekularno, strukturno in celično biokemijo, Inštituta Jožef Stefan.

3.4.3 Analiza L-aminokislinske oksidazne aktivnosti

L-aminokislinko oksidazno aktivnost smo analizirali, kot sta opisala Kishimoto in Takahashi (Kishimoto in Takahashi, 2001). Aktivnost smo testirali v mikrotitskih ploščicah z ravnim dnom pri 37 °C. 10 µl vzorca smo zmešali z 90 µl substrata ali pufra, pH 7,4 in dodali 5 mM L-amino kisline, 2 mM O-fenilendiamin in 0,81 U/mL hrenove peroksidaze. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 50 µl 2M H₂SO₄ in izmerili absorbanco pri 492 nm z uporabo 630 nm kot referenčno valovno dolžino. Inhibicijo z askorbinsko kislino smo testirali v končnih koncentracijah v območju od 0,1 mg/ml do 5 mg/mL. pH optimum encimske aktivnosti je bil določen z izvedbo testa v prisotnosti različnih pufrov: citratno fosfatnega pufra (pH 2,6 - pH 7,6), fosfatnega pufra (pH 6 - pH 9) in (bi) karbonatnega pufra (pH 9 - pH 11).

3.4.4 Primerjava protibakterijske in L-amino oksidazne aktivnosti *C. geotropa* in *A. phalloides*

Kot je opisano v (Kishimoto in Takahashi, 2001), smo 10 µL vzorca zmešali z 90 µL substrata ali pufra in inkubirali 60 min pri 37 °C. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 50 µl H₂SO₄. Nato smo v mikrotitrski ploščici z ravnim dnom izmerili absorbanco pri 492 nm in pri 630 nm. Vzorce smo testirali z dvema ponovitvama ter na vsako ploščico vključili kontrole, in sicer: blank (dodamo pufer namesto vzorca) in negativno kontrolo (pufer namesto substrata). Glej tudi točko 3.4.3.

3.4.5 Vpliv ekstraktov in očiščenih frakcij na gibeljivost *R. solanacearum*

Metodo smo povzeli po Yao in Allen (2006) in sicer smo za opazovanje gibeljivosti bakterij uporabili gojišče z mehkim agarjem in dodatkom triptona, ki vsebuje na L: 10 g triptona in 3 g agarja (Yao in Allen, 2006). V 0,01 M PBS smo pripravili suspenzijo *R. solanacearum* v koncentraciji 10⁹ celic/mL. Pred nanosom smo zmešali 10 µL vzorca (ekstrakta ali frakcije) in 20 µL bakterijske suspenzije. 3 µL mešanice smo nato nanesli na sredino plošč mehkega agarja s triptonom, in sicer 5 plošč za vsak vzorec. Gojišča smo inkubirali 24 h pri 28 °C.

4 REZULTATI

4.1 UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI EKSTRAKTOV IZ GOB IN VITRO

4.1.1 Presejalni test – testiranje v mikrotitrskih ploščicah

Gobe smo nabirali več sezont in jih identificirali do vrste (Preglednica 2). Testirali smo 150 ekstraktov iz gob (vključno z ekstraktom micelija) iz 94 različnih vrst višjih gliv, ki zastopajo 27 družin. Od teh je 15 ekstraktov (14 ekstraktov iz gob in 1 ekstrakt micelija *C. geotropa*) inhibiralo *R. solanacearum* *in vitro* (Preglednica 2, Priloga C). V primerjavi s pozitivno kontrolo, so ti ekstrakti kazali različne stopnje inhibicije *R. solanacearum* NIB Z30, in sicer: popolno inhibicijo (*Amanita phalloides*, *Amanita muscaria*, *Amanita virosa*, *Boletus luridiformis*, ekstrakt micelija in gobe *C. geotropa*, *Gomphidius glutinosus*, *Tricholoma saponaceum*, *Hypholoma* sp.), in delno inhibicijo (*Agaricus moelleri*, *Albatrellus ovinus*, *Bovista nigrescens*, *Suillus variegatus*, *Tricholoma ustale*). Slika 6 prikazuje stopnje inhibicije izbranih ekstraktov v primerjavi s kontrolami in neaktivnim ekstraktom. Da je odsotnost inhibicije ostalih ekstraktov res posledica odsotnosti inhibitornih snovi in ne nesterilnosti ekstrakta, zaradi katere bi lahko zrasli različni mikroorganizmi, ki bi povečali optično gostoto in s tem povzročili lažno negativne rezultate, smo potrdili s preverjanjem sterilnosti ekstrakta (Priloga D).

Pri 20 vrstah gob smo analizirali več kot 1 ekstrakt iz različnih trosnjakov. V primeru *T. saponaceum* je 8 ekstraktov popolnoma inhibiralo *R. solanacearum*, 1 pa je kazal delno inhibicijo. Skupaj 9 ekstraktov *C. geotropa* je popolnoma inhibiralo bakterijo, 3 pa delno, medtem ko je 7 ekstraktov *Amanita phalloides* popolnoma inhibiralo *R. solanacearum*, 3 pa so prav tako kazali delno inhibicijo (Preglednica 2). Delna inhibicija je verjetno posledica nižje koncentracije aktivnega proteina prisotnega v trosnjaku, ki je posledica podlage, na kateri trosnjak raste, vremenskih pogojev in starosti trosnjaka (Yildiz in sod., 2002). Namreč, ko smo ekstrakte, ki so delno inhibirali *R. solanaceaum* testirali proti nižji koncentraciji bakterij (10^4 , 10^5 in 10^6 celic/mL), so jo ti popolnoma inhibirali (Priloga E).

Preglednica 2: Seznam proteinskih ekstraktov iz trosnjakov (prostotrosnic in zaprtotrosnic), ki smo jih testirali proti *R. solanacearum* *in vitro* v mikrotitskih ploščicah.

Table 2: Mushroom protein extracts (from ascomycota in basidiomycota) tested against *R. solanacearum* in the *in-vitro* microtiter plate screening.

deblo, družina in vrsta gliv	užitna	inhibicija rasti <i>R. solanacearum</i>
Prostotrosnice		
<i>Agaricaceae</i>		
<i>Agaricus campestris</i>	da	ne
<i>Agaricus moelleri</i>	ne	da*
<i>Agaricus silvaticus</i>	da	ne
<i>Coprinus comatus</i> (2)	da	ne
<i>Lepiota ignivolvata</i>	ne	ne
<i>Leucoagaricus leucothites</i> (2)	da	ne
<i>Macrolepiota</i> sp.	da/ne	ne
<i>Amanitaceae</i>		
<i>Amanita caesarea</i>	da	ne
<i>Amanita lividopallescens</i> (2)	da?	ne
<i>Amanita muscaria</i>	ne	da
<i>Amanita phalloides</i> (7/10), #T	ne	da
<i>Amanita vaginata</i> (2)	da?	ne
<i>Amanita virosa</i>	ne	da
<i>Cortinariaceae</i>		
<i>Cortinarius caerulescens</i>	da?	ne
<i>Cortinarius glaucopus</i>	da	ne
<i>Cortinarius sanguineus</i>	ne	ne
<i>Cortinarius</i> sp.	da/ne	ne
<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	ne	ne
<i>Entolomataceae</i>		
<i>Entoloma rhodopolium</i>	ne	ne
<i>Fistulinaceae</i>		
<i>Fistulina hepatica</i>	da	ne
<i>Hygrophoraceae</i>		
<i>Hygrophorus chrysodon</i>	da	ne
<i>Hygrophorus pudorinus</i> (2)	da	ne
<i>Hygrophorus eburneus</i>	da	ne
<i>Hygrophorus fagi</i>	da	ne
<i>Hygrophorus erubescens</i>	ne	ne
<i>Hygrocybe ovina</i>	ne	ne
<i>Lycoperdaceae</i>		
<i>Bovista nigrescens</i> , #T	da?	da*
<i>Lycoperdon perlatum</i>	da?	ne
<i>Lycoperdon pyriforme</i>	da?	ne
<i>Physalacriaceae</i>		
<i>Armillaria mellea</i> (2)	da?	ne
<i>Pluteaceae</i>		
<i>Volvariella bombycinia</i>	da	ne
<i>Volvariella gloiocephala</i>	ne	ne
<i>Strophariaceae</i>		
<i>Hypholoma fasciculare</i>	ne	ne
<i>Hypholoma</i> sp.	da/ne	da
<i>Tricholomataceae</i>		
<i>Clitocybe alexandri</i>	da	ne
<i>Clitocybe geotropa</i> (9/12), #TP	da	da

se nadaljuje

nadaljevanje Preglednica 2: Seznam proteinskih ekstraktov iz trosnjakov (prostotrosnic in zaprtotrosnic), ki smo jih testirali proti *R. solanacearum* in vitro v mikrotitskih ploščicah.

deblo, družina in vrsta gliv	užitna	inhibicija rasti <i>R. solanacearum</i>
<i>Tricholomataceae</i> - nadaljevanje		
<i>C. geotropa</i> mycelium extract (2)	da?	da
<i>Clitocybe gibba</i>	da	ne
<i>Clitocybe nebularis</i> (1/2)	da	ne
<i>Collybia confluens</i>	da	ne
<i>Laccaria amethystina</i>	da	ne
<i>Lepista glaucocana</i> (2)	da?	ne
<i>Lepista inversa</i>	da	ne
<i>Lepista nuda</i>	da?	ne
<i>Mycena galericulata</i>	ne	ne
<i>Tricholoma atrosquamosum</i>	da	ne
<i>Tricholoma bufonium</i> (3)	ne	ne
<i>Tricholoma imbricatum</i> (2)	da?	ne
<i>Tricholoma mutabile</i>	na	ne
<i>Tricholoma pardinum</i> (2)	ne	ne
<i>Tricholoma saponaceum</i> (8/9), #TP	da?	da
<i>Tricholoma sejunctum</i>	da?	ne
<i>Tricholoma</i> sp.	da/ne	ne
<i>Tricholoma terreum</i>	da	ne
<i>Tricholoma ustale</i>	ne	da*
<i>Tricholoma vaccinum</i> (2)	da?	ne
<i>Tricholomopsis rutilans</i> (3)	da?	ne
<i>Boletaceae</i>		
<i>Boletus badius</i> (2)	da	ne
<i>Boletus calopus</i>	ne	ne
<i>Boletus luridiformis</i>	da?	da
<i>Leccinum scabrum</i>	da	ne
<i>Xerocomus chrysenteron</i>	da	ne
<i>Gomphidiaceae</i>		
<i>Gomphidius glutinosus</i>	da	da
<i>Suillaceae</i>		
<i>Suillus bovinus</i> (6)	da	ne
<i>Suillus granulatus</i> (3)	da	ne
<i>Suillus luteus</i> (3)	da	ne
<i>Suillus</i> sp. (5)	da	ne
<i>Suillus variegatus</i> , #TP	da	da*
<i>Tapinellaceae</i>		
<i>Tapinella atrotomentosa</i>	da?	ne
<i>Cantharellaceae</i>		
<i>Cantharellus</i> sp.	da?	ne
<i>Craterellus cornucopioides</i>	da	ne
<i>Hydnaceae</i>		
<i>Hydnum repandum</i>	da	ne
<i>Gastraceae</i>		
<i>Gastrum rufescens</i>	ne	ne
<i>Gomphaceae</i>		
<i>Clavariadelphus</i> sp.	da/ne	ne
<i>Ramaria botrytis</i>	da	ne
<i>Ramaria flava</i>	da	ne
<i>Ramaria formosa</i>	ne	ne

se nadaljuje

Erjavec J. Vpliv proteinskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

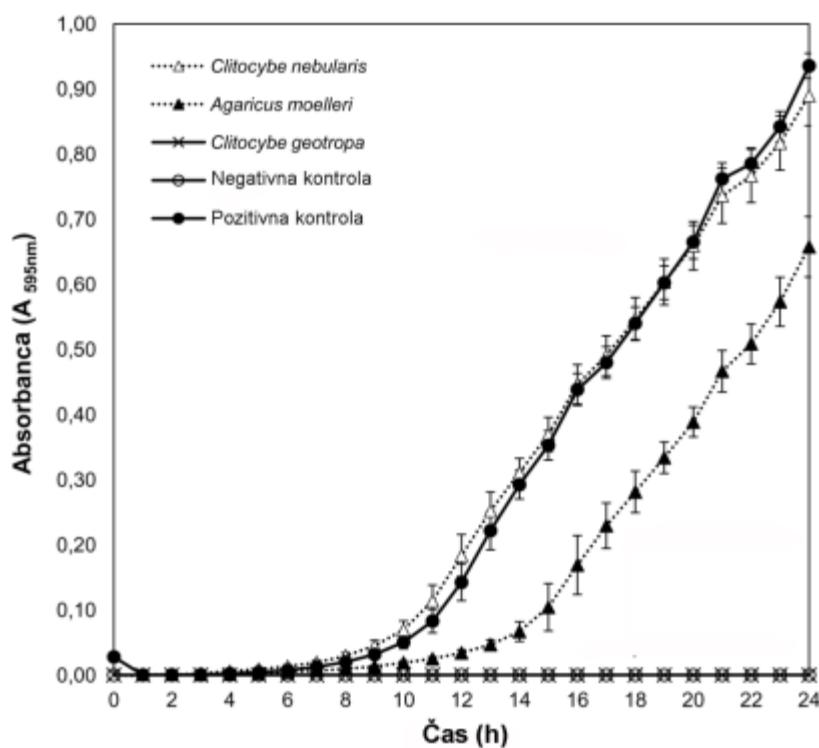
Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

nadaljevanje Preglednica 2: Seznam proteinskih ekstraktov iz trosnjakov (prostotrosnic in zaprtotrosnic), ki smo jih testirali proti *R. solanacearum* in vitro v mikrotitskih ploščicah.

deblo, družina in vrsta gliv	užitna	inhibicija rasti <i>R. solanacearum</i>
<i>Phallaceae</i>		
<i>Phallus</i> sp.	da?	ne
<i>Albatrellaceae</i>		
<i>Albatrellus ovinus</i>	da	da
<i>Albatrellus pes-caprae</i>	da	ne
<i>Russulaceae</i>		
<i>Lactarius blennius</i>	ne	ne
<i>Lactarius citriolens</i>	ne	ne
<i>Lactarius deliciosus</i>	da	ne
<i>Lactarius illyricus</i>	ne	ne
<i>Lactarius</i> sp.	da/ne	ne
<i>Russula albonigra</i>	ne	ne
<i>Sparassidaceae</i>		
<i>Sparassis crispa</i>	da	ne
<i>Thelephoraceae</i>		
<i>Sarcodon imbricatus</i>	da?	ne
Zaprtotrosnice		
<i>Morchellaceae</i>		
<i>Morchella esculenta</i>	da?	ne
<i>Tuberaceae</i>		
<i>Tuber aestivum</i>	da	ne
<i>Tuber excavatum</i>	da	ne
<i>Tuber fulgens</i>	da	ne
<i>Tuber magnatum</i>	da	ne
<i>Tuber mesentericum</i>	da	ne

Klasifikacija imen vrst višjih gliv je bila narejena na osnovi podatkovne baze Index Fungorum (<http://www.indexfungorum.org/>); užitnost gob je bila določena na podlagi podatkov s strani Rogers mushrooms (<http://www.rogersmushrooms.com/>). Inhibicija rasti *R. solanacearum*: da, popolna inhibicija; da*, delna inhibicija; ne, ni inhibicije (glej tudi Slika 6). Užitnost: da, užitna, ni je potrebno kuhati; da/ne: rod vsebuje užitne in neužitne vrste; da?, užitne samo mlade, po kuhanju ali odstranitvi določenih delov trosnjakov; ne, ni užitna ozziroma je strupena; na, ni podatkov. (Št.) število testiranih ekstraktov; (ŠtI/Št) število ekstraktov, ki so inhibirali *R. solanacearum*, kot je prikazano v tabeli. #T, ekstrakti testirani v testu patogenosti na paradižniku, #TP, ekstrakti testirani v testu patogenosti na paradižniku in krompirju.

Classification follows Index Fungorum database of fungal names (<http://www.indexfungorum.org/>); edibility from identification keys of Rogers mushrooms (<http://www.rogersmushrooms.com/>). Inhibition of *R. solanacearum* growth: yes, complete inhibition; yes*, partial inhibition; no, no inhibition (see also Figure 6). Edibility: yes, edible and no cooking prior to consumption; yes/no, for genus with edible and non-edible or poisonous species; yes?, some species only edible as young fruiting bodies and/or after cooking and/or cutting off certain parts of the fruiting body; no, non-edible or poisonous; na, edibility data not available. (Nt) number of extracts tested ; (Ni/Nt) number of extracts showing inhibition as designated in the table / number of extracts tested; #T, extract tested for inhibition of *R. solanacearum* in tomato pathogenicity test; #TP, extract tested for inhibition of *R. solanacearum* in tomato and potato pathogenicity tests.



Slika 6: Inhibitorni učinek izbranih ekstraktov na rast bakterije *R. solanacearum* NIB Z30 v *in vitro* testu na mikrotitrski ploščici.

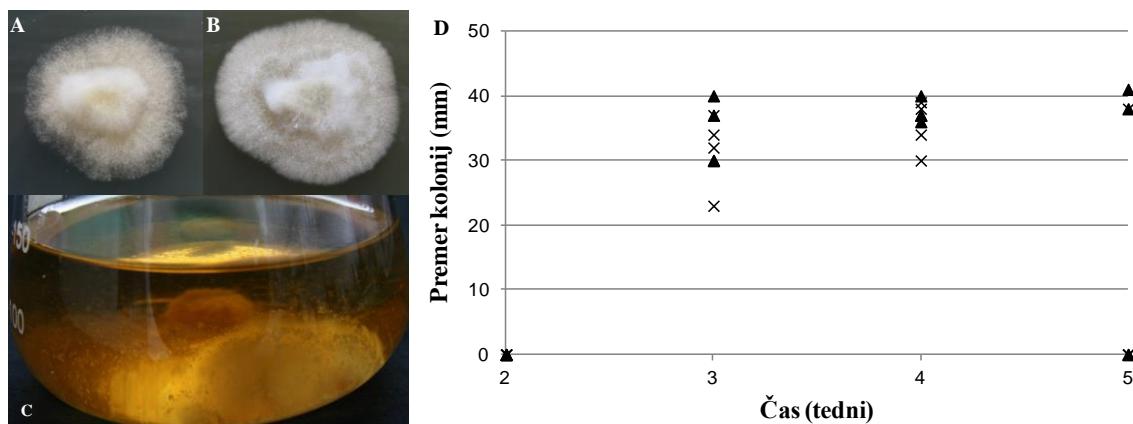
Kinetiko rasti smo merili spektrofotometrično pri 595 nm (A_{595}), 24 h. Številni ekstrakti so popolnoma inhibirali rast bakterije (v območju variacije negativne kontrole), drugi so kazali delno inhibicijo (rast bakterij počasnejša kot pri pozitivni kontroli *R. solanacearum* NIB Z30), nekateri pa bakterije niso inhibirali (v območju variacije pozitivne kontrole). Na sliki so prikazani standardni odkloni treh ponovitev.

Figure 6: Inhibitory effects of the representative mushroom protein extracts on *Ralstonia solanacearum* NIB Z 30 in the *in-vitro* microtitre plate assays.

Growth of *R. solanacearum* was measured spectrophotometrically at 595 nm (A_{595}) over 24 hours. Examples show no inhibition (A_{595} within the variation of the positive control), partial inhibition (a delayed exponential growth phase or slower growth of bacteria compared to *R. solanacearum* NIB Z 30 positive control) and complete inhibition (A_{595} within the variation of the negative control). Standard deviations of three technical repeats are shown.

4.1.2 Gojenje micelija *Clitocybe geotropa*

Micelij *C. geotropa* smo gojili na trdnih gojiščih SMY in PDA gojišču ter primerjali rast in morfologijo 2 do 5 tednov po inokulaciji. Preliminarni rezultati rasti kažejo, da je rast na gojišču PDA nekoliko počasnejša kot na SMY gojišču (Slika 7, D). Poleg tega je bil micelij na PDA gojišču bolj puhost, manj gost, na robu so bile jasno vidne posamezne hife, medtem ko je bil micelij na gojišču SMY gostejši, hife na robu so tesno skupaj (Slika 7, A in B). Na podlagi teh rezultatov smo se odločili, da bomo za gojenje micelija *C. geotropa* uporabljali gojišče SMY.

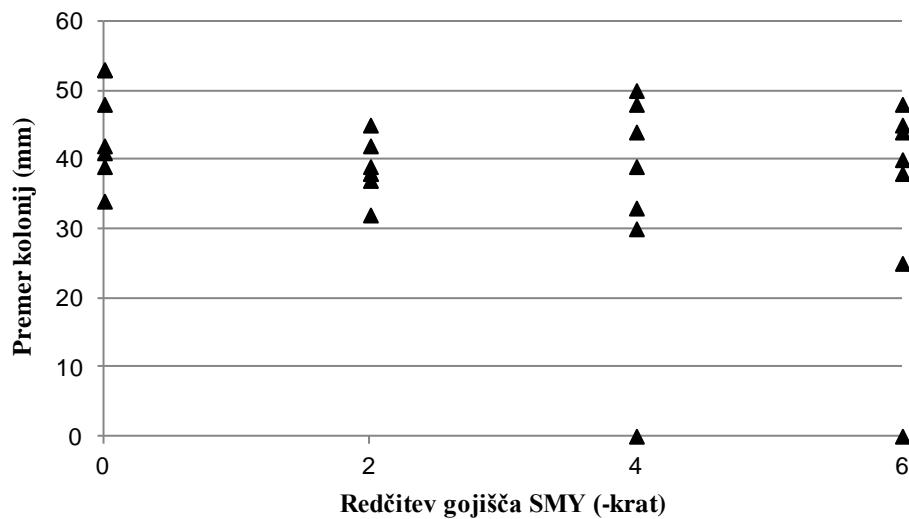


Slika 7: Micelij *C. geotropa* na (A) PDA gojišču, (B) SMY gojišču in (C) v tekočem SMY gojišču. Primerjali smo rast (premer) kolonij pri 25 °C na trdnem gojišču SMY (trikotniki) in PDA (križci) več tednov po inkubaciji (D).

Figure 7: Mycelia culture of mushroom *Clitocybe geotropa* on (A) PDA medium, (B) SMY medium and (C) in liquid SMY medium.

Growth (colony diameter) at 25 °C on SMY (triangles) and PDA (cross) medium was also compared several weeks post inoculation (D).

Ker micelij nekaterih gliv raste hitreje na gojiščih z manj hranil (Shrestha in sod., 2006), smo gojišče SMY redčili 2-krat, 4-krat in 6-krat ter primerjali premer kolonij 33 dpi. Za vsako redčitev smo nacepili 7 plošč. Na podlagi rezultatov (Slika 8) se kaže trend, da redčitev osnovnega gojišča vpliva negativno velikost kolonije micelija, saj je bil premer kolonij največji na osnovnem, neredčenem gojišču. Poleg tega smo primerjali tudi rast pri različnih pogojih v tekočem gojišču SMY, in sicer pri sobni temperaturi in stresanju 60 rpm, pri 25 °C brez stresanja in pri 28 °C brez stresanja. Po 14ih dneh inkubacije je bil micelij pri sobni temperaturi bel, puhat, premer kroglic približno 3 cm (Slika 7, C). Kroglice micelija pri 25 °C so manjše, micelij je rahlo rjavkaste barve. Micelij je pri 28 °C rjave barve in raste najpočasneje. Na podlagi rezultatov smo micelij *C. geotropa* gojili pri sobni temperaturi brez stresanja ali s stresanjem 60 rpm.

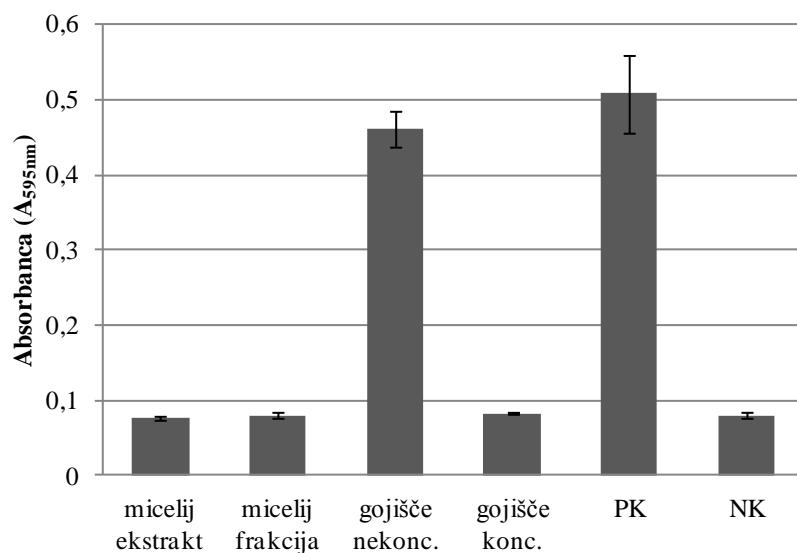


Slika 8: Primerjava premera kolonij micelija *C. geotropa* na trdnem (neredčenem) SMY gojišču, ki smo ga redčili 2-krat, 4-krat in 6-krat.

Figure 8: Comparison of *C. geotropa* mycelium colony diameter on the undiluted SMY medium and its 2-fold, 4-fold, 6-fold dilutions.

4.1.3 Preverjanje protibakterijske aktivnosti micelija *C. geotropa*

Z *in vitro* testi smo preverjali protibakterijsko aktivnost ekstrakta micelija *C. geotropa*, frakcij micelija po gelski kromatografiji, kot tudi gojišča v katerem je rasel micelij, saj smo želeli preveriti ali se aktivni protein izloča tudi v gojišče. To je pomembno predvsem z vidika industrijske proizvodnje, saj je molekule, ki se izločajo v gojišče, lažje čistiti, kar zniža stroške pridobivanja protibakterijske snovi (Wang in sod., 2005; Erjavec in sod., 2012; Young in sod., 2012). Ugotovili smo, da so frakcije in ekstrakt micelija popolnoma inhibirali rast *R. solanacearum*, njihov učinek je bil baktericiden. Prav tako je tudi koncentrirano gojišče popolnoma inhibiralo *R. Solanacearum*, kar dokazuje, da se aktivni protein izloča v gojišče. Nekoncentrirano gojišče ni inhibiralo bakterij, kar je najverjetneje posledica nižje koncentracije aktivnega proteina v nekoncentriranem vzorcu gojišča (Slika 9).



Slika 9: Analiza protibakterijske aktivnosti ekstrakta micelija *C. geotropa*, frakcije micelija po gelski kromatografiji ter gojišča SMY v katerem je micelij rastel.

Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni A₅₉₅ merjene po 24ih urah. Vsak vzorec smo analizirali v treh tehničnih ponovitvah.

Figure 9: Analysis of antibacterial activity of *C. geotropa* mycelium extract, mycelium fraction after size exclusion chromatography and SMY medium where mycelium was grown.

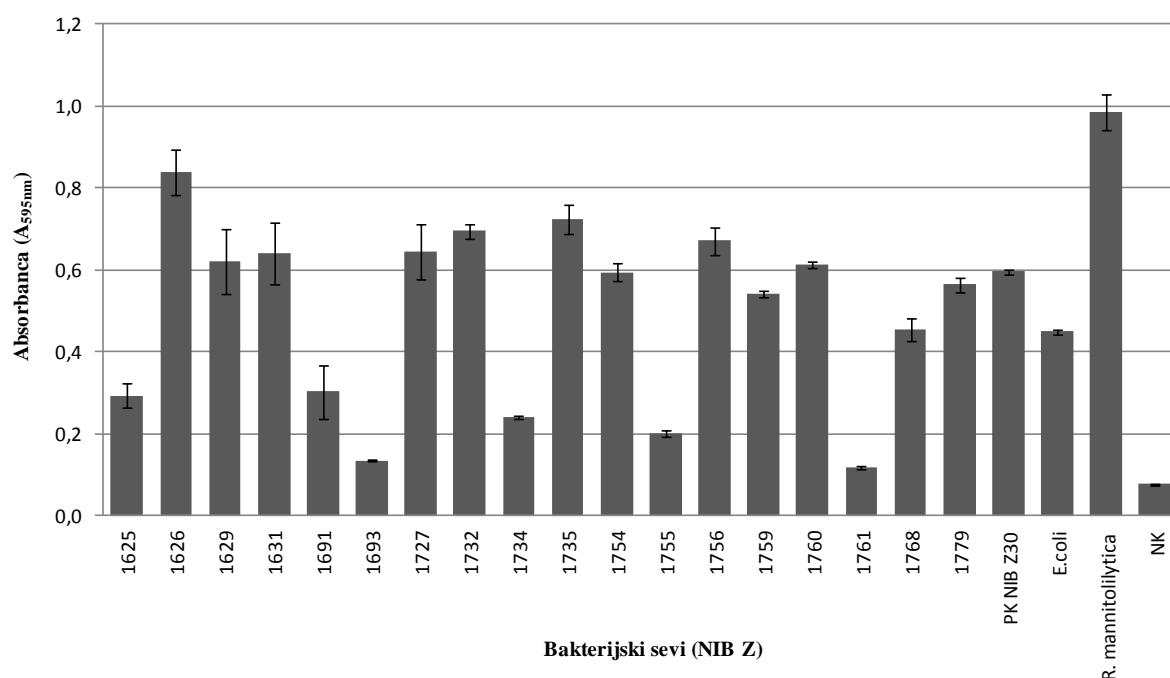
Average A₅₉₅ values after 24 h and standard deviation of three technical replicates are represented above.

4.1.4 Preverjanje specifičnosti inhibicije proti različnim filotipom *R. solanacearum* in drugim bakterijam *in vitro*

4.1.4.1 Test hitrosti rasti posameznih sevov *R. solanacearum*, *R. mannitololytica* in *E. coli* po 24ih urah

S testiranjem rasti različnih sevov (filotipov) *R. solanacearum* ter *E. coli* in *R. mannitololytica* smo želeli preveriti ali je rast teh sevov v mikrotitrski ploščici uspešna in ali bomo lahko opazovali inhibicijo ekstraktov glede na kontrole. Sevi so bili izolirani iz različnih gostiteljev in geografskih območij in zastopajo različne filotipe ter biovarje. Poleg tega smo v testiranju vključili tudi *R. mannitololytica* zaradi njene visoke genetske podobnosti z *R. solanacearum* ter dejstva, da je oportunistični patogen, ki je v zadnjih letih povzorčil številne bolnišnične okužbe (Castillo in Greenberg, 2007; Gröbner in sod., 2007; Jhung in sod., 2007; Block in sod., 2013). *E. coli* smo vključili kot nesorodno po Gramu negativno bakterijo, ki je ob enem pomembna humana patogena bakterija.

Rezultati so pokazali, da sevi NIB Z 1625, 1691, 1693, 1734, 1755, 1761 rastejo počasneje v primerjavi s kontrolnim sevom NIB Z 30. Kljub temu smo v testiranje specifičnosti inhibicije vključili vse seve in po podrobnejši analizi izločili tiste pri katerih nismo mogli razlikovati ali je slaba rast posledica inhibicije ali slabe rasti bakterije. Pri analizi specifičnosti inhibicije smo tako izločili seva NIB Z 1755 in 1761, medtem ko se je po ponovitvi poskusa izkazalo, da NIB Z 1693 ne sodi med počasi rastoče seve. Prav tako se je izkazalo, da sev NIB Z 1734 sicer raste počasi, vendar smo kljub temu lahko razlikovali prisotnost oziroma odsotnost inhibicije, tako kot pri NIB Z 1625 in 1691 (Slika 10).



Slika 10: Spektrofotometrično merjenje rasti posameznih sevov (filotipov) *R. solanaceum* ter *E. coli* in *R. mannitolytica* v mikrotitrski ploščici po 24ih urah.

Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni A_{595} merjene po 24ih urah. Vsak vzorec smo analizirali v treh tehničnih ponovitvah. Hitrost rasti smo preverjali preden smo testirali specifičnost inhibicije z dodajanjem ekstraktov iz gob. Počasi rastoče filotipe smo izločili iz nadaljnih analiz.

Figure 10: Spectrophotometrical measurement of growth of different *R. solanacearum* strains (phylogenotypes), *E. coli* and *R. mannitolytica* in microtiter plate after 24h incubation time.

Average A_{595} values after 24 h and standard deviation of three technical replicates are represented above. Growth was monitored before specificity of inhibition was tested. Slow growing bacterial strains were eliminated from further testing.

4.1.4.2 Inhibicija različnih sevov *R. solanacearum* v mikrotitrskih ploščicah

Da bi ocenili specifičnost inhibicije izbranih ekstraktov, ki so v *in vitro* testih inhibirali *R. solanacearum* NIB Z 30 in možnosti za njihovo širšo uporabo, smo jih testirali proti različnim

sevom *R. solanacearum*. Dva od desetih testiranih ekstraktov, *A. phalloides* in *T. saponaceum*, sta inhibirala vse seve *R. solanacearum*, kot tudi *R. mannitolilytica* in *E. coli*. Poleg teh so ekstrakti *A. virosa*, *B. luridiformis*, *C. geotropa* in *G. glutinosus* popolnoma inhibirali vse seve *Ralstonia*, vključno z *R. mannitolilytica*, niso pa inhibirali *E. coli*. Več variabilnosti inhibicije smo opazili pri ekstraktih *A. moelleri*, *T. ustale* in *A. ovinus*, ki so v presejalnih testih samo delno inhibirali NIB Z 30. Ekstrakt je *A. moelleri* samo delno inhibiral večino sevov *Ralstonia* (z izjemo NIB Z 1625), je pa popolnoma inhibiral *E. coli* (Preglednica 3).

Od desetih ekstraktov, ki smo jih testirali v začetnih presejalnih testih, je devet ekstraktov inhibiralo NIB Z 30 tudi v testu preverjanja specifičnosti inhibicije. Inhibitorne aktivnosti nismo potrdili pri ekstraktu *C. nebularis*, ki je bile eden od dveh ekstraktov, ki so v presejalnih testih delno inhibirali NIB Z 30. Rezultat ustreza kinetiki rasti *R. solanacearum* v prisotnosti teh dveh ekstraktov, namreč pri *C. nebularis* smo opazili le šibko inhibicijo v zadnjih nekaj urah meritev, medtem ko je ekstrakt *T. ustale* delno inhibiral *R. solanacearum* od začetka inkubacije (Priloga C).

Možni razlogi, da prihaja do razlik pri aktivnosti ekstraktov je občutljivost osnovnega presejalnega testa, ki je močno odvisna od začetne koncentracije bakterij (nižja kot je, lažje zaznamo inhibitorno aktivnost). Poleg tega lahko pri dolgotrajnem shranjevanju in/ali večkratnem odmrzovanju koncentracija aktivnega protein počasi pada, kar vodi do stohastičnega učinka pri testiranjih. Kljub odstopanju pri inhibiciji seva NIB Z 30, je ekstrakt *C. nebularis* inhibiral sev NIB Z 1691 izoliran iz ingverja in sev Z 1625 izoliran iz paradižnika (Preglednica 3).

Preglednica 3: Specifičnost inhibicije ekstraktov iz gob proti različnim filotipom *R. solanacearum* in drugim bakterijam *in vitro*.**Table 3:** Specificity of inhibition if mushroom extracts against different *R. solanacearum* phylotypes and other bacteria *in vitro*.

Sev	Gostitelj (Izvor)	Zbirka	Filotip	Biovar	Stopnja inhibicije proteinskega ekstrakta iz gobe																				<i>Tricholoma instabile</i>									
					<i>Tricholoma spadiceum</i>				<i>Amanita phalloides</i>				<i>Amanita virosa</i>				<i>Boletus luridiformis</i>				<i>Citocybe geotropa</i>				<i>Gomphidius glutinosus</i>				<i>Agave attenuata</i>					
<i>Ralstonia solanacearum</i> (NIB Z)																																		
1625	<i>L. esculentum</i> (Zimbabve)	LMG 2296 (RA 1.64)	III	1	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	S	+++	S	+++	S	+	S	+++	S	+	S				
1693	<i>S. tuberosum</i> (Brazilija)	CFBP 4613/ NCCPB 3989/ CIP 226/ SMT 45	II	2T	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	++	S	++	S	+++	S	-	na	+++	S	-	na				
1759	<i>H. caribea</i> (Martinique, Francija)	CFBP 6783/ ANT 25/ RUN 0017	IIB	1	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	++	S	++	S	+++	S	+++	S	-	na	+++	S	-	na				
1691	<i>Zingiber</i> (Filipini)	CFBP 4616/ NCCPB 4005/ SMT 49	I	4	+++	C	+++	C	+++	S	+++	S	+++	C	+++	C	+++	C	++	S	++	S	++	S	+	S	+	S	+	S				
30	<i>S. tuberosum</i> (Nizozemska) <i>M. sp. cv plantain</i> (Venezuela)	NCPPB 4156	IIB	2	+++	C	+++	C	+++	S	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+	S	+++	S	+++	S	-	na	+++	S	-	na				
1779	<i>S. nigrum</i> (Kamerun)	CFBP 6438/ UW181/ MLG28/ RUN0454	IIA	3	+++	C	+++	C	+++	S	+++	C	+++	C	+++	C	++	S	+	S	+	S	+	S	-	na	+++	S	-	na				
1727	<i>S. tuberosum</i> (Brazilija)	CFBP 7038/ CMR 66/ RUN 0166	III/23	/	+++	C	+++	S	+++	S	+++	C	+++	C	+++	C	++	S	+	S	+	S	++	S	-	na	+++	S	-	na				
1734	<i>S. tuberosum</i> (Brazilija)	CFBP 6446/ NCPPB 3987/ CIP217/ JT677/ RUN 0081	IIB	N2	+++	C	+++	C	+++	S	+++	C	+++	C	+++	C	+	S	+	S	-	n a	-	na	-	na	-	na	-	na				
1760	<i>S. tuberosum</i> (Martinique, Francija)	CFBP 3257/ CFBP 2972/ RUN 0030/ JS734/MPT1/	IIA	1	+++	C	+++	C	+++	S	+++	C	+++	C	+++	C	++	n t	-	n t	-	n t	-	n t	n t	n t	n t	nt						
1626	<i>S. tuberosum</i> (Fiji)	LMG 17144 (RA 1.72)	I	3	+++	C	+++	C	+++	S	+++	S	+++	C	+++	C	++	S	-	n a	++	S	-	na	++	S	-	na	++	S	-	na		
1732	<i>M. x paradisiaca</i> <i>L. cv. Saba</i> (Filipini)	CFBP 6925/ MOLK 2/ RUN 0074	IIB/3	/	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+	S	-	n a	++	S	-	na	++	S	-	na	++	S	-	na		
1629	<i>L. esculentum</i> (Peru)	CFBP 3928 (RA 3.20)/ NCPPB 3996	I	3	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	++	S	++	S	++	S	++	S	-	na	++	S	-	na	++	S	-	na
<i>Ralstonia manitolytica</i> (NIB Z)																																		
1631	okužena tekočina iz avtoklava (ZDA)	CFBP 6737/ LMG 6866 (F 5.35)	/	/	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+++	C	+	S	+	S	-	n a	-	na	-	na	-	na	-	na	-	na		
<i>Escherichia coli</i> (NIB Z)																																		
703	/	GSPB 48	/	/	+++	C	+++	S	-	n a	-	n a	-	n a	-	n a	-	n a	+++	S	-	n a	-	n a	n t	nt	nt	nt	nt					

Zbirke bakterij: NCPPB, National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, FERA, York, UK; CFBP, Collection Francaise des Bactéries Phytopathogenes, Institut National de la Recherche Agronomique, Beaucozé Cedex, France; BCCM/LMG Belgian Co-Ordinated Collections Of Micro-Organisms, Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent (UGent), IIVIA, Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, Spain; GSPB, Göttinger Collection of Phytopathogenic Bacteria, Göttingen, Germany.

++, popolna inhibicija bakterij: ni rasti ($\leq 15\% A_{595}$ pozitivne kontrole)

++, delna (močna) inhibicija bakterij: rast precej počasnejša v primerjavi s pozitivno kontrolo (15 % do 60 % A_{595} pozitivne kontrole)

+, delna (šibka) inhibicija bakterij: rast počasnejša v primerjavi s pozitivno kontrolo (60 % do 84 % A_{595} pozitivne kontrole)

-, ni inhibicije ($\geq 84\% A_{595}$ pozitivne kontrole)

S, bakteriostatični učinek – bakterije rastejo po prenosu na sveže gojišče

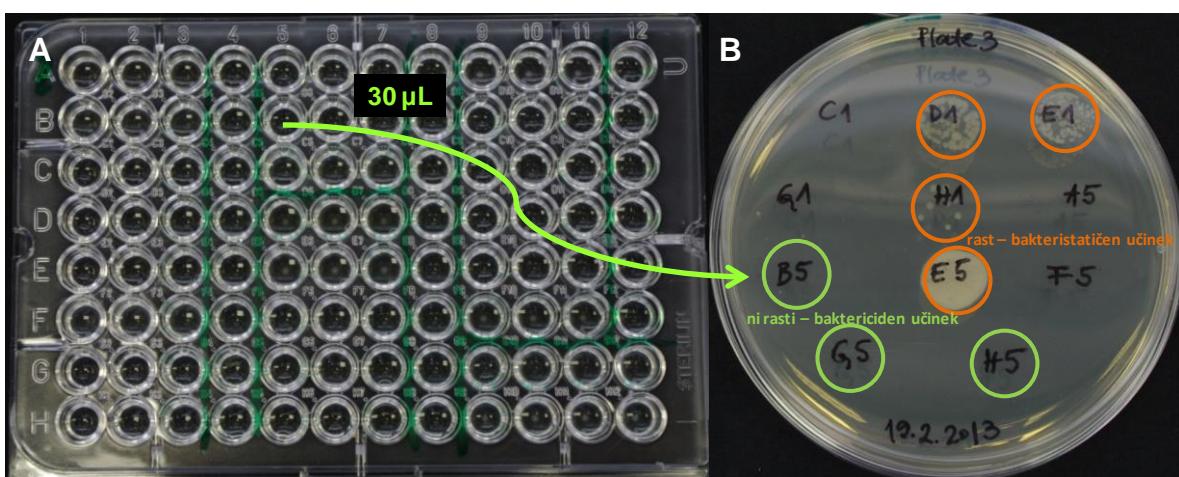
C, baktericidni učinek – bakterije ne rastejo po prenosu na sveže gojišče

nt, ni testirano

na, ni testirano, ker ekstrakt ni inhibiral bakterij

4.1.4.3 Baktericidni oziroma bakteristatični učinek ekstraktov

V sklopu testiranja specifičnosti inhibicije proti različnim sevom, smo preverjali tudi baktericidni oziroma bakteristatični učinek ekstraktov tako, da smo po končanem merjenju absorbance po 24ih urah 30 μL suspenzije ekstrakta in bakterije prenesli na sveže gojišče. Če smo po 24ih do 48ih urah opazili rast, je bil učinek bakteristatičen, v nasprotnem primeru pa baktericiden (Slika 11).



Slika 11: Test baktericidnosti in bakteristatičnosti.

V primeru, da smo po prenosu iz mikrotitrtske ploščice (A) na svežem gojišču (B) opazili kolonije, je bil učinek bakteristatičen, če pa ni bilo rasti, pa baktericiden.

Figure 11: Testing bacterial and bacteristatic properties of an extract.

If bacterial growth was observed after transfer from microtiter plate (A) onto fresh medium (B) the effect was bacteristatic, if no growth was observed, the effect was bactericidal.

Ekstrakti *Tricholoma saponaceum*, *A. phalloides* in *C. geotropa*, ki so inhibirale vse seve *Ralstonia*, so imeli vedno baktericiden učinek. Ekstrakt *G. glutinosus* je imel prav tako baktericiden učinek na vse seve, razen na sev NIB Z 1626 izoliran iz krompirja. Podobno je imel ekstrakt *B. luridiformis* bakteristatičen učinek proti NIB Z 1626 kot tudi NIB Z 1691 izoliran iz ingverja. Pri ekstraktu *A. virosa* smo opazili več variabilnosti, medtem ko so ekstrakti *Agaricus moelleri*, *Tricholoma ustale*, *Albatrellus ovinus* in *C. nebularis* imeli vedno samo bakteristatični učinek. Samo ekstrakt *T. saponaceum* je imel bakteristatični učinek na *E. coli* (Preglednica 3).

4.1.5 Temperaturna stabilnost protibakterijske aktivnosti ekstraktov

Izbrane ekstrakte, ki so v *in vitro* testih inhibirali *R. solanacearum*, smo za krajši čas izpostavili različnim temperaturam (Priloga F). Ekstrakti *A. phalloides*, *A. virosa*, *G. glutinosus*, *C. geotropa* in *T. saponaceum* so ohranili inhibitorno aktivnost po segrevanju pri 60 °C, medtem ko so popolnoma izgubili inhibitorno aktivnost po segrevanju pri 80 °C in 95 °C. Frakcija ekstrakta *A. phalloides* je ohranila aktivnost po segrevanju pri 60 °C, medtem ko je frakcija ekstrakta *C. geotropa*, tako kot ekstrakt micelija *C. geotropa*, ohranila aktivnost po segrevanju pri 40 °C. Ekstrakt *B. erythropus* je ohranil aktivnost po segrevanju pri 40 °C. Manjši sekundarni metaboliti in polisaharidi so večinoma temperaturno obstojni in ohranijo aktivnost tudi po kuhanju pri temperaturah 80 °C in več. Na podlagi teh rezultatov bi lahko sklepali, da so inhibitorne snovi v ekstraktih iz gob proteini (Preglednica 4).

Preglednica 4: Seznam in inhibitorna aktivnost ekstraktov in frakcij izbranih gob pred in po kuhanju.

Table 4: List and inhibitory activity of selected mushroom extracts and fractions before and after boiling.

vzorec	pred tretiranjem	<i>in vitro</i> inhibicija <i>R. solanacearum</i>			
		40 °C	60 °C	80 °C	95 °C
<i>Amanita phalloides</i> ekstrakt gobe	da	da	da	-	-
<i>A. phalloides</i> frakcija ekstrakta gobe	da	da	da	ne	ne
<i>Amanita virosa</i>	da	da	da	ne	ne
<i>Gomphidius glutinosus</i>	da	da	da	ne	ne
<i>Clitocybe geotropa</i> ekstrakt gobe	da	da	da*	ne	ne
<i>C. geotropa</i> frakcija ekstrakta gobe	da	da	ne	ne	ne
<i>C. geotropa</i> micelij ekstrakta	da	da*	ne	ne	ne
<i>C. geotropa</i> frakcija ekstrakta micelija	da	nt	nt	nt	ne
<i>Tricholoma saponaceum</i>	da	da	da*	ne	ne
<i>Boletus erythropus</i>	da	da	da	ne	ne
<i>Albatrellus ovinus</i>	da*	nt	nt	ne	ne
<i>S. variegatus</i> frakcija ekstrakta gobe	da	nt	nt	nt	ne
<i>Tricholoma ustale</i>	ne	ne	ne	ne	ne

da: popolna inhibicija *R. solanacearum*

da*: delna inhibicija *R. solanacearum*

ne: ni inhibicije *R. solanacearum*

nt: ni testirano

4.2 UGOTAVLJANJE VPLIVA EKSTRAKTOV IN FRAKCIJ IZ GOB ALI MICELIJA NA RAZVOJ BOLEZENSKIH ZNAMENJ IN KONCENTRACIJO BAKTERIJ V RASTLINAH OKUŽENIH Z *R. SOLANACEARUM*

4.2.1 Test patogenosti na rastlinah paradižnika

Za testiranje učinka ekstraktov iz gob na rastlinah smo kot modelno rastlino izbrali paradižnik. Poleg tega, da je paradižnik pogosto uporabljena testna rastlina v bakterijski diagnostiki, je tudi pomembna gostiteljska rastlina, ki jo okužuje *R. solanacearum*.

Za testiranje na rastlinah paradižnika cv. 'Moneymaker' smo izbrali pet ekstraktov iz gob, ki so inhibirali bakterije v *in vitro* presejalnem testu (Preglednica 2). Z vsako suspenzijo bakterij in ekstraktov smo inokulirali 42 rastlin, prav tako 42 rastlin pozitivne kontrole in 20 rastlin negativne kontrole. Izračunali smo odstotke obolelih rastlin, ki so kazale določeno stopnjo bolezenskih znamenj. Prav tako smo izračunali površino območja pod krivuljo napredovanja bolezni (AUDPC) (Priloga G, A), s katero izrazimo intenziteto bolezni po času, ki smo jo izrazili relativno glede na pozitivno kontrolo (% PC) (Preglednica 5).

Najbolj učinkovita pri zaviranju bolezenskih znamenj sta bila ekstrakta *C. geotropa* in *S. variegatus* (Slika 12). To potrjuje tudi analiza AUDPC (76 % in 68 %). Čeprav je ekstrakt *S. variegatus* samo delno inhibiral *R. solanacearum* *in vitro*, je bila stopnja bolezenskih znamenj statistično značilno nižja kot pri pozitivni kontroli 4, 5, 7 in 8 dpi po inokulaciji ($p<0.01$). Pri rastlinah inokuliranih z mešanico *C. geotropa* in *R. solanacearum* pa je bila stopnja bolezenskih znamenj statistično značilno nižja kot pri pozitivni kontroli 4 in 11 dpi ($p<0.05$). Čeprav se 15 dpi število rastlin inokuliranih z mešanico *T. saponaceum* in *R. solanacearum* ni bistveno razlikovalo od pozitivne kontrole (95 % in 100 % obolelih rastlin), je bila stopnja bolezenskih znamenj statistično značilno nižja 4 in 7 dpi ($p<0.05$), kar potrjuje nižja AUDPC vrednost (80 %).

Preglednica 5: Primerjava *in vitro* in *in vivo* inhibitorne aktivnosti ekstraktov in frakcij iz gob ali micelija.

Table 5: Comparison of *in vitro* and *in vivo* activities of the mushroom or mycelium protein extracts or fractions.

ekstrakt/frakcija	<i>in vitro</i> testi			testi patogenosti					
	stopnja inhibicije	učinek		paradižnik cv. 'Moneymaker'		krompir cv. 'Désirée'		statistično značilna razlika v primerjavi s PK ^b (da/ne)	statistično značilna razlika v primerjavi s PK ^b (da/ne)
				AUDPC ^a ponovitve TP	statistično značilna razlika v primerjavi s PK ^b (da/ne)	AUDPC ^a ponovitve TP	statistično značilna razlika v primerjavi s PK ^b (da/ne)		
				1	2	1	2		
<i>A. phalloides</i>	+++	C		114	98	ne	nt	na	na
<i>B. nigrescens</i>	+	S		94	nt	ne	nt	na	na
<i>T. saponaceum</i>	+++	C		80	nt	da	63	da	da
<i>S. variegatus</i>	++	S		68	nt	da	75	da	da
<i>C. geotropa</i>	+++	C		76	75	da	48	da	da
<i>C. geotropa</i> ekstrakt micelija	+++	C		nt	75	da	nt	na	na
<i>C. geotropa</i> frakcija	+++	C		nt	79	da	nt	na	na
<i>C. geotropa</i> frakcija ekstrakta micelija	+++	C		nt	85	da	nt	na	na
<i>A. phalloides</i> frakcija	+++	C		nt	93	ne	nt	na	na
lizin oksidaza <i>T. viride</i>	+++	C		nt	38	da	nt	na	na

^a AUDPC: izračun povprečne intenzitete bolezni 14 dni po inokulaciji rastlin paradižnika in krompirja. AUDPC vrednost je izražena kot % pozitivne kontrole paradižnika in krompirja (rastline inokulirane samo z *R. solanacearum*)

^b Časovne točke v posamezni skupini, pri katerih se porazdelitev bolezenskih znamenj razlikuje od ustrezne porazdelitve pozitivne kontrole, so označene z zvezdico nad stoplici (hi-kvadrat test; *, p < 0.05; **, p < 0.01). Rastline negativne kontrole niso kazale bolezenskih znamenj (Slika 12, 13; Priloga I)

++, popolna inhibicija bakterij: ni rasti ($\leq 15\% A_{595}$ pozitivne kontrole)

++, delna (močna) inhibicija bakterij: rast precej počasnejša v primerjavi s pozitivno kontrolo (15 % do 60 % A_{595} pozitivne kontrole)

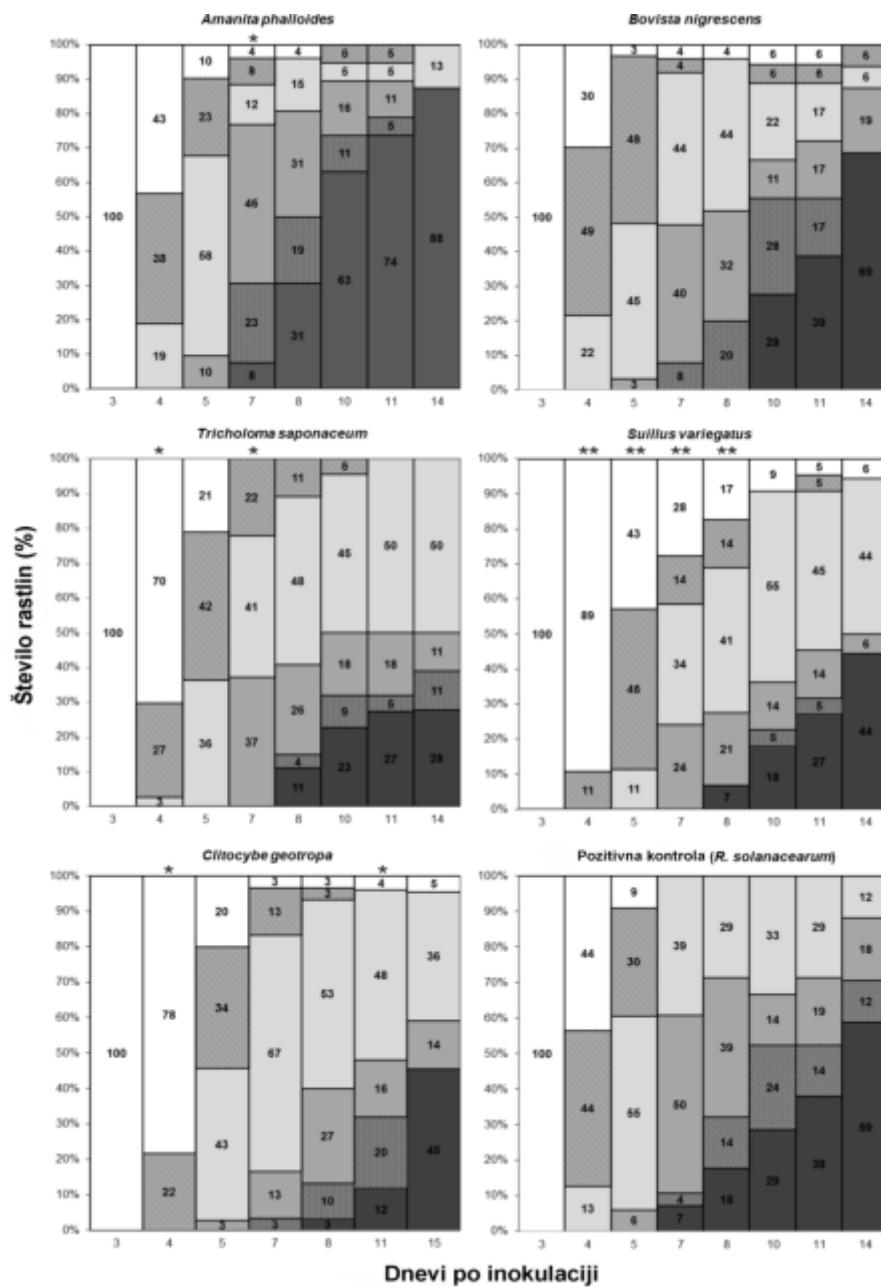
+, delna (šibka) inhibicija bakterij: rast počasnejša v primerjavi s pozitivno kontrolo (60 % do 84 % A_{595} pozitivne kontrole)

S, bakteriastični učinek – bakterije rastejo po prenosu na sveže gojišče

C, baktericidni učinek – bakterije ne rastejo po prenosu na sveže gojišče

nt, ni testirano

na, hi-kvadrat analiza ni bila narejena, ker ekstrakta nismo testirali na rastlinah



Slika 12: Vpliv izbranih ekstraktov iz gob na napredovanje bakterijskega venenja na rastlinah paradižnika cv. "Moneymaker".

Rastline smo inokulirali v steblo rastlin z *R. solanacearum* (pozitivna kontrola 10^5 CFU/mL) ali mešanico *R. solanacearum* in ekstrakta iz gob. Številke v stolpcih predstavljajo % rastlin, ki imajo izraženo določeno stopnjo bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah. Bolezenska znamenja smo ocenili s številčno lestvico po Winsteadu in Kelmanu (1952), in sicer: ni bolezenskih znamenj (bela); en list uvel (svetlo siva, črte); 2-3 listi uveli (svetlo siva); uveli vsi listi razen vrha rastline (srednje siva); 4, uveli vsi listi in vrh rastline (srednje siva, pike); odmrtje rastline (temno siva). Bolezenska znamenja smo spremljali do 14 dni. Časovne točke v posamezni skupini, pri katerih se porazdelitev bolezenskih znamenj razlikuje od ustrezne porazdelitve pozitivne kontrole, so označene z zvezdico nad stoplci (hi-kvadrat test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Rastline negativne kontrole niso kazale bolezenskih znamenj.

Figure 12: Influence of selected mushroom extracts on the bacterial wilt disease progression in artificially inoculated potted tomato plants of cv. "Moneymaker".

Plants were stem-inoculated with *R. solanacearum* (positive control, 10^5 CFU/ml) or mixture of *R. solanacearum* and mushroom extracts. For each time point, symptoms are expressed as percentage of plants with symptoms graded according to Winstead and Kelman (60) represented by different colors: no symptoms (white), 1 leaf wilted (light grey, stripes), 2-3 leaves wilted (light grey); all leaves except tip of the plant wilted (medium grey), all leaves and tip of the plant wilted (medium grey, dots), and dead plant (dark grey). Symptoms were recorded up to 14 dpi. Within groups, the time points at which the distribution of symptoms differs from the corresponding distribution in the positive control group, are marked by asterisk above columns (chi-squared test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Plants in the negative control group did not show any symptoms.

V ponovljenem testu patogenosti na paradižniku cv. 'Moneymaker' je bila stopnja bolezenskih znamenj pri rastlinah inokuliranih z ekstraktom micelija *C. geotropa* statistično značilni nižja kot pri pozitivni kontroli od 4 dpi do 11 dpi ($p < 0.05$ oz $p < 0.01$; AUDPC 75 %), prav tako tudi pri prečiščeni proteiniki frakciji (AUDPC 79 %) in ekstraktu micelija *C. geotropa* (AUDPC 75 %). Razlike prečiščene proteinske frakcije ekstrakta micelija *C. geotropa* so bile v primerjavi s pozitivno kontrolo statistično značilne od 5 dpi do 10 dpi ($p < 0.05$ oz. < 0.01 ; AUDPC 85 %). Stopnja bolezenskih znamenj ekstrakta in prečiščene frakcije *A. phalloides* se je od pozitivne kontrole razlikovala le 11 dpi oziroma 8 in 9 dpi ($p < 0.05$; AUDPC 98 oz. 93 %) (Slika 12, Preglednica 5, Priloga I). L-amino oksidaz (LAO) iz glive *Trichoderma viride* smo test patogenosti vključili z namenom preverjanja LAO aktivnosti *in vivo*, saj smo LAO aktivnost potrdili tudi pri ekstraktih *A. phalloides*, *C. geotropa* in *S. variegatus*. LAO iz *T. viride* je bila na videz najbolj učinkovita v testu patogenosti (AUDPC 38 %) zato, ker še preden jo inokuliramo v rastlino skupaj z bakterijo, uniči večji delež bakterij (Priloga H).

Inhibitorno aktivnost ekstraktov smo testirali tudi na paradižniku cv. Roma (Priloga G, C). AUDPC vrednosti rastlin inokuliranih z ekstrakti *S. variegatus* (69 %) in *T. saponaceum* (78 %) so potrdile dejstvo, da inhibitorna aktivnost ekstraktov ni odvisna od kultivarja. Najmanj aktivna sta bila ekstrakta *A. phalloides* in *B. nigrescens*, z AUDPC vrednostima 83 % in 84 %. Ekstrakta *C. geotropa* na paradižniku cv. Roma nismo testirali.

Test patogenosti na rastlinah paradižnika 'cv. 'Moneymaker'' smo dvakrat ponovili, test patogenosti na krompirju 'cv. 'Désirée'' pa enkrat. Rezultate smo povzeli v skupni tabeli (Preglednica 5).

4.2.2 Preverjanje vpliva ekstraktov iz gob in očiščenih frakcij na rastline paradižnika

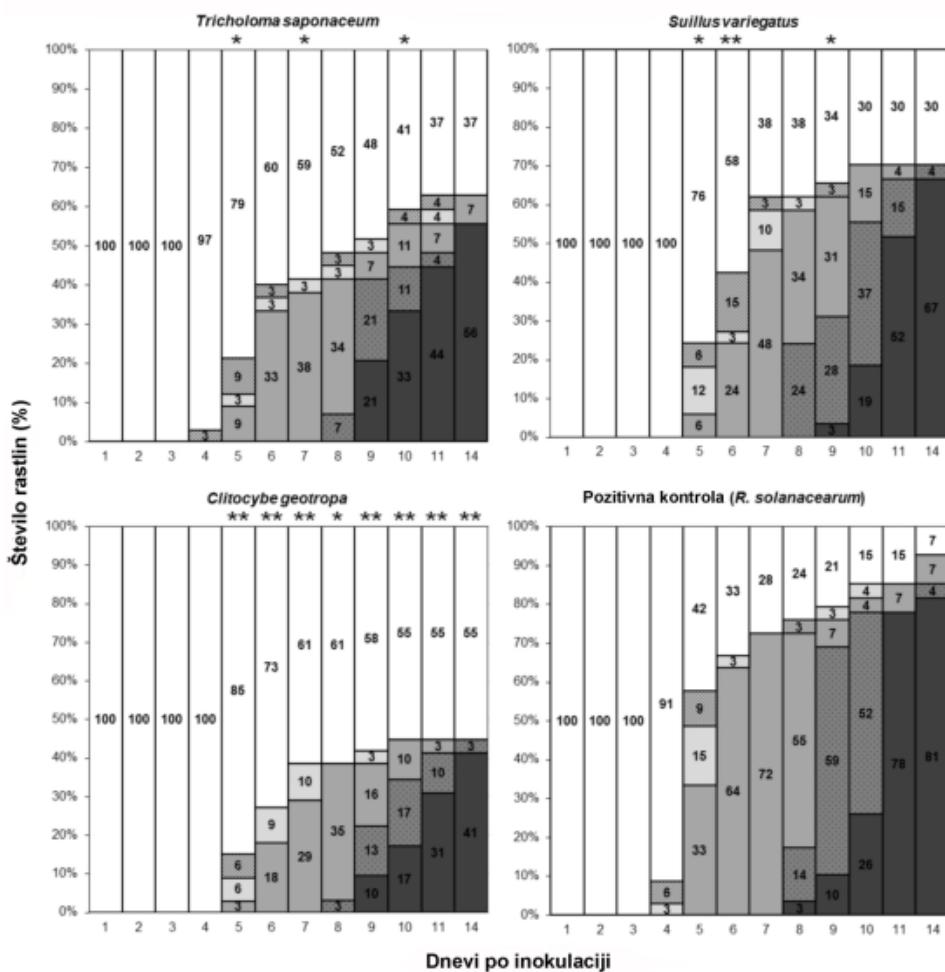
Preverjali smo vpliv samih ekstraktov in očiščenih frakcij brez dodane bakterije na rast rastlin paradižnika cv. 'Moneymaker', in sicer 10 rastlin na posamezno skupino. Testirali smo ekstrakte *A. phalloides*, *B. nigrescens*, *C. geotropa*, micelija *C. geotropa*, *S. variegatus* in *T. saponaceum* ter frakcije ekstraktov *A. phalloides*, *C. geotropa* in micelija *C. geotropa*. S primerjavo glede na pozitivno in negativno kontrolo smo potrdili, da ekstrakti in frakcije nimajo ne pozitivnega in ne negativnega učinka na rast rastlin paradižnika cv. 'Moneymaker' (Priloga K).

4.2.3 Test patogenosti na rastlinah krompirja

Izmed ekstraktov, ki smo jih testirali v testu patogenosti na paradižniku, smo ekstrakte *T. saponaceum*, *S. variegatus* in *C. geotropa* testirali s testom patogenosti na krompirju cv. 'Désirée' (Slika 13). Z vsako suspenzijo bakterij in ekstraktov smo inokulirali 42 rastlin, prav tako 42 rastlin pozitivne kontrole in 20 rastlin negativne kontrole. Napredovanje bolezeni je bilo pri rastlinah krompirja počasnejše kot pri rastlinah paradižnika. Čeprav smo prva bolezenska znamenja, tako kot pri paradižniku, opazili 4 dpi, je venelo samo 9 % rastlin pozitivne kontrole. Bolezen je potem hitro napredovala in ob koncu poskusa odmrlo 81 % rastlin pozitivne kontrole. Vsi ekstrakti so kazali inhibitorne učinke, kar je razvidno iz odstotka rastlin z določenim bolezenskim znamenjem (Slika 13) kot tudi iz krivulje napredovanja bolezni (AUDPC) (Preglednica 5, Priloga G, B). Bolezenska znamenja na rastlinah inokuliranih z *T. saponaceum* so se pojavila prav tako 4 dpi, vendar je venelo samo 3 % rastlin (ocena 1). 5 dpi so se bolezenska znamenja pri rastlinah inokuliranih z mešanico *T. saponaceum* statistično značilno razlikovala od pozitivne kontrole ($p<0.05$). Bolezenska znamenja pri rastlinah inokuliranih s *C. geotropa* in *S. variegatus* so se pojavila 5 dpi. Takrat je venelo 15 % oziroma 24 % rastlin, medtem ko je 5 dpi venelo 57 % rastlin pozitivne kontrole ($p<0.01$ in $p<0.05$). Po 14ih dneh je venelo 92 % rastlin pozitivne kontrole, medtem ko je bilo napredovanje bolezenskih znamenj pri rastlinah inokuliranimi z z mešanico *R. solanacearum* in ekstraktov počasnejše, saj je venelo 63 %, 67 %, in 44% rastlin inokuliranih z ekstrakti *T. saponaceum*, *S. variegatus* in *C. geotropa*. Ekstrakt *C. geotropa* je bil

učinkovitejši na rastlinah paradižnika, saj je bila stopnja bolezenskih znamenj statistično značilno nižja 5 do 14 dpi ($p < 0.01$, AUDPC vrednost 48 %) (Slika 13).

Na splošno je bilo napredovanje bolezni počasnejše pri rastlinah krompirja v primerjavi z rastlinami paradižnika, kar je lahko posledica različne reakcije rastlin na okužbo z *R. solanacearum* in prisotnost ekstraktov, npr. *C. geotropa* in *S. variegatus*.



Slika 13: Vpliv izbranih ekstraktov iz gob na napredovanje bakterijskega venenja na rastlinah paradižnika cv. 'Désirée'.

Rastline smo inokulirali v steblo rastlin z *R. solanacearum* (pozitivna kontrola 10^5 CFU/mL) ali mešanico *R. solanacearum* in ekstrakta iz gob. Številke v stolpcih predstavljajo % rastlin, ki imajo izraženo določeno stopnjo bolezenskih znamenj v različnih časovnih točkah. Bolezenska znamenja smo ocenili s številčno lestvico po Winsteadu in Kelmanu (1952), in sicer: ni bolezenskih znamenj (bela); en list uvel (svetlo siva, črte); 2-3 listi uveli (svetlo siva); uveli vsi listi razen vrha rastline (srednje siva); 4, uveli vsi listi in vrh rastline (srednje siva, pike); odmrtje rastline (temno siva). Bolezenska znamenja smo spremljali do 14 dni. Časovne točke v posamezni skupini, pri katerih se porazdelitev bolezenskih znamenj razlikuje od ustrezne porazdelitve pozitivne kontrole, so označene z zvezdico nad stolpci (hi-kvadrat test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Rastline negativne kontrole niso kazale bolezenskih znamenj.

Figure 13: Influence of selected mushroom extracts on the bacterial wilt disease progression in artificially inoculated potted potato plants of cv. ‘‘Désirée’’.

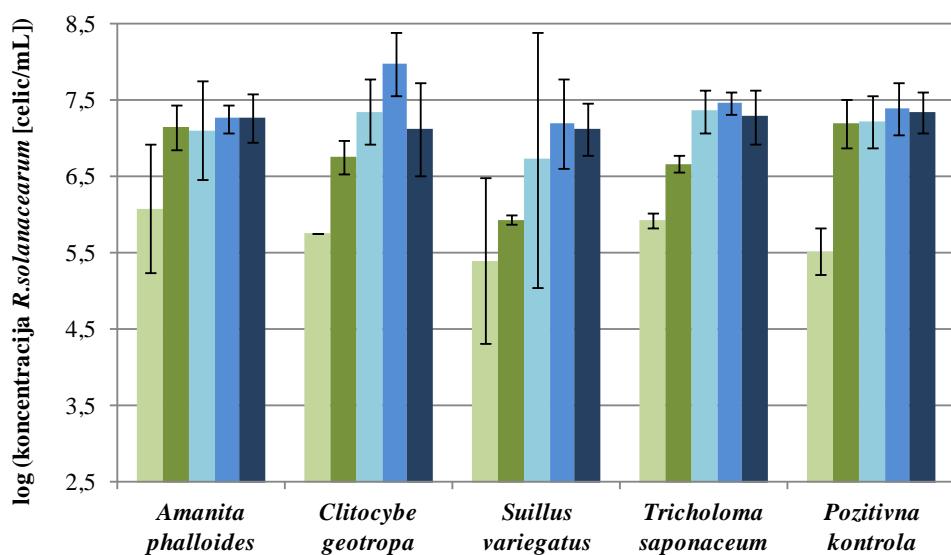
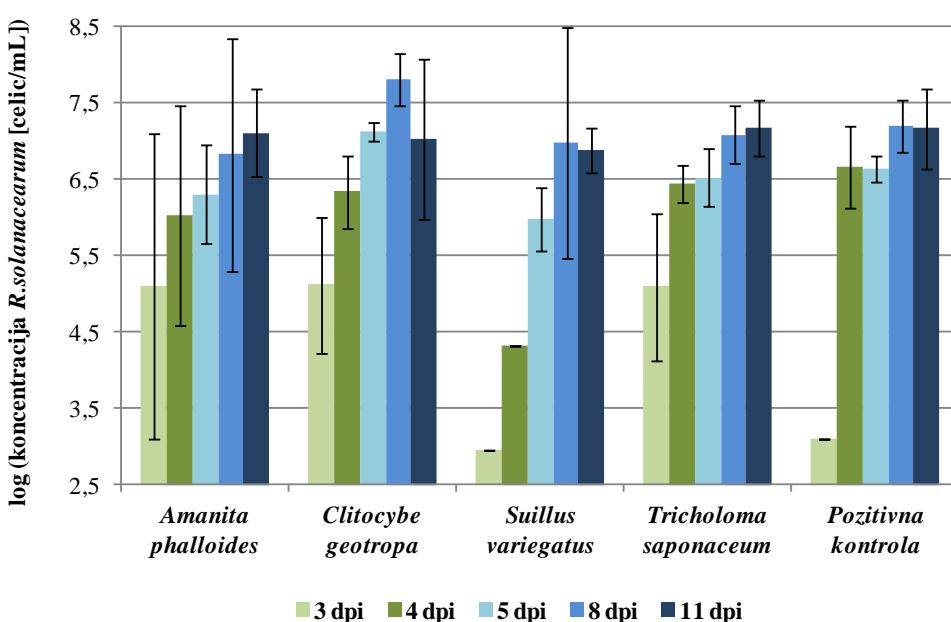
Plants were stem-inoculated with mixture of *R. solanacearum* and mushroom extract or *R. solanacearum* only (positive control, 10^5 CFU/ml). For each time point, symptoms are expressed as percentage of plants with symptoms graded according to Winstead and Kelman (Winstead & Kelman, 1952) represented by different colors no symptoms (white), 1 leaf wilted (light grey, stripes), 2-3 leaves wilted (light grey); all leaves except tip of the plant wilted (medium grey), all leaves and tip of the plant wilted (medium grey, dots), and dead plant (dark grey). Symptoms were recorded up to 14 dpi. Within groups, the time points at which the distribution of symptoms differs from the corresponding distribution in the positive control group, are marked by asterisk above columns (chi-squared test; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$). Plants in the negative control group did not show any symptoms.

4.2.4 Kvantifikacija *R. solanacearum* v rastlinah paradižnika z uporabo real-time PCR

Da bi ugotovili ali ekstrakti vplivajo na širjenje in koncentracijo *R. solanacearum* v rastlini, ter kako slednja vpliva na razvoj bolezenskih znamenj, smo vzorčili 5 mm koščke tkiva paradižnika cv. ‘Moneymaker’ pri prvem in drugem nodiju ter določili koncentracijo bakterij s qPCR (Slika 14, Slika 15). Vzorčili smo 2 do 11 rastlin v različnih časovnih točkah.

Pri vseh vzorcih in pozitivni kontroli, smo bakterije zaznali 3 dpi, še preden so rastline začele veneti, in sicer v visokih koncentracijah (več kot 10^6 celic/mL). Koncentracija bakterij v 2. nodiju pa je bila 3 dpi precej nižja kot v 1. nodiju. 4 dpi so bile koncentracije v 2. nodiju že zelo visoke, kar pomeni, da so se bakterije uspešno širile po rastlini navzgor. 4 dpi smo opazili tudi prva bolezenska znamenja. Kljub napredovanju bolezenskih znamenj, pa koncentracija bakterij do konca poskusa ni več bistveno naraščala (Slika 14). Preliminarni rezultati so pokazali, da je so razlike v koncentracijah večje pri rastlinah inokuliranih z bakterijo in ekstrakti iz gob v primerjavi s pozitivno kontrolo kot pri tistih, ki smo jih inokulirali samo z bakterijami, (Slika 15).

Visoko koncentracijo bakterij v 1. in 2. nodiju smo zaznali tudi pri rastlinah inokuliranih s *C. geotropa* in *S. variegatus*, vendar pa je bilo napredovanje bolezni počasnejše kot pri pozitivni kontroli. To bil lahko pomenilo, da je počasnejše venenje posledica obrambnega sistema rastline, ki se dodatno aktivira ob prisotnosti proteiniskega ekstrakta iz gob. Po drugi strani smo pri rastlinah inokuliranih s *T. saponaceum* zaznali nižjo koncentracijo bakterij in če upoštevamo še nižjo stopnjo bolezenskih znamenj, bi lahko sklepali, da ima ekstrakt *T. saponaceum* bolj neposreden učinek na bakterijske celice.

A**B****Slika 14:** Koncentracija *R. solanacearum* v rastlinah paradižnika.

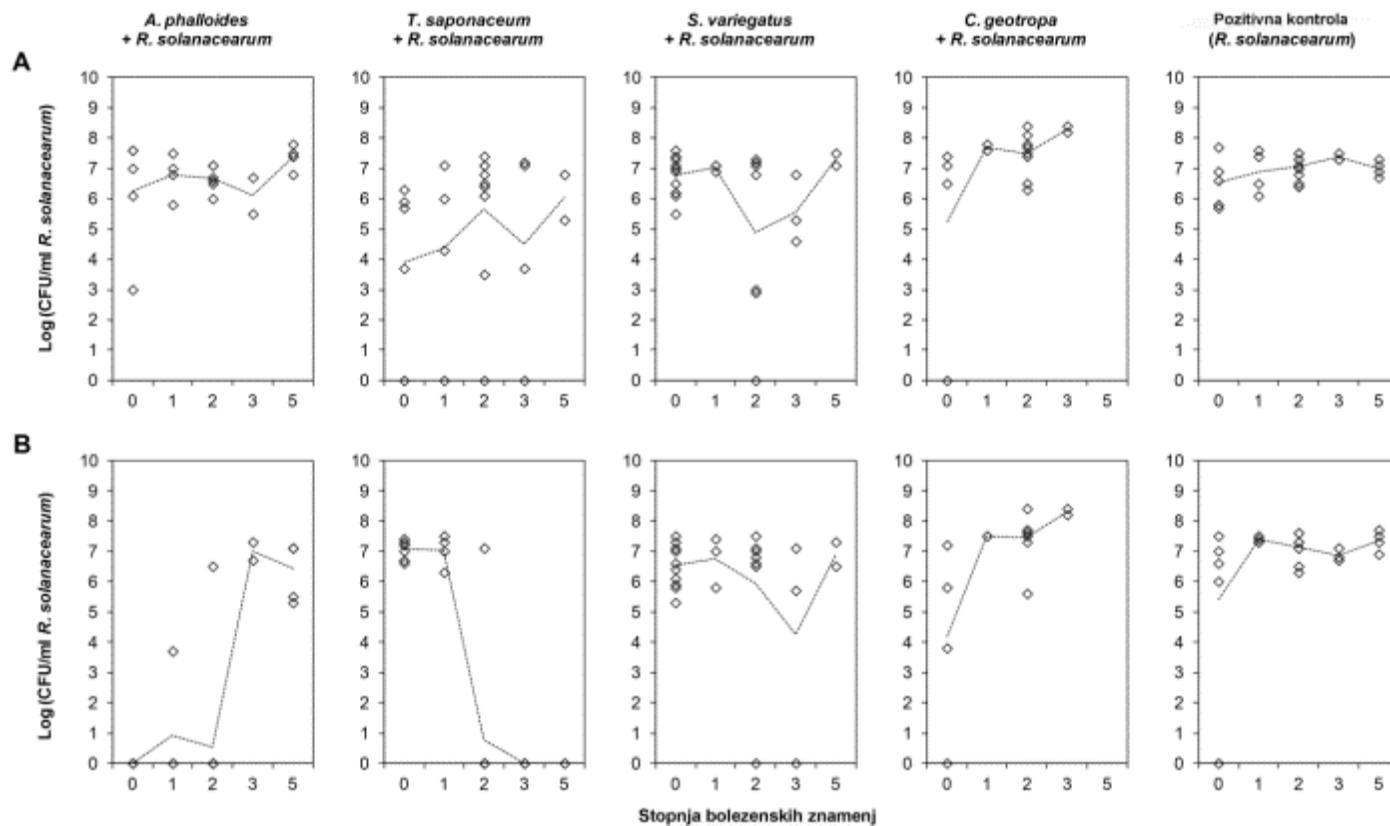
Koncentracija *R. solanacearum* določena s PCR v realnem času (logaritemska lestvica), v prvem (A) in drugem (B) nodiju rastlin paradižnika cv. 'Moneymaker' inokuliranih z *R. solanacearum* in proteinimi ekstrakti iz gob. Vzorčili smo 2 do 7 rastlin paradižnika 3, 4, 5, 8 in 11 dpi.

Figure 14: *R. solanacearum* concentration in tomato plants.

R. solanacearum concentration was determined by real-timePCR analysis (log scale) in the first (A) and in the second node (B) of tomato cv. 'Moneymaker' inoculated with *R. solanacearum* and mushroom protein extracts. 2 to 7 plant samples were taken 3, 4, 5, 8 and 11 dpi.

Neodvisno od stopnje bolezenskih znamenj, smo visoke koncentracije *R. solanacearum* v prvem nodiju zaznali tudi pri rastlinah inokuliranih z *A. phalloides* in pri rastlinah pozitivne kontrole. Pri *A. phalloides* pa smo v 2. nodiju zaznali nižje koncentracije bakterij, kar bi lahko pomenilo, da se bakterije počasneje širijo. Kljub temu pa je bila stopnja bolezenskih znamenj podobna kot pri pozitivni kontroli (Slika 14, Slika 15).

Koncentracijo *R. solanacearum* smo spremljali tudi s testom patogenosti na paradižniku cv. Roma. Tako kot pri cv. 'Moneymaker', je bila koncentracija bakterij v drugem nodiju nižja kot v prvem. Tudi sicer je bila koncentracija bakterij v vseh skupinah rastlin in tekom celotnega poskusa nižja kot pri cv. 'Moneymaker', vendar so se kazali podobni trendi koncentracij pri rastlinah inokuliranih z ekstrakti *A. phalloides*, *S. variegatus* in *T. saponaceum*. Na paradižniku cv. Roma nismo testirali ekstrakta *C. geotropa* (Priloga K). V nekaterih primerih so vrednosti standardnega odklona visoke, kar je posledica tega, da v nekaterih vzorčenih rastlinah bakterij nismo zaznali kljub temu, da smo v povprečju vzorčili 5 rastlin na kontrolo oziroma skupino rastlin inokuliranih z bakterijo in ekstrakti iz gob.



Slika 15: Korelacija med stopnjo bolezenskih znamenj in koncentracijo *R. solanacearum* v steblu umetno okuženih rastlin paradižnika z in brez ekstraktov iz gliv.

Rastline smo inokulirali z mešanico *R. solanacearum* in ekstrakti iz gob oziroma samo z *R. solanacearum* (pozitivna kontrola 10^5 CFU/mL). Tkivo stebla smo vzorčili tako, da smo zajeli različne stopnje bolezenskih znamenj ocenjene po lestvici Winsteada in Kelmana (Winstead in Kelman, 1952). Koncentracijo bakterij (logaritemska lestvica, CFU/mL, diamanti) smo določili s PCRv realnem času v prvem (A) in drugem (B) nodiju nad mestom inokulacije. Z razliko od skupine rastlin, ki smo jih inokulirali z mešanico *C. geotropa* in *R. solanacearum*, pri kateri nismo analizirali rastlin s stopnjo bolezenskih znamenj 5, smo v povprečju analizirali 5 rastlin za posamezno stopnjo bolezenskih znamenj v posamezni skupini.

Figure 15: Correlation of bacterial wilt symptom severity and *R. solanacearum* concentrations in the stem nodes of artificially inoculated tomato plants with and without mushroom extracts.

Plants were stem-inoculated with mixture of *R. solanacearum* and mushroom extract or *R. solanacearum* only (positive control, 10^5 CFU/mL). Numerical grades of Winstead and Kelman scale were used for symptom severity evaluation (Winstead & Kelman, 1952). Bacterial concentrations (logarithmic scale, CFU/ml, represented by diamonds) were determined by direct real-time PCR in the first (A) and the second node (B) above the inoculation point. Except for the *C. geotropa* and *R. solanacearum* co-inoculated plants, for which no plants with the symptom severity grade 5 were analyzed, five plants on average were analyzed for each group and symptom severity level.

4.2.5 Primerjava ocene koncentracije *R. solanacearum*, ki smo jo določili s štetjem na ploščah s tistimi, ki smo jih določili s qPCR

S primerjavo ocene koncentracij dobljenih z različnimi metodami smo v preliminarnih testih želeli preveriti ali z metodo qPCR dovolj dobro ocenimo koncentracijo bakterij v tkivu paradižnika v primerjavi s štetjem kolonij na gojiščih ali štetjem celic pod mikroskopom. Poleg tega smo želeli preveriti ali *R. solanacearum* prehaja v VBNC obliko (angl. viable but not culturable) kot sta opisala Grey in Steck (Grey in Steck, 2001). V primeru, da bi naš sev *R. solanacearum* prehajal v VBNC obliko, bi to še dodatno favoriziralo qPCR kot orodje za spremljanje širjenja bakterij po rastlini. V našem primeru smo iz rastlin inokuliranih samo z *R. solanacearum*, uspešno izolirali bakterije na gojiščih, kar pomeni, da bakterije niso bile v VBNC obliki (Preglednica 6, Slika 16). Koncentracije so bile večinoma nekoliko nižje kot tiste določene s qPCR, kar je verjetno posledica tega, da s qPCR zaznamo DNA mrtvih celic, medtem ko mrtvih celic na gojišču ne zaznamo. Zaradi majhnega števila vzorcev smo opazili tudi posamezna odstopanja. V 1. nodiju, 22 dpi bakterij na gojišču nismo zaznali, kar bi lahko bila posledica suhega tkiva, ki smo ga vzorčili in bi lahko vplivalo na hitrejše propadanje bakterij v tkivu. Prav tako v prvem pravem listu nismo zaznali bakterij na gojiščih, ker so bile v vzorcu prisotne samo mrtve celice, kar smo potrdili z BacLight kitom in štetjem pod mikroskopom. Teoretično bi se lahko s štetjem živih in mrtvih celic pod mikroskopom približali koncentraciji določeni s qPCR. Vendar v našem primeru ni bilo tako, saj so bile koncentracije ocenjenje z mikroskopijo precej nižje od tistih določenih s qPCR (Preglednica 6, Slika 17). To je posledica tega, da so mrtve celice v nekaterih vzorcih skoraj popolnoma razpadle in jih ni bilo mogoče šteti, njihovi ostanki pa so bili vidni kot razpršeno ozadnje, ki fluorescira.

Preliminarni razultati kažejo, da je metoda qPCR primerna za spremljanje širjenja in določanje koncentracije *R. solanacearum* v tkivu paradižnika. Za bolj zanesljive rezultate bi morali primerjati koncentracijo *R. solanacearum* z vsemi tremi metodami, v večjem številu vzorcev rastlinskega tkiva in odvetih v več časovnih točkah.

Preglednica 6: Primerjava koncentracije *R. solanacearum* v tkivu paradižnika določene s qPCR, štetjem na gojiščih in štetjem pod mikroskopom (BacLight) vzorčenem 10 in 22 dpi.

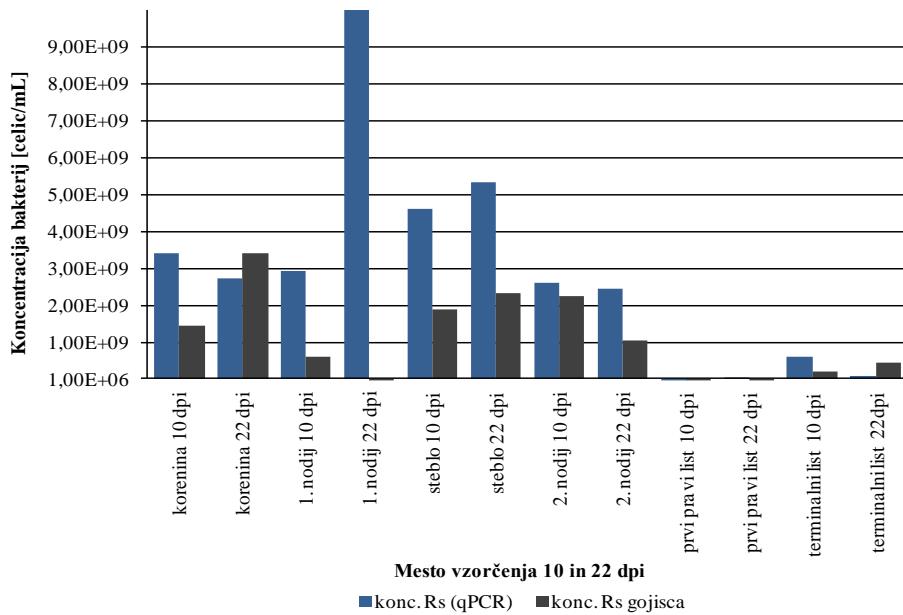
Za preliminarno analizo smo vzorčili po 1 vzorec posameznega dela rastline 10 dpi in 22 dpi ter analizirali 1 tehnično ponovitev 10-krat in 100-krat redčenih vzorcev s PCR v realnem času, 6 tehničnih ponovitev pri redčitvah na trdnih gojiščih ter 10 tehničnih ponovitev pri štetju pod mikroskopom.

Table 6: Comparison of *R. solanacearum* concentrations in tomato tissue 10 and 22 dpi determined with qPCR, colony count on solid medium and cell count under the microscope (BacLight kit).

For the present preliminary analysis, 1 sample was taken from the individual parts of the plant 10 dpi and 22 dpi. 1 technical replicate of each sample diluted 10-fold and 100-fold was analysed in real time PCR, 6 technical replicates for serial dilution of each sample on solid media and 10 technical replicates for each sample under the microscope.

	PCR v realnem času		gojišča		BacLight žive	BacLight mrtve	BacLight žive+mrtve
ime vzorca	koncentracija Rs (celic/mL ^a)						
	10 dpi	22 dpi	10 dpi	22 dpi	22 dpi		
korenina	3,42E+09	2,7E+09	1,43E+09	3,4E+09	2,3E+07	4,8E+08	5,0E+08
1. nodij	2,95E+09	2,5E+10	6,11E+08	0,0E+00	0,0E+00	1,5E+09	1,5E+09
steblo	4,59E+09	5,3E+09	1,89E+09	2,3E+09	1,5E+08	6,3E+08	7,8E+08
2. nodij	2,62E+09	2,5E+09	2,23E+09	1,0E+09	9,2E+07	8,0E+08	8,9E+08
prvi pravi list	2,26E+04	5,8E+07	0,00E+00	0,0E+00	0,0E+00	3,4E+07	3,4E+07
terminalni list	5,81E+07	9,6E+07	1,89E+08	4,6E+08	1,4E+08	1,3E+08	2,6E+08

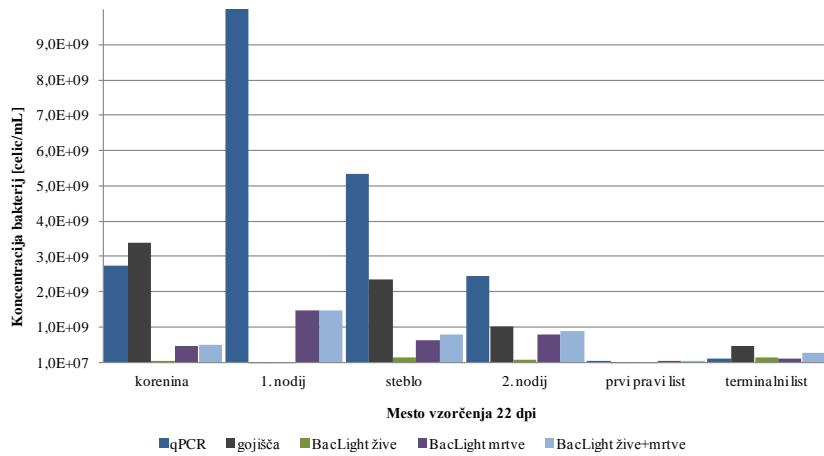
^a koncentracija na gojiščih določena v cfu/mL



Slika 16: Primerjava koncentracije *R. solanacearum* v različnih delih rastline paradižnika 10 dpi in 22 dpi, določene z qPCR [celic/mL] in štetjem kolonij na YPGA gojišču [cfu/mL].

Za preliminarno analizo smo vzorčili 1 vzorec na posameznem delu rastline 10 dpi in 22 dpi.

Figure 16: Comparison of *R. solanacearum* concentrations in different parts of tomato plant 10 dpi and 22 dpi determined with qPCR [cells/mL] and colony count on YPGA medium [cfu/mL]. For the present preliminary analysis, 1 sample was taken from the individual parts of the plant 10 dpi and 22 dpi.



Slika 17: Primerjava koncentracije *R. solanacearum* v različnih delih rastline paradižnika 22 dpi.

Koncentracije smo določili s PCR v realnem času [celic/mL], štetjem kolonij na YPGA gojišču [cfu/mL] in štetjem celic pod mikroskopom (BacLight kit) [celic/mL]. Za preliminarno analizo smo vzorčili po 1 vzorec na posameznem delu rastline 10 dpi in 22 dpi.

Figure 17: Comparison of *R. solanacearum* concentrations in tomato tissue 22 dpi.

Concentrations were determined with real-time PCR [cells/mL], colony count on YPGA medium [cfu/mL] and cell count under the microscope (BacLight kit) [cells/mL]. For the present preliminary analysis, 1 sample was taken from the individual parts of the plant 10 dpi and 22 dpi.

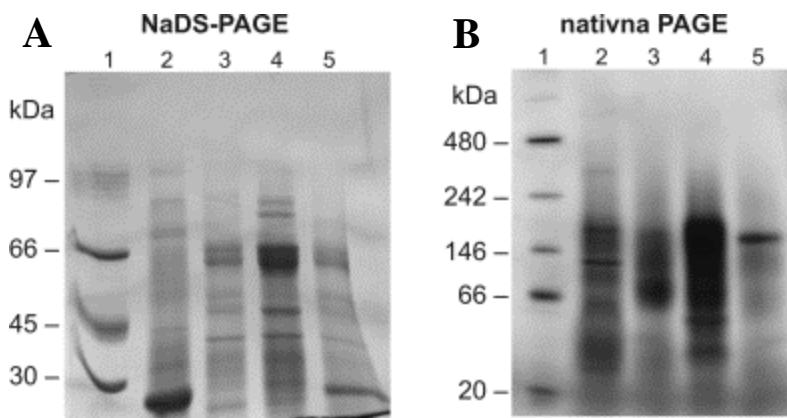
4.3 BIOKEMIJSKE ANALIZE AKTIVNIH PROTEINOV IZ IZBRANIH EKSTRAKTOV IZ GOB IN MICELIJA

Na podlagi rezultatov *in vitro* in *in vivo* testov smo za izolacijo in karakterizacijo aktivnih proteinov izbrali ekstraka *A. phalloides* in *C. geotropa*. Oba ekstrakta sta imela močno protibakterijsko aktivnost *in vitro*, *A. phalloides* je poleg vseh sevov *R. solanacearum*, *R. mannitolilytica*, inhibirala tudi *E. coli*, medtem ko je bila *C. geotropa* najučinkovitejša v *in vivo* testih na rastlinah paradižnika in krompirja. Biokemijske analize smo opravili tudi na ekstraktu micelija *C. geotropa*, ki je prav tako inhibiral *R. solanacearum* *in vitro* in *in vivo*. Prvi korak je bil čiščenje z gelsko in ionsko izmenjevalno kromatografijo, s pomočjo katerih smo ekstrakta razdelili na posamezne frakcije. Spremljali smo protibakterijsko aktivnost frakcij in na podlagi tega izbrali aktivne frakcije, ki smo jih koncentrirali in ponovno čistili. Proteinske profile frakcij smo spremļjali s pomočjo različnih kromatografij.

4.3.1 Izolacija biološko aktivnih proteinov iz *Clitocybe geotropa*

Nanos proteinskega ekstrakta na gel NaDS-PAGE je pokazal prisotnost velikega števila lis, proteinov različne velikosti. Ekstrakti namreč vsebujejo veliko različnih proteinov in proteinских kompleksov (Slika 18, A). Zato smo z namenom izolacije aktivne snovi iz ekstrakta gobe *C. geotropa* ekstrakt najprej razdelili na posamezne frakcije z uporabo gelske (Sephacryl S-200) in ionske izmenjevalne kromatografije (DEAE-SephadexTM).

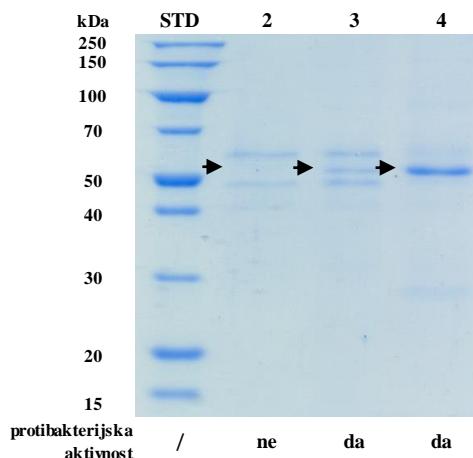
Z *in vitro* testom smo spremļjali protibakterijsko aktivnost in optimizirali analize protibakterijske aktivnosti frakcij in s tem sledili aktivnemu proteinu. Aktivne in posamezne neaktivne frakcije smo nanesli na NaDS-PAGE in primerjali proteinske profile. Z ločitvijo proteinov v posameznih frakcijah na gelu NaDS-PAGE, smo v frakcijah potrdili manjše število lis (proteinov) (Slika 19; Slika 18, A). Ugotovili smo, da neaktivne frakcije *C. geotropa*, pridobljene po ionsko izmenjevalni kromatografiji, ne vsebujejo ~ 60 kDa velikega proteina, medtem ko je bil protein te velikosti prisoten v vseh testiranih aktivnih frakcijah (Slika 19).



Slika 18: Rezultati NaDS-PAGE in nativna PAGE za ekstrakt *C. geotropa* in nekaterih frakcij.

Izolacijo protibakterijskega proteina iz ekstrakta *C. geotropa* izvedemo z gelsko in ionskih izmenjevalno kromatografijo. Frakcije analizirane z SDS-PAGE (A) in Blue-Native PAGE (B): stolpec 1, standard, stolpec 2, ekstrakt *C. geotropa*; stolpec 3, frakcije 71-85 ionsko izmenjevalna kromatografija na DEAE-Sephacel™ pri pH 6,5; stolpec 4, frakcija 18 po gelski kromatografiji na Sephadryl S-200; stolpec 5, frakcije 86-105 ionsko izmenjevalna kromatografija na DEAE-Sephacel™ pri pH 6,5; (avtor: Jerica Sabotič, IJS).

Figure 18: Results of the SDS-PAGE and Blue-native PAGE for a *Clitocybe geotropa* extract and fractions. Isolation of antibacterial protein from *C. geotropa* extract was performed by size-exclusion and ion-exchange chromatographies and fractions analysed by SDS-PAGE (A) and blue native PAGE (B): lane 1, molecular mass standard; lane 2, *C. geotropa* extract; lane 3, fractions 71-85 of ion-exchange on DEAE-Sephacel™ performed at pH 6.5; lane 4, fraction 18 of the size-exclusion chromatography on Sephadryl S-200; lane 5, fractions 86-105 of ion-exchange on DEAE-Sephacel™ performed at pH 6.5; (author: Jerica Sabotič, IJS).



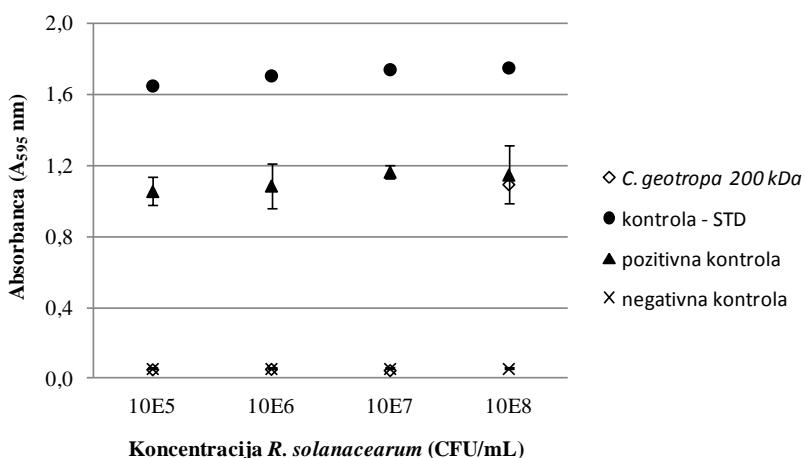
Slika 19: Rezultati NaDS-PAGE za frakcije *C. geotropa*.

Frakcije so bile pridobljene po ionsko izmenjevalni kromatografiji na DEAE-Sephacel™ pri pH 6,5. STD: standard; stolpec 2: frakcija 45, neaktivna v *in vitro* testih; stolpec 3: frakcija 48, aktivna v *in vitro* testih; stolpec 4: frakcija 51, aktivna v *in vitro* testih.

Figure 19: Results of the SDS-PAGE *Clitocybe geotropa* fractions.

Fractions were obtained after ion-exchange on DEAE-Sephacel™ performed at pH 6.5. STD: molecular mass standard; lane 2: fraction 45, inactive *in vitro*; lane 3: fraction 48, active *in vitro*; lane 3: active *in vitro*.

Ko smo frakcije s protibakterijsko aktivnostjo nanesli na nativno PAGE, smo najmočnejšo liso zaznali pri velikosti ~ 200 kDa (Slika 18, B). Z analizo SDS-PAGE smo ugotovili, da gre za proteinski kompleks, ki je sestavljen iz proteinske lise velike ~ 60 kDa in 5 do 6 šibkejših lis (Slika 19, Slika 18). Liso iz nativne PAGE smo izrezali, eluirali proteine in jih testirali proti *R. solanacearum* v *in vitro* testu proti različnim koncentracijam bakterij. Ugotovili smo, da ima ~ 200 kDa proteinski kompleks, katerega del je tudi ~ 60 kDa protein, protibakterijski in baktericiden učinek (Slika 20). Čeprav smo protibakterijsko aktivnost ~ 200 kDa proteinskega kompleksa testirali z eno ponovitvijo proti različnim koncentracijam bakterij, to ne zmanjšuje verodostojnosti rezultatov, saj so predhodne analize pokazale, da je test zagotavlja ponovljivost med posameznimi replikati. Lažno negativnim rezultatom pa smo se izognili s preverjanjem sterilnosti ekstraktov oziroma vzorcev.



Slika 20: Protibakterijska aktivnost 180 - 200 kDa proteinskega kompleksa *C. geotropa* izrezanega iz nativne PAGE.

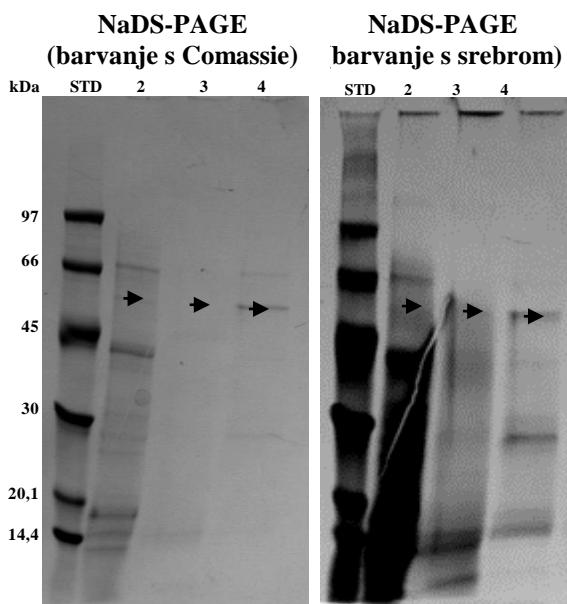
Proteinski kompleks je v primerjavi s pozitivno kontrolo popolnoma inhibiral rast *R. solanacearum* v koncentracijah 10^5 , 10^6 in 10^7 celic/mL, ni pa inhibiral *R. solanacearum* v koncentraciji 10^8 celic/mL. Kot dodatno kontrolo smo iz gela izrezali lise standarda (STD), da bi preverili ali sestavine gela ali kateri drugi naključni protein inhibira *R. solanacearum*. Učinek je bil nasproten, saj je bila rast bakterij hitrejša, kar je posledica dodatnih hrаниh v gelu. Prikazane so povprečne vrednosti in standardni odkloni štirih tehničnih ponovitev pozitivne in negativne kontrole. Vzorce smo testirali z eno ponovitvijo.

Figure 20. Antibacterial activity of the 180 - 200 kDa *C. geotropa* protein complex cut out and eluted from native PAGE.

Compared to positive control, protein complex completely inhibited *R. solanacearum* added in concentrations 10^5 , 10^6 and 10^7 cells/mL but did not inhibit concentration of 10^8 cells/mL. As an additional control, standard (STD) bands were cut out and eluted to confirm that inhibition is not a consequence of gel components and/or random protein. Average values and standard deviation of four technical replicates of positive and negative control are represented above. Samples were tested in 1 replicate.

4.3.2 Izolacija biološko aktivnih proteinov iz ekstrakta micelija *Clitocybe geotropa*

Izolacijo protibakterijskega proteina iz ekstrakta micelija *C. geotropa* smo izvedli z gelsko in ionsko izmenjevalno kromatografijo. Vzporedno smo v *in vitro* testih spremljali protibakterijsko aktivnost frakcij in s tem sledili aktivnemu proteinu (Slika 9). Aktivne in posamezne neaktivne frakcije smo nanesli na NaDS-PAGE in ugotovili, da aktivne frakcije pridobljene po gelski kromatografiji, vsebujejo ~ 60 kDa velik protein, medtem ko ta ni prisoten v neaktivnih frakcijah. Ko smo vzorce nanesli na nativno PAGE, smo najmočnejšo liso zaznali pri velikosti ~ 200 kDa. Prav tako smo potrdili, da ima ~ 200 kDa proteinski kompleks, katerega del je tudi ~ 60 kDa protein, protibakterijski učinek, LAO aktivnost, specifičnost za različne amino kisline in podoben pH optimum. To še dodatno dokazuje, da gre za podoben kompleks kot pri ekstraktu *C. geotropa* (Slika 21).



Slika 21: Rezultati NaDS-PAGE ekstrakta micelija *C. geotropa* in nekaterih frakcij barvanega s Comassie modrim (levo) in s srebrom (desno).

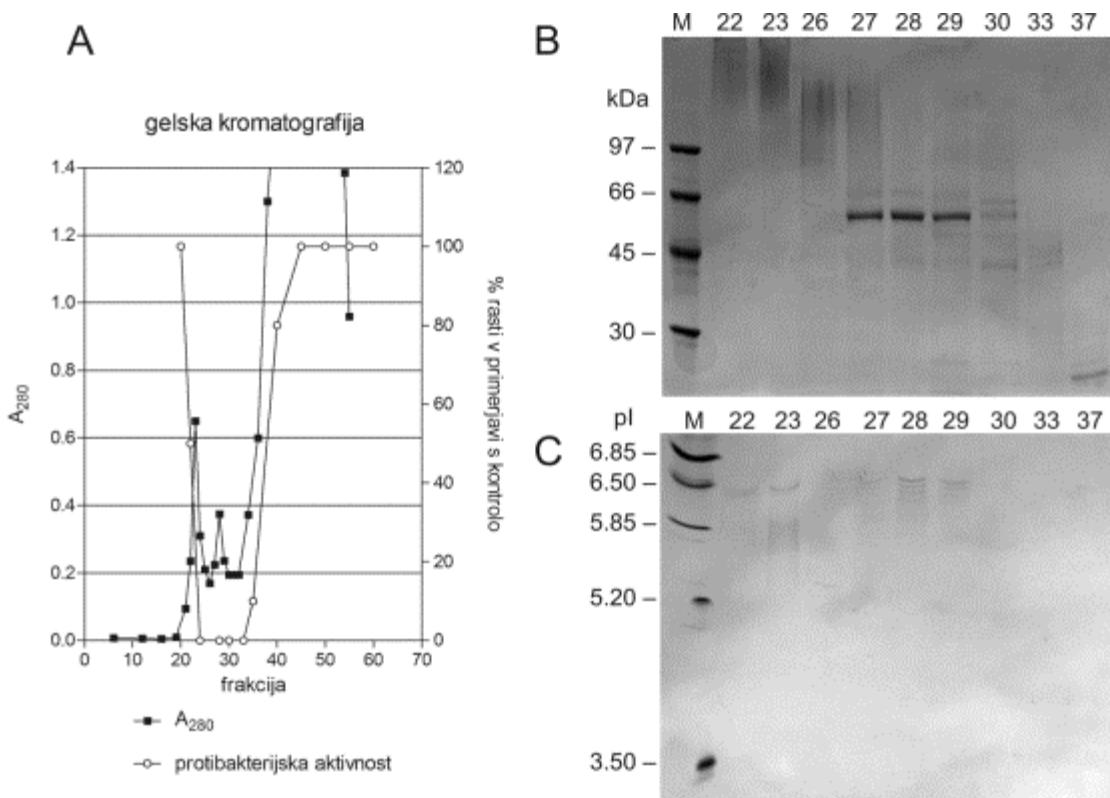
Izolacijo protibakterijskega proteina iz ekstrakta *C. geotropa* izvedemo z gelsko in ionskih izmenjevalno kromatografijo. Ekstrakt in frakcije analizirane z SDS-PAGE: STD, standard, stolpec 2, ekstrakt micelija *C. geotropa*; stolpec 3, frakcija 18 po gelski kromatografiji na Sephadex G-200; stolpec 4, frakcija 20 po gelski kromatografiji na Sephadex G-200; (avtor: Jerica Sabotič, IJS).

Figure 21: Results of the SDS-PAGE for a *Clitocybe geotropa* mycelium extract and fractions.

Isolation of antibacterial protein from *C. geotropa* extract was performed by size-exclusion and ion-exchange chromatographies and fractions analysed by SDS-PAGE: STD, molecular mass standard; lane 2, *C. geotropa* mycelium extract; lane 3, fraction 18 of the size-exclusion chromatography on Sephadex G-200; lane 4, fraction 20 of the size-exclusion chromatography on Sephadex G-200; (author: Jerica Sabotič, IJS).

4.3.3 Izolacija biološko aktivnih proteinov iz *Amanita phalloides*

Izolacijo proteinske frakcije s protibakterijsko aktivnostjo iz ekstrakta *A. phalloides* smo tako kot pri *C. geotropa* izvedli z gelsko in ionsko izmenjevalno kromatografijo. Po analizi z SDS-PAGE in izoelektričnim fokusiranjem smo v frakcijah s protibakterijsko aktivnostjo opazili \sim 60 kDa liso, ki je na nativnem PAGE kazala približno molekulsko maso 200 kDa in pl 6,5 (Slika 22). Za \sim 200 kDa liso smo po izpiranju izrezane lise iz gela potrdili protibakterijsko delovanje *in vitro*.



Slika 22: Rezultati NaDS-PAGE in nativna PAGE za *Amanita phalloides*.

Protibakterijski protein izoliramo iz ekstrakta *A. phalloides* z uporabo gelske kromatografije. Gelska kromatografija in analiza protibakterijske aktivnosti v frakcijah (A). NaDS-PAGE (B) in izoelektrično fokusiranje (C) in analiza frakcij iz gelske kromatografije (A). Števila nad stolpcji nad (B) in (C) ustrezajo frakcijam v (A); Stolpec M označuje molekulska masa markerja v (B) in pI markerja v (C) (avtor: Jerica Sabotič in Jože Brzin, IJS).

Figure 22: Results of the SDS-PAGE and Blue-native PAGE for *Amanita phalloides*.

Antibacterial protein was isolated from *Amanita phalloides* extract using size-exclusion chromatography of *A. phalloides* extract. Size-exclusion chromatography and analysis of antibacterial activity in fractions (A). SDS-PAGE (B) and isoelectric focusing (C) analysis of fractions from size-exclusion chromatography in panel A. Numbers above lanes in panels B and C correspond to fractions in panel A; lane M denotes the molecular mass marker in panel B and pI marker in panel C (author: Jerica Sabotič in Jože Brzin, IJS).

4.3.4 Masna spektrometrija proteinov *Clitocybe geotropa* in *Amanita phalloides*

4.3.4.1 Clitocybe geotropa

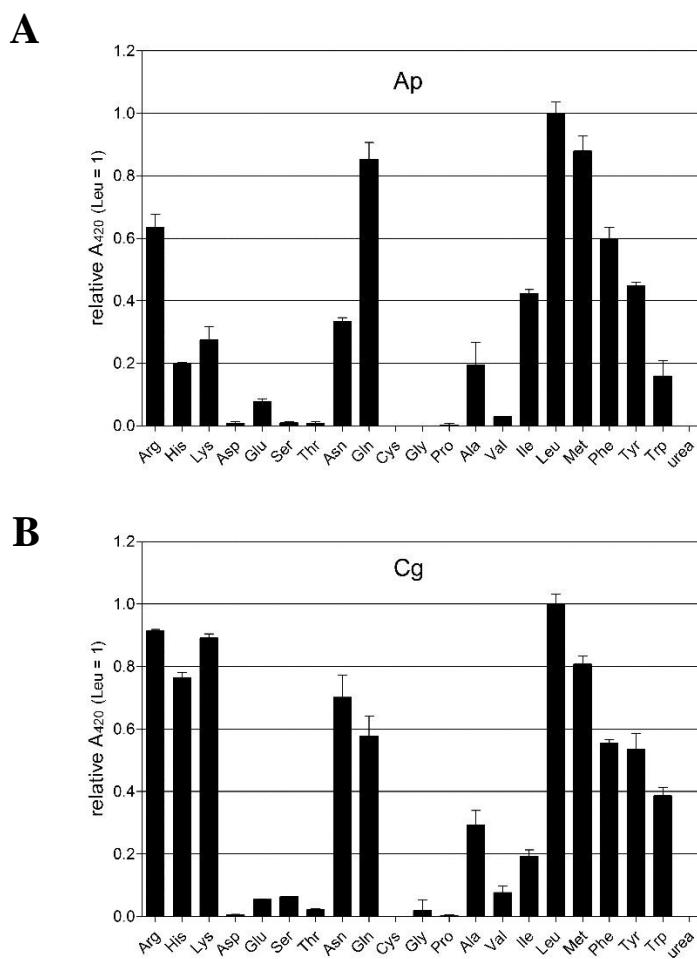
Analiza masne spektrometrije ~ 60kDa lise je liso opredelila kot dihidrolipoamid dehidrogenazo (ABA73359) kot najbolj zanesljiv zadetek (Priloga M, B). To je potrdila tudi analiza masne sprektrometrije pik izrezanih iz 2D gelske elektroforeze (Priloga M, A). Določeno je bilo N-terminalno zaporedje (TQKFDVVVIGAGPG), ki je potrdilo identičnost z N-terminalnim delom dihidrolipoamid dehidrogenaze iz *Pseudomonas* sp. Z masno sprektrometrijo smo analizirali tudi lise (proteine) iz ekstrakta micelija *C. geotropa*, ki pa ni vrnila zanesljivih rezultatov, kar je verjetno posledica slabega pokritja anotiranih zaporedij v bankah.

4.3.4.2 Amanita phalloides

N-terminalno zaporedje je bilo določeno z degradacijo po Edmanu, vendar nismo našli podobnosti z drugimi proteini v podatkovnih bazah. Protein je N-glikoziliran. Po deglikozilaciji s pomočjo rekombinantne N glikozidaze F smo ~ 60 kDa liso izrezali iz NaDS-PAGE, razrezali s tripsinom ter pripravili vzorec za analizo z masno spektrometrijo. Protein je bil identificiran kot toxophallin (ADA58360), ki je oksidaza L-amino kislin in je bila potrjena z encimskimi testi. LAO aktivnost je bila potrjena tudi v *C. geotropa* (frakcija 18), ki smo jo dobili z gelsko kromatografijo (Slika 18).

4.3.5 Analiza L-amino oksidazne (LAO) aktivnosti ekstraktov *C. geotropa* in *A. phalloides*

Frakcije, ki smo jih izolirali iz *A. phalloides* in *C. geotropa* imajo LAO aktivnost z različnimi specifičnosti za L-amino kisline (Slika 23). LAO aktivnost micelija *C. geotropa* je enaka kot pri proteinih izoliranih iz trosnjakov. Amino kislina L-levcin je optimalen substrat za vse tri. Encimska aktivnost je bila v vseh primerih preprečena z dodatkom askorbinske kisline. Frakciji obeh gob imata široko pH območje delovanja, saj je pri obeh prisotna več kot 50 % encimska aktivnost v območju pH 3 do pH 10. Optimum za encimsko aktivnost je pri pH 5 za *C. geotropa* in pri pH 6 za *A. phalloides*.



Slika 23: Prikaz analize specifičnosti L-amino oksidazne aktivnosti (LAO) proteinskih frakcij *Amanita phalloides* (A) in *Clitocybe geotropa* (B).

Analizirali smo specifičnost LAO aktivnosti proteinskih frakcij *A. phalloides* (zgornja slika) in *C. geotropa* (spodnjega slike). Frakcije smo redčili 5-krat. Redčitev je bila določena kot najprimernejša v prejšnjih eksperimentih (ni prikazano). V test so bile vključene vse L-amino kisline in urea za negativno kontrolo. pH pufra je bil 7,5, teste pa smo izvedli pri 37 °C. Rezultati za *A. phalloides* so prikazani po 30 minutah inkubacije in *C. geotropa* po 60 minutah inkubacije. Vrednosti smo normalizirali na Leu, ki je optimalen substrat za obe oksidazi; (avtor: Jerica Sabotič, IJS).

Figure 23: Results of the analysis of the specificity of L-amino-acid oxidase (LAO) activity for *Amanita phalloides* (A) and *Clitocybe geotropa* (B) protein fractions.

The specificity of L-amino-acid oxidase (LAO) activity for *Amanita phalloides* (upper panel) and *Clitocybe geotropa* (lower panel) protein fractions was analysed. Fractions were diluted 5-times which was determined as an appropriate concentration in previous experiments (not shown). All L-amino-acids were included in the test and urea for negative control. Buffer pH was set to 7.5 and tests were performed at 37 °C. Results for *A. phalloides* are shown at 30 minutes of incubation and for *C. geotropa* at 60 min of incubation. Values were normalized to Leu, which is the optimal substrate for both oxidases; (author: Jerica Sabotič, IJS).

4.3.6 Primerjava protibakterijske in LAO aktivnosti

Da bi ugotovili ali je inhibicija *R. solanacearum* povezana s prisotnostjo oksidaz L-amino kislin v ekstraktu oziroma frakcijah, smo primerjali protibakterijsko in LAO aktivnost izbranih ekstraktov in frakcij. Vključili smo tudi ekstrakte, ki v prejšnjih testih niso kazali protibakterijske aktivnosti, npr. *A. bisporus* in *M. procera*, da bi preverili ali je pri njih prav tako prisotna LAO aktivnost (Preglednica 7). V vseh primerih smo v ekstraktih in frakcijah s protibakterijsko aktivnostjo potrdili tudi LAO aktivnost. Tako je pri ekstraktih in frakcijah *A. phalloides*, *C. geotropa*, *Lepista nuda* in *T. mesentericum* inhibicija bakterij verjetno posledica prisotnosti oksidaz L-amino kislin (Slika 24). Ekstrakt *T. saponaceum* je tako kot v prejšnjih poskusih močno inhibiral bakterije *in vitro* in *in vivo*, vendar pa v ekstraktu nismo zaznali LAO aktivnosti. Prav tako frakcija *T. saponaceum* ni inhibirala bakterij, kar je verjetno posledica razredčitve oziroma izgube proteina pri kromatografskem čiščenju (Preglednica 7).

Preglednica 7: Primerjava LAO in protibakterijske aktivnosti izbranih ekstraktov in frakcij

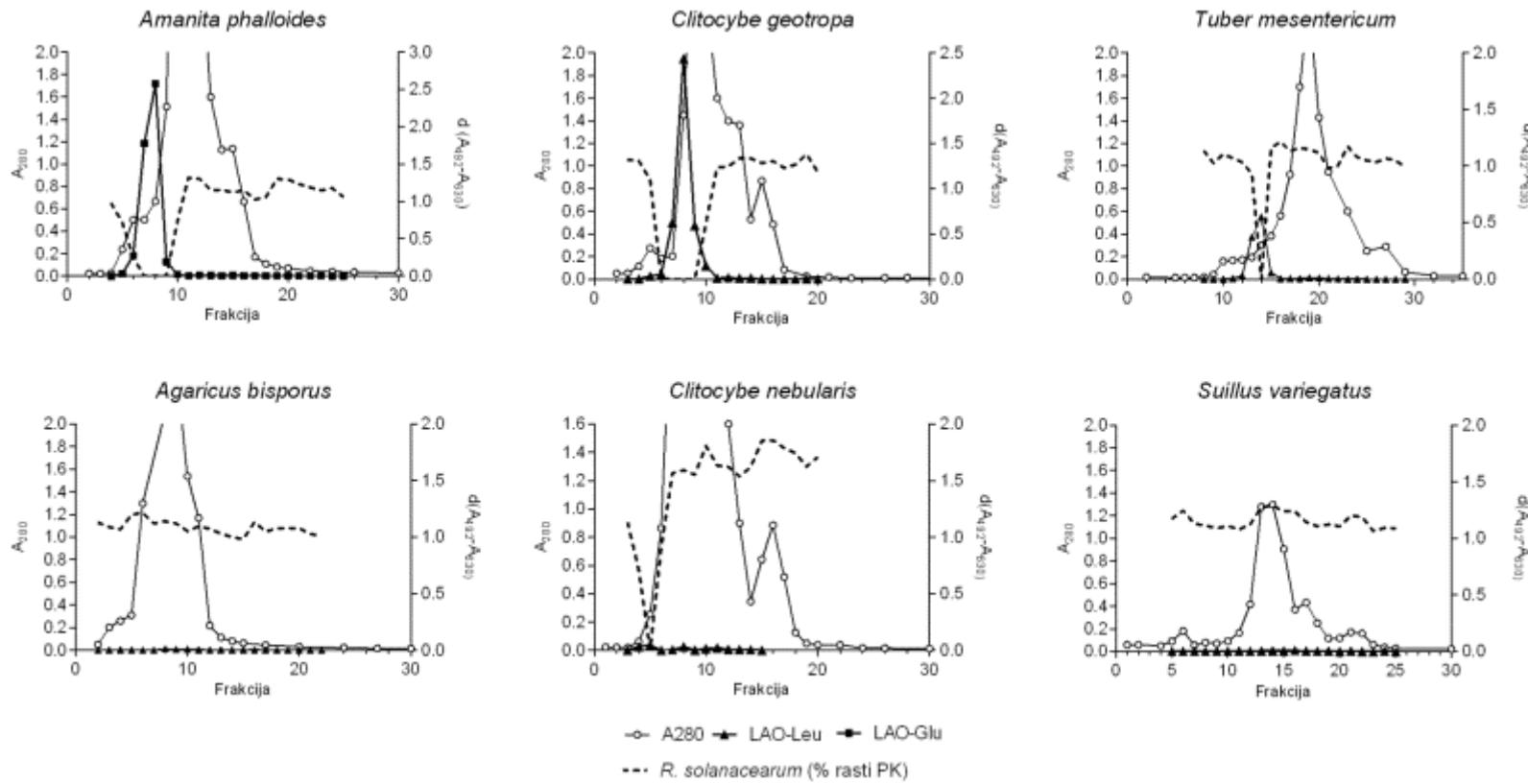
Table 7: Comparison of LAO and antibacterial activity of the selected mushroom extracts.

ekstrakt/frakcija gobe	ekstrakt	frakcija	LAO aktivnost (Leu) (+/-)	frakcija	ekstrakt
	maks. vrednost A ₄₉₂ nm - A ₆₀₀ nm	maks. vrednost A ₄₉₂ nm - A ₆₀₀ nm		protibakterijska aktivnost <i>in vitro</i> (+/-)	
<i>A. bisporus</i>	0,0	0,0	-	-	-
<i>A. phalloides</i>	2,7	1,9	+	+	+
<i>A. phalloides</i> (Asn)*	nt	1,0	+	+	+
<i>A. phalloides</i> (Glu)*	nt	2,6	+	+	+
<i>C. geotropa</i>	0,2	2,4	+	+	+
<i>C. nebularis</i>	0,0	0,0	-	-	-
<i>Coprinopsis sp.</i>	0,0	0,0	-	-	-
<i>H. erubescens</i>	0,0	0,0	-	-	nt
<i>L. nuda</i>	0,1	0,1	+	+	nt
<i>M. procera</i>	0,0	0,0	-	-	-
<i>S. variegatus</i>	0,0	0,0	-	-	-
<i>T. mesentericum</i>	0,1	0,4	+	+	-
<i>T. saponaceum</i>	0,0	0,0	-	-	+

+ prisotna protibakterijska oziroma LAO aktivnost

- ni protibakterijske oziroma LAO aktivnosti

*LAO aktivnost pozitivna tudi za amino kislini Asn in Glu



Slika 24: Primerjava LAO in protibakterijske aktivnosti izbranih frakcij.

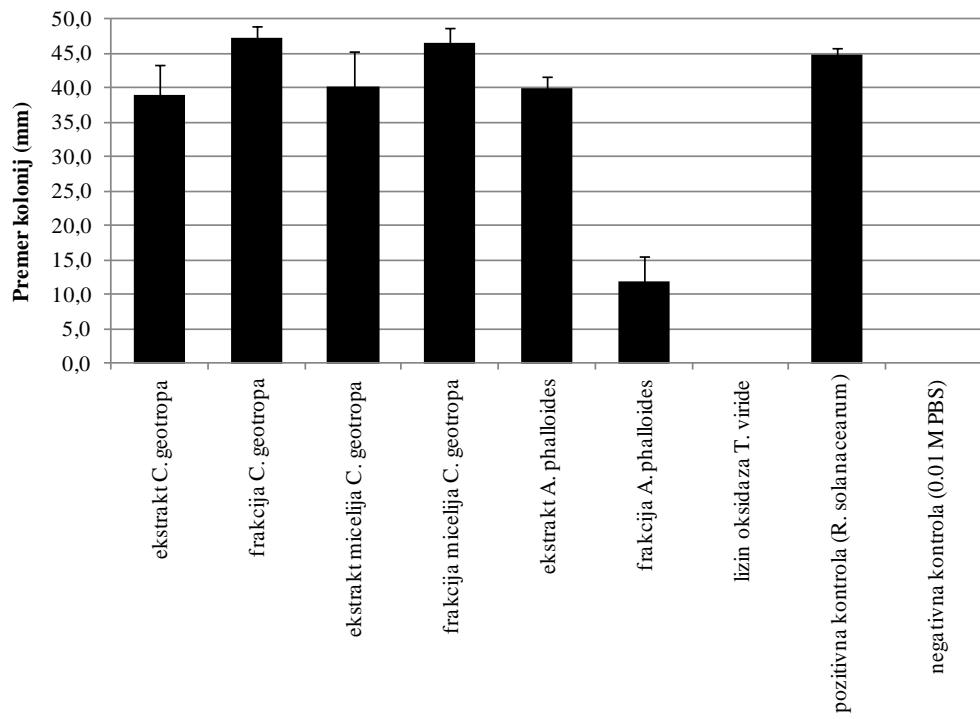
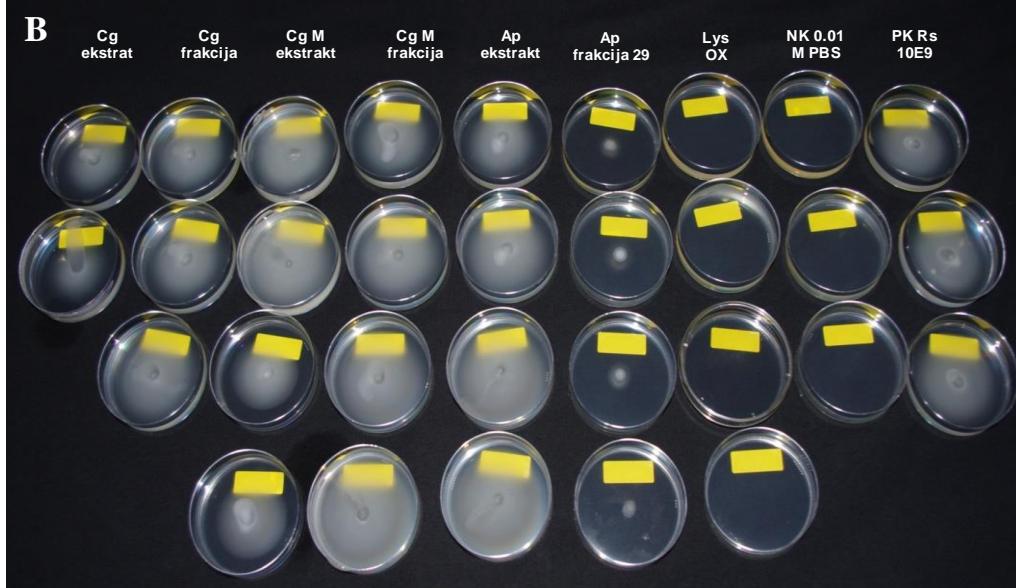
Frakcije *A. phalloides*, *C. geotropa* in *T. mesentericum* so inhibirale bakterije *in vitro*, prav tako so imele LAO aktivnost. Kot je vidno na grafih, obe aktivnosti sovpadata. To potrjuje tudi analiza ekstraktov *A. bisporus*, *C. nebularis* in *S. variegatus*, ki niso inhibirali *R. solanacearum*, in prav tako niso imeli LAO aktivnosti.

Figure 24: Comparison of LAO and antibacterial activity of the selected fractions.

A. phalloides, *C. geotropa* and *T. mesentericum* fractions inhibited bacteria *in vitro* and LAO was detected. Both activities correlate as it is shown on the graphs. Correlation has also been confirmed by the analysis of negative fractions *A. bisporus*, *C. nebularis* in *S. variegatus*, which did not inhibit *R. solanacearum* *in vitro* and did not possess LAO activity.

4.3.7 Vpliv ekstraktov in frakcij *A. phalloides* in *C. geotropa* na gibljivost *R. solanacearum*

Z merjenjem premera kolonij *R. solanacearum* smo želeli preveriti ali ekstrakti in/ali frakcije *A. phalloides* in *C. geotropa* vplivajo na gibljivost *R. solanacearum in vitro*, po čemer bi lahko sklepali tudi na gibljivost bakterije v rastlinah. V tem preliminarnem testiranju je bil premer kolonij najmanjši pri frakciji *A. phalloides*, kar je verjetno posledica hitrega uničenja bakterijskih celic zaradi prisotnosti protibakterijskega proteina v visoki koncentraciji. Podoben učinek ima tudi lizin oksidaza in *T. viride*, ki je takoj uničila vse bakterijske celice. Trendi kažejo, da se premer kolonij pri frakciji ekstrakta *C. geotropa* in micelija *C. geotropa*, ne razlikuje bistveno od pozitivne kontrole, medtem ko smo pri vseh treh ekstraktih izmerili manjše premere kolonij. Za podrobnejše razumevanje vpliva proteinov iz gob bi bilo v nadaljnjih raziskavah potrebno analizirati večje število tehničnih ponovitev pri posameznem vzorcu (Slika 25).

A**B**

Slika 25: Gibljivost *R. solanacearum* v prisotnosti ekstraktov in frakcij *A. phalloides* in *C. geotropa*.
Gibljivost (A) smo spremljali z merjenjem premera kolonij na mehkem agarju z dodanim triptonom (B). Za vsak vzorec smo merili premere kolonij *R. solanacearum* na 2 do 5 ploščah. Na sliki A so prikazana povprečja s standardnimi odkloni.

Figure 25: *R. solanacearum* motility in the presence of *A. phalloides* and *C. geotropa* extracts and fractions. Motility (A) was monitored with measurement of colony diameter on soft agar plates with typtone (B). Colony diameter was measured for each sample on 2 to 5 agar plates. Figure A represents average colony diameter with standard deviation.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Rastlinske bolezni so še vedno med najbolj omejujočimi dejavniki kmetijske produkcije. Glede na pomen trajnostnega kmetijstva, postaja klasično zatiranje rastlinskih patogenih organizmov, kot povzročiteljev bolezni, vse bolj zaskrbljujoče, v smislu pridelave zdrave hrane, kakovosti okolja in odpornosti škodljivih organizmov proti kemikalijam. To narekuje potrebo po dodatnem alternativnem upravljanju z rastlinskimi patogeni, ki bi bilo manj odvisno od sintetičnih pesticidov kot primarnim sredstvom za njihovo zatiranje.

5.1.1 Višje glive so slabo raziskan, a pomemben vir protimikrobnih snovi

Raziskav o višjih glivah kot možnem viru novih in uporabnih spojin je zelo malo. Trenutno na trgu še ni učinkovitega biološkega ali kemičnega sredstva za nadzor in zatiranje bakterije *R. solanacearum*. Edini primer proteina iz višjih gliv, ki so ga testirali proti rastlinskim patogenim bakterijam, so objavili Zhen in sodelavci (2010). Protein so izolirali iz gobe *Clitocybe sinopica*, inhibiral pa je bakterije *Rhizobium rhizogenes*, *R. radiobacter*, *R. vitis*, *Xanthomonas oryzae* in *X. malvacearum* *in vitro*. Vendar pa inhibitornih lastnosti proteina niso testirali na rastlinah. Naša raziskava je prva tovrstna študija, v okviru katere smo proučili protibakterijske učinke ekstraktov in čistih proteinov iz gob, proti *R. solanacearum* *in vitro* kot tudi *in vivo*.

Do sedaj poročajo o naravnih snoveh in mikroorganizmih, ki inhibirajo bakterijsko venenje na rastlinah, ki ga povzroča *R. solanacearum*. Mednje sodijo eterična olja (Ji in sod., 2005; Hong in sod., 2011) biokontrolne nižje glive in bakterije, na primer *Pythium oligandrum* (Hase in sod., 2008), bakterije iz rodov *Acinetobacter* in *Enterobacter* (Xue in sod., 2009), *Bacillus amyloliquefaciens* (Wei in sod., 2011; Tan in sod., 2013) in druge bakterije iz rizosfere paradižnika (Aliye in sod., 2008). Slabost pa je predvsem ta, da je učinkovitost biokontrolnega sredstva močno odvisna od klimatskih pogojev (Pal in sod., 2006; Sundin in sod., 2009). Nadzor *R. solanacearum* bi bil možen tudi z biofumigacijo, pri čemer se največkrat uporablja rastlinski ekstrakti in eterična olja (Pradhanang in sod., 2003; Ji in sod., 2005; Paret in sod., 2010).

5.1.2 Presejalni testi so ključni za hiter in učinkovit nabor biološko aktivnih ekstraktov in proteinov

Kot presejalni test smo uporabili test v mikrotitrski ploščici, ki smo ga za naše potrebe prilagodili na osnovi testa MIC (EUCAST, 2003). Poleg visoke zmogljivosti, je ena izmed njegovih prednosti tudi možnost uravnavanja koncentracije *R. Solanacearum*, ki pride v neposreden stik z inhibitornimi molekulami. To pa ne velja za test cone inhibicije, ki se sicer zelo pogosto uporablja za testiranje protibakterijske aktivnosti (Andrews, 2001). V preliminarnih testih se je izkazalo, da je občutljivost testa cone inhibicije slabša v primerjavi s testom v mikrotitrski ploščici, saj nismo zaznali delne inhibicije ekstraktov zaradi preraščanja bakterij (Erjavec, 2007). Kot smo potrdili v naši raziskavi za ekstrakt *S. variegatus*, lahko ekstrakti, ki le delno inhibirajo bakterije *in vitro*, močno zavirajo bolezenska znamenja *in vivo*.

Identificirali smo 15 ekstraktov iz 94 različnih vrst višjih gliv (16 %), ki so inhibirali *R. solanacearum*. V družinah *Amanitaceae* in *Tricholomataceae* so do sedaj izolirali številne protimikrobne molekule z nizko in visoko molekulsko maso (Vetter, 1998; Yoshikawa in sod., 2002; Guo in sod., 2005; Zhao in sod., 2009; Stasyk in sod., 2010; Antonyuk in sod., 2010). Tudi v naši raziskavi je bilo več ekstraktov, ki so inhibirali *R. solanacearum*, iz rodov *Amanitaceae* in *Tricholomataceae* (Preglednica 2). Kljub temu pa aktivnost ekstraktov ni bila omejena na specifično sistematsko kategorijo gliv.

5.1.3 Ekstrakt micelija gob kot vir protibakterijskih proteinov

Uspešno smo gojili micelij *C. geotropa* na trdnem in v tekočem gojišču ter pokazali, da imajo tako ekstrakt micelija, kot koncentrirano gojišče, v katerem je micelij rasel, protibakterijsko aktivnost. Na podlagi tega in analiz prisotnosti aktivnih proteinov različne velikosti sklepamo, da je v ekstraktu micelija najverjetneje prisoten in aktiven isti protibakterijski protein, kot v ekstraktu gobe.

Tako kot pri ekstraktih iz gob, smo inhibitorno aktivnost ekstraktov micelija in filtrata gojišča testirali v mikrotitrskih ploščicah. Zanimiva metoda testiranja protibakterijske aktivnosti micelija, je gojenje micelija na steklenih kroglicah (van Schöll in sod., 2006; Essig

in sod., 2014). V nedavni raziskavi so micelij *Coprinopsis cinerea* gojili na steklenih kroglicah, ki so bile namočene v tekoče gojišče. Po štirih dneh so gojišče zamenjali z gojiščem, v katerem so rasle po gramu pozitivne bakterije. Po 48ih urah so bakterijsko suspenzijo odstranili in spektrofotometrično določili koncentracijo bakterij v primerjavi s pozitivno kontrolo. Z gojenjem micelija na kroglicah in kasnejšo potopitvijo v bakterijsko suspenzijo so posnemali naravno okolje gline, ki se tudi v naravnem okolju sooča s kompleksnim naborom različnih bakterij. Ta način omogoča lažje spremeljanje kompeticije in interakcij med glivo in bakterijo (Essig in sod., 2014). Za testiranje protibakterijske aktivnosti micelija *C. geotropa* ta metoda ni najprimernejša, saj micelij raste zelo počasi in bi ga bakterije hitro prerasle. V primeru optimizacije rasti in hitro rastočih micelijev, pa je metoda zelo uporabna predvsem z vidika spremeljanja interakcij med bakterijo in glivo.

V primeru, da micelij proizvaja protibakterijski protein, je to velika prednost v primerjavi z nabiranjem trosnjakov, saj lahko neprestano proizvajamo tarčni protein. Medtem ko smo z nabiranjem gob v naravi omejeni glede na sezono in vremenske pogoje. Večje količine tarčnega proteina lahko pridobimo tudi s tehnologijo proizvodnje rekombinantnih proteinov. Za gojenje in proizvodnjo proteinov in drugih molekul se zato večinoma uporablja fermentacija na trdnih nosilcih (Upadhyay in Singh, 2010). Po podatkih Združenja proizvajalcev in oblikovalcev encimskih proizvodov za leto 2009 (ang. Association of Manufacturers and Formulators of Enzyme Products), okrog 60 % od 260 encimov na trgu izvira iz gliv. Le pet od teh izvira iz višjih gliv (3 lakaze, 1 peroksidaza, 1 fitaza), od katerih tri proizvajajo kot rekombinantne proteine v *Aspergillus oryzae* (Ostergaard in Olsen, 2010).

5.1.4 Prisotnost različnih inhibitornih molekul je odvisna od načina priprave ekstrakta

Do sedaj so samo v eni od raziskav testirali protein iz gob proti rastlinskim patogenim bakterijam in glivam *in vitro* (Zheng in sod., 2010). V ostalih raziskavah so večinoma testirali neobdelane ekstrakte (Alves in sod., 2012a), filtrate glivnih kultur (Chen in Huang, 2010; Pandey, 2013) ali alkoholne ekstrakte (Schwan in sod., 2010; Alves in sod., 2012b). Medtem ko surovi ekstrakti vsebujejo mešanice vseh molekul, ki jih najdemo v trosnjakih,

pa filtrati glivnih kultur in alkoholni ekstrakti vsebujejo majhne molekule, ki so pretežno sekundarni metaboliti.

V enem od večjih presejalnih testih protibakterijske aktivnosti 330 metanolnih ekstraktov gob proti *Acinetobacter baumannii* in *Burkholderia cepacia*, so samo trije ekstrakti (0.9 %) inhibirali bakterije *in vitro*. Na podlagi tega so avtorji zaključili, da je iskanje novih aktivnih snovi, ki bi inhibirale po Gramu negativne bakterije, zelo zahtevno (Schwan in sod., 2010). Vendar pa so v drugi raziskavi (Chen in Huang, 2010), trije od 27 (11 %) testiranih filtratov glivne kulture izolirane iz *Syzygium samarangense* inhibirali *R. solanacearum* PS152 *in vitro*. V eni od raziskav so ugotovili, da je devet od 70 (13 %), filtratov glivne kulture iz gob inhibiralo *R. solanacearum* *in vitro* (Pandey, 2013). Odstotek aktivnih filtratov glivnih kultur je bil podoben odstotku aktivnih proteinских ekstraktov iz naše raziskave. Druge raziskave, v okviru katerih so testirali protibakterijsko aktivnost ekstraktov iz višjih gliv, so večinoma vključevale manjše število ekstraktov, ki so jih testirali proti enim ali več patogenih mikroorganizmov (Wasser, 2011; Alves in sod., 2012a; b; Pandey, 2013). Na podlagi visokega odstotka ekstraktov, ki so v naši raziskavi inhibirali po Gramu negativno bakterijo *R. solanacearum*, lahko zaključimo, da ekstrakti iz višjih gliv predstavljajo velik potencial proteinov s protibakterijsko aktivnostjo.

5.1.5 Ekstrakti iz gob inhibirajo različne filotipe *R. solanacearum*

Spremljali smo inhibitorno aktivnost 11 ekstraktov iz gob ali micelija proti 12 sevom *R. solanacearum*, ki vključujejo različne filotipe in biovarje (Preglednica 3). Dva od šestih ekstraktov, *Amanita phalloides* and *Tricholoma saponaceum*, sta inhibirala vse bakterije, vključno z *R. mannitolilytica* in *Escherichia coli*, iz česar bi lahko sklepali, da gre za bolj splošen mehanizem inhibicije bakterijskih celic. Poleg teh dveh, so tudi ekstrakti *A. virosa*, *B. luridiformis*, *C. geotropa* in *G. glutinosus* popolnoma inhibirali vse seve *Ralstonia* sp., vključno z *R. mannitolilytica*, niso pa inhibirali nepatogenega seva *E. coli*, zato so zelo obetavni za nadaljnje proučevanje. Prav tako smo potrdili, da ekstrakt micelija *C. geotropa* popolnoma inhibira vseh 12 sevov *R. solanacearum*.

Nekateri sevi *R. solanacearum* so bili občutljivi proti več ekstraktom iz gob, vendar pa ni bilo povezave med inhibicijo in razvrstitevjo v filotipe in biovarje. Z vidika komercialne

uporabe, je inhibicija različnih sevov (filotipov) *R. solanacearum* velika prednost, saj bi na ta način z enim protibakterijskim sredstvom lahko nadzoroval bakterijsko venenje na različnih gostiteljih. V ostalih objavljenih študijah so protibakterijske snovi iz višjih gliv večinoma testirali samo proti enem sevu *R. solanacearum* (Chen in Huang, 2010; Deberdt in sod., 2012; Ji in sod., 2005); Pandey, 2013; Paret in sod., 2010; Pradhanang in sod., 2003). Ker so bili v naši študiji sevi *R. solanacearum* različno občutljivi na delovanje ekstraktov, je pomembno, da bi se v prihodnjih študijah protibakterijske aktivnosti vključevalo različne seve iste bakterijske vrste.

Po pričakovanjih je 8 od 11 ekstraktov inhibiralo *R. mannitolilytica*, ki je filogenetsko sorodna z *R. solanacearum* in ima zelo podoben genom (Preglednica 3). To odpira tudi popolnoma nove možnosti uporabe ekstraktov iz višjih gliv in snovi, ki smo jih identificirali v naši raziskavi. *R. mannitolilytica* je oportunistična patogena bakterija, ki povzroča epidemije tudi v bolnišnicah, večinoma zaradi kontaminacije medicinske opreme (De Baere in sod., 2001; Gröbner in sod., 2007; Jhung in sod., 2007 Block in sod., 2013). Proteini iz gob, ki inhibirajo *R. mannitolilytica*, bi bili zato uporabni v medicini, na primer za razkuževanje površin in opreme, pa tudi kot aktivne molekule za zdravljenje bakterijskih okužb.

Od vseh testiranih ekstraktov so samo ekstrakti *T. saponaceum*, *A. phalloides* in *A. moelleri* popolnoma inhibirali rast nepatogenega seva *E. coli*, medtem ko drugi niso bili učinkoviti. Verjetno imajo ekstrakti, ki so inhibirali vse tri bakterije, bolj splošen mehanizem delovanja na bakterijske celice. Splošen način delovanja ima tudi nedavno izolirani defenzin iz *C. cinerea*, copsis, ki se veže na lipid II, ki je osnovni gradnik celične stene vseh po gramu pozitivnih bakterij. Z vezavo na lipid II moti normalno sintezo celične stene in bakterijske celice propadejo. Copsis je zato inhibiral po Gramu pozitivne bakterije primerljivo z antibiotičnimi kontrolami, proti po Gramu negativnim bakterijam pa ni imel učinka (Essig in sod., 2014). V našem primeru je inhibicija *E. coli* zanimiva tudi z vidika medicinskih aplikacij. Zato bi bilo potrebno v prihodnosti testirati inhibitorne učinke proteinov iz gob proti patogenim sevom *E. coli* kot tudi drugim po Gramu negativnim in pozitivnim humanim patogenim bakterijam. To so storili tudi Botić in sodelavci (2009) v eni od prejšnjih raziskav, v kateri so v *in vitro* testih potrdili protibakterijske učinke pripravkov *Ganoderma lucidum*,

Lentinula edodes in *Grifola frondosa* proti bakterijam *E. coli*, *Bacillus cereus* in *Pseudomonas fluorescens*.

5.1.6 Ekstrakti in proteini s protibakterijsko aktivnostjo izhajajo iz užitnih in strupenih vrst bazidiomicet

Protibakterijsko aktivnost proti različnim sevom *Ralstonia* sp in *E. coli* smo zaznali pri ekstraktih in proteinih, ki smo jih pridobili iz užitnih, pogojno užitnih in strupenih vrst gob. Užitne gobe, ki jih lahko jemo tudi surove so: *C. geotropa* (pozna livka), *G. glutinosus* (veliki slinar) in *A. ovinus* (ovčji mesnatovec). Pogojno užitne, ki jih je potrebno pred zaužitjem prekuhati so: *B. luridiformis* (prašičji goban), *C. nebularis* (poprhnjena livka) in *T. saponaceum* (milnata kolobarnica). Strupene pa so *A. phalloides* (zelena mušnica), *A. virosa* (koničasta mušnica), *A. moelleri* (ščitkani kukmak) in *T. ustale* (osmojena kolobarnica).

Z vidika biotehnološke proizvodnje in širše uporabnosti je zaželeno, da tarčna molekula izvira iz vrste, ki je definirana kot GRAS (ang. generally recognized as safe), saj je na ta način pot do komercialne uporabe cenejša in manj zahtevna z vidika registracije, predvsem na račun dodatnega testiranja varnosti (vir: EPA, spletna stran <http://www2.epa.gov/pesticide-registration/data-requirements> in spletna stran European Comission; http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/index_en.htm). Tudi če protein izhaja iz toksične vrste gob še ne pomeni, da je toksičen in da bo negativno vplival na ljudi, živali ali rastline. Z uporabo dostavnih sistemov so na primer toksin α -amanitin iz *A. phalloides*, uspešno uporabili za zdravljenje raka trebušne slinavke pri miškah (Moldenhauer in sod., 2012). V nadaljevanju raziskave bi bilo, zaradi potencialne širše uporabnosti, smiselno testirati vse aktivne ekstrakte in čiste proteine proti humanim patogenim bakterijam ter oceniti toksičnost na humanih celičnih kulturah. Prav tako je za razvoj končnega produkta pomembna razjasnitev mehanizma delovanja, na podlagi katerega se lahko oblikuje učinkovit končni produkt (Erjavec in sod., 2012) .

5.1.7 Testi patogenosti so pomembni za razumevanje vpliva protibakterijskih učinkovin na rastline

5.1.7.1 Ekstrakti iz gob in micelija zavirajo bolezenska znamenja, ki jih povzroča *R. solanacearum* na rastlinah paradižnika in krompirja

S testi patogenosti smo pridobili pomembne informacije o učinkih ekstraktov in proteinov iz gob v ksilemu gostiteljskih rastlin, okuženih z *R. solanacearum*. *In vitro* inhibitorno aktivnost ekstraktov *T. saponaceum*, *S. variegatus*, *C. geotropa* in micelija *C. geotropa*, ki so delno ali popolnoma inhibirali *R. solanacearum* *in vitro*, smo potrdili tudi *in vivo*. Bolezen je na umetno okuženih rastlinah, inokuliranih s štirimi glavnimi ekstrakti, počasneje napredovala (Slika 12, Slika 13). Uporabili smo relativno agresivno metodo neposredne inokulacije stebla, poleg tega pa se ekstrakt ob vstopu tudi razredči. Po drugi strani pa bakterija na ta način vstopi neposredno v ksilem, ki je optimalno mesto za razmnoževanje in gibanje stran od inhibitornih molekul. Poleg tega vbrizgamo v steblo zelo visoko koncentracijo bakterij, zato ima obramba rastline zelo malo časa za odziv (Walters, 2009). Če upoštevamo vse našteto, potem je močen inhibitorni učinek proteinovih ekstraktov iz gob *in vivo* na nek način presenetljiv, vendar potrjuje, da bi lahko proteinske ekstrakte iz gob oziroma posamezne proteine uporabili tudi za varstvo rastlin.

5.1.7.2 Učinkovitost protibakterijskega ekstrakta ali proteina se lahko razlikuje *in vitro* in *in vivo*

V naši raziskavi je *S. variegatus* samo delno inhibiral bakterije *in vitro*, medtem ko je *in vivo* zaviral napredovanje bolezni podobno kot ekstrakt *T. saponaceum*, ki je sicer popolnoma inhibiral rast bakterij *in vitro* (Preglednica 5). To bi lahko pomenilo, da ekstrakt *S. variegatus*, poleg neposrednega vpliva na bakterije, vzpodbuja tudi rastlinski obrambni sistem. Da bi to potrdili, bi bilo potrebno analizirati ekspresijo rastlinskih genov, ki so vključeni v obrambo pred patogenimi organizmi. Po drugi strani so ekstrakti *C. geotropa*, micelija *C. geotropa* in *T. saponaceum* popolnoma inhibirala bakterije *in vitro* in *in vivo*, kar kaže na potencialno bolj neposredni mehanizem delovanja na bakterijske celice. Ekstrakt micelija *C. geotropa* je bil v primerjavi z ekstraktom gobe *C. geotropa* manj učinkovit, kar

bi bila lahko posledica odsotnosti dodatnih snovi, ki so prisotne v ekstraktu. Odsotnost *in vivo* inhibicije pri frakcijah micelija *C. geotropa* pa je verjetno posledica nižje koncentracije proteinov.

Vendar pa inhibicija *in vitro* še ne pomeni, da je ekstrakt ali protein učinkovit tudi *in vivo*. To se je izkazalo v primeru ekstraktov *A. phalloides* in *B. nigrescens*, ki nista zavirala bolezenskih znamenj na rastlinah. Ena od možnih razlag je, da je potreben daljši neposredni kontak med inhibitorno snovjo v ekstraktu in bakterijskimi celicami, ki je v *in vitro* testih zagotovljena, *in vivo* pa ne. Kljub temu, pa bi bil ekstrakt *A. phalloides* ali posamezne komponente uporabne v drugih aplikacijah, na primer za površinsko razkuževanje. Razhajanja med *in vitro* in *in vivo* učinki so dobro znana predvsem v medicinskih raziskavah zdravilnih učinkov (Wienkers in Heath, 2005), pogosta pa so tudi iskanju novih sredstev za varstvo rastlin (Rajkumar in sod., 2005; Ran in sod., 2005; Lemessa in Zeller, 2007). Razliko med *in vitro* in *in vivo* inhibicijo so opazili tudi v raziskavi rizobakterij in njihovih učinkov na *R. solanacearum*, kjer je *Streptomyces setonii* popolnoma inhibirala *R. solanacearum* *in vitro*, na rastlinah paradižnika pa ni zavirala bolezni (Lemessa in Zeller, 2007). Prav tako različni biokontrolni sevi *Pseudomonas* sp., ki so *in vitro* močno zavirali *R. solanacearum*, *in vivo* na rastlinah *Eucalyptus urophylly* niso zavirali bakterijskega venenja (Ran in sod., 2005).

Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da je pomembno vključiti teste patogenosti na rastlinah kmalu po začetnih presejalnih testih *in vitro*, saj le tako lahko identificiramo tiste ekstrakte, ki zavirajo bolezen na rastlinah in morda celo vzpodbujujo njihovo rast. Prav tako je pomembno, da obravnavamo kot potencialna sredstva za varstvo rastlin tudi tiste ekstrakte, ki vsaj delno inhibirajo bakterije *in vitro*.

5.1.8 PCR v realnem času omogoča spremljanje koncentracije *R. solanacearum* v različnih delih rastlin paradižnika

Preliminarni rezultati kvantifikacije *R. solanacearum* v listnih nodijih kažejo, da bi ekstrakti lahko imeli bodisi neposreden vpliv na bakterijske celice bodisi posreden, preko vpliva na delovanje obrambnega sistema rastlin. Za potrditev teh rezultatov bi bila potrebna ponovitev testa patogenosti z več odvzetimi vzorci za npr. analizo PCR v realnem času, štetje živil

celic na gojiščih ter opazovanje morfologije bakterijske membrane pod elektronskim mikroskopom. Rezultate bi nato primerjali s tistimi, ki bi jih pridobili s testiranjem v *in vitro* pogojih – inkubacija *R. solanacearum* skupaj z ekstrakti *in vitro* v različnih časovnih točkah, ki bi ji sledila ocena živosti na gojiščih, opazovanje membrane pod elektronskim mikroskopom, itn.

qPCR je zelo občutljiva metoda saj lahko z njeno pomočjo zaznamo zelo nizke koncentracije bakterij. Zato smo vzorčili tkivo paradižnika že v zgodnjih dneh po inokulaciji, da bi ugotovili ali je počasnejše napredovanje bolezni posledica nižje koncentracije bakterij v steblu. V naših poskusih je bila koncentracija *R. solanacearum* v 1. nodiju zelo visoka in se ni bistveno razlikovala med rastlinami inokuliranimi z ekstrakti in tistimi, ki smo jih inokulirali samo z *R. solanacearum*. Razlike pa smo opazili v 2. nodiju, saj smo pri ekstraktu *A. phalloides* zaznali zelo nizke koncentracije ali pa bakterij sploh nismo zaznali (stopnja bolezenskih znamenj 0, 1 in 2), kot tudi pri *T. saponaceum* (stopnja bolezenskih znamenj 2, 3 in 5) (Slika 13, Slika 14). Prejšnje raziskave so pokazale, da se mehanizmi odpornosti proti patogenim mikroorganizmom v rastlinah paradižnika nahajajo v osrednjem delu steba in ne v koreninah ali listih (Prior in sod., 1996; Dannon in Wydra, 2004), zato bi bilo mogoče, da ekstrakta *A. phalloides* in *T. saponacearum* aktivirata te obrambne mehanizme in na ta način vsaj delno preprečita kolonizacijo bakterij proti vrhu rastline. Tudi sicer obstaja povezava med nižjo koncentracijo *R. solanacearum* na sredini steba in boljšo odpornostjo rastlin paradižnika proti bakterijskem venenju, ki so jo opazili pri proučevanju vpliva dodajanja silicija na odpornost proti bakterijske venenju (Dannon in Wydra, 2004). Vendar pa je bila v poznejših fazah testa patogenosti (stopnja bolezenskih znamenj 3 in 5) pri rastlinah okuženih z bakterijo *R. solanacearum*, koncentracija v 2. nodiju podobna kot pri pozitivni kontroli. Iz tega lahko sklepamo, da bakterija v poznejših fazah okužbe premaga obrambni sistem rastline in uspešno kolonizira celotno steblo. Posledično je bila stopnja bolezenskih znamenj podobna kot pri rastlinah inokuliranimi z ekstraktom *B. nigrescens* in rastlinami pozitivne kontrole. Tudi v tem primeru je bilo venenje posledica blokade žil, ki je najbolj običajen vzrok venenja in propada rastlin (Denny in sod., 1990; Meng, 2013).

Napredovanje bolezenskih znamenj je bilo počasnejše pri rastlinah okuženih z ekstrakti *T. saponaceum*, *S. variegatus* in *C. geotropa* ter bakterijo, čeprav je bila koncentracija bakterij

v steblu zelo visoka, kar je lahko posledica tolerance rastline na bakterijo. Tudi sicer je vzpodbujanje rastlinske obrambe bolj zaželeno kot neposreden učinek na patogeni mikroorganizem. Na ta način namreč dosežemo bolj celovit obrambni odziv proti več patognim mikroorganizmom, ki se posledično počasneje prilagajajo obrambnim sistemom rastlin, kar vodi v počasnejši razvoj odpornih sevov (Glare in sod., 2012). Nekatera biološka sredstva za varstvo rastlin (biopesticidi), ki uporabljajo sistem vzpodbujanja rastlinske obrambe proti različnim patogenim mikroorganizmom, ki se prenašajo z zemljo (npr. *Rhizoctonia solani*), so že na trgu. Tak primer je biopesticid Regalia® (Marrone BioInnovations).

5.1.9 Ekstrakti iz gob in micelija gob vsebujejo protibakterijske proteine

5.1.9.1 Protibakterijski proteini iz *A. phalloides* in *C. geotropa* so del večjega proteinskega kompleksa

Tako za protibakterijske proteine *A. phalloides* kot *C. geotropa* in micelij *C. geotropa* smo ugotovili, da so aktivni proteini del večjega kompleksa proteinov. Na nativni PAGE namreč nismo videli lise pri ~ 60 kDa, kot na NaDS-PAGE, ampak je bila lisa vidna pri velikosti ~ 200 kDa. Izrezana in eluirana lisa je imela tako protibakterijsko, kot LAO aktivnost, prav tako je po kuhanju izgubila aktivnost, kar dokazuje da so protibakterijske molekule v frakcijah proteini. Da so protein iz višjih gliv pogosto kompleksi in sestavljeni iz več podenot so opazili tudi že drugi raziskovalci, kar smo povzeli v Erjavec s sodelavci (2012). Zato bi bilo potrebno v nadaljevanju raziskave narediti rekombinantno ~ 60 kDa veliko podenoto in preveriti njeno aktivnost *in vitro* in *in vivo*.

5.1.9.2 Masna spektrometrija kot orodje na analizo proteinov iz gob

Analiza masne spektrometrije ~ 60 kDa lise iz frakcije *A. phalloides* je pokazala, da gre za protein toksofalin (ADA58360). Toxofalin so iz *A. phalloides* izolirali že Stasyk in sod. (Stasyk in sod., 2010) in ugotovili, da gre za 55 kDa protein, ki ima oksidira L-amino kisline. Podobne proteine so izolirali tudi iz drugih višjih gliv. Eden izmed njih je toksovirin, 55 kDa protein iz *Amanita virosa*, ki je oksidaza L-amino kislin in je strukturno zelo podobne

toksofalinu (Antonyuk in sod., 2010). Oksidaze L-amino kislin so izolirali tudi iz več vrst *Hebeloma* sp. in *Laccaria bicolor* (Nuutinen in Timonen, 2008). Velikost proteinov izoliranih iz *L. bicolor* je bila prav tako 55 kDa, medtem ko je bil protein iz *Hebeloma cylindrosporium* velik 67 kDa (Nuutinen in sod., 2012). Oksidaze L-amino kislin sicer najpogostejsa komponenta kačjih stupov, njihova struktura pa je homodimer v velikosti med 110 in 150 kDa (Doley in Kini, 2009). Oksidaze L-amino kislin sicer uvrščamo med flavoencime in katalizirajo oksidativno deaminacijo L-amino kislin, ob kateri se sprostita amonijak in vodikov peroksid. Slednji je tudi odgovoren za toksični učinek (Doley in Kini, 2009).

Analiza masne spektrometrije ~ 60 kDa lise oziroma lis iz 2-DE gela frakcije *C. geotropa* je, kot najbolj zanesljiv zadetek, liso opredelila kot dihidrolipoamid dehidrogenazo (sinonim tudi dihidrolipolil dehidrogenaza) (ABA73359). Drugi bolj verjetni zadetki so bili še glutation disulfid reduktaza iz *L. bicolor* (dvobarvna bledivka, EDR10885) in *Coprinopsis cinerea okayama* (gnojična tintovka sev okayama; EAU88178). Vsi omenjeni encimi so flavoproteini, ki so vpleteni v številne celične procese, med drugim tudi v oksidativno razgradnjo amino kislin. Uvrščamo jih v družino oksidoreduktaz (EC1), kamor uvščamo encime, ki katalizirajo oksidacijo ene snovi, z redukcijo druge. Oksidoreduktaze, ki oksidirajo amino kisline, uvrščamo v podrazred EC 1.4 (vir: UniProt, <http://www.uniprot.org/>). Rezultati masne spektrometrije, skupaj z analizo LAO aktivnosti potrjujejo, da je protibakterijski protein iz *C. geotropa* flavoprotein, ki ga uvrščamo v družino oksidoreduktaz in je oksidaza L-amino kislin. Ker genom *C. geotropa* ni sekvenciran in anotiran, točnega imena ali funkcije proteina (encima) še ne poznamo.

Identifikacija proteinov iz gob je ta trenutek še zelo zahtevna, zaradi (i) velikega števila proteinov, ki jih vsebujejo, (ii) njihove kompleksnosti in (iii) majhnega števila anotiranih sekvenc v bazah podatkov. V prihodnosti bi bilo potrebno sekvencirati večje število genomov prostotrosnic in zaprtotrosnic, ki bi omogočile hitrejšo identifikacijo in karakterizacijo proteinov in posledično hitrejši razvoj komercialno zanimivih produktov. Pri tem bo, predvsem v smislu večjega donosa, igrala pomembno vlogo tudi izboljšava ekspresije heterolognih proteinov iz višjih gliv (Erjavec in sod., 2012).

5.1.9.3 Proteini iz *A. phalloides* in *C. geotropa* imajo LAO aktivnost

Frakcije, ki smo jih izolirali iz ekstrakta *A. phalloides* in ekstrakta ter micelija *C. geotropa* imajo LAO aktivnost z različnimi specifičnosti za L-amino-kisline. LAO aktivnost micelija *C. geotropa* je enaka kot pri proteinih izoliranih iz trosnjakov. Amino kislina L-levcin je optimalen substrat za ekstrakte in frakcije *A. phalloides* kot tudi *C. geotropa*. Dobri substrati za *A. phalloides* LAO so bili tudi L-leucin, L-metionin, L-glutamin, L-arginin in L-fenilalanin, za *C. geotropa* LAO pa L arginin, L-lizin, L-metionin in L-histidin. Encimska aktivnost je bila v vseh primerih preprečena z dodatkom askorbinske kisline. Po pričakovanjih imata tudi toksofalin in toksovirin iz prejšnjih raziskav podobne specifičnosti za L-amino kisline, na primer L-metionin, L-glutamin, L-leucin in L-fenilalanin (Antonyuk in sod., 2010; Stasyk in sod., 2010). Za LAO iz gobe *L. bicolor* sta bila najboljša substrata, L-leucin in L-fenilalanin (Nuutinen in Timonen, 2008), medtem ko sta bili za LAO iz *H. cylindrosporium* najboljša substrata, L-glutaminska kislina in L-glutamin (Nuutinen in sod., 2012).

pH optimum za encimsko aktivnost je pri pH 5 za *C. geotropa* in pri pH 6 za *A. phalloides*. Ekstrakta obeh imata široko pH območje delovanja, saj imata več kot 50 % encimska aktivnost v območju med pH 3 in pH 10. Široko pH območje delovanja LAO iz višjih gliv so potrdili tudi v ostalih raziskavah (Nuutinen in Timonen, 2008; Antonyuk in sod., 2010; Stasyk in sod., 2010; Nuutinen in sod., 2012).

Na podlagi zgoraj opisanih rezultatov lahko sklepamo, da so si, kljub nekaterim razlikam v specifičnosti razgradnje L-amino kislin, LAO iz višjih gliv med seboj podobne, tako po velikosti molekule kot tudi po biokemijskih lastnostih.

5.1.10 Ekstrakti in frakcije iz gob vplivajo na gibeljivost *R. solanacearum*

Gibeljivost je eden izmed najpomembnejših virulenčnih dejavnikov *R. solanacearum* (Tans-Kersten in sod., 2001; Meng, 2013). Snovi, ki bi delovale neposredno na gibalni aparat bakterije, bi močno zmanjšale možnost okužbe in boleznska znamenja na rastlinah (Tans-Kersten in sod., 2004).

Na ploščah, kjer smo dodali ekstrakte *A. phalloides*, *C. geotropa* in micelija *C. geotropa*, smo izmerili manjše premere kolonij *R. solanacearum* (Priloga N). Možni vzroki so: (i) protibakterijski proteini so prisotni v višji koncentraciji in uničijo večji delež celic, kar opazimo kot manjši premer kolonije; (iii), proteini vplivajo neposredno na gibalni aparat *R. solanacearum*; (iii) prisotnostjo dodatnih snovi v ekstraktu za bakterijo pomeni dodatna hranila, zaradi česar se počasneje gibljejo v okolico. Slednje se tudi sklada z opažanji v preliminarnih testih, da neaktivni ekstrakti pogosto vzpodbuju rast *R. solanacearum* v mikrotitrskih ploščah v primerjavi s pozitivno kontrolo (Priloga O). Po drugi strani se premer kolonij pri frakciji ekstrakta *C. geotropa* in micelija *C. geotropa*, ni bistveno razlikoval od pozitivne kontrole. Verjeten vzrok je ta, da v frakcijah ni prisotna dovolj visoka koncentracija protibakterijskega proteina, da bi takoj uničila večji del bakterijskih celic tako kot frakcija *A. phalloides* oziroma v frakcijah ni prisotnih dodatnih hranilnih snovi. Bakterije se, po principu zaznavanja kvorum (angl. quorum sensing), tako hitreje gibajo stran od inhibitornega sredstva, ko dosežejo dovolj visoko koncentracijo (Genin in sod., 2005).

Za ugotovitev natančnejšega mehanizma delovanja bi bilo potrebno opraviti dodatne teste in analizirati večje število plošč, kar so Rasmussen in sodelavci (2011) opisali že v eni od prejšnjih raziskav. Test gibljivosti bakterije *Vibrio cholerae* so izvedli na mehkem agarju z dodanim triptonom v ploščah s 384 luknjicami. Gibljivost v prisotnosti različnih inhibitornih molekul pa so spremljali spektrofotometrično z merjenjem absorbance. Poleg tega so z uporabo barvila alarmarBlue® lahko ločili med mrtvimi celicami in tistimi, ki so bile žive in negibljive. Na ta način so izločili molekule, ki so uničile bakterijske celice od tistih, ki so vplivale na gibalni aparat. Ker gre za visoko zmogljivo metodo, bi bila uporabna tudi pri raziskavah mehanizma delovanja proteinov iz gob.

5.2 SKLEPI

- Ugotovili smo, da imajo ekstrakti in čisti proteini iz gob, ki jih najdemo v naši gozdovih, protibakterijske učinke proti rastlinski patogeni bakteriji *R. solanacearum*. Identificirali smo 15 ekstraktov s protibakterijsko aktivnostjo, njihov učinek pa je bil večkrat baktericiden kot bakteristatičen. Prav tako smo v miceliju gobe *C. geotropa* dokazali inhibitorno aktivnost *in vitro* in *in vivo*.

- *In vitro* test v mikrotitrskih ploščicah, ki smo ga uporabili kot presejalni test za testiranje protibakterijske aktivnosti ekstraktov, je bolj primeren za ugotavljanje protibakterijske aktivnosti *in vitro* kot test cone inhibicije.
- Ekstrakti iz gob zavirajo pojav in napredovanje bolezenskih znamenj na rastlinah paradižnika in krompirja okuženih z *R. solanacearum*. Vedar pa ni vedno povezave med *in vitro* inhibitorno aktivnostjo in zaviranjem bolezenskih znamenj na rastlinah.
- Preliminarna analiza vzorcev rastlinskega tkiva z metodo PCR v realnem času je pokazala, da med koncentracijo bakterij v tkivu in izraženimi bolezenskimi znamenji ni nujno povezave, saj so bile ponekod tudi pri rastlinah z manj izraženimi bolezenskimi znamenji koncentracije bakterij zelo visoke in primerljive s pozitivnom kontrolo. Ker je metoda qPCR zelo občutljiva, je primerna za kvantifikacijo živih in mrtvih bakterij v rastlinskem tkivu.
- Iz ekstraktov gob *A. phalloides*, *C. geotropa* in micelija *C. geotropa* smo izolirali aktivne proteine v čistejši obliki. Ugotovili smo, da so del večjega kompleksa proteinov in potrdili protibakterijsko in LAO aktivnost. ~ 60 kDa aktivno podenoto *A. phalloides* smo po analizi z masno spektrometrijo identificirali kot toksofalin, za ~ 60 kDa aktivno podenoto iz *C. geotropa* pa je bil najbližji zadetek po analizi z masno spektrometrijo dihidrolipoamid dehidrogenazo, flavoprotein, ki ga uvrščamo v družino oksidoreduktaz in je oksidaza L-amino kislin. Ker genom *C. geotropa* ni sekvenciran in anotiran, točnega imena ali funkcije proteina (encima) še ne poznamo.
- Naša raziskava bo pomembno prispevala k raziskavam novih proteinov s protibakterijskimi učinki iz naravnih virov. Rezultate in znanje, ki lahko predstavljajo temelj za razvoj novih sredstev za zatiranje *R. solanacearum*, smo združili tudi v patentni prijavi (Erjavec in sod., 2013).

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Višje glive so pomemben vir proteinov, ki inhibirajo rastlinsko patogeno bakterijo *R. solanacearum*. V naši raziskavi je kar 15 ekstraktov gob (trošnjakov) iz 94 različnih vrst višjih gliv (16 %) inhibiralo rast bakterij v *in vitro* testih. Večina je imela baktericiden učinek, kar pomeni da so popolnoma uničili vse bakterije. Štirje od šestih ekstraktov, vključno z ekstraktom micelija *C. geotropa*, so upočasnili razvoj bolezenskih znamenj in zmanjšali število obolelih rastlin paradižnika in krompirja. Poleg tega se je izkazalo, da *in vitro* in *in vivo* aktivnost nista bili nujno enaki, kar še dodatno podarja pomen zgodnjega vključevanja testov patogenosti na rastlinah. Poleg tega so testiranja na rastlinah nakazala možne mehanizme delovanja ekstraktov iz gob, ki zavirajo pojav bolezenskih znamenj bodisi z neposrednim delovanjem na bakterijske celice bodisi z vzpodbujanjem obrambnega sistema rastlin oziroma kombinacija obeh.

Pri testiranju specifičnosti inhibicije proti različnim sevom *R. solanacearum* smo ugotovili, da je kar 7 od 11 ekstraktov popolnoma inhibiralo vse seve *R. solanacearum*, pri ostalih 4 pa smo opazili, da so posamezni sevi različno občutljivi na proteinske ekstrakte. Prav tako smo ugotovili, da ni povezave med občutljivostjo bakterij in razvrsttvijo sevov v filotipe, biovarje, glede na gostiteljske rastline ali geografski izvor.

Po kromatografskem čiščenju ekstraktov *A. phalloides*, *C. geotropa* in micelija *C. geotropa* smo ugotovili, da gre za ~ 200 kDa velike komplekse proteinov, katerih del so aktivne podenote v velikosti ~ 60 kDa. Slednjega smo pri *A. phalloides* identificirali kot toksofalin, pri *C. geotropa* pa je bil najbližji zadetek v bazah podatkov po analizi z masno spektrometrijo identificiran kot dihidrolipoamid dehidrogenaza, ki sodi v družino flavoproteinov. Omenjeni proteini oziroma kompleksi proteinov imajo protibakterijske učinke in so oksidaze L-amino kislin.

Z nadaljno identifikacijo aktivnih proteinov lahko pridobimo podatke, ki bodo omogočili njihovo biotehniološko uporabo.

6.2 SUMMARY

Mushrooms are a good source of protein antibacterial substances that are active against the plant pathogen *R. solanacearum*. In our study, altogether 15 protein extracts (16 %) from 94 different species were active in the *in vitro* tests. These not only show potent inhibition of bacterial growth, but more commonly have bactericidal effects, which completely kill the bacterial cells, rather than being bacteriostatic. Three out of five of the extracts tested in the pathogenicity tests were active *in vivo*, which resulted in slower disease progression and reduced disease severity in artificially inoculated tomato and potato plants. The *in vitro* activities did not always correlate with the *in vivo* activities, which emphasises the importance of performing early screening tests also *in vivo*. The use of *in vivo* testing also indicated different types of phytoprotective mechanisms of extracts i.e. direct effects on the bacteria, or indirect effects on the plant defence system, or a combination of these two.

When selected mushroom protein extracts were tested against several other strains of *R. solanacearum* no correlation could be observed between their susceptibility and their phylotype, biovar, host plant or geographical origin, which stresses the importance of including a large number of strains in such studies. Some extracts also inhibited *R. mannitolytica*, a phylogenetically related bacterium to *R. solanacearum*, thus identifying the potential for their broader application.

Purified fractions of *A. phalloides*, *C. geotropa* and *C. geotropa* mycelium revealed ~200 kDa protein complexes, part of which are ~60 kDa antibacterial proteins. The ~ 60 kDa protein from *A. phalloides* was identified as a toxophallin, while dihydrolipoamide dehydrogenase was the highest score after mass spectrometry analysis for *C. geotropa* protein. Protein complexes also possessed antibacterial and LAO activity.

With further characterization of active proteins, we can obtain data that will enable their application in the field of biotechnology.

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

7 VIRI

- Aguilar M. I. (ed.). 2003. HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols. Vol. 251, Clifton, Humana Press: 399 str.
- Albino Smania E. d. F., Delle Monache F., Yunes R. A., Paultert R., Smania Junior A., Alvarez B., Lopez M. M., Biosca E. G. 2007. Antimicrobial activity of methyl australate from *Ganoderma australe*. Brazilian Journal of Pharmacognosy Pharmacognosy, 17, 1: 14 – 16
- Aldon D., Brito B., Boucher C., Genin S. 2000. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. EMBO Journal, 19, 10: 2304–2314
- Aliye N., Fininsa C., Hiskias Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). Biological Control, 47, 3: 282–288
- Alves M. J., Ferreira I. C. F. R., Dias J., Teixeira V., Martins A., Pintado M. 2012a. A review on antimicrobial activity of mushroom (*Basidiomycetes*) extracts and isolated compounds. Planta Medica, 78, 16: 1707–1718
- Alves M. J., Ferreira I. C. F. R., Martins A., Pintado M. 2012b. Antimicrobial activity of wild mushroom extracts against clinical isolates resistant to different antibiotics. Journal of Applied Microbiology, 113, 2: 466–475
- Andrews J. M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48: 5–16
- Antonyuk V. O., Yu Klyuchivska O., Stoika R. S. 2010. Cytotoxic proteins of *Amanita virosa* Secr. mushroom: Purification, characteristics and action towards mammalian cells. Toxicon, 55, 7: 1297–1305
- Arora D. S., Sharma R. K. 2010. Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications. Applied Biochemistry and Biotechnology, 160, 6: 1760–1788

Erjavec J. Vpliv proteinских ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Baere T., De Steyaert S., Wauters G., Vos P., Des, Goris J., Coenye T., Suyama T., Verschraegen G., Vaneechoutte M. 2001. Classification of *Ralstonia pickettii* biovar 3/'thomasii' strains (Pickett 1994) and of new isolates related to nosocomial recurrent meningitis as *Ralstonia mannitolilytica* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, 2: 547–558
- Baldrian P., Valaskova V. 2008. Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. FEMS Microbiology Reviews, 32, 3: 501–521
- Berne S., Lah L., Sepčič K. 2009. Aegerolysins: Structure, function, and putative biological role. Protein Science, 18, 4: 694–706
- Bleuler-Martinez S., Butschi A., Garbani M., Walti M. A., Wohlschlager T., Potthoff E., Sabotič J., Pohleven J., Luthy P., Hengartner M. O., Aebi M., Kunzler M. 2011. A lectin-mediated resistance of higher fungi against predators and parasites. Molecular Ecology, 20, 14: 3056–3070
- Block C., Ergaz-Shaltiel Z., Valinsky L., Temper V., Hidalgo-Grass C., Minster N., Werissman C., Benenson S., Jaffe J., Moses A. E., Bar-Oz B. 2013. Déjà vu: *Ralstonia mannitolilytica* infection associated with a humidifying respiratory therapy device, Israel, June to July 2011. Eurosurveillance, 18, 18: 1–7
- Botić T., Krajnc I., Pohleven F., Knez Ž. 2009. Antioksidativno in protibakterijsko delovanje mikrokemikalij iz gliv tradicionalne kitajske medicine. Slovenski kemijski dnevi 2009, 12
- Brzin J., Rogelj B., Popovic T., Strukelj B., Ritonja A. 2000. Clitocypin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. Journal of Biological Chemistry, 275, 26: 20104–20109
- Buddenhagen I. W., Sequeira L., Kelman A. 1962. Designation of races in *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, 52: 726
- Casieri L., Anastasi A., Prigione V., Varese G. C. 2010. Survey of ectomycorrhizal, litter-degrading, and wood-degrading Basidiomycetes for dye decolorization and ligninolytic enzyme activity. Antonie Van Leeuwenhoek, 2, 4: 483–504

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

Castillo J. A., Greenberg J. T. 2007. Evolutionary dynamics of *Ralstonia solanacearum*.

Applied and Environmental Microbiology, 73, 4: 1225–1238

Cellini F., Chesson A., Colquhoun I., Constable A., Davies H. V, Engel K. H., Gatehouse A. M. R., Kärenlampi S., Kok E. J., Leguay J.-J., Lehesranta S., Noteborn H. P. J. M., Pedersen J., Smith M. 2004. Unintended effects and their detection in genetically modified crops. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 42, 7: 1089–125

Chen J.-T., Huang J.-W. 2010. Antimicrobial activity of edible mushroom culture filtrates on plant pathogens. Plant Pathology Bulletin, 19, 261–270

Collins C. M., Heneghan M. N., Kilaru S., Bailey A. M., Foster G. D. 2010. Improvement of the *Coprinopsis cinerea* molecular toolkit using new construct design and additional marker genes. Journal of Microbiological Methods, 82, 2: 156–62

Corpillo D., Gardini G., Vaira A. M., Basso M., Aime S., Accotto G. P., Fasano M. 2004. Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: the case of a virus-resistant tomato. Proteomics, 4, 1: 193–200

COUNCIL DIRECTIVE 98/57/EC 1998. COUNCIL DIRECTIVE 98/57/EC on the control of *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi in sod. Comission Directive, 74

https://www.eppo.int/ABOUT_EPPO/EPPO_MEMBERS/phytoreg/eu_texts/2006-063-EC-e.pdf (maj, 2015)

Cox P. W., Hooley P. 2009. Hydrophobins: New prospects for biotechnology. Fungal Biology Reviews, 23, 1-2: 40–47

Curtis H., Noll U., Störmann J., Slusarenko A. J., Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K. 2004. Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and Oomycetes. Physiological and Molecular Plant pathology, 65, 5: 79 – 89

Dannon E. A., Wydra K. 2004. Interaction between silicon amendment, bacterial wilt development and phenotype of *Ralstonia solanacearum* in tomato genotypes. Physiol Molecular Plant Pathology, 64, 5: 233–243

Erjavec J. Vpliv proteinovih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

Dashtban M., Schraft H., Qin W. 2009. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. International Journal of Biological Sciences, 5, 6: 578–595

Deberdt P., Perrin B., Coranson-Beaudu R., Duyck P. F., Wicker E. 2012. Effect of *Allium fistulosum* extract on *Ralstonia solanacearum* populations and tomato bacterial wilt. Plant Disease, 96, 5: 687–692

Denny T. P., Carney B. F., Schell M. A. 1990. Inactivation of multiple virulence genes reduces the ability of *Pseudomonas solanacearum* to cause wilt symptoms. Plant Microbe Interactions, 3, 293–300

Doley R., Kini R. M. 2009. Protein complexes in snake venom. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 66, 17: 2851–2871

Dreo T., Pirc M., Ramšak Ž., Pavšič J., Milavec M., Zel J., Gruden K. 2014. Optimising droplet digital PCR analysis approaches for detection and quantification of bacteria: a case study of fire blight and potato brown rot. Analytical and bioanalytical chemistry, 406, 26: 6513–6528

Elphinstone J. G. 2005. The current bacterial wilt situation: a global overview. V: Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. Allen C., Prior P. in Hayward A. C. (eds.). St. Paul, APS Press: 9–28 str.

Elphinstone J. G., Hennessy J., Wilson J. K., Stead D. E. 1996. Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts. EPPO Bulletin, 26, 3-4: 663–678

EPPO 2004. EPPO Standards Diagnostic protocols for regulated pests Protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. OEPP/EPPO Bulletin, 34, 155–157

Erjavec J. 2007. Vpliv ekstraktov gliv na rastlinske patogene bakterije. Diplomsko delo. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčenga študija mikrobiologije: 68 str.

Erjavec J., Dreo T., Sabotič J., Brzin J., Kos J., Ravnikar M. 2014. Composition and method for plant protection. European Patent Office PCT/EP2014/071216: 60 str.

Erjavec J. Vpliv proteinih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

Erjavec J., Kos J., Ravnikar M., Dreö T., Sabotič J. 2012. Proteins of higher fungi - from forest to application. *Trends in Biotechnology*, 30, 5: 259–273

Essig A., Hofmann D., Münch D., Gayathri S., Künzler M., Kallio P. T., Sahl H.-G., Wider G., Schneider T., Aebi M. 2014. Copsin, a novel peptide-based fungal antibiotic interfering with the peptidoglycan synthesis. *The Journal of biological chemistry*, 1–26

EUCAST - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2003. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 509–515

Fang E. F., Ng T. B. 2011. Ribonucleases of different origins with a wide spectrum of medicinal applications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1851, 1: 65–74

FAO 2008. The role of agricultural biotechnologies for production of bioenergy in developing countries.

<http://www.fao.org/biotech/c15doc.htm> (maj, 2015)

Faria R. O. de, Rotuno Moure V., Lopes de Almeida Amazonas M. A., Krieger N., Mitchell D. A. 2007. The Biotechnological Potential of Mushroom Tyrosinases. *Food Technology and Biotechnology*, 45, 3: 287 – 294

Fegan M., Prior P. 2005a. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. Allen C, Hayward A. C. in Prior P. (eds.), St. Paul, APS Press: 528 str.

Fegan M., Prior P. 2005b. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex”? Allen C., Hayward A. C. in Prior P. (eds.), St. Paul, APS Press: 449–461 str.

Fleissner A., Dersch P. 2010. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 4: 1255–1270

Floyd J. 2008. New Pest Response Guidelines *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2,130

Gatehouse J. A. 2008. Biotechnological prospects for engineering insect-resistant plants. *Plant Physiology*, 3: 881–887

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Genin S., Brito B., Denny T. P., Boucher C. 2005. Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. FEBS Letters, 579, 10: 2077–2081
- Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., Marrone P., Morin L., Stewart A. 2012. Have biopesticides come of age? Trends Biotechnol, 30, 5: 250–258
- Goldstein I. J., Winter H. C. 2007. Mushroom Lectins. V: *Comprehensive glycoscience : from chemistry to systems biology*. Kamerling J. P., Boons G. J., Lee Y., Suzuki A., Taniguchi N. in Voragen A. G. J. (eds.). Cambridge, Elsevier Science: 981 str.
- Gonzalez E. T., Brown D. G., Swanson J. K., Allen C. 2007. Using the *Ralstonia solanacearum* Tat Secretome To Identify Bacterial Wilt Virulence Factors. Applied and Environmental Microbiology, 73, 12: 3779–3786
- Grey B. E., Steck T. R. 2001. The viable but nonculturable state of *Ralstonia solanacearum* may be involved in long-term survival and plant infection. Applied and Environmental Microbiology, 67, 9: 3866–3872
- Gröbner S., Heeg P., Autenrieth I. B., Schulte B. 2007. Monoclonal outbreak of catheter-related bacteraemia by *Ralstonia mannitolilytica* on two haemato-oncology wards. Journal of Infection, 55, 6: 539–544
- Guo Y., Wang H., Ng T. B. 2005. Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. Peptides, 26, 4: 575–580
- Gutierrez A., Rio J. C. del, Martinez A. T. 2010. Fungi and Their Enzymes for Pitch Control in the Pulp and Paper Industry. V: *The Mycota Industrial Applications X*. Hofrichter M. (ed.), Berlin, Springer: 357–377
- Halaouli S., Asther M., Sigoillot J. C., Hamdi M., Lomascolo A. 2006. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. Journal of Applied Microbiology, 100, 2: 219–232

- Han C. H., Zhang G. Q., Wang H. X., Ng T. B. 2010. Schizolysin, a hemolysin from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. FEMS Microbiology Letters, 309, 2: 115–121
- Hase S., Takahashi S., Takenaka S., Nakaho K., Arie T., Seo S., Ohashi Y., Takahashi H. 2008. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. Plant Pathology, 57, 5: 870–876
- Hatakka A., Hammel K. E. 2010. Fungal Biodegradation of Lignocellulose. V: The Mycota Industrial Applications X. Hofrichter M. (ed.), Berlin, Springer: 319–340
- Hawksworth D. L. 2001. Mushrooms: The Extent of the Unexplored Potential. International Journal of Medicinal Mushrooms, 3, 4: 5
- Hektor H. J., Scholtmeijer K. 2005. Hydrophobins: proteins with potential. Current Opinion in Biotechnology, 16, 4: 434–439
- Hektor H. J., Scholtmeijer K. 2005. Hydrophobins: proteins with potential. Protein Technologies and Commercial Enzymes, 16, 4: 434–439
- Hilden K., Hakala T. K., Lundell T. 2009. Thermotolerant and thermostable laccases. Biotechnol Letters, 31, 8: 1117–1128
- Hong J. C., Momol T. M., Ji P., Olson S. M., Colee J., Jones J. B. 2011. Management of bacterial wilt in tomatoes with thymol and acibenzolar-S-methyl. Crop Protection, 30, 10: 1340–1345
- Huynh M.-L., Russell P., Walsh B. 2009. Tryptic digestion of in-gel proteins for mass spectrometry analysis. Methods in molecular biology, 519: 507–513
- Ispas C. R., Ravalli M. T., Steere A., Andreescu S. 2010. Multifunctional biomagnetic capsules for easy removal of phenol and bisphenol A. Water Research, 6: 1961–1969
- Jawaid S., Khan T. H., Osborn H. M., Williams N. A. 2009. Tyrosinase activated melanoma prodrugs. Anticancer Agents in Medical Chemistry, 9, 7: 717–727

- Jeon J. R., Baldrian P., Murugesan K., Chang Y. S. 2011. Laccase-catalysed oxidations of naturally occurring phenols: from in vivo biosynthetic pathways to green synthetic applications. *Microbial Biotechnology*, 5, 3: 318–332
- Jhung M. A., Sunenshine R. H., Noble-Wang J., Coffin S. E., St John K., Lewis F. M., Jensen B., Peterson A., LiPuma J., Arduino M. J., Holzmann-Pazgal G., Atkins J. T., Srinivasan A. 2007. A national outbreak of *Ralstonia mannitolytica* associated with use of a contaminated oxygen-delivery device among pediatric patients. *Pediatrics*, 119, 6: 1061–1068
- Ji P., Momol M. T., Olson S. M., Pradhanang P. M., Jones J. B. 2005. Evaluation of thymol as biofumigant for control of bacterial wilt of tomato under field conditions. *Plant Disease*, 89, 5: 497–500
- Kelman A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 64: 693–695
- Khan F., Khan M. I. 2011. Fungal Lectins: Current Molecular and Biochemical Perspectives. *International Journal of Biological Chemistry*, 5, 1: 1–20
- Kishimoto M., Takahashi T. 2001. A spectrophotometric microplate assay for L-amino acid oxidase. *Analytical Biochemistry*, 298, 1: 136–139
- Kuiper H. A., Kok E. J., Engel K.-H. 2003. Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 2: 238–243
- Kunamneni A., Plou F. J., Ballesteros A., Alcalde M. 2008. Laccases and their applications: a patent review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2, 1: 10–24
- Lam S., Ng T. 2010. Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1–11
- Lemessa F., Zeller W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. *Biological Control*, 42, 3: 336–344
- Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Julich W. D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 3: 285–299

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Linder M. B., Szilvay G. R., Nakari-Setala T., Penttila M. E. 2005. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev*, 29, 5: 877–896
- Matos M. J., Santana L., Uriarte E., Delogu G., Corda M., Fadda M. B., Era B., Fais A. 2011. New halogenated phenylcoumarins as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic and Medical Chemistry Letters*, 21, 11: 3342–3345
- Meng F. 2013. The Virulence Factors of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 4, 3: 3–5
- Michan C., Daniels C., Fernandez M., Solano J., La Campa A. M. De, Ramos J. L. 2010. Sugar (ribose), spice (peroxidase) and all things nice (laccase hair-dyes). *Microbial Biotechnology*, 3, 2: 131–133
- Min K., Yoo Y. J. 2009. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase-SWNTs-Ppy composite electrode. *Talanta*, 80, 2: 1007–1011
- Moldenhauer G., Salnikov A. V., Lüttgau S., Herr I., Anderl J., Faulstich H. 2012. Therapeutic potential of amanitin-conjugated anti-epithelial cell adhesion molecule monoclonal antibody against pancreatic carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 104, 8: 622–634
- Murphy Cowan M. 1999. Plant Products as Antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 4: 564 – 582
- Nakaho K., Inoue H., Takayama T., Miyagawa H. 2004. Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 2: 115–119
- Nevalainen K. M. H., Te'o V. S. J., Bergquist P. L. 2005. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 23, 9: 468–474
- Nishikawa M., Ogawa K., Oard S. V, Enright F. M. 2004. Antimicrobial Activity of a Chelatable Poly(Arginyl-Histidine) Produced by the Ergot Fungus *Verticillium kibicense*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1: 229 – 235

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Nuutinen J. T., Marttinen E., Soliymani R., Hildén K., Timonen S. 2012. L-Amino acid oxidase of the fungus *Hebeloma cylindrosporum* displays substrate preference towards glutamate. *Microbiology*, 158, 1: 272–283
- Nuutinen J. T., Timonen S. 2008. Identification of nitrogen mineralization enzymes, L-amino acid oxidases, from the ectomycorrhizal fungi *Hebeloma* spp. and *Laccaria bicolor*. *Mycological research*, 112, 12: 1453–1464
- Okano K., Iida Y., Samsuri M., Prasetya B., Usagawa T., Watanabe T. 2006. Comparison of *in vitro* digestibility and chemical composition among sugarcane bagasses treated by four white-rot fungi. *Animal Science Journal*, 77, 3: 308–313
- Ostergaard L. H., Olsen H. S. 2010. Industrial Applications of Fungal Enzymes. V: The Mycota Industrial Applications X. Hofrichter M. (ed.), Berlin, Springer: 269–290
- Pal K. K., Scholar V., Gardener B. M. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1–25
- Pandey V. K. 2013. Anti plant pathogenic properties of higher fungi, especially wild mushrooms. PhD Thesis. Palampur, Chaudhary Sarwan Kumar Himachal Pradesh Krishi Vishvavidyalaya: 155 str.
- Paret M. L., Protection E., Peps S. 2010. Effect of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* Race 4 and bacterial wilt of edible ginger. *Plant Disease*, 94, 5: 521–527
- Patel S., Goyal A. 2012. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. *3 Biotech*, 2, 1: 1–15
- Peumans W. J., Damme E. J. Van 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol*, 109, 2: 347–352
- Philippoussis A. N. 2009. Production of Mushrooms Using Agro-Industrial Residues as Substrates. V: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation*. Singh nee' Nigam P. in Pandey A. (eds.), Rotterdam, Springer: 163–196 str.

- Pohleven J., Brzin J., Vrabec L., Leonardi A., Čokl A., Štrukelj B., Kos J., Sabotič J. 2011. Basidiomycete *Clitocybe nebularis* is rich in lectins with insecticidal activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 4: 1141–1148
- Pohleven J., Renko M., Magister Š., Smith D. F., Küzler M., Štrukelj B., Turk D., Kos J., Sabotič J. 2012. Bivalent carbohydrate binding is required for biological activity of *Clitocybe nebularis* lectin (CNL), N,N'-diacetyllactosidamine (GalNAc β 1-4GlcNAc, LacdiNAc)-specific lectin from basidiomycete *C. nebularis*. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 13: 10602–10612
- Pontoppidan K., Pettersson D., Sandberg A. S. 2007. *Peniophora lycii* phytase is stable and degrades phytate and solubilises minerals *in vitro* during simulation of gastrointestinal digestion in the pig. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87, 14: 2700–2708
- Poueymiro M., Genin S. 2009. Secreted proteins from *Ralstonia solanacearum*: a hundred tricks to kill a plant. *Host-Microbe Interactions: Bacteria*, 12, 1: 44–52
- Pradhanang P. M., Momol M. T., Olson S. M., Jones J. B. 2003. Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease*, 87, 4: 423–427
- Prior P., Bart S., Leclercq S., Darrasse A., Aanais G. 1996. Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burkholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathology*, 45, 4: 720–726
- Prior P., Fegan M. 2005. Recent Developments in the Phylogeny and Classification of *Ralstonia solanacearum*. *Acta Horticulturae*, 695: 127–136
- Promdonkoy P., Tang K., Sornlake W., Harnpicharnchai P., Kobayashi R. S., Ruanglek V., Upathanpreecha T., Vesaratchavest M., Eurwilaichitr L., Tanapongpipat S. 2009. Expression and characterization of *Aspergillus* thermostable phytases in *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology letters*, 290, 1: 18–24
- R Development Core Team 2008. A language and environment for statistical computing
- Rahaie M., Kazemi S. S. 2010. Lectin-based biosensors: As Powerful Tools in Bioanalytical Applications. *Biotechnology*, 9, 4: 428–443

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Rajkumar M., Lee W. H., Lee K. J. 2005. Screening of bacterial antagonists for biological control of *Phytophthora* blight of pepper. *Journal of Basic Microbiology*, 45, 1: 55–63
- Ran L. X., Liu C. Y., Wu G. J., Loon L. C. van, Bakker P. a. H. M. 2005. Suppression of bacterial wilt in *Eucalyptus urophylla* by fluorescent *Pseudomonas* spp. in China. *Biological Control*, 32, 1: 111–120
- Rani P., Kalyani N., Prathiba K. 2008. Evaluation of lignocellulosic wastes for production of edible mushrooms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151, 2-3: 151–159
- Rasmussen L., White E. L., Pathak A., Ayala J. C., Wang H., Wu J.-H., Benitez J. A., Silva A. J. 2011. A high-throughput screening assay for inhibitors of bacterial motility identifies a novel inhibitor of the Na⁺-driven flagellar motor and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55, 9: 4134–4143
- Renko M., Sabotič J., Mihelič M., Brzin J., Kos J., Turk D. 2010. Versatile loops in mycocyprins inhibit three protease families. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 1: 308–316
- Rodgers C. J., Blanford C. F., Giddens S. R., Skamnioti P., Armstrong F. A., Gurr S. J. 2010. Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes? *Trends in Biotechnology*, 28, 2: 63–72
- Rosa L. H., Machado K. M. G., Jacob C. C., Capelari M., Rosa C. A., Zani C. L. 2003. Screening of Brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 967–974
- Sabotič J., Galeša K., Popovič T., Leonardi A., Brzin J. 2007. Comparison of natural and recombinant clitocyprins, the fungal cysteine protease inhibitors. *Protein Expression and Purification*, 53, 1: 104–111
- Sabotič J., Kos J. 2012. Microbial and fungal protease inhibitors - current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 4: 1351–1375

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Sabotič J., Popovič T., Puizdar V., Brzin J. 2009. Macrocytins, a family of cysteine protease inhibitors from the basidiomycete *Macrolepiota procera*. *FEBS Journal*, 276, 16: 4334–4345
- Sabotič J., Trček T., Popovič T., Brzin J. 2007. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128, 2: 297–307
- Salanoubat M., Genin S., Artiguenave F., Gouzy J., Mangenot S., Arlat M., Billault A., Brottier P., Camus J. C., Cattolico L., Chandler M., Choisne N., Claudel-Renard C., Cunnac S., Demange N., Gaspin C., Lavie M., Moisan A., Robert C., Saurin W., Schiex T., Siguier P., Thébault P., Whalen M., Wincker P., Levy M., Weissenbach J., Boucher C. A. 2002. Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*, 415, 6871: 497–502
- Schöll L. van, Hoffland E., Breemen N. van 2006. Organic anion exudation by ectomycorrhizal fungi and *Pinus sylvestris* in response to nutrient deficiencies. *The New Phytologist*, 170, 1: 153–163
- Schwan W., Dunek C., Gebhardt M., Engelbrecht K., Klett T., Monte A., Toce J., Rott M., Volk T., LiPuma J., Liu X. T., McKelvey R. 2010. Screening a mushroom extract library for activity against *Acinetobacter baumannii* and *Burkholderia cepacia* and the identification of a compound with anti-Burkholderia activity. *Annalitical and Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9, 1: 4
- Seo S. Y., Sharma V. K., Sharma N. 2003. Mushroom Tyrosinase: Recent Prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 10: 2837–2853
- Shokribousjein Z., Deckers S. M., Gebruers K., Lorgouilloux Y., Baggerman G., Verachtert H., Delcour J. A., Etienne P., Rock J. M., Michiels C., Derdelinckx G. 2011. Hydrophobins, beer foaming and gushing. *Cerevisia*, 35, 4: 85–101
- Shrestha B., Lee W.-H., Han S.-K., Sung J.-M. 2006. Observations on Some of the Mycelial Growth and Pigmentation Characteristics of *Cordyceps militaris* Isolates. *Mycobiology*, 34, 2: 83–91

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Singh R. S., Bhari R., Kaur H. P. 2010. Mushroom lectins: current status and future perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30, 2: 99–126
- Sivakumar R., Vetrichelvan T., Rajendran N. N., Devi M. I., Sundaramoorthi K., Shankar A. S. K., Shanmugam S. 2006. Antibacterial activity of mushroom *Osmoporus odoratus*. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 4: 523–524
- Standish L. J., Wenner C. A., Sweet E. S., Bridge C., Nelson A., Martzen M., Novack J., Torkelson C. 2008. *Trametes versicolor* mushroom immune therapy in breast cancer. *Journal of the Society for Integrative Oncology*, 6, 3: 122–128
- Stasyk T., Lutsik-Kordovsky M., Wernstedt C., Antonyuk V., Klyuchivska O., Souchelnytskyi S., Hellman U., Stoika R. 2010. A new highly toxic protein isolated from the death cap *Amanita phalloides* is an l-amino acid oxidase. *FEBS J*, 277, 5: 1260–1269
- Stead D. E. 1992. Techniques for detecting and identifying plant pathogenic bacteria. V: Techniques for the rapid detection of plant pathogens. Duncan J. M, Torrance L. (eds.), Hoboken, Blackwell Science: 76–111
- Stirpe F. 2004. Ribosome-inactivating proteins. *Highlights in plant toxins*, 44, 4: 371–383
- Sundin G. W., Pathology P., Lansing E., Nicole A., York N., Experiment A., Keith S. 2009. Field evaluation of biological control of fire blight in the eastern United States. *Plant Disease*, 93, 4: 386–394
- Šmid I., Buh Gasparič M., Sabotič J., Gruden K., Brzin J., Žel J. 2012. Use of macrocypins as pesticidal agents: European Patent Office PCT/EP2012/065373: 22 str.
- Šmid I., Gruden K., Buh Gašparič M., Koruza K., Petek M., Pohleven J., Brzin J., Kos J., Žel J., Sabotič J. 2013. Inhibition of the growth of colorado potato beetle larvae by macrocypins, protease inhibitors from the parasol mushroom. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 51: 12499–509
- Šmid I., Rotter A., Gruden K., Brzin J., Buh Gašpariča M., Kos J., Žel J., Sabotič J. 2015. Clitocypin, a fungal cysteine protease inhibitor, exerts its insecticidal effect on

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

Colorado potato beetle larvae by inhibiting their digestive cysteine proteases. Pesticide Biochemistry and Physiology, In Press: doi:10.1016/j.pestbp.2014.12.022: 5 str.

Takakura Y., Oka N., Suzuki J., Tsukamoto H., Ishida Y. 2012. Intercellular Production of Tamavidin 1, a Biotin-Binding Protein from Tamogitake Mushroom, Confers Resistance to the Blast Fungus *Magnaporthe oryzae* in Transgenic Rice. Molecular Biotechnology, 51, 1: 9–12

Takakura Y., Tsunashima M., Suzuki J., Usami S., Kakuta Y., Okino N., Ito M., Yamamoto T. 2009. Tamavidins - novel avidin-like biotin-binding proteins from the Tamogitake mushroom. FEBS Journal, 276, 5: 1383–1397

Tan S., Jiang Y., Song S., Huang J., Ling N., Xu Y., Shen Q. 2013. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth. Crop Protection, 43, 0: 134–140

Tans-Kersten J., Brown D., Allen C. 2004. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. Molecular Plant-Microbe Interactions, 17, 6: 686–695

Tans-Kersten J., Huang H., Allen C. 2001. *Ralstonia solanacearum* Needs Motility for Invasive Virulence on Tomato. The Journal of Bacteriology, 183, 12: 3597–3605

Thanikaivelan P., Rao J. R., Nair B. U., Ramasami T. 2004. Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing. Trends in Biotechnology, 22, 4: 181–188

Trigueros V., Lougarre A., Ali-Ahmed D., Rahbe Y., Guillot J., Chavant L., Fournier D., Paquereau L. 2003. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of a new pesticidal protein. Biochimica et Biophysica Acta, 1621, 3: 292–298

Upadhyay R. C., Singh M. 2010. Production of Edible Mushrooms. In: The Mycota Industrial Applications X. 2nd ed. Hofrichter M. (ed.), Berlin, Springer: 79–97

Erjavec J. Vpliv proteininskih ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Ussuf K. K., Laxmi N. H., Mitra R. 2001. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science India*, 80, 847–853
- Vetter J. 1998. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon*, 36, 1: 13–24
- Voet D., Voet J. G. 1995. *Biochemistry*. 4th ed., Hoboken, Wiley: 1361 str.
- Walser P. J., Haebel P. W., Kunzler M., Sargent D., Kues U., Aebi M., Ban N. 2004. Structure and functional analysis of the fungal galectin CGL2. *Structure*, 12, 4: 689–702
- Walters D. R. 2009. Are plants in the field already induced? Implications for practical disease control. *Crop Protection*, 28, 6: 459–465
- Wang L., Ridgway D., Gu T., Moo-Young M. 2005. Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, 23, 2: 115–129
- Wang Z., Feng S., Huang Y., Li S., Xu H., Zhang X., Bai Y., Qiao M. 2010. Expression and characterization of a *Grifola frondosa* hydrophobin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 72, 1: 19–25
- Wasser S. P. 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89, 5: 1323–1332
- Wei Z., Yang X., Yin S., Shen Q., Ran W., Xu Y. 2011. Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Applied Soil Ecology*, 48, 2: 152–159
- Weller S. A., Elphinstone J. G., Smith N. C., Boonham N., Stead D. E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 7: 2853–2858
- Wienkers L. C., Heath T. G. 2005. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nature Reviews. Drug discovery*, 4, 10: 825–33

Erjavec J. Vpliv proteinских ekstraktov in čistih proteinov iz gliv ... na ... bakterijo *R. solanacearum*.

Dokt. disertacija, Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, 2015

- Winstead N. N., Kelman A. 1952. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 42, 11: 628–634
- Wohlleben W., Subkowski T., Bollschweiler C., Vacano B. von, Liu Y., Schrepp W., Baus U. 2010. Recombinantly produced hydrophobins from fungal analogues as highly surface-active performance proteins. *European Biophysics Journal*, 39, 3: 457–468
- Wong J. H., Ng T. B., Cheung R. C., Ye X. J., Wang H. X., Lam S. K., Lin P., Chan Y. S., Fang E. F., Ngai P. H., Xia L. X., Ye X. Y., Jiang Y., Liu F. 2010. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 4: 1221–1235
- Xu X., Yan H., Chen J., Zhang X. 2011. Bioactive proteins from mushrooms. *Biotechnology Advances*, 29, 6: 667–674
- Xue Q.-Y., Chen Y., Li S.-M., Chen L.-F., Ding G.-C., Guo D.-W., Guo J.-H. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control*, 48, 3: 252–258
- Yao J., Allen C. 2006. Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 188, 10: 3697–708
- Yeh C. M., Yeh C. K., Hsu X. Y., Luo Q. M., Lin M. Y. 2008. Extracellular Expression of a Functional Recombinant *Ganoderma lucidum* Immunomodulatory Protein by *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 4: 1039–1049
- Yildiz S., Yildiz Ü. C., Gezer E. D., Temiz A. 2002. Some lignocellulosic wastes used as raw material in cultivation of the *Pleurotus ostreatus* culture mushroom. *Process Biochem*, 38, 3: 301–306
- Yin H., Zhou Y., Xu J., Ai S., Cui L., Zhu L. 2010. Amperometric biosensor based on tyrosinase immobilized onto multiwalled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine-silk fibroin film and its application to determine bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 659, 1-2: 144–150

- Yoshikawa K., Kuroboshi M., Arihara S., Miura N., Tujimura N., Sakamoto K., Zapantis A., Lacy M. K., Horvat R. T., Grauer D., Barnes B. J., O'Neal B., Couldry R. 2002. New triterpenoids from *Tricholoma saponaceum*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 50, 12: 1603–1606
- Young C. L., Britton Z. T., Robinson A. S. 2012. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. Biotechnology Journal, 7: 620–634
- Zhang, R., Zhang G., Hu D., Wang H., Ng T. 2010. A Novel Ribonuclease with Antiproliferative Activity from Fresh Fruiting Bodies of the Edible Mushroom *Lyophyllum shimeiji*. Biochemical Genetics, 48, 7: 658–668
- Zhao S., Guo Y. X., Liu Q. H., Wang H. X., Ng T. B. 2009. Lectins but not antifungal proteins exhibit anti-nematode activity. Environmental Toxicology and Pharmacology, 28, 2: 265–268
- Zheng S., Liu Q., Zhang G., Wang H., Ng T. B. 2010. Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom *Clitocybe sinopica*. Acta Biochimica Polonica, 57, 1: 43–48
- Želko Gosak M. 2010. Proučevanje protibakterijskega učinka ekstraktov gliv. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 100 str.

ZAHVALA

Zahvaljujem se Agenciji za raziskovalno delavnost Republike Slovenije za sofinanciranje raziskovalnega dela.

Zahvaljujem se članom komisije za kritičen pregled disertacije in konstruktivne predloge, ki so izboljšali vsebino.

Lidiji Matičič in Špeli Prijatelj Novak se zahvaljujem za pomoč pri pripravi rastlin paradižnika in krompirja za teste patogenosti, gojenju micelija *C. geotropa* in *in vitro* testiranju inhibitorne aktivnosti ekstraktov.

Hvala Andreju Blejcu, Ani Rotter in Živi Ramšak za nasvete glede statistične obdelave podatkov in pomoč pri analizi podatkov s programom R statistical.

Hvala Simonu Isteniču in Marcu Friebeju za pomoč pri izvedbi *in vitro* testiranja inhibitorne aktivnosti ekstraktov in frakcij ter testiranja LAO aktivnosti.

Hvala Mirjani Oblak in Heleni Valas za pomoč pri patentni prijavi in trženju patenta.

Hvala Tinetu Grebencu za pomoč pri nabiranju in identifikaciji trosnjakov ter hvala za nasvete glede *in vitro* gojenja micelija.

Hvala Jerica Sabotič in Jože Brzin z Inštituta Jožef Stefan za uspešno, večletno sodelovanje ter znanje o proteinih iz gob, ki sta ga delila z mano.

Iskrena hvala Tanja Dreo za svoje znanje, ki si ga vedno z veseljem delila, strokovno pomoč pri raziskavi, vzpodbudo in podporo tudi takrat, ko stvari niso šle po načrtih.

Iskrena hvala moji mentorici Maji Ravnikar za vodenje, vspodbujanje in strokovno pomoč pri raziskavi. Maja, v izjemno čast mi je, da si moja mentorica in imam neizmerno srečo, da sem lahko opravljala delo na oddleku FITO, ki brez tebe ne bi bil tak kot je.

Hvala bakteriologom za dobre kave, dobro družbo in vso podporo v času mojega dela na FITO.

Hvala sodelavcem na FITO za odlično delovno vzdušje.

Hvala mami, Marijana in Janez za vso ljubezen in podporo na moji poklicni poti. Hvala Bor in Zoja, ker z mano raziskujeta svet in mi polepšata še tako deževen dan. In hvala Jure, ker si mi vedno stal ob strani. Rada vas imam.

PRILOGE

Priloga A: Viri, ki so citirani v Tabeli 1.

Appendix A: References cited in Table 1.

- 1 Wang, H., *in sod.* (2004) Alveolarin, a novel antifungal polypeptide from the wild mushroom *Polyporus alveolaris*. *Peptides* 25, 693-696
- 2 Ngai, P.H.K., *in sod.* (2005) Agrocybin, an antifungal peptide from the edible mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides* 26, 191-196
- 3 Park, B.T., *in sod.* (2009) Antifungal and anticancer activities of a protein from the mushroom *Cordyceps militaris*. *Korean J Physiol Pharmacol* 13, 49-54
- 4 Wong, J.H., *in sod.* (2011) Cordymin, an antifungal peptide from the medicinal fungus *Cordyceps militaris*. *Phytomedicine* 18, 387-392
- 5 Wang, H. and Ng, T.B. (2004) Eryngin, a novel antifungal peptide from fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Peptides* 25, 1-5
- 6 Wang, H. and Ng, T.B. (2006) Ganodermin, an antifungal protein from fruiting bodies of the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *Peptides* 27, 27-30
- 7 Lam, S.K. and Ng, T.B. (2001) Hypsin, a novel thermostable ribosome-inactivating protein with antifungal and antiproliferative activities from fruiting bodies of the edible mushroom *Hypsizigus marmoreus*. *Biochem Bioph Res Co* 285, 1071-1075
- 8 Ngai, P.H.K. and Ng, T.B. (2003) Lentin, a novel and potent antifungal protein from shiitake mushroom with inhibitory effects on activity of human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and proliferation of leukemia cells. *Life Sci* 73, 3363-3374
- 9 Lam, S.K. and Ng, T.B. (2001) First simultaneous isolation of a ribosome Inactivating protein and an antifungal protein from a mushroom (*Lyophyllum shimeji*) together with evidence for synergism of their antifungal effects. *Arch Biochem Biophys* 393, 271-280
- 10 Chu, K.T., *in sod.* (2005) Pleurostrin, an antifungal peptide from the oyster mushroom. *Peptides* 26, 2098-2103

- 11 Ngai, P.H.K. and Ng, T.B. (2004) A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Peptides* 25, 11-17
- 12 Guo, Y., *in sod.* (2005) Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides* 26, 575-580
- 13 Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Julich W. D. 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms. *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, **2** (3), 285–299
- 14 Gerasimenya, V.P., *in sod.* (2002) Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.:Fr.) Kumm. extracts. *Int J Med Mushrooms* 4, 127-132
- 15 Zheng S., Liu Q., Zhang G., Wang H., Ng T. B. 2010. Purification and characterization of an antibacterial protein from dried fruiting bodies of the wild mushroom *Clitocybe sinopica*. *Acta Biochim. Pol.*, **57** (1), 43–48
- 16 Gu, C.Q., *in sod.* (2007) Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-1 protein from *Grifola frondosa*. *Antivir Res* 75, 250-257
- 17 Collins, R.A. and Ng, T.B. (1997) Polysaccharopeptide from *Coriolus versicolor* has potential for use against human immunodeficiency virus type 1 infection. *Life Sci* 60, PL383-387
- 18 Han, C.H., *in sod.* (2010) Schizolysin, a hemolysin from the split gill mushroom *Schizophyllum commune*. *FEMS Microbiol Lett* 309, 115-121
- 19 Guo Y., Wang H., Ng T. B. 2005. Isolation of trichogin, an antifungal protein from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma giganteum*. *Peptides*, **26** (4), 575–80
20. Wang, H. and Ng, T.B. (2001) Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular-weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Sci* 68, 2151-2158
- 21 Wu, Y.Y., *in sod.* (2011) A novel metalloprotease from the wild basidiomycete mushroom *Lepista nuda*. *J Microbiol Biotechnol* 21, 256-262

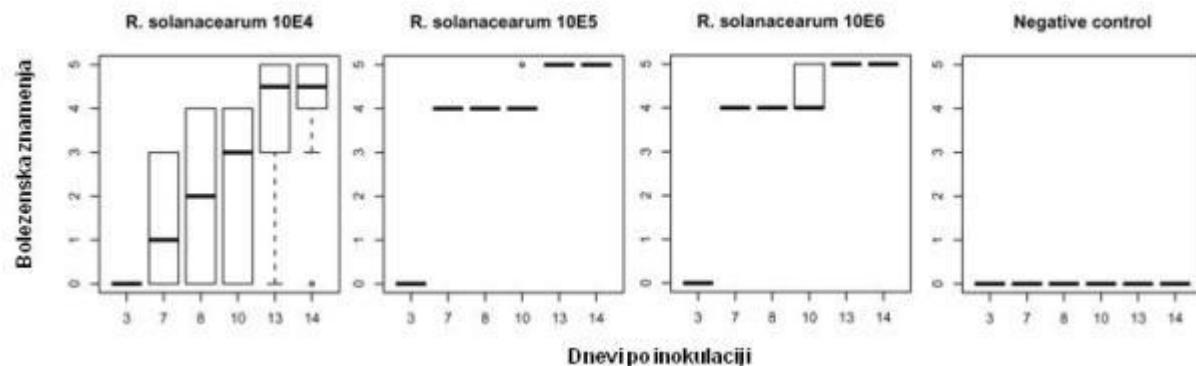
- 22 Mentel, R., *in sod.* (1994) In vitro antiviral effect of extracts of *Kuehneromyces mutabilis* on influenza virus. *Pharmazie* 49, 859-860
- 23 Johannes C. Coetzee, J. C. in Wyk, A. E. 2009. The genus Calvatia (Gasteromycetes, Lycoperdaceae): A review of its ethnomycology and biotechnological potential. African Journal of Biotechnology Vol. 8 (22), pp. 6007-6015
- 24 Hsiao, Y.M., *in sod.* (2008) Effect of a fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae* on cell cycle and interferon-gamma production through phosphatidylinositol 3-kinase signal pathway. *Process Biochem* 43, 423-430
- 25 Fujii, T., *in sod.* (1978) Isolation and characterization of a new antitumor polysaccharide, KS-2, extracted from culture mycelia of *Lentinus edodes*. *J Antibiot (Tokyo)* 31, 1079-1090
- 26 Zhang, J., *in sod.* (1994) Antitumor polysaccharides from a Chinese mushroom, "Yuhuangmo," the fruiting body of *Pleurotus citrinopileatus*. *Biosci Biotech Biochem* 58, 1195-1201
- 27 Cao, Q.Z. and Lin, Z.B. (2006) *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide inhibits the growth of vascular endothelial cell and the induction of VEGF in human lung cancer cell. *Life Sci* 78, 1457-1463
- 28 Yu, L., *in sod.* (1993) Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res* 53, 4627-4632
- 29 Yang, N., *in sod.* (2005) Molecular character of the recombinant antitumor lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. *J Biochem* 138, 145-150
- 30 Lam S., Ng T. 2010. Lectins: production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1-11
- 31 Girjal, V.U., *in sod.* (2011) *Ganoderma lucidum*: a source for novel bioactive lectin. *Protein Pept Lett* 18, 1150-1157
- 32 Pohleven, J., *in sod.* (2009) Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochim Biophys Acta* 1790, 173-181

- 33 Zhang, G.Q., *in sod.* (2009) A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. *Acta Biochim Pol* 56, 415-421
- 34 Wang, H.X., *in sod.* (1995) Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide-peptide complex from a mycelial culture of *Tricholoma* sp., a local edible mushroom. *Life Sci* 57, 269-281
- 35 Wu, Y., *in sod.* (2011) Purification and characterization of a novel RNase with antiproliferative activity from the mushroom *Lactarius flavidulus*. *J Antibiot (Tokyo)*
- 36 Wang, H.X., *in sod.* (2003) A ubiquitin-like peptide with ribonuclease activity against various polyhomoribonucleotides from the yellow mushroom *Cantharellus cibarius*. *Peptides* 24, 509-513
- 37 Wu, J.Y., *in sod.* (2010) Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *Pleurotus ostreatus* and *Volvariella volvacea*. *Evid-Based Compl Alt Med*, 10
- 38 Ngai, P.H., *in sod.* (2003) Purification and characterization of a ubiquitin-like peptide with macrophage stimulating, antiproliferative and ribonuclease activities from the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Peptides* 24, 639-645
- 39 Kodama, N., *in sod.* (2003) Effect of Maitake (*Grifola frondosa*) D-Fraction on the activation of NK cells in cancer patients. *J Med Food* 6, 371-377
- 40 Hsu, H.C., *in sod.* (1997) Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea*. *Biochem J* 323 (Pt 2), 557-565
- 41 Kino, K., *in sod.* (1989) Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8), from *Ganoderma lucidum*. *J Biol Chem* 264, 472-478
- 42 Ko, J.L., *in sod.* (1995) A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence. *Eur J Biochem* 228, 244-249
- 43 Sheu, F., *in sod.* (2009) Purification, cloning, and functional characterization of a novel immunomodulatory protein from *Antrodia camphorata* (bitter mushroom) that exhibits TLR2-dependent NF-kappaB activation and M1 polarization within murine macrophages. *J Agric Food Chem* 57, 4130-4141

- 44 Chen, J.N., *in sod.* (2011) Inhibitory effect of a glycoprotein isolated from golden oyster mushroom (*Pleurotus citrinopileatus*) on the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in RAW 264.7 macrophage. *J Agric Food Chem* 59, 7092-7097
- 45 Li, F., *in sod.* (2011) Purification and characterization of a novel immunomodulatory protein from the medicinal mushroom *Trametes versicolor*. *Sci China Life Sci* 54, 379-385
- 46 Jeurink, P.V., *in sod.* (2008) Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 8, 1124-1133
- 47 Ng, T.B. and Wang, H. (2004) Adustin, a small translation-inhibiting polypeptide from fruiting bodies of the wild mushroom *Polyporus adusta*. *Peptides* 25, 689-692
- 48 Ng, T.B., *in sod.* (2003) Calcaelin, a new protein with translation-inhibiting, antiproliferative and antimitogenic activities from the mosaic puffball mushroom *Calvatia caelata*. *Planta Med* 69, 212,217
- 49 Ng, T.B. and Wang, H.X. (2004) Flammin and velin: new ribosome inactivating polypeptides from the mushroom *Flammulina velutipes*. *Peptides* 25, 929-933
- 50 Wang, H. and Ng, T.B. (2000) Flammulin: a novel ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Biochem Cell Biol* 78, 699-702
- 51 Wang, H.X. and Ng, T.B. (2001) Isolation of Pleturegin, a novel ribosome-inactivating protein from fresh sclerotia of the edible mushroom *Pleurotus tuber-regium*. *Biochem Biophys Res Co* 288, 718-721

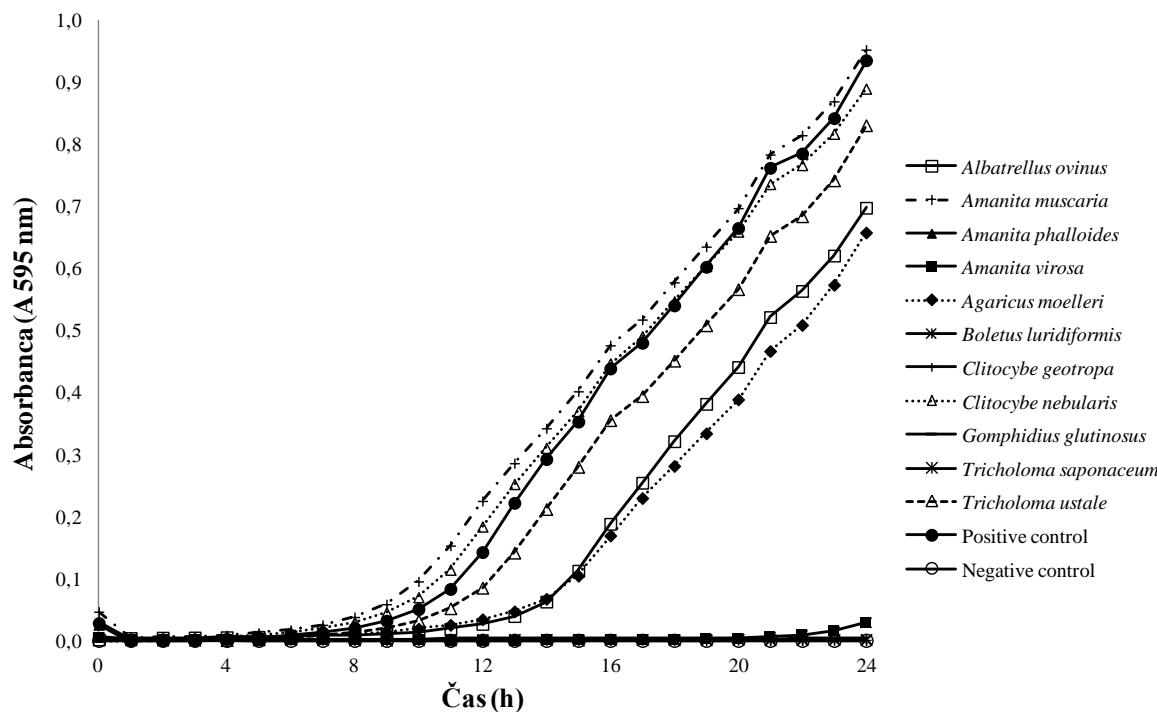
Priloga B: Inokulacija rastlin paradižnika cv. ‘Moneymaker’ z različnimi koncentracijami *R. solanacearum*. Ugotovili smo, da koncentracija 10^5 cfu/ml, povzroča značilne simptome na vseh rastlinah. Zato smo to koncentracijo uporabili v vseh naslednjih testih patogenosti.

Appendix B: Inoculation of tomato cv. ‘Moneymaker’ plants with different *R. solanacearum* concentrations. Concentration of bacteria 10^5 cfu/mL causes typical symptoms on all inoculated plants, therefore this was the chosen concentration that would be used in further pathogenicity testing.



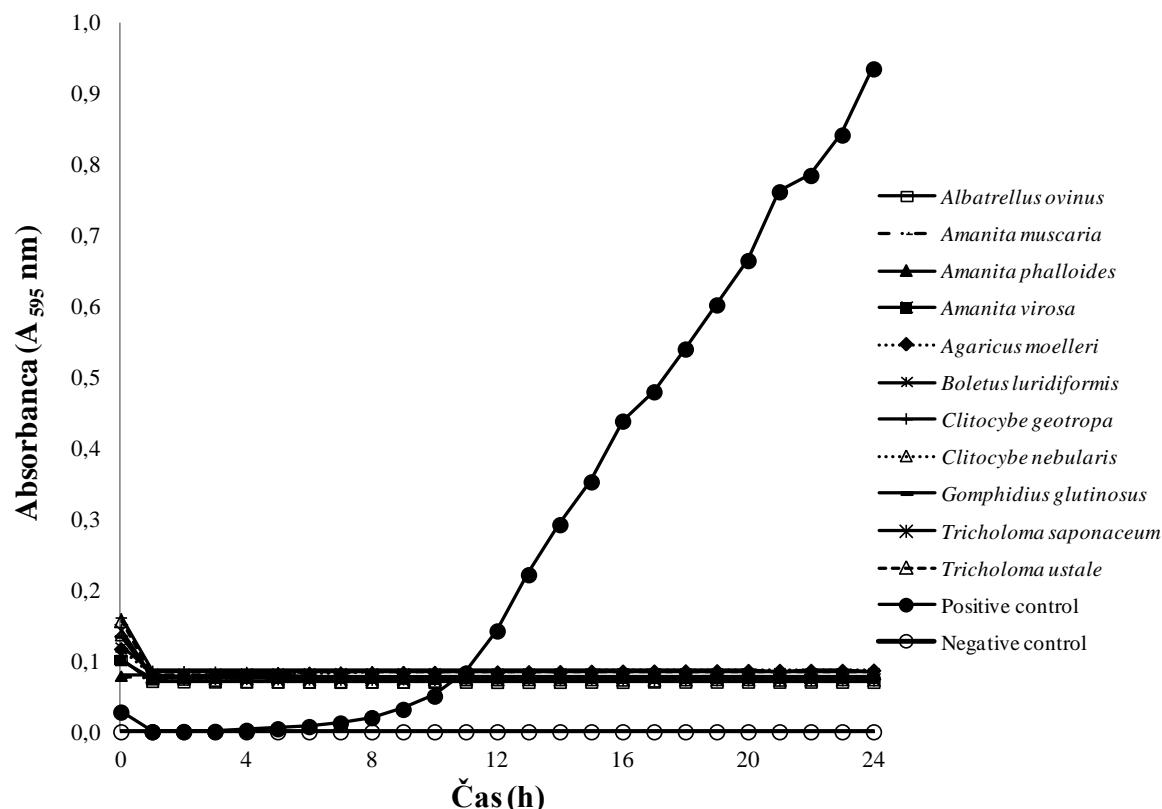
Priloga C: Inhibitorna aktivnost *R. solanacearum* NIB Z 30 izbranih ekstraktov iz gob.

Appendix C: Inhibitory activity of the selected mushroom extracts against *R. solanacearum* NIB Z 30.



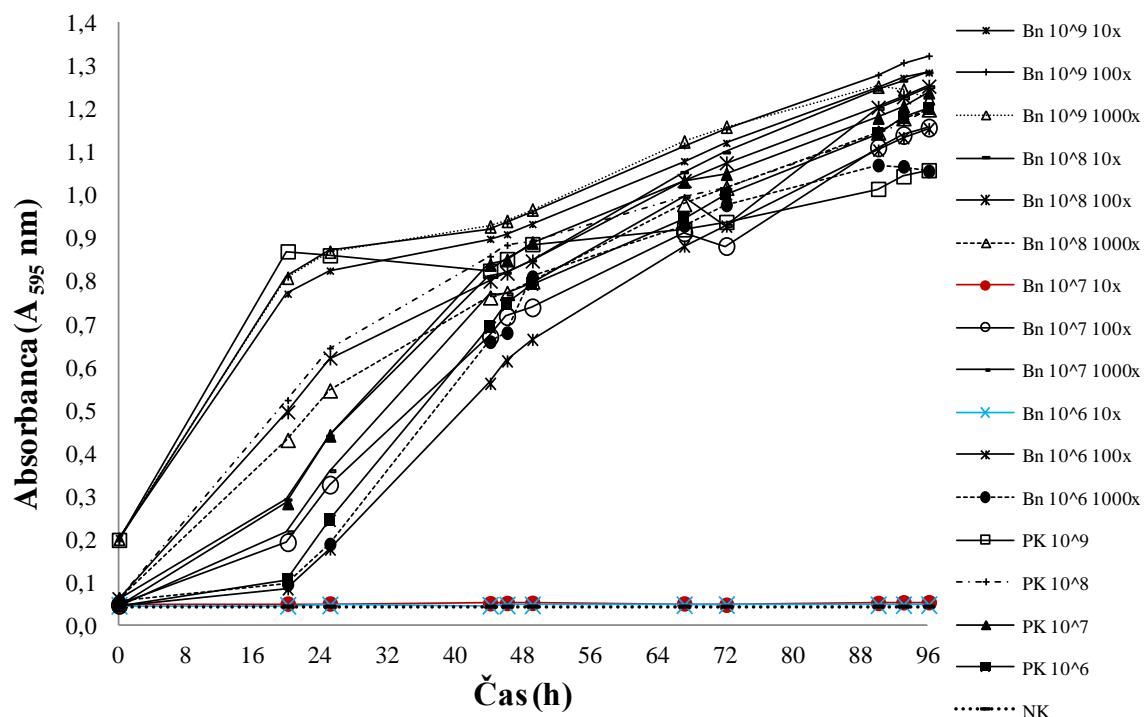
Priloga D: Kontrola sterilnosti ekstraktov, ki smo jo preverjali v vsakem *in vitro* testu na mikrotitrski ploščici. Krivulje ekstraktov so ravne, vendar nekoliko nad negativno kontrolo, ker ekstrakti obarvajo suspenzijo. Ker vrednosti A₅₉₅ ne naraščajo pomeni, da so ekstrakti sterilni.

Appendix D: Control of the extract sterility was monitored on every microtitre plate in the *in vitro* testing. Extracts slightly colour the suspension, causing extract control curves to be slightly above negative control curve. However, A₅₉₅ values are constant, confirming the extract sterility.



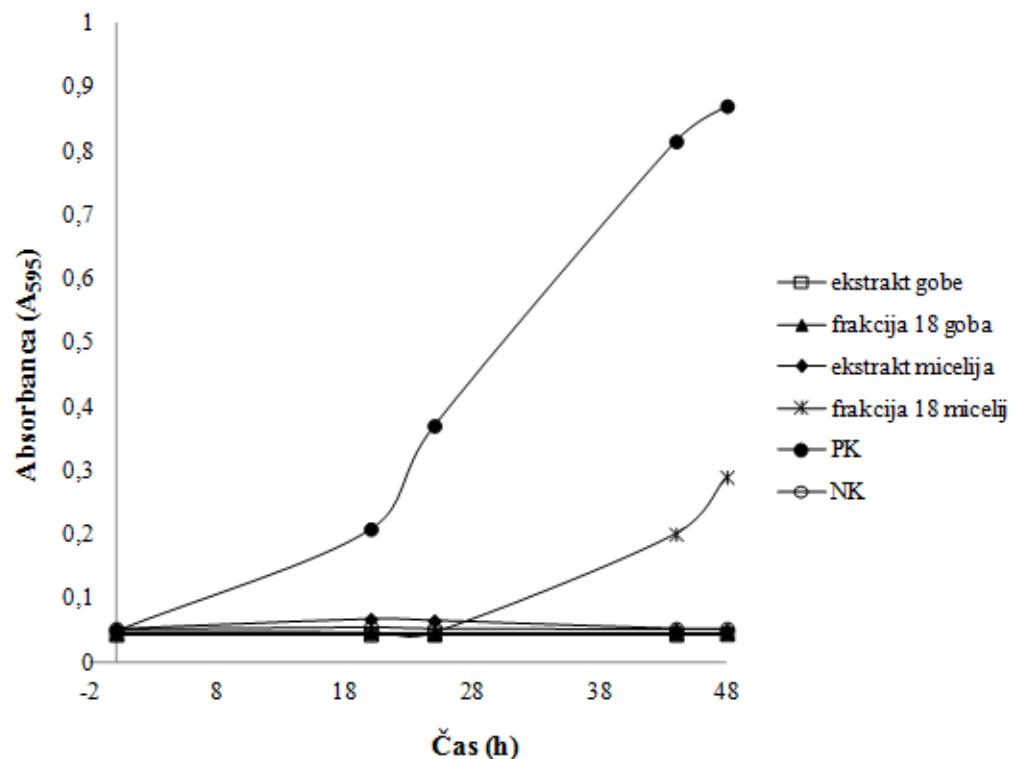
Priloga E: Preverjanje *in vitro* inhibicije ekstrakta *B. nigrescens* (redčen 10-krat, 100-krat, 1000-krat) proti različnim koncentracijam *R. solanacearum* (10^9 , 10^8 , 10^7 in 10^6 celic/mL). 10-krat redčen ekstrakt je popolnoma inhibiral *R. solanacearum* v koncentraciji 10^6 in 10^7 celic/mL.

Appendix E: *B. nigrescens* *in vitro* inhibition of different concentrations of *R. solanacearum* (10^9 , 10^8 , 10^7 in 10^6 cells/mL). extract was diluted 10-fold, 100-fold and 1000-fold. Only 10-fold dilution inhibited *R. solanacearum* concentrations of 10^6 cells/mL and 10^7 cells/mL.



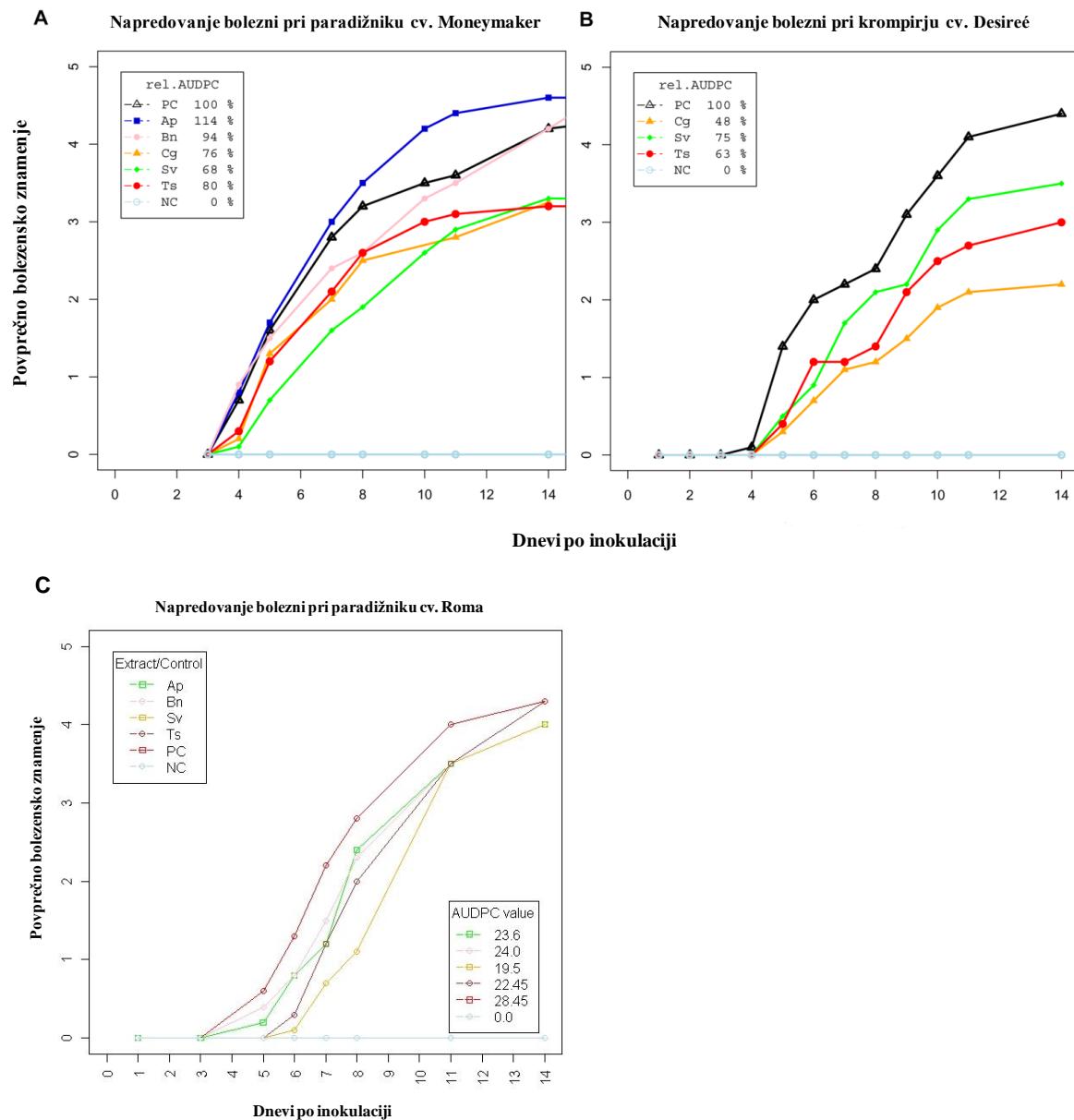
Priloga F: Rezultati inhibitorne aktivnosti ekstraktov ter frakcij gob in micelija *C. geotropa* pred in po kuhanju.

Appendix F: Results of the inhibitory activity of *C. geotropa* mushroom and mycelium extracts and fractions before and after boiling.



Priloga G: Pri okuženih rastlinah paradižnika (cv. Roma in cv. 'Moneymaker') in krompirja cv. 'Désirée', smo izračunali površino območja pod krivuljo napredovanja bolezni (AUDPC), s katero izrazimo intenziteto bolezni po času, ki smo jo izrazili relativno glede na pozitivno kontrolo (% PC).

Appendix G: Area under disease progress curve (AUDPC) values were calculated for inoculated tomato plants (cv. Roma and cv. 'Moneymaker') and potato plants cv. 'Désirée'. Values were expressed relative to positive control values (% PC).



Priloga H: Lizin oksidaza iz *T. viride* v koncentraciji 0,6 mg/mL, uniči velik delež celic *R. solanacearum* takoj ko pride z njimi v stik.

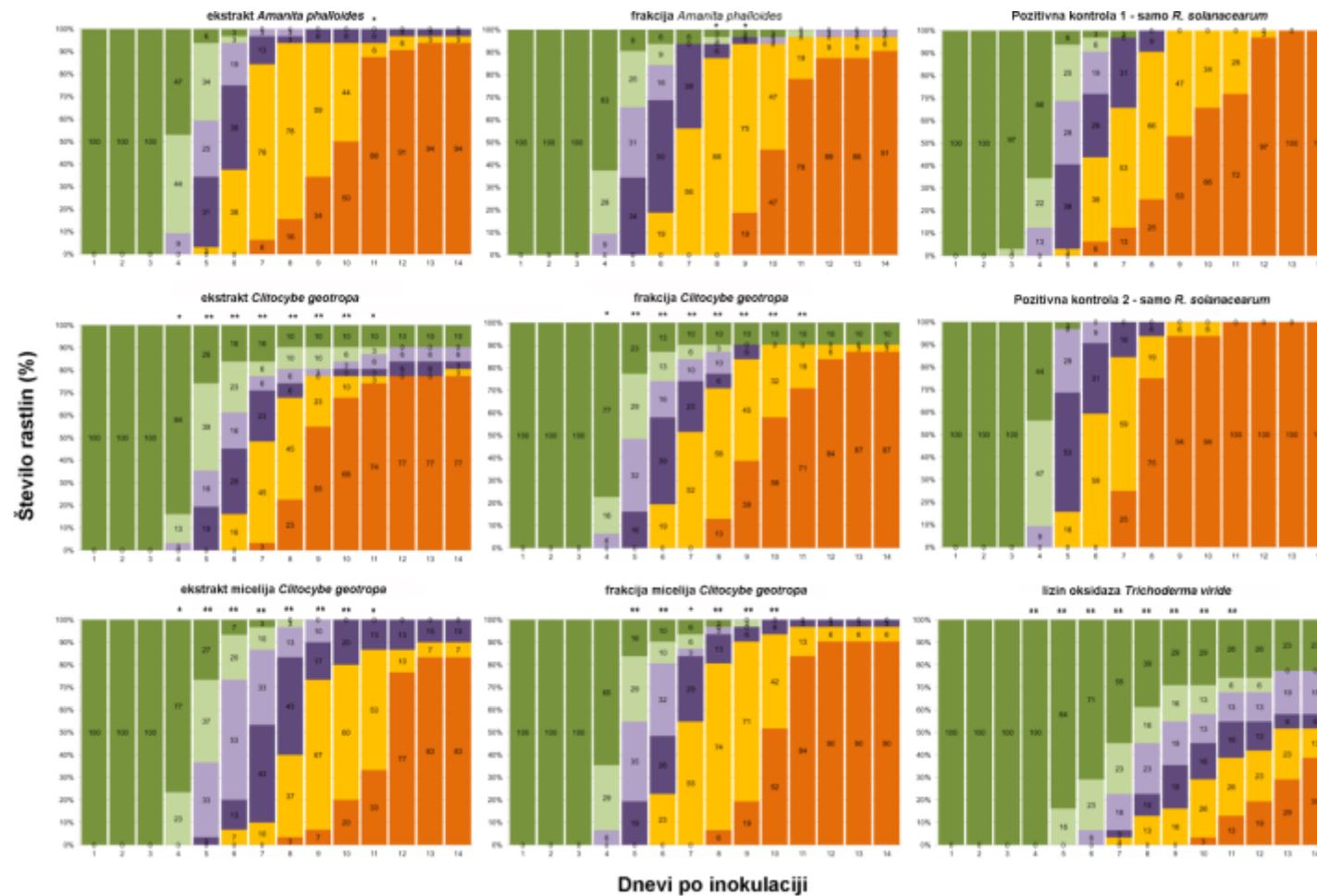
Appendix H: *T. viride* lysine oxidase kills large proportion of *R. solanacearum* cells as soon as it comes into contact with them.

redčitvena vrsta - nanos na gojišče	čas inkubacije <i>R. solanacearum</i> in ekstrakta (razmerje 10:1)			
	0 min	10 min	30 min	3 h
	koncentracija <i>R. solanacearum</i> (cfu/mL)			
lizin oksidaza <i>T. viride</i> (0.6 mg/mL)	10⁵	0	0	0
	10⁴	0	0	0
	10³	167	300	50
	10²	83	83	50
	10¹	0	17	50
	10⁰	67	33	17
pozitivna kontrola <i>R. solanacearum</i> (10E6 celic/mL)	10⁵	na ^a	na	na
	10⁴	na	na	na
	10³	383	550	300
	10²	117	167	50
	10¹	50	0	17
	10⁰	67	17	0

na^a: izračun koncentracije ni mogoč, ker je bila plošča neštevna (kolonije so se zlivale)

Priloga I: Ponovitev testa patogenosti na paradižniku cv. ‘Moneymaker’. Poleg ekstraktov *C. geotropa* in *A. phalloides* smo testirali tudi ekstrakt in frakcijo micelija *C. geotropa* ter frakcijo *A. phalloides*. Kot kontrolo LAO aktivnosti smo uporabili lizin oksidazo iz *T. viride*.

Appendix I: Pathogenicity test on tomato cv ‘Moneymaker’ repeated for the second time. Besides *C. geotropa* and *A. phalloides* extracts, *C. geotropa* mycelium extracts and mycelium fraction, as well as *A. phalloides* fraction were also included. *T. viride* lysine oxidase was used as a control enzyme for LAO activity.



Priloga J: Rastline paradižnika inokulirane samo z ekstrakti iz gob *A. phalloides* (Ap), *B. nigrescens* (Bn), *Suillus variegatus* (Sv) in *Tricholoma saponaceum* (Ts).

Tako 7 kot 12 dni po inokulaciji nismo opazili niti negativnega niti pozitivnega vpliva na rast rastlin v primerjavi s pozitivno (PK) in negativno (NK) kontrolo.

Appendix J: Tomato plants inoculated only with protein extracts from *A. phalloides* (Ap), *B. nigrescens* (Bn), *Suillus variegatus* (Sv) and *Tricholoma saponaceum* (Ts).

When compared to positive control (PC) and negative control (NC) neither positive nor negative effect on plant growth was observed 7 and 12 days post-inoculation.



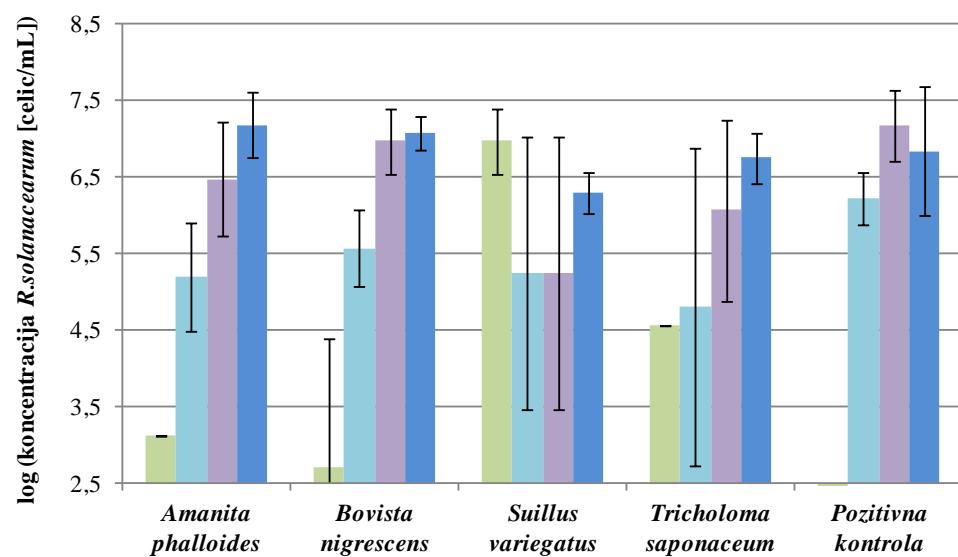
Priloga K: Koncentracija *R. solanacearum* v rastlinah paradižnika cv. Roma.

Koncentracija *R. solanacearum* določena s PCR v realnem času (logaritemska lestvica), v prvem (A) in drugem (B) nodiju rastlin paradižnika cv. Roma inokuliranih z *R. solanacearum* in proteinskimi ekstrakti iz gob. V vsaki skupini smo vzorčili 4 rastline paradižnika, in sicer 3, 5, 7 and 8 dpi.

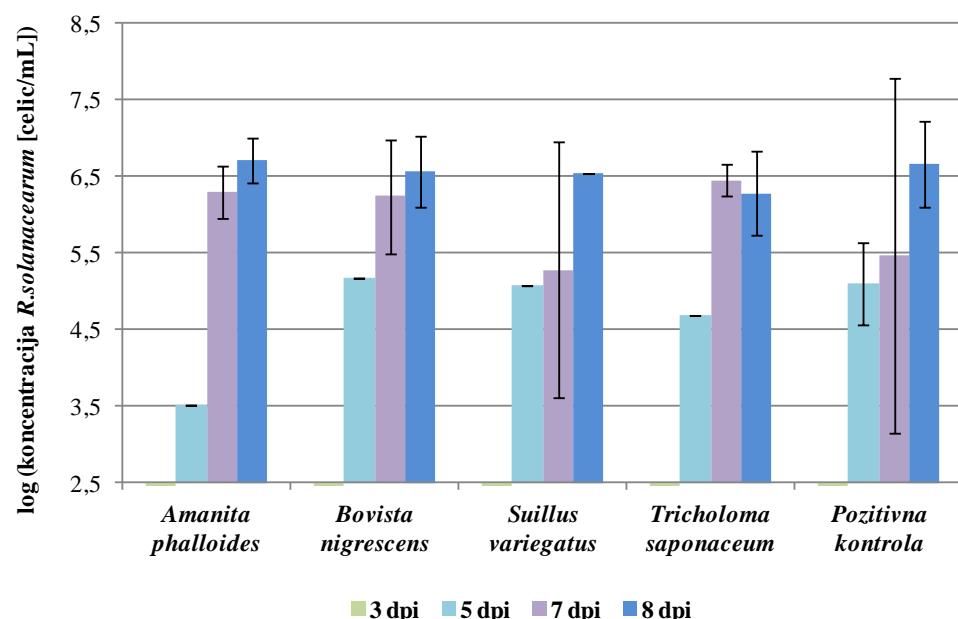
Appendix K: *R. solanacearum* concentration in tomato plants cv. Roma.

R. solanacearum concentration determined by qPCR analysis (log scale) in the first (A) and in the second node (B) of tomato cv. Roma inoculated with *R. solanacearum* and mushroom protein extracts. In each group, 4 plant samples were taken 3, 5, 7 and 8 dpi

A



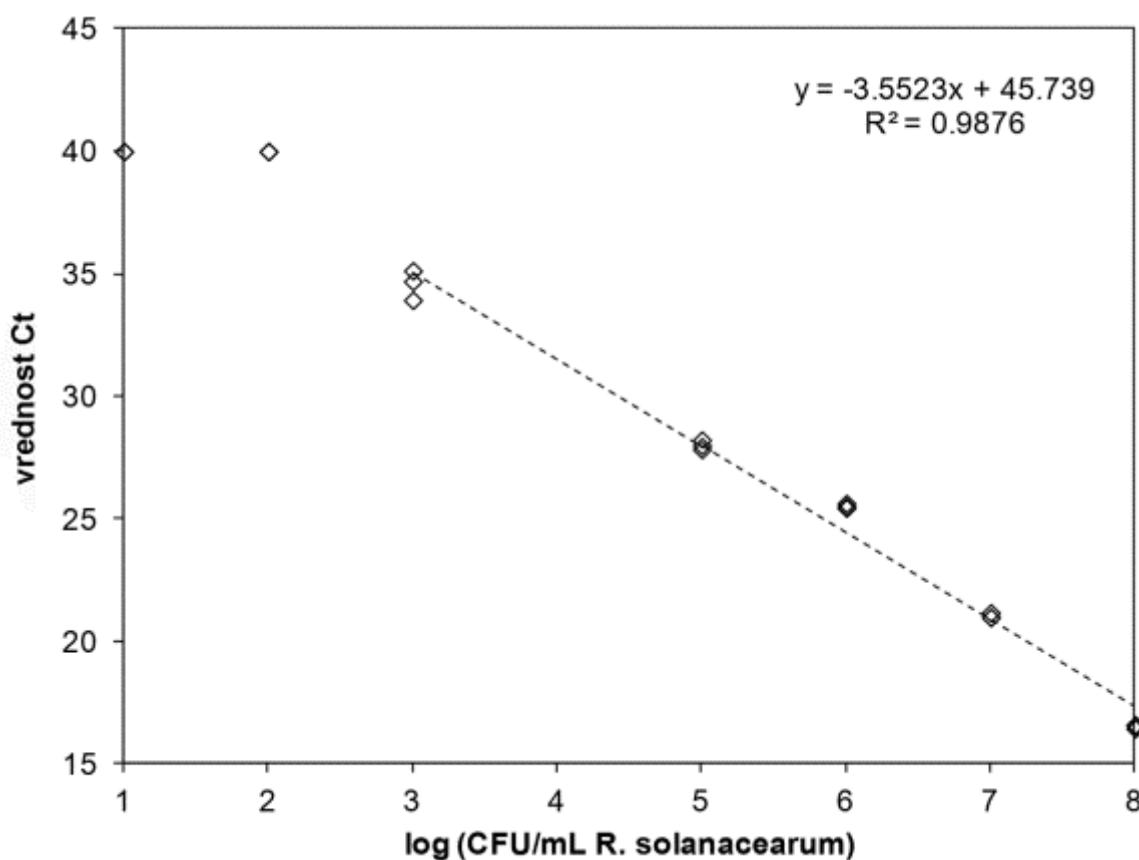
B



Priloga L: Podatki in prikaz umeritvene krivulje *R. solanacearum* analizirane s PCR v realnem času. Umeritvene krivulje smo poleg vzorcev, nanesli na vsako ploščico s 384 luknjicami in jih uporabili kot osnovo za izračun koncentracij *R. solanacearum* v vzorcih paradižnika.

Appendix L: *R. solanacearum* data and standard curve in real-time PCR analysis. Standard curve was pipetted on every 384-well plate and was used to calculate *R. solanacearum* concentration in tomato plant samples.

konc. <i>R. solanacearum</i>	Ct (Rs)			povprečni Ct (Rs)	Cv(Ct)	(konc. Rs)	log naklon (dCt)
	paralelka 1	paralelka 2	paralelka 3				
1,0E+08	16,4	16,6	16,6	16,5	0,00	8	
1,0E+07	21,0	21,0	21,2	21,0	0,01	7	
1,0E+06	25,4	25,5	25,6	25,5	0,00	6	
1,0E+05	28,0	27,8	28,2	28,0	0,01	5	-3,30
1,0E+03	34,7	35,1	33,9	34,6	0,02	3	
1,0E+02	Und (45)	Und (45)	Und (45)	NA	NA	2	
1,0E+01	Und (45)	Und (45)	Und (45)	NA	NA	1	

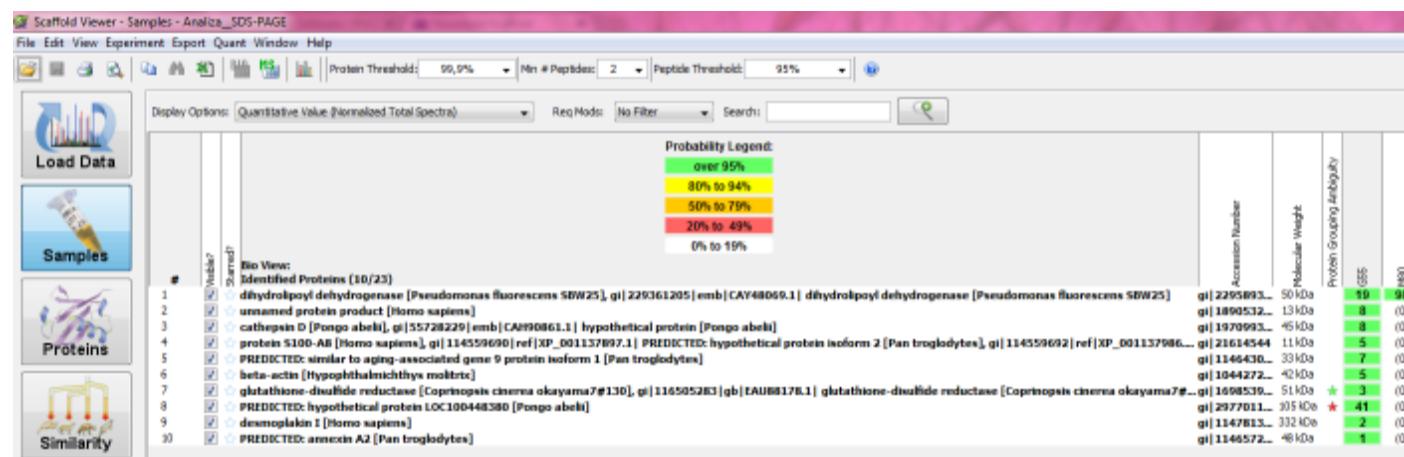


Priloga M: Primer zadetkov iskanja po bazah podatkov na podlagi analize masne spektrometrije pik (proteinov) *C. geotropa* izrezanih iz 2DE gela (A) in lis izrezanih iz NaDS-PAGE (B). MS analizo sta opravila M. Fonović in J. Pohleven, IJS.

Appendix M: Database search after mass spectrometry analysis of *C. geotropa* spots (proteins) cut out of 2DE gel (A) and bands cut out of SDS-PAGE (B). MS analysis was performed by M. Fonović and J. Pohleven, IJS.

11							ni uiemania
17							
		59684	8.91	Laccaria bicolor S238N-H82	170107939	predicted protein	
		75234	5.32	Coprinopsis cinerea okayama7#130	169864286	predicted protein	
20	1	14.04	2	82264	6.05	Glomerella cingulata	1679757 2-component histidine kinase CHK-1
	1	13.47	2	56066	7.14	Aspergillus oryzae RIB40	169763744 hypothetical protein
	1	11.13	3	55082	6.42	Aspergillus oryzae RIB40	169778343 hypothetical protein
23	1	12.75	2	56066	7.14	Aspergillus oryzae RIB40	169763744 hypothetical protein
27	1	16.54	5	44741	9.57	Ornithorhynchus anatinus	149577521 PREDICTED: similar to bactericidal/permeability-increasing protein-like 3, partial
	1	12.73	7	40029	6.25	Candida glabrata	50292267 unnamed protein product
	1	12.46	6	30677	6.31	Coprinopsis cinerea okayama7#130	169868000 predicted protein
31	1	12.11	4	29405	4.69	Sclerotinia sclerotiorum 1980	156059971 predicted protein
	1	12.01	13	12009	7.03	Moniliophthora perniciosa FA553	215455204 hypothetical protein MPER_09587
	1	11.2	1	86235	6.03	Chaetomium globosum CBS 148.51	116196310 hypothetical protein CHGG_04753

B



Priloga N: Podatki merjenja premera kolonij *R. solanacearum* za oceno gibljivosti na mehkem agarju z dodanim triptonom.

Appendix N: Data of the measurement of *R. solanacearum* colony diameter on the soft agar plates with tryptone.

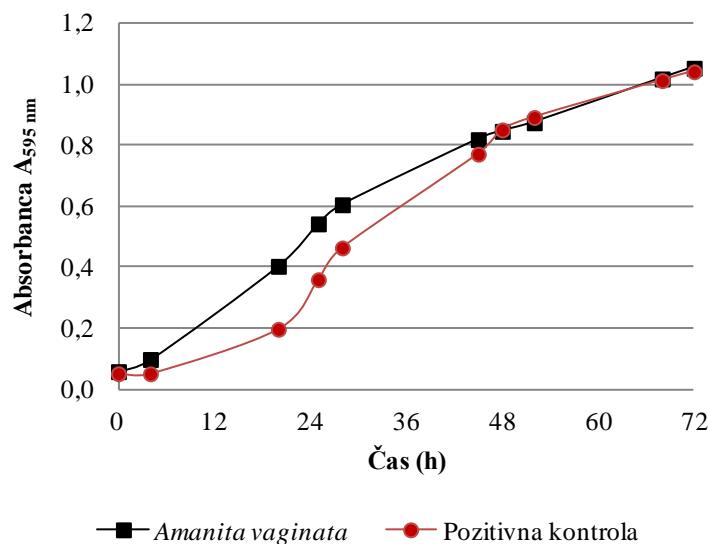
vzorec	premer kolonije <i>R. solanacearum</i> (mm)					standardni povprečje odklon	
	P1	P2	P3	P4	P5		
ekstrakt <i>C. geotropa</i>	42	36	NA	NA	NA	39,0	4,2
frakcija <i>C. geotropa</i>	48	49	47	45	NA	47,3	1,7
ekstrakt micelija <i>C. geotropa</i>	36	46	NA	36	43	40,3	5,1
frakcija micelija <i>C. geotropa</i>	46	47	45	50	44	46,4	2,3
ekstrakt <i>A. phalloides</i>	NA	40	40	38	42	40,0	1,6
frakcija <i>A. phalloides</i>	14	7	15	NA	12	12,0	3,6
lizin oksidaza <i>T. viride</i>	0	0	0	0	0	0,0	0,0
pozitivna kontrola (<i>R. solanacearum</i>)	NA	44	46	45	44	44,8	1,0
negativna kontrola (0.01 M PBS)	0	0	0	0	0	0,0	0,0

P: ponovitev (paralelka)

NA: gojišče ni dobro strjeno in je steklo na pokrov, kot tudi *R. solanacearum*. Premera kolonije nismo mogli izmeriti.

Priloga O: Primer vspodbujanja bakterijske rasti. Rast *R. solanacearum* je v prisotnosti ekstrakta *Amanita vaginata* prvih 48 h hitrejša kot pri pozitivni kontroli.

Appendix O: Example of enhancing *R. solanacearum* growth. Bacteria were growing faster for the first 48 h in the presence of *Amanita vaginata* extract, compared to positive control



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Jana ERJAVEC

**VPLIV PROTEINSKIH EKSTRAKTOV IN ČISTIH
PROTEINOV IZOLIRANIH IZ GLIV
(BASIDIOMYCOTA) TER NJIHOVI UČINKI NA
RASTLINSKO PATOGENO BAKTERIJO *RALSTONIA*
*SOLANACEARUM***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Podiplomski študij biotehnologije

Ljubljana, 2015

