

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok TKAVC

**IDENTIFIKACIJA IN GENOTIPIZACIJA  
ENTOMOPATOGENIH GLIV IZOLIRANIH IZ  
TROGLOFILNIH METULJEV *Scoliopteryx libatrix* L.  
IN *Triphosa dubitata* L.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Rok TKAVC

**IDENTIFIKACIJA IN GENOTIPIZACIJA ENTOMOPATOGENIH  
GLIV IZOLIRANIH IZ TROGLOFILNIH METULJEV *Scoliopteryx  
libatrix* L. IN *Triphosa dubitata* L.**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION AND GENOTYPIZATION OF  
ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATED FROM TROGLOPHILE  
MOTHS *Scoliopteryx libatrix* L. AND *Triphosa dubitata* L.**

GRADUATION THESIS

University Studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih Katedre za biologijo mikroorganizmov na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija mikrobiologije je na seji za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Nino Gunde-Cimerman, za somentorico asist. dr. Silvo Sonjak in za recenzenta prof. Dr. Petra Rasporja.

Mentorica: prof. dr. Nina Gunde-Cimerman

Somentorica: asist. dr. Silva Sonjak

Recenzent: prof. dr. Peter Raspor

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: prof. dr. Nina GUNDE-CIMERMAN

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica asist. dr. Silva SONJAK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Peter RASPOR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega terenskega in raziskovalnega dela.

Rok Tkavc

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 576.8: 577.2.08: 582.28: 595.7 (043) = 863
- KG zajedalstvo/glive/metulji/kraške jame/*Scoliopteryx libatrix* L./*Triphosa dubitata* L./makromorfologija/mikromorfologija/AFLP
- AV TKAVC, Rok
- SA GUNDE-CIMERMAN, Nina (mentorica)/SONJAK, Silva (somentorica)/RASPOR, Peter (recenzent)
- KZ SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2007
- IN IDENTIFIKACIJA IN GENOTIPIZACIJA ENTOMOPATOGENIH GLIV  
IZOLIRANIH IZ TROGLOFILNIH METULJEV *Scoliopteryx libatrix* L. IN  
*Triphosa dubitata* L.
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XIV, 80 str., 16 sl., 11 pregl., 1 pril, 79 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Entomopatogene glive so zelo pomemben ekološki dejavnik, saj vplivajo na velikost, raznolikost in razširjenost populacij žuželk in so pomemben člen v kroženju snovi v oligotrofnih hipogeičnih okoljih. Kadavre in žive odrasle troglofilne metulje vrst *Scoliopteryx libatrix* in *Triphosa dubitata* smo vzorčili v desetih različnih kraških jamah. Iz aseptično odstranjenega črevesa žrtvovanih metuljev nismo uspeli izolirati gliv. Iz kadavrov smo izolirali entomopatogene glive in jih identificirali na podlagi makromorfologije, mikromorfologije in nukleotidnega zaporedja dela ITS1-5,8S rDNA-ITS2 regije DNA. Iz kadavrov smo izolirali tri vrste gliv, in sicer *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* in *Lecanicillium fusisporum*. Najpogosteje smo izolirali seve vrste *Beauveria bassiana*, ki doslej še niso bili izolirani iz gostiteljev *Scoliopteryx libatrix* in *Triphosa dubitata*. Za določitev populacijske strukture smo seve te vrste analizirali z metodo polimorfizma dolžin pomnoženih delov (AFLP). Ugotovili smo, da ima večina sevov zelo nizko stopnjo polimorfizma, da pa se sevi izolirani iz kadavra vrste *Scoliopteryx libatrix* grupirajo glede na jamo, ki jo je metulj naseljeval, oz. so iz ene jame zelo podobni ali identični. Za razliko so bili sevi izolirani iz kadavrov vrste *Triphosa dubitata* zelo raznoliki.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 576.8: 577.2.08: 582.28: 595.7 (043) = 863
- CX parasitism/fungi/moths/karstic caves/*Scoliopteryx libatrix* L./*Triphosa dubitata* L./macromorphology/micromorphology/AFLP
- AU TKAVC, Rok
- AA GUNDE-CIMERMAN, Nina (supervisor)/SONJAK, Silva (co-supervisor)/RASPOR, Peter (reviewer)
- PP SI-Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB Univ. of Ljubljana, Biotechnical Fac., Interdepartmental Program in Microbiology
- PY 2007
- TI IDENTIFICATION AND GENOTYPIZATION OF ENTOMOPATHOGENIC FUNGI ISOLATED FROM TROGLOPHILE MOTHS *Scoliopteryx libatrix* L. AND *Triphosa dubitata* L.
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XIV, 80 p., 16 fig., 11 tab., 1 ann., 79 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Entomopathogenic fungi are very important ecological factor because they influence the insect population size, diversity and distribution and are important in nutrient cycling in oligotrophic hypogaeic environments. Imago and imago cadavers of troglomorphic moths *Scoliopteryx libatrix* and *Triphosa dubitata* were sampled in 10 different limestone caves in slovenian karst. From aseptically isolated intestine of sacrificed imago we couldn't isolate any fungi. From imago's cadavers entomopathogenic fungi were isolated and identified on the basis of macromorphology, micromorphology and one part of the DNA regions' ITS1-5,8S rDNA-ITS2 nucleotide sequence. From hosts three different fungal species were isolated: *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* and *Lecanicillium fusisporum*. Fungal species *Beauveria bassiana* was isolated most frequently, although it wasn't ever isolated from *Scoliopteryx libatrix* and *Triphosa dubitata* before. The population structure of isolated strains of this species was analysed by amplified fragment length polymorphism (AFLP). We found out that the majority of strains had a low rate of polymorphism and that strains isolated from *Scoliopteryx libatrix* cadaver group together regarding cave origin, while strains isolated from *Triphosa dubitata* imago cadavers were in contrast very different.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE.....	1
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>2</b>
2.1 ENTOMOPATOGENE GLIVE .....	2
<b>2.1.1 Sistematika .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.2 Ekologija.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.3 Mehanizmi patogeneze .....</b>	<b>6</b>
2.1.3.1 Struktura kutikule žuželk.....	6
2.1.3.2 Pritrditev spor in kalitev .....	8
2.1.3.3 Prodor glive skozi integument.....	9
2.1.3.4 Rast glive znotraj gostitelja .....	10
<b>2.1.4 Biotehnoška uporabnost entomopatogenih gliv in njihovih presnovkov .</b>	<b>11</b>
<b>2.1.5 Biološka kontrola žuželk.....</b>	<b>12</b>
2.2 JAME.....	15
<b>2.2.1 Definicija .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.2 Speleogeneza .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.3 Jame kot habitat .....</b>	<b>16</b>
2.2.3.1 Troglobionti.....	17
2.2.3.2 Troglofili.....	17
2.2.3.3 Troglokseni.....	18
<b>2.2.4 Mikroorganizmi v jamah .....</b>	<b>18</b>
2.3 TROGLOFILNA METULJA <i>Scoliopteryx libatrix</i> L. IN <i>Triphosa dubitata</i> L. ....	19

<b>2.3.1 Sistem</b> .....	<b>19</b>
<b>2.3.2 Morfologija</b> .....	<b>20</b>
2.3.2.1 Opis vrste <i>Triphosa dubitata</i> .....	20
2.3.2.2 Opis vrste <i>Scoliopteryx libatrix</i> .....	21
<b>2.3.3 Življenjski cikel</b> .....	<b>22</b>
<b>2.4 METODE ZA IDENTIFIKACIJO ENTOMOPATOGENIH GLIV</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4.1 Morfologija</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4.2 Kemotaksonomija</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.3 Fiziologija</b> .....	<b>24</b>
<b>2.4.4 Molekularno-genetske metode</b> .....	<b>24</b>
2.4.4.1 Analiza celotnega genoma .....	24
2.4.4.2 Analiza specifičnih genov .....	25
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 KEMIKALIJE, REAGENTI IN DRUGI PRIPOMOČKI</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.1 Kemikalije</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1.2 Laboratorijski pribor</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1.3 Laboratorijske aparature</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2 GOJIŠČA, RAZTOPINE IN PUFRI</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.1 Gojišča</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.2 Raztopine, zmesi in pufri</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2.3 Priprava gelov za analizo DNA</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3 UPORABLJENI SEVI</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4 METODE</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.1 Fotografija kadavrov</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.2 Vzorčenje</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.3 Osamitev entomopatogenih gliv</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4.4 Osamitev gliv iz črevesja metuljev</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.5 Taksonomske analize in identifikacija</b> .....	<b>35</b>
3.4.5.1 Morfološke analize .....	35
3.4.5.1.1 Makromorfološki opis .....	35
3.4.5.1.2 Mikromorfološki opis .....	35

3.4.5.1.3 Identifikacija .....	36
3.4.5.2 Molekularno genetske taksonomske analize .....	36
3.4.5.2.1 Gojenje mirujoče kulture in osamitev genomske DNA .....	36
3.4.5.2.2 Pomnoževanje zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2 z verižno reakcijo s polimerazo .....	37
3.4.5.2.3 Gelska elektroforeza .....	38
3.4.5.2.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja.....	39
<b>3.4.6 Polimorfizem dolžine pomnoženih delov (AFLP).....</b>	<b>39</b>
3.4.6.1 Restrikcija genomske DNA .....	39
3.4.6.2 Priprava adapterjev .....	40
3.4.6.3 Ligacija .....	41
3.4.6.4 Predhodno pomnoževanje .....	41
3.4.6.5 Pomnoževanje.....	42
3.4.6.6 Priprava vzorcev in poliakrilamidna elektroforeza .....	43
3.4.6.7 Analiza gela .....	44
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>45</b>
4.1 VZORČENJE .....	45
4.2 FOTOGRAFIJA KADAVROV .....	45
4.3 IZOLACIJA GLIV IZ ČREVEESA .....	48
4.4 OSAMITEV ČISTIH KULTUR GLIV IZ KADAVROV METULJEV.....	49
4.5 MAKROMORFOLOGIJA IZOLIRANIH KULTUR.....	49
4.6 MIKROMORFOLOGIJA IZOLIRANIH KULTUR .....	51
4.7 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA .....	53
4.8 ANALIZA POPULACIJE IZOLIRANIH SEVOV <i>Beauveria bassiana</i> Z METODO POLIMORFIZEM DOLŽINE POMNOŽENIH DELOV .....	54
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>56</b>
5.1 RAZPRAVA.....	56
<b>5.1.1 Pojavljanje troglofilnih vrst <i>S. libatrix</i> in <i>T. dubitata</i> v kraških jamah .....</b>	<b>56</b>
<b>5.1.2 Predlagan splošni prehranjevalni splet v oligotrofnem hipogeičnem habitatu.....</b>	<b>57</b>



<b>5.1.3 Izolacija gliv iz črevesa živih metuljev in kadavrov <i>S. libatrix</i> in <i>T. dubitata</i></b> .....	<b>59</b>
<b>5.1.4 Pojavnost entomopatogenih gliv na kadavrih obeh vrst metuljev</b> .....	<b>60</b>
<b>5.1.5 Genotipizacija izolatov <i>Beauveria bassiana</i></b> .....	<b>62</b>
<b>5.2 SKLEPI</b> .....	<b>65</b>
<b>6 POVZETEK</b> .....	<b>66</b>
<b>7 VIRI</b> .....	<b>67</b>
<b>PRILOGA A: NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA ODSEKA ITS1-5,8S RDNA-ITS2 ZA IZBRANE SEVE.</b> .....	<b>78</b>
<b>NADALJEVANJE PRILOGA A: NUKLEOTIDNA ZAPOREDJA ODSEKA ITS1-5,8S RDNA-ITS2 ZA IZBRANE SEVE.</b> .....	<b>79</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura kutikule žuželk (Ramel, 2007). .....	7
Slika 2: Ličinka metulja <i>Triphosa dubitata</i> (Silvonen, 1993). .....	20
Slika 3: Odrastla žival metulja <i>Triphosa dubitata</i> (Stemmer, 2004b). .....	21
Slika 4: Ličinka metulja vrste <i>Scoliopteryx libatrix</i> (Stemmer, 2004a). .....	21
Slika 5: : Odrasla žival metulja vrste <i>Scoliopteryx libatrix</i> (Stemmer, 2004a). .....	22
Slika 6: Shema poteka dela. ....	26
Slika 7: Lokacija naleganja oligonukleotidnih začetnikov ITS4 in ITS5 (White in sod., 1990) .....	37
Slika 8: Zemljevid Slovenije z označenimi mesti vzorčenja. (Geodetski inštitut Slovenije, 2007). .....	47
Slika 9: Kadaver vrste <i>S. libatrix</i> L. preraščen z glivo <i>Paecilomyces farinosus</i> (A). .....	48
Slika 10: Kadaver vrste <i>T. dubitata</i> na steni Zelških jam. Na njem je viden glivni micelij (B). .....	48
Slika 11: Fotografija preparata seva EX-F3297 pri povečavi 1000x. ....	51
Slika 12: Fotografija preparata seva EX-F3297 pri povečavi 1000x. ....	51
Slika 13: Fotografija preparata seva EX-F3300 pri povečavi 1000x. ....	52
Slika 14: Fotografija seva EX-F3325 pri povečavi 1000x. ....	52
Slika 15: Nekoreninjeno drevo narejeno na podlagi matrike podobnosti profilov AFLP. S polno debelo črto so označene gruče, s črtrkano pa podgruče. ....	55
Slika 16: Predlagan prehranjevalni splet jamskih habitatov s poudarkom na hibernirajočih organizmih (npr. metulja <i>S. libatrix</i> ). .....	58

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Strategije prenosa entomopatogenih gliv (Ewalds, 1994).....	5
Preglednica 2: Seznam potencialnih in že registriranih gliv za biološki nadzor žuželk do leta 1991 (Roberts in sod., 1991).....	14
Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij. ....	27
Preglednica 4: Seznam uporabljenih aparatov. ....	28
Preglednica 5: Seznam uporabljenih sevov iz mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002). ....	33
Preglednica 6: Program za pomnoževanje dela zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2. ....	38
Preglednica 7: Program za predpomnoževanja. ....	42
Preglednica 8: Program za pomnoževanje.....	43
Preglednica 9: Lokacije odvzetih vzorcev metuljev v Sloveniji med leti 2005-2007. ....	46
Preglednica 10: Seznam izoliranih sevov in njihov izvor. ....	53
Preglednica 11: Seznam identificiranih sevov in odstotek podobnosti z zaporedji v bazi podatkov GeneBank. ....	54

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

°C	stopinje Celzija
µl	mikroliter ( $10^{-6}$ L)
µm	mikrometer ( $10^{-6}$ m)
®	registrirano (ang. registerd sign)
'	minut
"	sekund
x	krat(en)
%	odstotek
3-D	tridimenzionalen
Φ	premer
A	amper, adenin
AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih delov (ang. Amplified fragment lenght polymorphism)
B-	oznaka seva deponiranega v Mikrobiološki zbirki Kemijskega inštituta (npr. B-302)
<i>B. bassiana</i>	<i>Beauveria bassiana</i>
BLAST	osnovno iskalno orodje lokalne poravnave (ang. Basic local alignment search tool)
C	citozin
CCF	Zbirka gliv Karlove univerze v Pragi (ang. Culture Colection of Fungi)
cit.	citirano (npr. cit. po – citirano po)
cm	centimeter ( $10^{-2}$ m)
CMA	agar s koruzno moko (ang. Cornmeal agar)
CO <sub>2</sub>	ogljikov dioksid
CTAB	cetil trimetil amonijev bromid
dH <sub>2</sub> O	destilirana voda
ddH <sub>2</sub> O	bidestilirana voda
DOM	razopljena organska snov (ang. dissolved organic matter)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat

ed.	urednik (ang. editor)
eds.	Uredniki (ang. editors)
EDTA	etildiaminotetrocetna kislina
EX-F	oznaka sevov zbirke ekstremofilnih gliv (Katedra za biologijo mikroorganizmov, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija)
g	gram
G	gvanin
G+C	vsebnost gvanina in citozina
h	višina
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	borova (V) kislina
HCl	klorovodikova kislina
itd.	In tako dalje
itn.	In tako naprej
idr.	in drugi
ITS	distančniki; zaporedja, ki ločujejo rDNA različnih ribosomskih podenot (ang. Internal transcribed spacer)
ITS4	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na ' koncu
ITS5	oligonukleotidni začetnik, ki nalega na ' koncu
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dikalijev hidrogenfosfat (V)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogenfosfat (V)
l	liter
L.	Linné
<i>L. fusisporum</i>	<i>Lecanicillium fusisporum</i>
M	molarno (mol/L)
mA	miliamper (10 <sup>-3</sup> A)
MgCl <sub>2</sub>	magnezijev (II) klorid
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	
min.	minut
ml	mililiter
MEA	agar s sladnim ekstraktom (ang. Malt extract agar)
mm	milimeter (10 <sup>-3</sup> m)

MZKI	Mikrobiološka zbirka Kemijskega inštituta
ng	nanogram ( $10^{-9}$ g)
NaCl	natrijev klorid
npr.	na primer
oz.	oziroma
PCA	agar s krompirjem in korenčkom (ang. Potato carrot agar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (ang. Polymerase chain reaction)
<i>P. farinosus</i>	<i>Paecilomyces farinosus</i>
PDA	agar s krompirjem glukozo (ang. Potato dextrose agar)
pH	negativni logaritem koncentracije protonov
pmol	pikomol ( $10^{-12}$ mol)
rDNA	zaporedje DNA, ki kodira ribosomsko RNA
RFLP	polimorfizem delov rezanih z endonukleazami (ang. Restriction fragment length polymorphism)
RNA	Ribonukleinska kislina
S	Svedberg
s	sekund
<i>S. libatrix</i>	<i>Scoliopteryx libatrix</i> L.
SDA	<u>Sabouraudovo gojišče z dekstrozo (ang. Sabouraud dextrose agar)</u>
sod.	sodelavci (npr. in sod. – in sodelavci)
sp.	ena izmed vrst nekega rodu
spp.	več vrst nekega rodu
str.	stran
T	timin
TBE	TRIS-borat-EDTA
TE	TRIS-EDTA
<i>T. dubitata</i>	<i>Triphosa dubitata</i> L.
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
U	enota (ang. unit); definicija enote v encimatiki se razlikuje od encima do encima
UV	ultraviolečen
V	volt

VIS	vidni spekter svetlobe (ang. visible)
W	vat
ZDA	Združene države Amerike

## 1 UVOD

Entomopatogene glive so pomemben ekološki dejavnik, saj vplivajo tako na raznolikost kakor tudi na številčnost populacije žuželk ter so pomemben člen v kroženju hranil. Imajo različno široko gostiteljsko območje in različno infektivno dozo. Nekatere med njimi uporabljajo za zatiranje škodljivcev gospodarsko pomembnih rastlin in žuželk, ki so vektorji pri prenašanju zoonoz. Entomopatogene glive proizvajajo tudi bogat spekter sekundarnih metabolitov, ki so uporabni tako za zatiranje škodljivcev kot tudi kot zaviralci imunskega odziva pri presaditvah organov.

*Scoliopteryx libatrix* L. in *Triphosa dubitata* L. sta vrsti metuljev, ki pogosto naseljujeta hipogeična okolja. V jamah hibernirajo 8-10 mesecev in takrat so v obdobju diapavze. Ličinke se prehranjujejo z listjem topola, vrb, črnega trna in krhlike, zato lahko ob povečanem številu povzročajo gospodarsko škodo, saj se topol uporablja v papirni industriji kot vir celuloze. Obe vrsti metuljev sta ekološko pomembni, saj predstavljata pomemben člen v prehranjevalnem spletu v oligotrofnih jamskih habitatih. Predstavljata vir energije in hranil in sta povezovalni člen med primarnimi producenti zunaj in višjimi trofičnimi nivoji znotraj jam, kjer so primarni producenti odsotni.

### 1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Cilj diplomskega dela je bil izolirati glive iz črevesa žrtvovanih troglofilnih metuljev vrst *Scoliopteryx libatrix* in *Triphosa dubitata* ter entomopatogene glive iz kadavrov obeh vrst in jih umestiti v prehranjevalni splet v oligotrofnem hipogeičnem habitatu. Izolirane glive smo želeli identificirati na podlagi makro- in mikromorfologije ter dela nukleotidnega zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2. Na podlagi raziskav opravljeni v čeških jamah (Kubátová in Dvořák, 2005) smo predpostavili, da bomo izolirali entomopatogene glive, ki pripadajo deblu Ascomycota (Fungi) oziroma ustrezne anamorfne oblike, ki imajo široko gostiteljsko območje. Seve najpogosteje izolirane vrste smo hoteli tudi tipizirati ter jih primerjati s sevi izoliranimi iz drugih habitatov. Predvidevali smo, da se bodo sevi v kladogramu združevali v gruče glede na gostitelja oziroma mesto izolacije.



## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ENTOMOPATOGENE GLIVE

#### 2.1.1 Sistematika

Entomopatogene glive so polifiletska skupina in se nahajajo v dveh kraljestvih: Chromista (Stramenopila) in Fungi (Eumycota). Najdemo jih v vseh taksonih, razen v deblu Basidiomycota (Roberts in Hajek, 1992).

Poznanih je več kakor 750 vrst, ki jih uvrščamo v več kot 100 rodov; največ se jih nahaja v kraljestvu Fungi v deblih Ascomycota in Zygomycota. Na spletu se vodijo bazo podatkov o entomopatogenih glivah in njihovih gostiteljih (Ihara, 2007).

Deblo Oomycota (kraljestvo Chromista), za katerega je značilen cenocitičen micelij, celulozna celična stena in biflagelatne zoospore, zajema zgolj nekaj opisanih entomopatogenih vrst, ki spadajo večinoma v rodova *Lagenidium* (Lagenidiales) in *Leptolegnia* (Saprolegniales). Le-ti okužujeta večinoma ličinke komarjev in nekaj drugih dvokrilcev (Glare in Milner, 1991).

V deblo Chytridiomycota (kraljestvo Chromista) sodi 70 vrst, ki okužujejo razred Heteroptera, metuljev pa ne. Večina vrst sodi v rod *Coelomomyces* (Blastocladales), ki potrebujejo vmesnega gostitelja (Glare in Milner, 1991).

V deblo Zygomycota spada red Entomophthorales, v katerega so uvrščene izključno entomopatogene glive (približno 200 vrst). Za te glive je med drugim značilna tvorba balistospor (izjema je le rod *Massospora*). V red Mucorales je tudi uvrščenih nekaj entomopatogenih gliv, ki so večinoma oportunisti. V tem redu je v rodu *Mucor* opisana tudi troglofilna vrsta *Mucor troglophilus* (Gunde-Cimerman in sod., 1998). V razredu Trichomyces je bila opisana zgolj vrsta *Smittium morbosium* (Glare in Milner, 1991).

V skupino Deuteromycetes uvrščamo glive, ki so tekom evolucije izgubile teleomorfno obliko ali pa teleomorf še ni bil odkrit. Sem uvrščamo 40 rodov entomopatogenih gliv,

med drugim tudi tiste, ki se najpogosteje pojavljajo: *Aschersonia*, *Beauveria*, *Culicinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomurea*, *Tolypocladium* in *Lecanicillium* (nekoč *Verticillium*) (Glare in Milner, 1991). Za določene vrste iz rodu *Beauveria* so že odkrili teleomorfno obliko, ki ustreza rodu *Cordyceps* (deblo Ascomycota).

Za deblo Ascomycota je značilen septiran haploiden micelij in tvorba pogosto osmih mejospor v askih, ki se združujejo v plodna telesa imenovana askom. Večina entomopatogenih vrst (čez 300) spada v rod *Cordyceps* (Clavicipitales). V razred Clavicipitales sodi tudi rod entomopatogenih gliv *Ascospaera*, ki za razliko od ostalih prične z infekcijo v črevesju (Glare in Milner, 1991).

Nekatere teorije zagovarjajo, da izvirajo mikrosporidiji iz entomopatogenih gliv (Cavalier-Smith, 1998; Keeling in sod. 2000). Poznanih je približno 1200 vrst mikosporidijev od katerih jih polovica okužuje žuželke, invazijo gostitelja pa začnejo v črevesju po tem, ko jih gostitelj zaužije (Becnel in Andreadis, 1999).

### **2.1.2 Ekologija**

Med koevolucijo členonožcev in gliv so se glede na odnos do členonožcev razvile vsaj tri skupine gliv:

- entomopatogene glive, ki napadejo in tudi ubijejo žival,
- ektosimbionti, katerih talus je povezan s kutikulo, lahko pa tudi prodirajo v globlja in mehkejša tkiva členonožcev,
- endosimbionti, ki naseljujejo prebavni trakt gostitelja brez škodljivih posledic zanj (Cooke in Whipps, 1993).

Entomopatogene glive so splošno razširjene in poseljujejo tako vodne kakor tudi kopenske ekosisteme. Glede na tip habitata so se pri glivah razvili različno kompleksni življenjski cikli in tudi različni načini prenosa infektivnih oblik.

V vodnih ekosistemih živeče nižje entomopatogene glive pogosto tvorijo običkane zoospore, ki so sposobne kemotakse. Stopnja patogenosti se med vrstami razlikuje: lahko

so obligatno ali pa fakultativno parazitske, sposobne pa so tudi saprotrofije. Nekatere (npr. *Coelomomyces spp.*) imajo kompleksnejši življenjski cikel in za zaključitev infektivnega kroga nujno potrebujejo vmesnega gostitelja, najpogosteje so to raki ceponožci ali pa dvoklopniki.

Vodne habitate naseljujejo glive iz rodov *Lagenidium* in *Leptolegnia* (Oomycota), ki so specifične za ličinke komarjev, *Erynia* (Entomophthorales), *Culicinomyces*, *Tolypocladium* (Deuteromycetes) (Samson in sod., 1988), iz vode Sečoveljskih solin pa so izolirali celo rod *Beauveria* (Ascomycota) (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002).

Na potek infekcije v vodnih okoljih in na življenjski cikel tako gostitelja kakor tudi parazita, močno vplivajo abiotični dejavniki, kot so temperatura, slanost, pH ter prisotnost anorganskih in organskih onesnaževalcev (Glare in Milner, 1991).

V kopenskih ekosistemih je vrstna zastopanost in številčnost gostiteljev večja kot v vodnih okoljih, zato je tudi več entomopatogenih vrst gliv. V teh okoljih prevladujejo splošno razširjene anamorfnе entomopatogene glive (Samson in sod., 1988). Vrstno najpestrejši ekosistem je tropski pragozd, za človeka najpomembnejši pa so poljedelski ekosistemi. O dejavnikih, ki vplivajo na razširjenost, strukturo populacije in evolucijo virulenčnih dejavnikov je zelo malo znanega (Chandler, 2005).

V terestričnih habitatih sta najpomembnejša zunanja dejavnika temperatura in vlažnost. Za normalen razvoj infekcije je potrebna zelo visoka relativna zračna vlaga, ki je prisotna predvsem v tropskem gozdu ali pa v rastlinjakih. Obstajajo tudi poročila, da so nekatere glive iz redu Entomophthorales sposobne infekcije pri nižji relativni zračni vlagi. Pomembni sta tudi sončna svetloba in UV sevanje, ki vplivata na izsuševanja konidijev in na uspešnost sporulacije, saj nekatere glive tvorijo infektivne spore v točno določenem delu dneva (Glare in Milner, 1991).

Pri razumevanju dinamike parazit-gostitelj igra ključno vlogo prenos infektivne oblike glive med gostitelji. Ewald (1994) je opredelil štiri strategije prenosa, ki vplivajo na virulenco.

Preglednica 1: Strategije prenosa entomopatogenih gliv (Ewalds, 1994).

Tip prenosa	Strategija prenosa	Vpliv smrti gostitelja na prenos parazita	Preživetje v okolju	Virulenca
Vertikalni		zmanjša	-	nizka
Horizontalni	mobilen gostitelj vektor »sedeti in čakati«	zmanjša nekoliko zmanjša pospeši	slabo - dobro	nizka visoka visoka

Strategija »sedeti in čakati« je po Ewaldovem opisu značilna za najvirulentnejše entomopatogene glive. Po smrti gostitelja se infektivne oblike sprostijo v okolje in pride do horizontalnega prenosa. Infekcijski cikel se nadaljuje po okužbi novega dovzetnega gostitelja, uspešnost takega prenosa pa je odvisna od gostote populacije gostitelja. Pri žuželkah, ki ne živijo v kolonijah, je verjetnost okužbe novega organizma nizka. Gre za močan selekcijski pritisk. Dlje ko infektivna oblika preživi v okolju, višja je verjetnost, da pride v stik z dovzetnim gostiteljem. Posledično so glive redu Entomophthorales (*Pandora neoaphidis*, *Entomophthora muscae*, *Neozygites fresenii*) razvile mirujoče zigospore, sposobne prezimiti. Pri tej strategiji je prenos učinkovit le, če patogen pretvori veliko gostiteljeve biomase v infektivne enote, zaradi česar so ti sevi zelo virulentni. V epizootični fazi (visoka gostota populacije gostiteljev) producirajo tudi balistospore kot primarne konidije (Chandler, 2005).

Pri nekaterih sistemih patogen-gostitelj, kot so na primer *Lecanicillium fusisporum*-listne uši, se gostitelji po infekciji do trenutka smrti vedejo normalno, kar omogoča prenos patogena znotraj kolonije gostiteljev. Kadar je populacija gosta, se patogen razširja lokalno, npr. v radiju 1-3 mm okoli kadavra. Tiste glive, ki pa okužujejo žuželke, ki ne živijo v kolonijah, (npr. *Entomophthora muscae* in muha), pa spremenijo vedenje gostitelja. V tem primeru muha leti navzgor in tako omogoči glivi aktivno razširjanje spor v večjem radiju (Chandler, 2005).

Nekatere entomopatogene glive redno povzročajo epizooze z visoko stopnjo smrtnosti (npr. *Neozygites floridana* povzroči 84% redukcijo populacije pršic na soji v dveh dneh). Dolgo je veljalo, da je uspešen parazit le zmerno patogen ali povsem nepatogen, saj mu je v interesu, da ostane njegov gostitelj živ, nedavne evolucijske analize pa so pokazale, da je

smrt gostiteljev potrebna za razširjanje v velikem obsegu v zelo kratkem času (Chandler, 2005).

### 2.1.3 Mehanizmi patogeneze

Večina gliv, za razliko od bakterij, virusov in mikrosporidijev, napade svojega gostitelja s prodorom skozi eksokutikulo. Strategija okužbe preko kutikule je edinstvena, saj za okužbo gostitelja ni potrebno zaužitje spor. Tako predstavljajo gostitelje tudi tiste žuželke, ki se prehranjujejo z rastlinskim sokom, npr. listne uši (Roberts in Hajek, 1992).

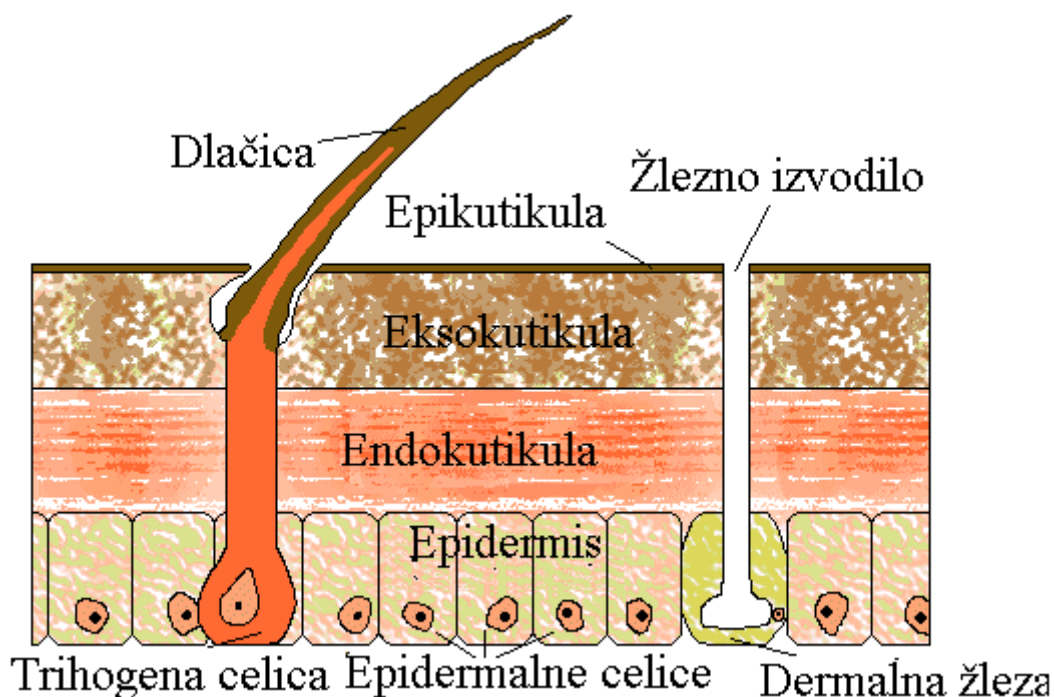
Prebavilo žuželk predstavlja za glive zelo stresno okolje zaradi anaerobioze, spreminjajočega se redoks potenciala, velikega števila bakterij, delovanja encimov, prisotnosti fenolnih spojin, ki jih izloča bakterijska črevesna flora in visoke koncentracije topljencev. Pritrditev gliv na črevesno sluznico pa je ovirana tako zaradi izločanja sluzi kakor zaradi peristaltike (Cooke in Whipps, 1993).

Infekcija preko eksoskeleta poteka v treh zaporednih stopnjah:

- pritrditev spor na eksokutikulo in kalitev;
- prodor skozi integument;
- rast glive znotraj telesa gostitelja.

#### 2.1.3.1 Struktura kutikule žuželk

Struktura kutikule se razlikuje med vrstami žuželk, med življenjskimi stadiji znotraj ene vrste in med različnimi telesnimi segmenti. Kljub temu obstaja splošna shema kutikule (Slika 1) (Cooke in Whipps, 1993).



Slika 1: Struktura kutikule žuželk (Ramel, 2007).

Epikutikula je tanka, inertna, brez hitina, trdna, hidrofobna in najbolj zunanja plast integumenta žuželk (Cooke in Whipps, 1993). Gradijo jo plasti cementa, ki je sestavljen iz proteinov in polifenolov ter voska iz estrov maščobnih kislin, maščobnih kislin, sterolov in ogljikovih hidratov. Sledita ji zunanja epikutikula iz polimeriziranih proteinov in notranja epikutikula iz lipoproteinov stabiliziranih s kinoni (Cooke in Whipps, 1993). Iz notranje epikutikule proti zunanosti pod plastjo cementa vodijo kanalčki, ki služijo izločanju voskov (Locke, 1960).

Prokutikula je zgrajena iz hitina, pod katerim se nahajajo proteinska vlakna, ki potekajo vzporedno s površino, orientacija vlaken pa se malenkostno spreminja (Livolant in sod, 1978). Glede na lastnosti proteinov in tip povezave med hitinom in proteini je lahko diferencirana v sklerotizirano eksokutikulo in mehko endokutikulo. Sklerotizacijo povzročijo oksidirani reaktivni derivati difenolnih spojin, kot sta N-acetildopamin in N-alanildopamin, ki reagirajo med seboj in s proteini (Andersen, 1979; 1985). V prokutikuli se nahajajo drobni kanali, ki vsebujejo voske, lipide in druge snovi in se na meji z epikutikulo lahko obarvajo (Cooke in Whipps, 1993).

### 2.1.3.2 Pritrditev spor in kalitev

Na površini členonožcev redko najdemo avtohtono glivno floro zaradi prisotnosti protiglivnih snovi, kot so lipidni izločki iz metapleuralne žleze pri nekaterih mravljah,  $\beta$ -hidroksi dekanajska kislina iz metatorakalne žleze pri nekaterih mravljah, benzojska kislina, benzoil cianid in fenol pri nekaterih stonogah (Cooke in Whipps, 1993), kratkoverižne maščobne kisline na epikutikuli ličink metuljev (Smith in Grula, 1982; Saito in Aoki, 1983) in drugih snovi.

Najpogostejša infektivna oblika entomopatogenih gliv so spore. Od narave njihove površine je odvisna pritrditev na integument. Ugotovili so, da se lahko površina gliv razlikuje: lahko so hidrofilne, kot na primer pri vrsti *Paecilomyces fumosoroseus* (Dunlap in sod., 2005) ali pa hidrofobne, kot na primer spore vrste *Conidiobolus obscurus* (Latagé in sod. 1987).

Fialokonidiji nekaterih gliv, npr. vrste *Lecanicillium lecanii* in vrste *Hirsutella thompsonii*, balistospore glive *Entomophthora muscae*, zoospore gliv rodu *Coelomomyces* in balistospore glive *Conidiobolus obscurus* so obdane z amorfnim mukusom iz fibrilarnih glukanov, nekaterih drugih kompleksnejših ogljikovih hidratov in/ali amorfnih proteinov, ki olajšajo pritrditev na integument (Boucias in sod., 1988).

Vrste *Nomurea rileyi*, *Metarrhizium anisopliae* in *Beauveria bassiana* proizvajajo suhe, negativno nabite hidrofobne fialokonidije, ki ne izločajo sluzi. Pri pritrjanju teh spor igrajo pomembno vlogo nespecifične hidrofobne interakcije. Pri interakciji spora-kutikula igra ključno vlogo kemijska stabilnost obeh komponent (Boucias in sod., 1988).

Po pritrditvi spore se lahko zgodi troje: kalitev in tvorba klične cevke, tvorba neinfektivne sekundarne spore ali pa odmrtnje spore (Latgé in sod., 1987).

Na kalitev vplivajo različni abiotski dejavniki, kot so temperatura, vlažnost, prisotnost hranil, površina epikutikule (prisotnost nekaterih kemikalij), prisotnost kisika, in tudi biotski dejavniki, kot je prisotnost saprofitske mikroflore (Samson in sod, 1984).

Eksoskelet predstavlja substrat bogat z ogljikom in dušikom, ki ni živ in zato kolonizacija njegove površine ne izzove obrambnega odgovora (Cooke in Whipps, 1993).

Prisotnost diacilglicerolov in polarnih lipidov na površini kutikule metuljev vzpodbuja kalitev glive *Nomurea rileyi*. *Erynia variabilis*, ki je specifična za dvokrilce, pa za uspešnejšo kalitev potrebuje prisotnost oleinske kisline (Cooke in Whipps, 1993). Spore gliv *Beauveria bassiana* in *Metarhizium anisopliae* kalijo na površini širokega spektra gostiteljev, zaradi lahke dostopnosti vodotopnih hranil, večinoma amino kislin, ki jima zadoščajo (Cooke in Whipps, 1993).

Kalitvena cevka se zasidra na površino insekta z izločanjem mukusa bogatega z glukani (Cooke in Whipps, 1993). Pri nekaterih glivah, kot so *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* in *Neozygites fresenii* pride do tvorbe amorfnega apresorija na meji z epikutikulo, ki je odgovoren za pritrditev.

Druge glive kot npr. *Pandora neoaphodis*, pričnejo s kalitvijo ne glede na substrat. V primeru neugodnih okoliščin se iz konidijev tvorijo sekundarni konidiji, ki se nato aktivno razpršijo v okolico (Glare in Milner, 1991).

Klitje spore je nujen, vendar ne zadosten pogoj za penetracijo. Debel integument skupaj s površinskimi eksudati predstavlja prvo obrambno linijo pred infekcijo, zato so ranjene žuželke lahke tarče šibkih patogenov ali pa celo saprofitov, kot so vrste iz rodov *Mucor* ali *Fusarium*.

### 2.1.3.3 Prodor glive skozi integument

Prodor poteka tako mehansko kakor tudi encimsko in je natančno uravnavana. Že omenjeni apresorij ne služi zgolj pritrditvi, temveč sodeluje tudi pri mehanski penetraciji.

Encimi se pojavljajo v sledečem zaporedju: esteraze in endoproteaze, aminopeptidaze, karboksipeptidaze, sledijo N-acetilglukaminidaze in nazadnje še hitinaze in lipaze. Proteolitični encimi se izločajo ne samo za sproščanje amino kislin, ki služijo kot



pomembno hranilo, temveč tudi za razkrije hitina (Cooke in Whipps, 1993). Lipaze, proteaze in hitinaze so pomembni virulenčni dejavniki, saj sevi vrst gliv z okvarjenimi geni za omenjene proteine niso sposobni infekcije (Paris in Ferron, 1984).

Vsesplošna histoliza prokutikule je redka. Hifna razrast v zunanji prokutikuli poteka po liniji najmanjšega upora, in sicer lateralno med lamelami. Hife dosežejo hemocel večinoma dva dni po pritrditvi spor (Cooke in Whipps, 1993).

### 2.1.3.4 Rast glive znotraj gostitelja

V hemocelu se lahko glive razraščajo filamentozno, vendar večina spremeni morfologijo. Tvorijo lahko blastokonidije (*Metarhizium anisopliae*, *Culicinomyces clavisporus*), artrokonidije, hifna telesca (*Zoophtora radicans*, *Pandora neoaphidis*, *Metarhizium anisopliae*), protoplaste (*Pandora neoaphidis*) ali pa kvasne celice (Cooke in Whipps, 1993).

Prodor lahko sproži imunski odziv, ki omeji oziroma prepreči infekcijo ter lahko vodi do popolnega okrevanja gostitelja. Sproži se celični in/ali humoralni imunski odziv, katerega končna faza je fagocitoza. Melanizirana celična stena spor štiti glivo v granulomu. Celice, ki obdajajo propagul pa glive oslabijo s produkcijo toksinov, ki preprečijo večcelično reakcijo.

Na mestu vdora se nakopičijo hemociti in pride do odlaganja melanina. Melanin, oziroma njegovi prekurzoriji, inhibirajo hitinaze in proteaze in delujejo fungistatično. Nespecifični stik med fenoloksidazo in serinsko proteazo, ki je del celične stene, in aktivacija fenoloksidaze s strani beta-1-3 parietalnih glukanov sprožijo obrambno reakcijo (Ferron in sod., 1991).

Nekaj minut po vdoru se okrog melaniziranega propagula pričnejo kopičiti granulociti. Nato plazmatociti oblikujejo pseudo-tkivo v koncentričnih krogih okoli propagula in se počasi pričnejo spreminjati v granulom, ki lahko doseže velikost tudi do 1 mm. Nekateri poročajo tudi o popolni lizi glivne celice v 15 dni starem granulomu (Ferron in sod., 1991).

Celice s celično steno lahko fagocitirajo hemociti, lahko pa se hemociti združijo okoli teh celic in tvorijo kapsulo. Smrt nastopi zaradi kombinacije dejavnikov, kot so blokiranje hemocela, motnja vitalnih organov, sproščanje proteaz ali pa zaradi sproščanja toksinov (Cooke in Whipps, 1993).

Do enkapsulacije pride samo pri šibko virulentnih sevih. Hipervirulentni sevi vrste *Metarrhizium anisopliae*, obidejo enkapsulacijo in nadaljujejo z rastjo. Imunskemu odzivu se izognejo z izločanjem imunosupresivnih snovi, kot so na primer destruksin E. Destruksin E inhibira nastanek granuloma z oviranjem premikanja hemocitov in povzroči začetno tetanično paralizo gostitelja z neposrednim odprtjem  $Ca^{2+}$  kanalčkov, kar povzroči depolarizacijo mišične membrane, in z indukcijo fosforilacije citoplazemskih proteinov. Destruksina A in B, ki imata podoben mehanizem delovanja, sta bolj toksična za metulje (Khachatourians, 1991). V prebavilu nekaterih insektov lahko pride tudi do biološke transformacije destruksinov in detoksifikacije (Pedras in sod., 2002).

En način izogibanja imunskemu odzivu je tudi protoplastiranje pri glivah redu Entomophthorales, saj protoplasti ne privlačijo hemocitov (Ferron in sod., 1991).

Entomopatogene glive, ki se uspešno izognejo obrambi gostitelja, le-tega ponavadi ubijejo. Gostitelja lahko, kot npr. gliva *Zoophtora radicans*, z rizoidi in rizomorfi pritrdijo na podlago. Nove infektivne spore lahko proizvajajo in sproščajo v zunanosti, ali pa v notranosti kadavra. Glive, kot je *Culicinomyces clavissporus*, proizvajajo infektivne konidije na zunanosti kadavra, v notranosti pa proizvajajo izključno mirujoče neinfektivne spore (Glare in Milner, 1991).

#### **2.1.4 Biotehnološka uporabnost entomopatogenih gliv in njihovih presnovkov**

Entomopatogene glive so zelo zanimive z biotehnološkega vidika. Uporabljamo jih lahko za biološko zatiranje škodljivcev gospodarsko pomembnih rastlin. Sekundarni metaboliti, ki jih te glive proizvajajo, pa lahko delujejo baktericidno, imunosupresivno in insekticidno.

Entomopatogene glive producirajo raznolike spojine: od oksalne kisline do proteinov (Roberts in Hajek, 1992), najzanimivejša skupina pa so depsipeptidi. Med prvimi depsipeptidi z insekticidnim in baktericidnim delovanjem je bil v filtratih kulture *Beauveria bassiana* odkrit rdeč pigment, imenovan oosporein, kasneje pa so odkrili še rumena pigmenta tenelin in basianin. Depsipeptid beauvericin, ki ga razen glive *Beauveria bassiana* producira tudi *Paecilomyces fumosoroseus*, učinkuje tudi na nekatere druge členonožce, kot je npr. solinski rakec *Artemia salina*. Ciklodepsipeptid bassianolid, ki so ga izolirali iz gliv *Beauveria bassiana* in *Lecanicillium lecanii*, tudi kaže izrazito insekticidno delovanje (Khachatourians, 1991).

Že omenjeni destruksini delujejo pri insektih imunosupresivno, njihovo delovanje pa je tudi protivirusno in fitotoksično (Pedras in sod., 2002).

Nekateri sevi vrst *Tolypocladium spp.* proizvajajo ciklosporin A, ki je toksičen za ličinke komarjev. Spojino komercialno uporabljajo kot imunosupresiv pri transplantacijah organov (Roberts in Hajek, 1992).

Nekateri endofiti producirajo tudi alkaloidne, ki zmanjšajo herbivorijo (Khachatourians, 1991).

### **2.1.5 Biološka kontrola žuželk**

Da lahko glive rastejo na žuželkah so ugotovili že leta 900 na bližnjem vzhodu. Prve raziskave uporabe entomopatogenih gliv za kontrolo škodljivcev pa so potekale že v letih od 1880 do zgodnjih 1900' (Roberts in Hajek, 1992).

Mikrobno kontrolo škodljivcev razvijajo po dveh pristopih: ekološkem in industrijskem (Chandler, 2005). Poznamo tri osnovne strategije uporabe entomopatogenih gliv (Shah in Pell, 2003):

- **Klasična biološka kontrola** temelji na uporabi naravnih patogenih agensov, ki so eksotični na območju uporabe, kar omogoča dolgotrajno in poceni rešitev (Shah in Pell,

2003). Pri tem ekološkem pristopu uporabljajo glive redu Entomophthorales zaradi značilne ekomorfološke prilagoditve na življenjski cikel gostiteljev in zaradi povzročanja naravnih epizooz v populacijah škodljivcev (Chandler, 2005). Znana sta le dva primera klasične biološke kontrole: i) uporaba japonskih sevov glive *Entomophthora maimaiga* za zatiranje navadnega gobarja (*Lymantria dispar*) v ZDA v letih 1900 in 1989, ii) uporaba izraelskih sevov glive *Zoophtora radicans* za zatiranje deteljične uši (*Therioaphis trifolii*) v Avstraliji leta 1979 (Shah in Pell, 2003).

- **Avgmentacija** se uporablja v primerih, ko so naravni patogeni prisotni v premajhnem številu ali pa so aktivni prepozno, da bi zaščitili pridelek. Gre za industrijski pristop pri katerem najpogosteje uporabljajo anamorfne entomopatogene glive. Te glive so redkeje povezane z naravno epizoozo, vendar jih je lažje masovno gojiti in so zato primernejše za kratkoročno kontrolo (Chandler, 2005). Znotraj avgmentacije ločimo pristopa inokulacije in inundacije. Pri inokulaciji aplicirajo glivo v manjših količinah na začetku sezone in tako pride do dolgotrajne zaščite, pri inundaciji pa aplicirajo glivo v velikih količinah, kar poskrbi za hitro in kratkotrajno kontrolo. Možnosti sekundarne infekcije so minimalne. Inundacijo označujeta termina mikopesticid ali pa mikoinsekticid. V inokulativnem avgmentacijskem pristopu uporabljajo vrsto *Beauveria brongniartii* za zatiranje poljskega majskega hrošča in vrsto *Zoophtora radicans* za zatiranje kapusovega molja (*Plutella xylostella*). Poznani so komercialni in pol-komercialni proizvodi s hifomicetnimi glivami za inundativni pristop, kot so Vertalec<sup>®</sup> in Mycotal<sup>®</sup> (blastospore glive *Lecanicillium lecanii*) za zatiranje listnih uši v rastlinjakih v Evropi, Mycotrol<sup>®</sup>, Mycotrol O<sup>®</sup> in BotaniGard<sup>®</sup> (zračni konidiji glive *Beauveria bassiana*) za zatiranje različnih žuželk v Severni Ameriki in Green Muscle<sup>®</sup> (gliva *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*) v Nigeriji in Zahodni Afriki za zatiranje kobilic (Shah in Pell, 2003).

- **Ohranjanje** vključuje spremembe kmetovanja, ki pospešijo aktivnost entomopatogenih gliv. Pri tej strategiji ohranjajo naravne sovražnike škodljivcev, ki so prilagojeni na okolje in škodljivca. To taktiko uporabljajo za zatiranje bombaževčeve uši (*Aphis gossypii*) v ZDA (Shah in Pell, 2003).

Preglednica 2: Seznam potencialnih in že registriranih gliv za biološki nadzor žuželk do leta 1991 (Roberts in sod., 1991).

Takson	Gostitelj	Status
Chromista		
Chytridiomycota		
Chytridiomycetes-		
Blastocladales		
<i>Coelomomyces</i>	komarji	
Oomycota		
Oomycetes		
Lagenidiales		
<i>Lagenidium</i>	komarji	
Saprolegniales		
<i>Leptolegnia</i>	komarji	
Fungi		
Zygomycota		
Zygomycetes		
Entomophthorales		
<i>Entomophaga</i>	kobilice, metulji	
<i>Entomophthora</i>	muhe, listne uši	
<i>Conidiobolus</i>	listne uši	
<i>Zoophtora</i>	listne uši, metulji, rilčkarji, bolšice, kobilice, škržati	
Deuteromycetes		
<i>Aschersonia</i>	ščitkarji	registrirano, v uporabi, bivša USSR
<i>Beauveria</i>	metulji, hrošči, kobilice, komarji, termiti, škržati, pršice, mravlje	registrirano, v uporabi, Kitajska, bivša USSR
<i>Culicinomyces</i>	komarji	
<i>Hirsutella</i>	škržati, pršice	registrirano, ni v uporabi, ZDA
<i>Metarhizium</i>	slinarice, škržati, hrošči, komarji, termiti	registrirano, v uporabi, Brazilija
<i>Nomurea</i>	metulji	
<i>Paecilomyces</i>	metulji, hrošči, ščitkarji, škržati, nematodi	registrirano, v uporabi, Filipini
<i>Tolypocladium</i>	komarji	
<i>Lecanicillium</i>	listne uši, ščitkarji, resarji, pršice, kobilice	registrirano, ni v uporabi, VB

Kljub temu, da je poznanih več kot 750 vrst entomopatogenih gliv je bilo za zatiranje škodljivcev do leta 1991 registriranih samo 6 vrst (Roberts in Hajek, 1992).

Slabosti uporabe entomopatogenih gliv za kontrolo populacij škodljivcev kulturnih rastlin so, da je potrebno zagotoviti visoko relativno vlago in relativno visoko temperaturo (povprečna temperatura subtropskega pasu), da so infektivne oblike občutljive na UV sevanje, da je virulenca odvisna od gostote infektivnih enot, da imamo premalo znanja o sami ekologiji. Prednosti pa so da nam velika genska variabilnost entomopatogenih gliv omogoča izbor širine gostiteljskega območja in virulenco, da potek infekcije preko

kutikule omogoča okužbo tudi tistih škodljivcev, ki se prehranjujejo izključno z rastlinskimi sokovi, da omogoča izatiranje škodljivcev, ki živijo v zemlji ali pod zemljo, da imamo zadostno znanje o fermentaciji in produkciji suhega micelija za aplikacijo in da je tveganje za zdravje ljudi zelo majhno (Roberts in Hajek, 1992).

## 2.2 JAME

### 2.2.1 Definicija

Termin jama opisuje mnogo definicij. Jamarska zveza Slovenije jamo definira kot vsakršno odprtino s stropom, dolgo vsaj 10 m in dovolj široko, da gre lahko vanjo človek.

Jame so hipogeična okolja, za katera je značilno:

- Dokaj stabilna nizka temperatura. Temperatura zraka v jamah je enaka povprečni letni temperaturi na vhodnih predelih.
- Tema. Kar se jakosti svetlobe tiče je jama razdeljena v tri območja: vhodno območje, območje somraka in območje teme (Aden, 2005). Jakost svetlobe je eden izmed pomembnih dejavnikov, ki odmerjajo življenjski prostor različnim skupinam organizmov.
- Visoka relativna zračna vlaga. Večina aktivnih kraških jam ima absolutno vlažnost ali pa se vlažnost približuje absolutni. Ta lastnost ni značilna za suhe jame.
- Nizka koncentracija hranil. Ker je svetloba prisotna zgolj v vhodnih predelih, v jamah ni primarne produkcije (razen bakterijske kemotsinteze). Večina organske snovi pride v jamo iz zunanosti. Hranila in minerali lahko pridejo v jamo z vodo (spiranje površine, potok itd.), s sedimentom (nanosi prsti, blata itd. iz zunanosti) ali pa v obliki žive biomase.

### 2.2.2 Speleogeneza

Po nastanku delimo jame na (White in Culver, 2005):

- jame, ki so nastale z mehanskimi procesi,
- jame, ki so nastale z diferencialno erozijo,
- vulkanske jame,
- ledeniške jame in

- jame, ki so nastale z raztapljanjem matične kamnine.

V Sloveniji je bilo do maja 2007 registriranih 9023 jam. Velika večina teh je nastala z raztapljanjem apnenčaste matične kamnine zaradi ogljikove (IV) kisline v območju lezike - stikom med apnenčastimi skladi. Speleogeneza je dolgotrajen proces. Za nastanek prehoda s premerom 5-10 cm je potrebnih 3000-5000 let (Klimchouk, 2004). Sprva poteka raztapljanja kamnine zaradi raztopljenega ogljikovega dioksida. Lamelarni tok vode teče po območju lezike, ko pa se špranja dovolj razširi, pride do nastanka turbolentnega toka, ki speleogenezo eksponentno pospeši.

Apnenčasti skladi so nastali s sedimentacijo foraminiferskih frustul v obdobjih od devona naprej, največ pa v obdobju triasa in krede. Plast apnenca je ponekod na Slovenskem debela 8000 m, kar je med najdebelejšimi plastmi apnenca na svetu.

### **2.2.3 Jame kot habitat**

Jama je življenjski prostor mnogih organizmov, ki pripadajo vsem domenam: bakterijam, arhejam, protozajem, kromistom, glivam, živalim in rastlinam. Ker je svetloba prisotna le na vhodnih delih jam, so le tam prisotni fototrofni primarni producenti in govorimo o jami kot o habitatu oziroma semiekosistemu, in ne ekosistemu.

Biodiverziteteta v dinarskih kraških jamah presega bioraznolikost na površju in v drugih jamah v svetu. V suhih jamah brez ponornic in brez spiranja humusa s površja je podzemnih živali manj (Gams, 2004).

Organizme, ki jih najdemo v jamah, razdelimo v tri večje skupine:

- troglobionti,
- troglofili in
- troglokseni.

### 2.2.3.1 Troglobionti

Troglobionti so živali, ki so popolnoma prilagojene drugačnemu-jamskemu okolju in se razlikujejo od sorodnih živali, ki živijo na vhodnih predelih jam ali pa izven jam. Troglobionti so se v jame preselili s površja zaradi podnebnih sprememb med ledenimi dobami ali pa po izsušitvi jezer ali morij v geološki preteklosti (Gams, 2004).

Troglobionti se po mnogih značilnostih razlikujejo od površinske favne in imajo nekaj skupnih lastnosti s skrito favno – favno, ki živi v prsti, pod prstjo in v skalnatih razpokah, ki za človeka niso prehodni (Gams, 2004). Troglomorfoze, oziroma morfološke prilagoditve na jamsko okolje, se kažejo kot redukcija ali pa kot povečanje okončin in organov. Živali so tako lahko brezoke ali pa so njihove oči nefunkcionalne, lahko imajo podaljšane antene in so brez pigmenta. Zanje je značilen upočasnjjen metabolizem, počasnejši ontogenetski razvoj in pedomorfoza.

Troglobionti so t.i. prave podzemne živali, ki se večinoma prehranjujejo z ilovico bogato z organskimi snovmi. Organske snovi z vodo pridejo v notranjost in se odlagajo v ilovici.

V predelih, kjer najdemo troglobionte, so vplivi zunanjih abiotskih okoljskih dejavnikov minimalni. Sestava zraka v notranjosti zračene jame je približno enaka sestavi okoljske atmosfere, le koncentracija CO<sub>2</sub> je za spoznanje višja. Relativna zračna vlaga niha med 95 % in 100 %. Troglobionti so higrofilne živali, občutljive na izsušitev.

### 2.3.3.2 Troglofilni

Živali, ki jim jamske razmere ustrezajo, vendar le-te niso njihov edini habitat, imenujemo troglofilni. Najdemo jih tudi v tunelih, pod kamni, na temnih vlažnih območjih idr.

Troglofilom jamski habitati ustrezajo zaradi teme in visoke relativne zračnosti. Mnogi avtorji jih opisujejo kot neobligatne podzemne obiskovalce in tiste, ki v podzemlju



prezimujejo. Pomembna razlika med troglobionti in troglofilni je ta, da so slednji pigmentirani in imajo večinoma funkcionalne oči.

### 2.3.3.3 Troglokseni

To so naključni obiskovalci podzemlja. V jame se umaknejo, ko so okoljske razmere zanje neustrezne (suša, mraz itd.). V jame lahko zaidejo tudi po naključju (Gasparo, 1998).

### 2.3.4 Mikroorganizmi v jamah

Jame predstavljajo bivalni prostor mnogim mikroorganizmom, ki igrajo pomembno vlogo pri razgradnji organskega materiala. Nekatere kemolitotrofne bakterije sodelujejo pri speleogenezi. Imajo pomembno vlogo tako pri formaciji jam kakor tudi pri precipitaciji kalcita, saj zaradi površinskega naboja služijo kot nukleacijsko jedro pri precipitaciji. Bakterije na stenah jam tvorijo biofilme in preproge. Entomopatogenih bakterij na jamskih žuželkah doslej še niso našli.

Glivno floro jam je v začetku 20. stoletja raziskoval Fransman J. Lagarde. Opisoval je tudi entomopatogene glive troglofilnih insektov (Samson in sod., 1984). Lagarde je v letih 1913, 1927 in 1922 izdal dobro ilustrirane publikacije o glivah v Alžiriji in Franciji, v katerih je govoril tudi o entomopatogenih glivah. Nizozemski entomolog H. Schmitz je v začetku prejšnjega stoletja zbiral glive, ki so parazitirale na jamskih muhah iz nizozemskih jam St. Pietersberg (Rombach in Samson, 1983). V limburških jamah so opazovali insekte, ki so bili večinoma okuženi s hifomicetnimi glivami, med katerimi sta bili tudi ubikvitarni vrsti *Beauveria bassiana* in *Paecilomyces farinosus* (Samson in sod., 1984).

Iz prsti jamskega sistema Rio Camuy so med drugim izolirali entomopatogene glive iz rodov *Paecilomyces* in *Hirsutella* (Nieves-Riviera, 2003).

Prvo domnevno entomopatogeno glivo *Stilbella kervillei* (takrat *Stilbum kervillei*), ki je parazitirala na troglofilni muhi *Leria caesia*, je opisal Quélet leta 1884. To glivo so našli v povezavi s številnimi dvokrilci širom evropskih jam (Rombach in Samson, 1983). Petch je

leta 1937 predpostavil, da *Stibella* ni pravi patogen, temveč da parazitira na glivi *Hirsutella dipterigena*. To glivo je tudi opisal, in sicer v povezavi s troglofilnimi muhami angleških ter nekaterih nizozemskih jam. Kasneje so domnevnega mikoparazita, ki naj bi se razvil iz entomopatogenih prednikov, našli tudi v povezavi z drugimi hiperparaziti, kot so *Paecilomyces farinosus*, *Lecanicillium lecanii* ipd.. Rod *Stibella* je opisan kot troglofilen, saj še ni bil najden izven jamskih habitatov (Rombach in Samson, 1983).

O troglofilnih glivah poroča tudi Gunde-Cimerman s sodelavci (1998), in sicer so opisali glivo *Mucor troglophilus*, ki so jo izolirali iz jamskih kobilic *Troglophilus neglectus* in *Troglophilus cavicola*. Iz jamske kobilice *Hadenoeus cumberlandicu* te glive niso izolirali (Benoit in sod., 2004).

Doslej je bilo iz kadavrov troglofilnih žuželk, ki hibernirajo v jamskih habitatih izoliranih 20 glivnih vrst. S kadavrov troglofilnega metulja *Scoliopteryx libatrix* so izolirali vrste *Engyodontium rectidentatum*, *Lecanicillium muscarium*, *Paecilomyces farinosus*, *Paecilomyces fumosoroseus* in *Simplicillium* cf. *lamellicola*, iz metulja *Triphosa dubitata* pa vrste *Aphanocladium album*, *Cordyceps* sp., *Engyodontium* sp. *Parvisporum*, *Paecilomyces farinosus* in *Simplicillium* cf. *lamellicola* (Kubátová in Dvořák, 2005).

## 2.3 TROGLOFILNA METULJA *Scoliopteryx libatrix* L. IN *Triphosa dubitata* L.

### 2.3.1 Sistem

Kraljestvo: Animalia

    Deblo: Arthropoda

        Razred: Insecta

            Red: Lepidoptera

                Podred: Noctuidea

                    Družina: Noctuidae

Družina Noctuidae ali sovke vsebuje več kot 35000 vrst, najverjetneje okoli 100000 v več kot 4200 rodovih in je največja družina iz skupine Macrolepidoptera. Zanje so značilna

toga kirla. Vrste znotraj te družine so različnih oblik, velikosti in barv (Emly, 1982). Rod *Scoliopteryx* sodi v poddružino Calpinae.

Podred: Glossata

Naddružina Geometroidea

Družina: Geometridae

Družina Geometridae vsebuje preko 26000 vrst in je ena od dveh največjih družin znotraj skupine Macrolepidoptera. Zanja je značilno ozko telo, tanka krila in šibka sposobnost letenja. Ta družina združuje metulje različnih oblik in velikosti (Emly, 1982). Znotraj te družine ločimo več skupin. Rod *Triphosa* sodi v skupino Rheumapterini.

## 2.3.2 Morfologija

### 2.3.2.1 Opis vrste *Triphosa dubitata*

Ličinka je zelena, dorzalno ima štiri belkaste črte, rumena črta na straneh. Ličinka je rumena med segmenti. Pojavijo se med junijem in avgustom. Hranijo se z listjem črnega trna in krhlike.

Odrasle živali imajo na krilih značilen valovit umazano rjav, zelen ali nekoliko rožnat vzorec na srebrno sivem ozadju. Razpon kril je 38-48 mm. Med hiberniranjem imajo ponavadi pol odprta krila, zato imajo obliko enakostraničnega trikotnika. Izven jamskih habitatov jih najdemo od začetka avgusta do začetka septembra.



Slika 2: Ličinka metulja *Triphosa dubitata* (Silvonen, 1993).



Slika 3: Odrastla žival metulja *Triphosa dubitata* (Stemmer, 2004b).

### 2.3.2.2 Opis vrste *Scoliopteryx libatrix*

Gosenica zelo podolgovata, gola, zelena z rumeno črto, ki je obkrožena s črno. Pojavijo se med junijem in avgustom. Hranijo se z listjem vrb in topolov.

Odrasle živali imajo svetlo rjava krila s svetlo oranžnim sredinskim delom. Črte na spodnji polovici kril so blede in jasno definirane. Na sprednjem krilu ima beli piki. Zadnja krila so iste barve kot sprednja, vendar bolj bleda. Razpon kril je 44-48 mm. Hibernirajo z zaprtimi krili v obliki strehe in so zato 3-D oblike. Izven jamskih habitatov jih najdemo od julija do oktobra.



Slika 4: Ličinka metulja vrste *Scoliopteryx libatrix* (Stemmer, 2004a).



Slika 5: : Odrasla žival metulja vrste *Scoliopteryx libatrix* (Stemmer, 2004a).

### 2.3.3 Življenjski cikel

Kakor vsi predstavniki razreda Lepidoptera imata tudi *T. dubitata* in *S. libatrix* dve aktivni fazi – to sta ličinka in odrasla žival.

Iz jajčec, ki so odporna na ekstremne temperature, se razvijejo ličinke. Gosenice metulja *T. dubitata* se prehranjujejo z listjem krhlike (*Rhamnus sp.*) in črnega trna (*Prunus spinosa*), metulja *S. libatrix* pa z vrbami in topoli (Chapman, 1993). V juliju se med listjem spremenijo v podolgovato bubo (Turquin, 1996). Takoj ko se iz bube razvije odrasla žival, leti v jame oziroma druga zavetišča (Chapman, 1993). Odrasle živali se verjetno ne prehranjujejo, temveč živijo na račun zalog, ki so si jih nabrale kot ličinke.

Leta 1907 je Banta prvi predpostavil, da *S. libatrix* med septembrom in aprilom hibernira v hipogeičnih okoljih. Preučeval je tudi vpliv temperature na migracije metulja. Številna kasnejša opažanja so potrdila, da nekatere vrste, med katerimi sta tudi *S. libatrix*. in *T. dubitata*, niso naključni, temveč redni obiskovalci vhodnih predelov jam pozimi in/ali poleti (Bouvet in sod., 1974).

Troglofilni metulji so prilagojeni na jamsko okolje. V zavetišču v povprečju prezimujejo 8 -10 mesecev (od julija do marca). Lahko so aktivni ali pa mirujejo (Turquin, 1996).

*T. dubitata* se v jamah nahaja bliže vhodnim predelom in nižje na steni. Tekom prezimovanja je v kolonijah in spreminja lokacijo. Jamo lahko od časa do časa tudi zapusti. *S. libatrix* pa je v jami v globokem spancu, pogosto obdan s kapljicami vode, in miruje. Kljub mirovanju zazna zvoke netopirjev in se v primeru napada spusti vzdolž stene in pade na tla. Ne zazna pa bližine polža *Oxychilus cellarus* in je tako pogosto njegov plen (Turquin, 1996).

Preden metulj vstopi v hipogeično okolje oziroma druga okolja, ki mu nudijo zavetišče, nastopi diapavza (Bouvet in sod., 1974). V obdobju prezimovanja poteka zorenje spolnih celic pri obeh vrstah sočasno (Bouvet in sod., 1974). Dejavniki, ki vplivajo na zorenje jajčec niso vezani na klimatske razmere.

Zaradi spreminjanja zračnih mas zapustijo zavetišče, odletijo na prosto ter se, ko so reprodukcijski organi popolnoma zreli, pari. Parjenje lahko poteka ves čas, ko so na prostem. Ko dosežejo primerno rastlinje, se začne leženje jajčec.

## 2.4 METODE ZA IDENTIFIKACIJO ENTOMOPATOGENIH GLIV

### 2.4.1 Morfologija

Morfologija je za taksonomijo gliv zelo pomembna. Nemogočesi jo je predstavljati brez uporabe binokularne lupe ter mikroskopa, s pomočjo katerih opazujemo sledeče parametre (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002):

- morfološke makroskopske znake (oblika, barva micelija ter razmnoževalnih struktur);
- morfološke mikroskopske znake (oblika, barva, dimenzije spor ter drugih mikroskopskih struktur);
- kriterije mikroskopske dinamike (razvoj spor - sporogeneza, konidiogeneza).

Pri slednjem so pomembni sledeči parametri: izvor ter razvoj konidijev, izvor stene konidija, ureditev konidijev, način sproščanja in drugi. Na osnovi teh parametrov v kombinaciji z gojitvenimi zahtevami so napisani taksonomski morfološki ključni (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

## 2.4.2 Kemotaksonomija

Kemotaksonomija proučuje razlike v kemijski sestavi pri različnih organizmih. Pri glivah kemotaksonomija pomaga pri prepoznavanju in ločevanju vrst in podvrst in jo velikokrat uporabljamo tudi kot dopolnilno metodo h klasičnim. Glive lahko razlikujemo na osnovi naslednjih celičnih sestavin: celokupni proteini, izoenzimi, sekundarni metaboliti, lipidi, ubikinoni, ogljikovi hidrati (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

Biokemijske metode so primerne kot dopolnilne tehnike pri identifikaciji gliv, najbolj smotrna je uporaba biokemijskih tehnik tedaj, kadar obravnavamo morfološko zelo podobne organizme (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

## 2.4.3 Fiziologija

Zlasti v taksonomiji kvasovk so se uveljavili komercialni avtomatski in polavtomatski fiziološki testi, ki večinoma temeljijo na asimilacijskih sposobnostih. Reakcije interpretiramo s primerjavo rasti, kvasovko pa s pomočjo identifikacijskih preglednic (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

## 2.4.4 Molekularno-genetske metode

Identifikacija samo na ravni fenotipa je mnogokrat zavajajoča in nezanesljiva, saj na proučevane lastnosti vplivajo pogoji gojenja. Fenotipske lastnosti so lahko genetsko nestabilne ali pa jih kodirajo izvenkromosomski elementi, ki so prenosljivi med sevi. Ko govorimo o molekularnih metodah, govorimo o analizi nukleinskih kislin DNA in RNA, in sicer o dveh pristopih: o analizi celotnega genoma in o proučevanju specifičnih genov ali genskih sklopov (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).

### 2.4.4.1 Analiza celotnega genoma

Najpogosteje so uporabljene sledeče metode:

- Vsebnost gvanina in citozina (G+C);

- DNA-DNA hibridizacija;
- Polimorfizem delov rezanih z endonukleazami (RFLP)
- Naključno pomnoževanje polimorfne DNA s polimerazno verižno reakcijo (RAPD PCR) – uporaba oligonukleotidnih začetnikov z naključnim zaporedjem;
- Polimorfizem dolžin pomnoženih delov (Amplified fragment length polymorphism - AFLP): je novejša molekulska tehnika s široko uporabno vrednostjo, saj nam posamezna analiza omogoča detekcijo velikega števila polimorfizmov genomske DNA, ima visoko ponovljivost in je primerna za rutinske analize (Radišek in sod., 2001). Temelji na selektivni pomnožitvi restrikcijskih delov genomske DNA z reakcijo verižne polimerizacije. Tehnika vključuje 3 korake: i) restrikcija DNA in ligacija dvoverižnih oligonukleotidnih adapterjev, ii) selektivno pomnoževanje restrikcijskih delov z uporabo začetnikov, ki imajo na 3'-koncu dodane 0-3 bazne pare iii) analiza elektroforeznega gela s pomnoženimi fragmenti (Vos in sod., 1995). S pomočjo te metode lahko odkrivamo razlike med organizmi brez predhodnega znanja o nukleotidnem zaporedju genoma proučevanega organizma, saj so le te odvisne od sprememb prepoznavnih mest restrikcijskih encimov, ki nastanejo zaradi mutacij. Metoda zajame celoten genom in je primerna za ločevanje ozko sorodnih organizmov znotraj vrste (Vos in sod., 1995).

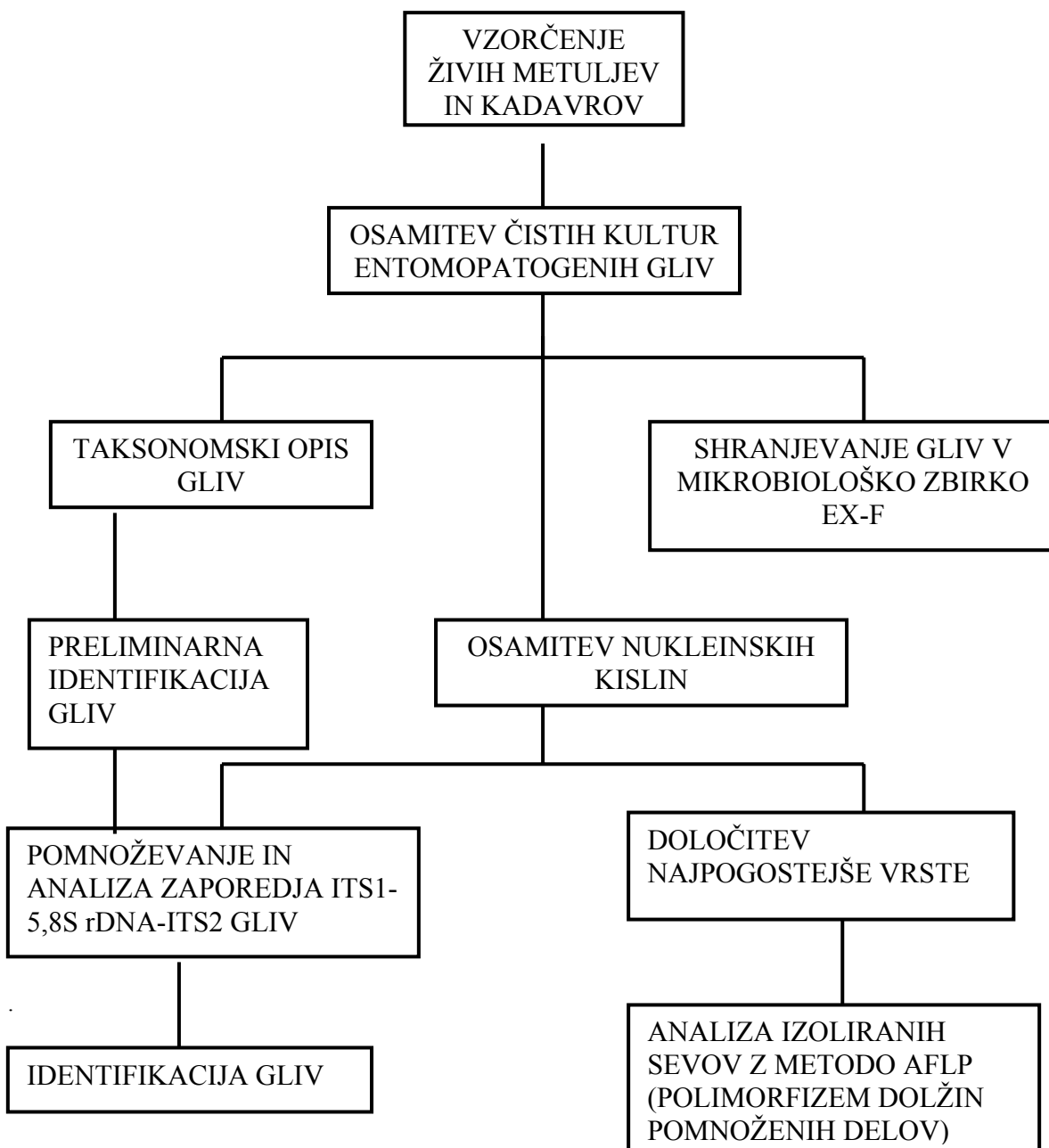
#### 2.4.4.2 Analiza specifičnih genov

Za identifikacijo pogosto ugotavljamo in primerjamo zaporedja, ki se evolucijsko zelo malo spreminjajo. Ti molekularni kronometri so lahko zaporedja, ki kodirajo proteine (npr. tubulinski geni, histonski geni,...) ali pa rRNA. Za identifikacijo najpogosteje analiziramo zaporedji 18S (pri prokariotskih organizmih 16S) ali pa 28S rDNA, ki sta uporabni za širok spekter taksonomskih enot. Za identifikacijo na nivoju vrste pa največkrat zadostuje analiza zaporedja medgenskih distančnikov, ki se nahajajo med 28S in 5,8S rDNA (ITS1) in 5,8S in 18S rDNA (ITS2), ali pa analiza celotnega zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2 (Zalar in Gunde-Cimerman, 2002).



### 3 MATERIALI IN METODE

Raziskovalno delo je potekalo v več različnih stopnjah (Slika 6). Materiali in metode, ki smo se jih tekom raziskovalnega dela posluževali, so predstavljene v spodnjih podglavjih.



Slika 6: Shema poteka dela.

## 3.1 KEMIKALIJE, REAGENTI IN DRUGI PRIPOMOČKI

### 3.1.1 Kemikalije

Pri raziskovalnem delu smo uporabili kemikalije, ki so zbrane v preglednici 3.

Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij.

<b>Kemikalija</b>	<b>Proizvajalec</b>
10x ligacijski pufer	Fermentas, Life Sciences, Litva
10x PCR pufer brez MgCl <sub>2</sub>	Fermentas, Life Sciences, Litva
Agar agar	Merck, Darmstadt, Nemčija
Agaroz	BMA, Rockland, ME, ZDA
ALF express <sup>TM</sup> lestvica 50-500	Amersham Bioscience, ZDA
Bacto kvasni ekstrakt	Difco Lab., Detroit, Mi., ZDA
Bacto pepton	Difco Lab., Detroit, Mi., ZDA
Bacto sladni ekstrakt	Difco Lab., Detroit, Mi., ZDA
Barvilo anilin modro	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Bromfenol modro	Merck, Darmstadt, Nemčija
Celit	Merck, Darmstadt, Nemčija
CTAB	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
dNTP	Fermentas, Life Sciences, Litva
<i>EcoRI</i> endonukleaza (10U/μl)	Fermentas, Life Sciences, Litva
<i>EcoRI</i> linker1 (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3')	Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA
<i>EcoRI</i> linker2 (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3')	Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA
<i>EcoRI</i> oligonukleotidni začetnik (5'-GACTGCGTACCAATTC-3')	Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA
Etanol 96%	Chemo d.d., Ljubljana, Slovenija
Etidijev bromid	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Glicerol	Kemika, Zagreb, Hrvaška
HCl	Kemika, Zagreb, Hrvaška
<i>HpaII</i> endonukleaza (20U/μl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Kloramfenikoli	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA
Kloroform	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Ksilencianol	Serva, Heidelberg, Nemčija
Ligaza (1 U Weiss)	Fermentas, Life Sciences, Litva
<i>MspI</i> linker1 (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')	Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA
<i>MspI</i> linker2 (5'-CGTCAGGACTCAT-3')	Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA
<i>MspI</i> oligonukleotidni začetnik (5'-GATGAGTCCTGAGCGG-3')	Proligo LLC, Boulder, CO, ZDA
Multi core 10x pufer	Promega corporation, ZDA
NaCl	Merck, Darmstadt, Nemčija
NaEDTA	Kemika, Zagreb, Hrvaška
Nanašalno barvilo za AFLP reakcijo	Amersham Bioscience, ZDA
Silikagel	Merck, Darmstadt, Nemčija
Taq polimeraza (5U/μl)	Fermentas, Life Sciences, Litva
Tris baza	Sigma Chemical C., St. Louis, Mo., ZDA

### 3.1.2 Laboratorijski pribor

Pri raziskovalnem delu smo uporabili sledeč laboratorijski pribor:

- cepilne zanke ;
- filter (0,22  $\mu\text{m}$ );
- laboratorijska steklovnina (erlenmajerice, čaše, merilni valji, pipete, epruvete, infuzijske stekleničke, sistem za vakuumsko filtriranje);
- laboratorijske rokavice;
- nastavki za pipete, Eppendorf, Habmurg, Nemčija;
- mikrocentrifugirke, Eppendorf, Habmurg, Nemčija(200  $\mu\text{l}$ , 1500  $\mu\text{l}$ , 2000  $\mu\text{l}$ );
- plastična posodica Rotilabo<sup>®</sup> s stisljivim pokrovom (h=8,5 cm,  $\Phi$ =2,9 cm);
- plastične petrijevke Golias, Slovenija ( $\Phi$ =70 in 90 cm);
- pincete, secirni pribor;
- polavtomatska pipeta Proline Pipete, Helsinki, Finska (0.5-10  $\mu\text{l}$ );
- polavtomatske pipete Eppendorf, Hamburg, Nemčija (2-20  $\mu\text{l}$ , 10-100  $\mu\text{l}$ , 100-1000  $\mu\text{l}$ ).
- sterilni zobotrepci.

### 3.1.3 Laboratorijske aparature

Pri raziskovalnem delu smo uporabili laboratorijske aparature, ki so zbrane v preglednici 4.

Preglednica 4: Seznam uporabljenih aparatov.

<b>Aparat</b>	<b>Proizvajalec</b>
Avtoklav A-63C	Kambič, Slovenija
Bunsenov gorilnik	TLOS, Zagreb, Hrvaška
Centrifuga	Eppendorf, Hamburg, Nemčija
Digestorij Variolab Mobilien W90	Waldner, Wangen, Nemčija
Digitalna kamera DP12	Olympus, Tokio, Japonska
Električni transformator za elektroforezo Consort E143	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ZDA
Elektroforezna banjica E33	Hofer, San Francisco, CA, ZDA
Homogenizator MM301	Retsch, Haan, Nemčija
Laminarij IBK 1V2	Iskra, Slovenija
Lupa Steri SV11 z virom svetlobe KL1500 LCD	Zeiss, Oberkochen, Nemčija
Magnetno mešalo Rotamix 550MMH	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Mikroskop Olympus BX51	Olympus, Tokio, Japonska
Mikrovalovna pečica	Gorenje, Slovenija
<i>PCR sistem</i>	<i>Eppendorf, Hamburg, Nemčija</i>

Tabela 4 – nadaljevanje

<b>Aparat</b>	<b>Proizvajalec</b>
pH meter Metrohm 713	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Sekvenator ALFexpress®	Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
Spektrofotometer UV/VIS	Perkin Elmer, Waltham, MA, ZDA
Tehtnica EXACTA 310 EB	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Tehtnica ET-1111	Tehtnica, Železniki, Slovenija
Transluminator LKB 2001 Macrovue	LKB Bromma, Stockholm, Švedska
Vodna kopel	Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska
Vorteks mešalo	Železniki, Slovenija

## 3.2 GOJIŠČA, RAZTOPINE IN PUFRI

### 3.2.1 Gojišča

Gojišča smo pripravljali tako, da smo večino topila dali v čašo z magnetnim mešalom in dodali suhe sestavine. Ko so se vse sestavine raztopile, smo raztopino prelili v merilni valj in dodali preostali del topila. Če je bilo potrebno umeriti pH, smo to storili pred dodatkom agarja. Gojišča smo avtoklavirali v Erlenmeyerjevih bučkah, prekritih z aluminijasto folijo 15 minut pri 121 °C. Po končanem avtklaviranju smo gojišča ohladili na 55 °C, dodali sterilno raztopino antibiotika in jih aseptično nalili v plastične petrijevke z različnimi premeri. Ko so se gojišča strdila, smo jih zložili v plastično embalažo in jih do uporabe hranili v hladni komori pri 4 °C.

#### PDA (Krompir-dekstrozni agar – Potato dextrose agar) (The Oxoid Manual, 1995)

Potatoe dextrose agar	42 g
dH <sub>2</sub> O	1000 ml

#### PCA (Krompir-korenčkov agar – Potato carrot agar) (Van der Plaats-Niterink, 1981)

Krompir	20 g
Korenje	20 g
Agar	15 g
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>do 1000 ml</u>

Korenje smo spasirali, krompir olupili in narezali na majhne kocke. Krompir in korenje smo vreli 10 min v 500 ml vode, nato smo precedili preko gaze, dodali preostanek vode in agar.

MEA (Agar s sladnim ekstraktom – Malt extract agar) (Raper in Thom, 1949)

Sladni ekstrakt	20 g
Kvasni ekstrakt	1 g
Glukoza	10 g
Agar	20 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

CMA (Agar iz koruzne moke – Cornmeal agar) (Rosentahl in Reyes, 1958)

Koruzna moka	60 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

Koruzno moko smo zavezali v gazo in v 500 ml vreli 1 uro. Gazo smo odstranili, dodali preostanek vode in agar.

SDA (Sabouraudovo gojišče z dekstrozo– Sabouraud dextrose agar) (Carlier, 1948, cit. po The Oxoid Manual, 2002)

Glukoza	40 g
Pepton	10 g
Agar	15 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

Tekoče gojišče za izolacijo DNA (Raper in sod., 1972)

Glukoza	10 g
Pepton	2,0 g
Kvasni ekstrakt	2,0 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,46 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

### 3.2.2 Raztopine, zmesi in pufri

Raztopine in pufre smo pripravili na enak način kot gojišča. Suhe snovi smo zatehtali in jih prenesli v čašo z večjim delom destilirane vode (topila). Ko so se vse sestavine raztopile, smo raztopino prelili v merilni valj in dodali preostali del topila. Če je bilo potrebno, smo umerili pH. Raztopine in pufre smo avtoklavirali v infuzijskih stekleničkah 15 minut pri 121 °C. Uporabili smo jih, ko so se ohladili na sobno temperaturo.

Zmesi suhih snovi smo pripravili tako, da smo posamezne sestavine zatehtali in prenesli v infuzijsko stekleničko s širšim vratom. Sestavine smo premešali s stresanjem in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

#### Fiziološka raztopina (Sambrook in sod., 1989)

NaCl	8,5 g
dH <sub>2</sub> O	do 1000 ml

#### Raztopina kloramfenikola (Sambrook in sod., 1989)

Kloramfenikol	5 g
<u>Metanol</u>	<u>do 100 ml</u>

Raztopino smo sterilizirali s filtracijo preko filtra 0,22 µm.

#### Zmes silikagela in celita (Gerrits van den Ende in de Hoog, 1999)

Silikagel	30 g
<u>Celit 545</u>	<u>15 g</u>

Zmes pripravljamo v laminariju.

#### Pufer CTAB (Sambrook in sod., 1989)

Trizma	2,42 g
NaCl	8,2 g
NaEDTA	0,74 g
CTAB	2,0 g
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>do 100 ml</u>

pH=7,5

0,5 M EDTA (Sambrook in sod., 1989)

EDTA	186,12 g
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>do 1000 ml</u>

pH=8, pH uravnavamo z NaOH

Pufer TE (Sambrook in sod., 1989)

Trizma	0,12 g
EDTA	0,04 g
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>do 100 ml</u>

pH=8, pH uravnemo s HCl.

5x Pufer TBE (Sambrook in sod., 1989)

Trizma	50,4 g
Borova kislina	27,5 g
EDTA (0,5 M)	20 ml
<u>dH<sub>2</sub>O</u>	<u>do 1000 ml</u>

5x nanašalni pufer (Sambrook in sod., 1989)

Bromfenol modro	0,25 g
Ksilen cianol	0,25 g
Glicerol	30,0 ml
<u>Destilirana voda</u>	<u>do 100,0 ml</u>

Tega pufra nismo avtoklavirali

TBE pufer za AFPL (Radišek in sod., 2001, 2003)

H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	6,3 g
Trizma	16 g
EDTA	5 ml
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>do 2500 ml</u>

Nanašalnega pufra nismo avtoklavirali.

### 3.2.3 Priprava gelov za analizo DNA

#### 1 % agarozni gel za elektroforezo

Agarozna	0,35 g
Pufer TBE (0,5x)	35 ml

Agarozni gel smo pripravili po metodi, ki so jo objavil Sambrook in sod. (1989). Zatehtano agarozo smo prenesli v 100 ml Erlenmeyerjevo bučko ter jo segrevali v mikrovalovni pečici dokler se ni raztopila. Med segrevanjem smo premešali in dolili toliko destilirane vode, kot je je izparelo. Ko se je raztopljena agarozna ohladila na približno 40 °C, smo dodali 7 µl etidijevega bromida s koncentracijo 1 mg/ml. Pazljivo smo premešali in vlili v pripravljen model z glavnički.

#### Priprava gela za AFLP

Pri metodi AFLP smo uporabili komercialni gel. Dve tekočini smo zmešali in zlili med stekleni plošči z glavničkom. Za 10 min smo izpostavili UV žarkom, da je gel polimeriziral, odstranili glavničke, vstavili v sistem ALFexpress® in v banjice dolili pufer do oznak.

### 3.3 UPORABLJENI SEVI

Pri metodi AFLP smo za primerjavo uporabili tudi seve iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002) (Preglednica 5).

Preglednica 5: Seznam uporabljenih sevov iz mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002).

Oznaka seva	Vrsta	Mesto vzorčenja	Substrat
MZKI B-302	<i>Beauveria bassiana</i>	Sečovlje, Portorož	prst v aktivnem solinskem bazenu
MZKI B-435	<i>Beauveria bassiana</i>	Tunel v Kozlovem robu	kadaver larve jamske kobilice ( <i>Troglophilus neglectus</i> )
MZKI B-436	<i>Beauveria bassiana</i>	Jama Mengore, Tolmin	okončine odrasle jamske kobilice ( <i>Troglophilus neglectus</i> )
MZKI B-437	<i>Beauveria bassiana</i>	Tunel v Kozlovem robu	kadaver larve jamske kobilice ( <i>Troglophilus neglectus</i> )
MZKI B-865	<i>Beauveria bassiana</i>	Sečovlje, Portorož	hiperslana voda iz aktivnega solinskega bazena



## 3.4 METODE

Raziskovalno delo je vključevalo različne metode: fotografiranje kadavrov, vzorčenje živih metuljev in kadavrov, izolacijo gliv iz črevesa žrtvovanih živali z uporabo različnih gojišč, izolacijo gliv iz kadavrov z uporabo različnih gojišč, morfološke analize, molekularno genetske analize in tipizacijske analize.

### 3.4.1 Fotografija kadavrov

Kadavre metuljev z vidno glivno rastjo smo na mestu fotografirali z digitalnim fotoaparatom Praktica DCZ 4.4. Kot vir svetlobe smo uporabili svetilko s 14 LED diodami, ki je integrirana v jamarsko čelado Petzl Explorer. Fotografirali smo na razdalji 20 cm.

V laboratoriju smo kadavre fotografirali z binokularno lupo Steri SV11 (Olympus), ki ima integrirano kamero.. Kot vir svetlobe smo uporabili svetilo KL1500 LCD (Olympus).

### 3.4.2 Vzorčenje

Vzorce (t.j. kadavre in žive metulje) smo odvzeli s sten in tal štirih različnih jam širom slovenskega krasa v času med majem 2005 in majem 2007. Natančne lokacije so prikazane v preglednici 8 in sliki 8. Kadavre smo vzorčili s sterilnimi zobotrebci, hranili pa v sterilni plastični posodici v hladilniku pri 4 °C do nadaljnjih analiz.

### 3.4.3 Osamitev entomopatogenih gliv

Kadaver smo homogenizirali v 1 ml fiziološke raztopine v mikrocentrifugirki s stekleno palčko, 100 µl homogenizata razmazali po površini splošnih mikoloških gojišč MEA, PDA in PCA s kloramfenikolom ter inkubirali 7 dni pri sobni temperaturi (Kubátova in Dvořák, 2005; nekoliko spremenjeno). Zrastle kolonije smo precepljali s sterilno iglo v črti po površini gojišč MEA dokler nismo izolirali čistih kultur.

### **3.4.4 Osamitev gliv iz črevesja metuljev**

Metulje smo žrtvovali s 5 minutno inkubacijo pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Površinsko sterilizacijo metuljev smo izvedli v treh zaporednih enominutnih inkubacijah: v 1 % NaOCl, v fiziološki raztopini in 70 % etanolu. Aseptično smo odstranili črevo in ga s stekleno palčko v mikrocentrifugirki (1,5 ml) v 600  $\mu\text{l}$  fiziološke raztopine homogenizirali. Homogenizat smo razmazali po površini trdnih gojišč SDA, CMA in MEA. Homogenizat smo razmazali po površini dveh plošč vsakega gojišča in inkubirali v temi pri  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  in pri sobni temperaturi.

### **3.4.5 Taksonomske analize in identifikacija**

Taksonomske analize smo izvedli na morfološkem in molekularno-genetskem nivoju.

#### **3.4.5.1 Morfološke analize**

V okviru morfoloških analiz smo seve opisali makro- in mikromorfološko ter jih na podlagi teh značilnosti s pomočjo dihotomnih identifikacijskih ključev identificirali.

##### **3.4.5.1.1 Makromorfološki opis**

Osamljene seve smo nacepili točkovno na površino gojišča MEA in inkubirali pri sobni temperaturi v temi (Samson, 1974; nekoliko spremenjeno). Po desetdnevni inkubaciji smo opisali obliko, barvo, izgled in premer kolonij, reverz in morebitno produkcijo vodotopnih pigmentov in eksudatov. Seve smo na podlagi makromorfološke podobnosti združili v skupine.

##### **3.4.5.1.2 Mikromorfološki opis**

Del micelija osamljenih sevov smo s sterilno iglo prenesli v kapljico 60 % mlečne kisline ali anilinskega modrila na objektnem steklu. Preparat smo pokrili s krovnim steklom (Humber, 1998). Mikroskopirali in fotografirali smo jih z mikroskopom Olympus BX51 in

kamero Olympus DP15. Opisali smo konidije in konidiogene celice. Izmerili smo 50 struktur in dimenzije podali kot interval, v katerem se bila večina izmerjenih struktur.

### **3.4.5.1.3 Identifikacija**

Seve smo identificirali do rodu s pomočjo dihotomnih ključev po literaturi Atlas of Entomopathogenic fungi (Samson in sod., 1988) in Entomopathogenic fungal identification (Humber, 1998). Za identifikacijo do vrste pa smo uporabili ključe objavljene v monografijah Studies in Mycology (de Hoog, 1972; Samson, 1974).

### **3.4.5.2 Molekularno genetske taksonomske analize**

V okviru molekularno genetskih analiz smo analizirali del nukleotidnega zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2 (Slika 7) in na podlagi zaporedja potrdili oz. ovrgli točnost identifikacije.

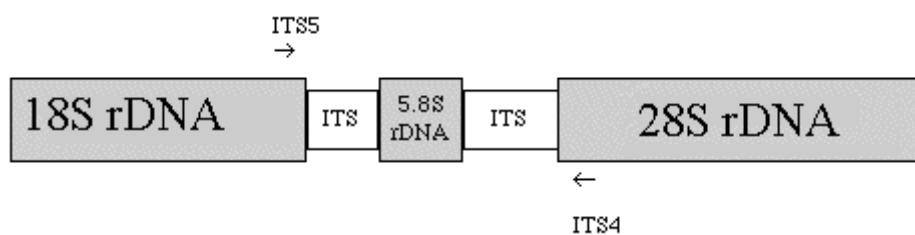
#### **3.4.5.2.1 Gojenje mirujoče kulture in osamitev genomske DNA**

DNA smo izolirali po protokolu, ki sta ga objavila Gerrits van den Ende in de Hoog (1999). Dva tedna stare kulture smo s trdnega gojišča MEA cepili v 4 ml gojišča za izolacijo DNA v epruveti. Po štiridnevni inkubaciji pri sobni temperaturi smo s sterilno cepilno zanko prenesli micelij iz površine tekočega gojišča v mikrocentrifugirko (2 ml) s 500 µl pufra CTAB, približno 0,5 g mešanice celita in silikagela in sterilno jekleno šibro. Micelij smo homogenizirali s homogenizatorjem 1 minuto pri frekvenci 30 tresljajev na sekundo. Homogeniziran micelij smo inkubirali 30 min v vodni kopeli pri 65 °C in nato centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min. Supernatant smo odpipetirali v čisto mikrocentrifugirko ter dodali 500 µl kloroforma, pretresli z vorteksom 1-2 sekundi in ponovno centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min. Vodno (zgornjo) fazo smo prenesli v čisto sterilno mikrocentrifugirko in ponovno dodali 500 µl kloroforma, centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in vodno fazo prenesli v čisto sterilno mikrocentrifugirko. Nato smo vodni fazi dodali dvakratni volumen 96 % etanola ohlajenega na -20 °C. Zmes vodne faze in etanola smo inkubirali čez noč pri -20 °C. Po inkubaciji smo zmes centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in pazljivo odstranili supernatant. Usedlino smo sprali s 500 µl 70 %

etanolom, centrifugirali 5 min pri 14000 obr/min in nato pazljivo odpipetirali etanol. DNA smo posušili, nato pa raztopili v 50 µl sterilne bidestilirane vode.

### 3.4.5.2.2 Pomnoževanje zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2 z verižno reakcijo s polimerazo

Za pomnoževanje dela zaporedja ITS1-5,8SrDNA-ITS2 smo uporabili nekoliko spremenjen protokol od Sonjak in sod. (2007). Uporabili smo univerzalna evkariontska oligonukleotidna začetnika: i) ITS4, ki nalega na 3' konec 28S rDNA (zaporedje: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White in sod., 1990) in ii) ITS5, ki nalega na konec 5' 18S rDNA (zaporedje: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White in sod., 1990).



Slika 7: Lokacija naleganja oligonukleotidnih začetnikov ITS4 in ITS5 (White in sod., 1990).

#### Priprava 25 µl mešanice za PCR (1 vzorec)

10x pufer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
ITS4 (20 µM)	1 µl
ITS5 (20 µM)	1 µl
Taq polimeraza (5 U/ µl)	0,2 µl
ddH <sub>2</sub> O	17,3 µl
DNA	1 µl

Mešanico za PCR smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+2 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 2-negativna kontrola in rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko

(1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP in oligonukleotidne začetnike ITS4 in ITS5. Po dodatku oligonukleotidnih začetnikov smo zmes dobro premešali, dodali polimerazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo odpipetirali DNA oziroma enako količino ddH<sub>2</sub>O v primeru negativne kontrole ter dodali 24 µl mešanice.

Za pomnoževanje dela regije ITS1-5,8S rDNA-ITS2 s cikličnim sistemom Eppendorf smo uporabili nekoliko spremenjen protokol od Sonjak in sod. (2007) prikazan v Preglednici 6.

Preglednica 6: Program za pomnoževanje dela zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2.

Temperatura [°C]	Trajanje	Število ciklov
94	5'	
<b>94</b>	<b>30"</b>	
<b>55 (-1 °C na ciklus)</b>	<b>30"</b>	7
<b>72</b>	<b>45"</b>	
94	30"	
54	30"	20
72	45"	
<b>72</b>	<b>7'</b>	
<b>4</b>	<b>∞</b>	

### 3.4.5.2.3 Gelska elektroforeza

Po končani verižni reakciji s polimerazo smo uspešnost pomnoževanja preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Agarozni gel (1 %) smo pripravili po receptu (glej poglavje 3.2.3). Iz gela smo odstranili glavničke in ga z nosilcem vred vzeli iz modela ter dali v elektroforezno banjico. Banjico smo napolnili z 0,5x pufrom TBE tako, da je bil gel popolnoma prekrit s pufrom (Sambrook in sod., 1989).

Na traku parafilma smo si pripravili vzorce po spodnjem receptu in jih s pipeto prenesli v luknjice na gelu. Luknjice ob robovih smo pustili prazne, v prvo naslednjo smo nanegli lestvico, sledila je negativna kontrola in nato vzorci. Elektroforeza je potekala pod napetostjo 90 V približno pol ure. Po končani elektroforezi smo gel fotografirali na transiluminatorju in ga obdelali z računalniškim programom UVI.

#### Priprava lestvice

Lestvica (100 bp, Fermentes)	2 $\mu$ l
5x nanašalni pufer	1 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	5 $\mu$ l

#### Priprava vzorcev

PCR pomnožek	3 $\mu$ l
5x nanašalni pufer	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l

#### **3.4.5.2.4 Določanje in obdelava nukleotidnega zaporedja**

Nukleotidno zaporedje pomnožka je določilo podjetje Macrogen (Seoul, Koreja) z DNA sekvenatorjem 3730xl, ki temelji na Sangerjevi metodi in kapilarni elektroforezi.

Nukleotidno zaporedje pomnožka smo obdelali z računalniškim programom Clustal X (Thomson in sod., 1997). S spletnim orodjem BLAST (NCBI, 2007) smo poiskali obdelanim zaporedjem najsorodnejša.

#### **3.4.6 Polimorfizem dolžine pomnoženih delov (AFLP)**

Polimorfizem dolžine pomnoženih zaporedij je genotipizacijska metoda, ki sestoji iz sedmih korakov.

##### **3.4.6.1 Restrikcija genomske DNA**

Z merjenjem absorbance svetlobe pri 260 in 280 nm smo določili koncentracijo in čistost izolirane DNA ter pripravili 7,5  $\mu$ l raztopine, ki je vsebovala 250 ng DNA. Restriksijsko mešanico smo pripravili po nekoliko spremenjenem protokolu od Sonjak in sod. (2007).

#### Priprava 20 $\mu$ l restriksijske mešanice (1 vzorec)

DNA (250 ng)	7,5 $\mu$ l
--------------	-------------

Pufer Y <sup>+</sup> /Tango 10x	2,5 µl
EcoRI 10 U/ µl	0,125 µl
MspI 10 U/ µl	0,125 µl
ddH <sub>2</sub> O	9,75 µl

Restriksijsko mešanico smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda in pufer. Rastopino smo dobro premešali, dodali restriksijske encime in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo odpipetirali DNA ter dodali 12,5 µl restriksijske mešanice.

Restriksijsko mešanico smo inkubirali 3 ure v vodni kopeli pri 37 °C in nato restriksijske endonukleaze inaktivirali z 20' inkubacijo pri 65 °C.

#### 3.4.6.2 Priprava adapterjev

Mešanici adapterjev *EcoRI* in *MspI* smo pripravili ločeno po nekoliko spremenjenem protokolu od Radišek in sod. (2001, 2003) in Sonjak in sod. (2007).

##### Priprava 40 µl adapterja *EcoRI* (5 pmol/µl)

<i>EcoRI</i> linker 1 (1 µg/µl)	1,02 µl
<i>EcoRI</i> linker 2 (1 µg/µl)	1,10 µl
TrisHCl (1M, pH =7,7)	10,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	27,88 µl

##### Priprava 40 µl adapterja *MspI* (50 pmol/µl)

<i>MspI</i> linker 1 (1µg/µl)	6,75 µl
<i>MspI</i> linker 2 (1µg/µl)	6,45 µl
TrisHCl (1M, pH =7,7)	10,0 µl
ddH <sub>2</sub> O	16,31 µl

Mikrocentrifugirki z mešanicama adapterjev smo dali v segret termoblok (98 °C), ter počakali, da je temperatura padla na 25 °C

### 3.4.6.3 Ligacija

Ligacija je potekala po nekoliko spremenjenem protokolu od Radišek in sod. (2001, 2003) in Sonjak in sod. (2007).

#### Priprava 25 µl ligacijske mešanice (1 vzorec)

Restriksijska mešanica	20 µl
Adapter <i>MspI</i>	0,5 µl
Adapter <i>EcoRI</i>	0,5 µl
Ligacijski pufer 10x	0,5 µl
Ligaza T4 (1 U/ µl)	0,3 µl
ddH <sub>2</sub> O	3,2 µl

Restriksijsko mešanico smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer in oba adapterja. Raztopino smo dobro premešali, dodali ligazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo odpipetirali restriksijsko mešanico ter dodali 5 µl ligacijske mešanice.

Inkubirali smo pri 22 °C čez noč. Encim smo inaktivirali z 10' inkubacijo pri 65 °C.

### 3.4.6.4 Predhodno pomnoževanje

Predhodno pomnoževanje je potekalo po nekoliko spremenjenem protokolu od Radišek in sod. (2001, 2003) in Sonjak in sod. (2007).

#### Priprava 25 µl mešanice za PCR (1 vzorec)

Restriksijsko-ligacijska mešanica	2,5 µl
-----------------------------------	--------



MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl
Pufer s sulfatom (10x)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
oligonukleotidni začetnik EcoRI (75 ng/µl)	0,5 µl
oligonukleotidni začetnik MspI (75 ng/µl)	0,5 µl
polimeraza Taq (5 U/µl)	0,15 µl
ddH <sub>2</sub> O	16,85 µl

Mešanico za PCR smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N=število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP in oligonukleotidne začetnike EcoRI in MspI. Po dodatku oligonukleotidnih začetnikov smo zmes dobro premešali, dodali polimerazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200 µl) smo odpipetirali restrikcijsko-ligacijsko mešanico ter dodali 22,5 µl mešanice za PCR.

Program za preamplifikacijo s cikličnim sistemom Eppendorf je prikazan v Preglednici:7

Preglednica 7: Program za predpomnoževanja.

Temperatura [°C]	Trajanje	Število ciklov
94	30"	
54	1'	20
72	1'	

### 3.4.6.5 Pomnoževanje

Pomnoževanje je potekalo po nekoliko spremenjenem protokolu od Radišek in sod. (2001, 2003) in Sonjak in sod. (2007).

#### Priprava 10 µl mešanice za PCR (1 vzorec)

Preamplifikacijska mešanica	2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,6 µl
Pufer s sulfatom 10x	1,0 µl
dNTP (10 mM)	0,2 µl

oligonukleotidni začetnik EcoRI (15 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
oligonukleotidni začetnik MspI (15 ng/ $\mu$ l)	1,0 $\mu$ l
polimeraza Taq (5 U/ $\mu$ l)	0,06 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	4,14 $\mu$ l

Mešanico za PCR smo pripravljali na ledu. Dodajali smo N+1 kratno količino reagentov (N-število vzorcev, 1-rezerva). V sterilno mikrocentrifugirko (1,5 ml) smo odpipetirali sestavine v sledečem vrstnem redu: bidestilirana voda, pufer, MgCl<sub>2</sub>, dNTP in oligonukleotidne začetnike EcoRI in MspI. Po dodatku oligonukleotidnih začetnikov smo zmes dobro premešali, dodali polimerazo in rahlo premešali. V mikrocentrifugirke (200  $\mu$ l) smo odpipetirali preamplifikacijsko mešanico ter dodali 8  $\mu$ l mešanice za PCR.

Program za amplifikacijo s cikličnim sistemom Eppendorf je prikazan v preglednici 7.

Preglednica 8: Program za pomnoževanje.

Temperatura [°C]	Trajanje	Število ciklov
94	30"	
65 (-0,7 °C na ciklus)	30"	13
72	60"	
94	30"	
56	30"	23
72	60"	
4	$\infty$	

#### 3.4.6.6 Priprava vzorcev in poliakrilamidna elektroforeza

Vzorce smo pripravili po nekoliko spremenjenem protokolu od Radišek in sod. (2001, 2003) in Sonjak in sod. (2007).

Po končani amplifikaciji smo vzorcem dodali mešanico formamida in barvila ter jih denaturirali z inkubacijo pri 94 °C 5 min in jih nato takoj prenesli na led. Enako smo naredili z lestvico.

Lestvico in vzorce smo s pipeto nanесли v luknjice gela (glej 3.2.3), ki smo jih pred tem temeljito sprali s pufrom. Elektroforeza je potekala na pod naslednjimi pogoji:

- Električna napetost 1500 V
- Električni tok 60 mA
- Električna energija 15 W
- Temperatura 55 °C
- Čas reakcije 450 min
- Čas vzorčenja 1 s

#### 3.4.6.7 Analiza gela

Gel smo analizirali z računalniškim programom Fragment Analyzer (Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska) ter ročno. Elektroforegram smo pretvorili v matriko, kjer je kolona predstavljal sev, vrstica pa vrh na elektroforegramu. Če je bil določen vrh prisoten pri določenem sevu, smo to označili z 1, če je bil odsoten, pa z 0. Iz podatkov urejenih v matriko, smo s programom FreeTree (Pavliček in sod., 1999) izračunali podobnost ugotovljenih profilov Jaccard-ovega koeficienta. Jaccard-ov koeficient uporabimo takrat, kadar imamo veliko število rezultatov 0, ki nastanejo zaradi izbire neustreznih lastnosti. Ta koeficient ne upošteva parov 0-0. Za ugotavljanje podobnosti elektroforetskih profilov smo uporabili netehtano metodo parnih skupin z aritmetično sredino UPGMA (unweighted paired group method of agglomerative hierarchical clustering). Kladograme smo pregledovali s programom Tree view (Page, 2000)

## 4 REZULTATI

Raziskovalno delo je potekalo od 9. maja 2005 do 27. julija 2007. Terensko delo je potekalo kot odprava manjše skupine jamarjev in v okviru interdisciplinarnih odprav Jamarskega kluba Železničar v območju slovenskega krasa (Slika 8). Fotografije kadavrov smo opravili na Katedri za botaniko (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani), preostalo laboratorijsko delo pa v laboratorijih Katedre za biologijo mikroorganizmov (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

### 4.1 VZORČENJE

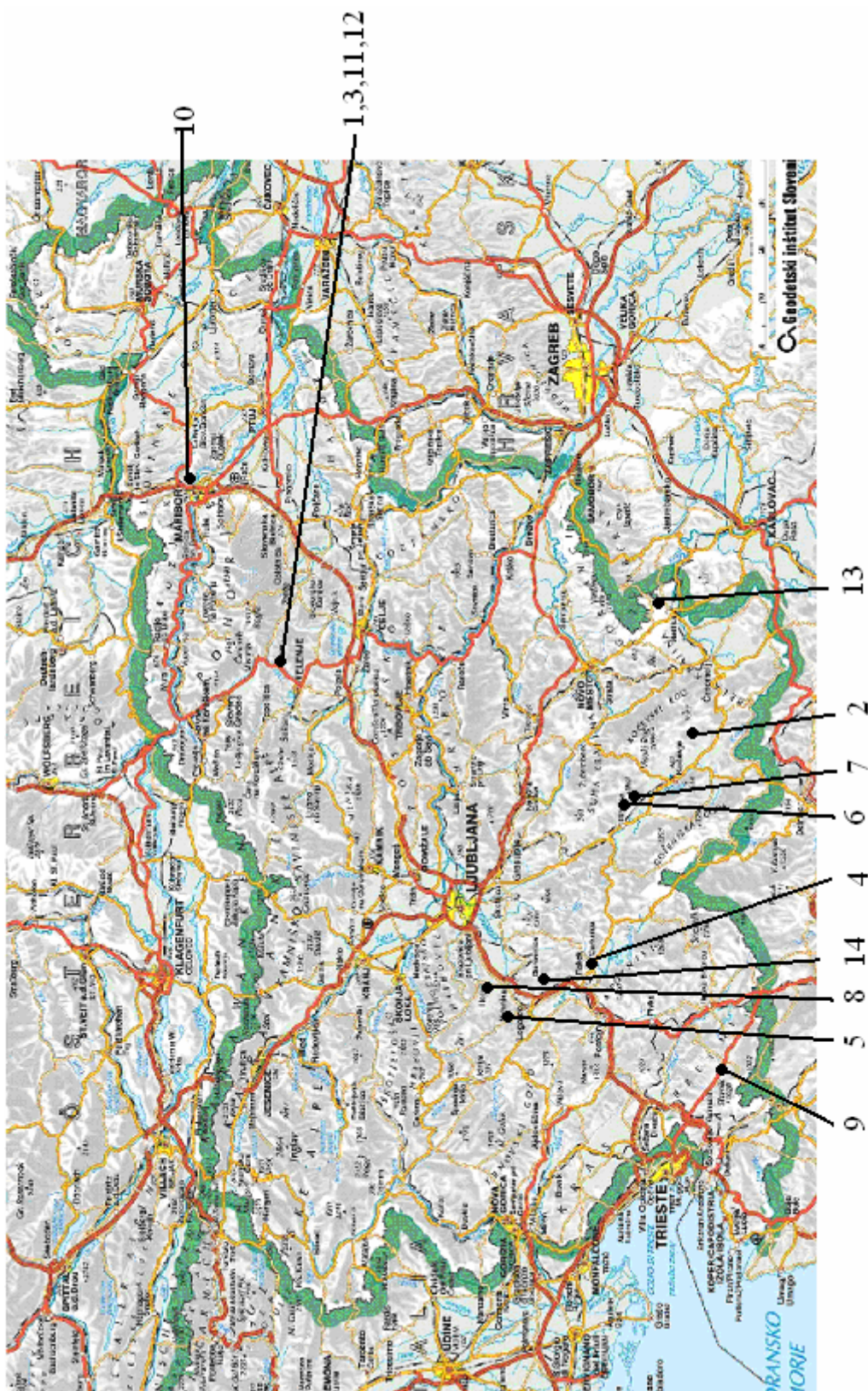
V času od maja 2005 do maja 2007 smo v skupno 14 slovenskih kraških jamah (Slika 8) vzorčili tako žive metulje vrst *Scoliopteryx libatrix* in *Triphosa dubitata* kot tudi kadavre metuljev obeh vrst z vidno glivno rastjo. V tem času je bilo vzorčenih 40 živih metuljev (20 metuljev vsake vrste) in 22 kadavrov: 14 jih je pripadalo vrsti *Scoliopteryx libatrix*, 8 pa vrsti *Triphosa dubitata* (Preglednica 9).

### 4.2 FOTOGRAFIJA KADAVROV

Fotografirali smo vse vzorčene kadavre. Nekatere glive, ki so preraščale kadaver, so tvorile sinemata (oznaka A, Slika 10), nekatere pa bel gost preplet po trupu metulja (oznaka B, Slika 11).

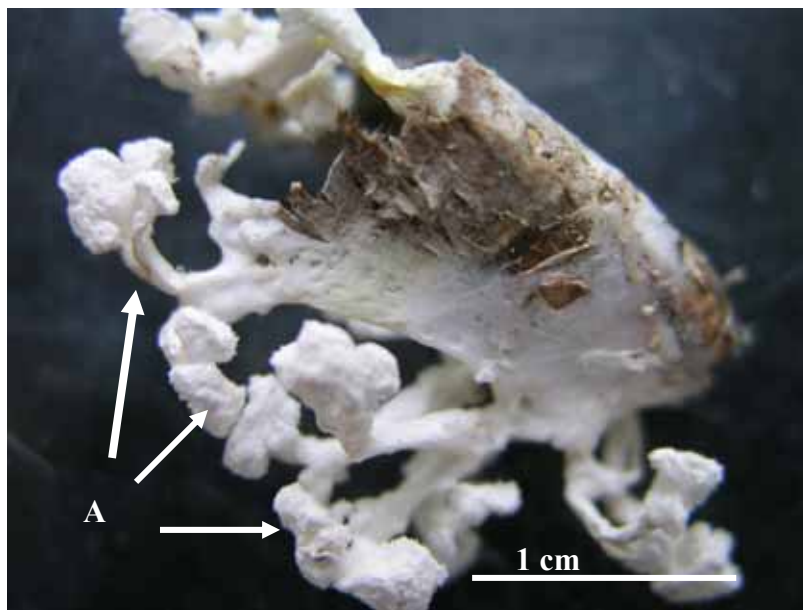
Preglednica 9: Lokacije odvzetih vzorcev metuljev v Sloveniji med leti 2005-2007.

Jama na Sliki 1	Ime jame	Datum vzorčenja	Število in vrsta metuljev	Tip vzorca
1	Pilanca	09.05.2005	4, <i>S. libatrix</i>	kadaver
			2, <i>S. libatrix</i>	živ
			2, <i>T. dubitata</i>	živ
2	Apolonova jama	01.05.2006	3, <i>S. libatrix</i>	kadaver
3	Jama Školjka	25.04.2006	4, <i>S. libatrix</i>	kadaver
			2, <i>S. libatrix</i>	živ
4	Zelške jame	27.03.2007	8, <i>T. dubitata</i>	kadaver
			2, <i>T. dubitata</i>	živ
5	Turkova jama	03.03.2007	3, <i>T. dubitata</i>	živ
			5, <i>S. libatrix</i>	živ
6	Kološevka	15.02.2007	2, <i>T. dubitata</i>	živ
			2, <i>S. libatrix</i>	živ
7	Koblarska jama	15.02.2007	1, <i>T. dubitata</i>	živ
8	Petrova jama	02.10.2006	1, <i>T. dubitata</i>	živ
9	Dimnice	15.01.2006	2, <i>S. libatrix</i>	živ
			2, <i>T. dubitata</i>	živ
10	Jama pri pruhu	17.03.2007	5, <i>S. libatrix</i>	živ
11	Huda lukna	09.05.2005	3, <i>T. dubitata</i>	živ
			2, <i>S. libatrix</i>	živ
12	Špehovka	09.05.2005	1, <i>T. dubitata</i>	živ
13	Bečka jama	11.09.2006	1, <i>T. dubitata</i>	živ
14	Mačkovca	17.02.2007	2, <i>T. dubitata</i>	živ

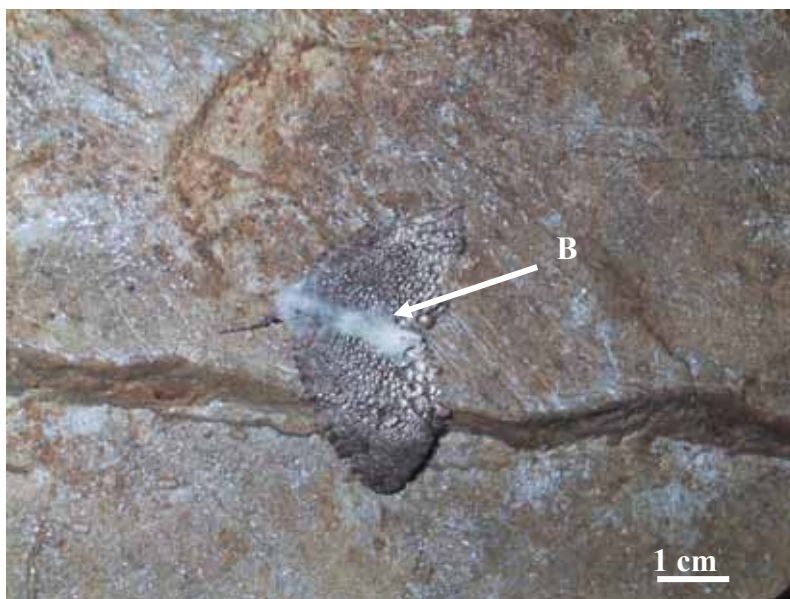


Slika 8: Zemljevid Slovenije z označenimi mesti vzorčenja. (Geodetski inštitut Slovenije, 2007).





Slika 9: Kadaver vrste *S. libatrix* L. preraščen z glivo *Paecilomyces farinosus* (A).



Slika 10: Kadaver vrste *T. dubitata* na steni Zelških jam. Na njem je viden glivni micelij (B).

### 4.3 IZOLACIJA GLIV IZ ČREVEESA

Po razmazu homogenizata črevesa po površini gojišč SDA, CMA in MEA po sedemdnevni inkubaciji, pri večini ni bilo vidne glivne rasti. Pojavljale so se samo kolonije gliv iz rodov *Cladosporium* in *Penicillium*, ki pa so bile kontaminante. Plošče brez kontaminant smo

inkubirali nadaljnje tri tedne in jih pregledovali enkrat tedensko. Po končani inkubaciji kolonij filamentoznih gliv nismo zasledili. Pregledali vse zrasle kolonije, vendar se je izkazalo, da so bakterijske in ne kvasne.

#### 4.4 OSAMITEV ČISTIH KULTUR GLIV IZ KADAVROV METULJEV

Po homogenizaciji kadavrov metuljev in razmazu homogenizata na površino trdnih gojišč PDA, MEA in PCA je po sedemdnevni inkubaciji v temi pri sobni temperaturi na vseh gojiščih zarstlo enako število glivnih kolonij. Ker je na vsaki plošči zrasel samo en tip kolonij (izjema sta bila le dva kadavra *T. dubitata* iz Zelških jam, kjer sta zrasla dva tipa), smo nadalje precepljali le eno kolonijo (dve v primeru, da sta zrastle dva tipa) iz vsakega gojišča. V postopku pridobitve čiste kulture smo za začetna precepljanja uporabljali gojišča s kloramfenikolom. Ko se bakterije niso več pojavljale, smo za nadaljnja precepljanja uporabili le gojišča MEA brez kloramfenikola. Ugotovili smo, da so za rast izoliranih kultur primerna vsa tri gojišča. V Zbirko mikroorganizmov EX-F smo po identifikaciji shranili le en sev iz vsakega kadavra (oziroma dva, kjer smo izolirali dva).

#### 4.5 MAKROMORFOLOGIJA IZOLIRANIH KULTUR

Izolirane seve smo na podlagi makromorfološke podobnosti razdelili v sedem različnih morfoloških tipov in opisali makromorfološke lastnosti vsakega tipa kolonije, in sicer obliko, izgled, barvo, reverz, morebitno produkcijo vodotopnih pigmentov in eksudatov ter premer kolonij. Vse izolate (Preglednica 10) smo shranili v mikrobiološko zbirko kultur EX-F Oddelka za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Slovenija.

##### Tip I

Orogla kolonija z definiranim robom, dvignjena nad površino gojišča, micelij bel, na sredini blede rumen. Reverz je blede do kremno rumen. V tekočem gojišču izloča vodotopne pigmente, raste tudi do globine 2 cm. Premer kolonije 27-29 mm.



#### Tip II

Okrogla kolonija z definiranim robom, dvignjena nad površino gojišča, micelij bel, na sredini rumen. Reverz je na sredini svetlo rumen. V tekočem gojišču izloča rdeče vodotopne pigmente. Premer kolonije je 26-31 mm.

#### Tip III

Okrogla kolonija z definiranim robom, visoko dvignjena nad površino gojišča, micelij je bel. Reverz je bel do svetlo rumen. V tekočem gojišču ne izloča vodotopnih pigmentov. Premer kolonije je 20-22 mm.

#### Tip IV

Okrogla, popkasto izbočena kolonija z definiranim robom, micelij je bel. Reverz je intenzivnih barv. Sledijo si rdečkasto-oranžna v sredini in rumena na robu. V tekočem gojišču izločajo rdeče vodotopne pigmente. Premer kolonije je 22-24 mm.

#### Tip V

Okrogla kolonija z definiranim robom, nizka, micelij se iz sredine kolonije izrašča strogo radialno. Micelij je bel. Reverz je bel. V tekočem gojišču raste počasi, izključno na površini in hitreje ob robovih epruvete. Po desetdnevni inkubaciji doseže premer 10 mm.

#### Tip VI

Okrogla kolonija z definiranim robom, dvignjena nad površino gojišča, micelij bel. Reverz je svetlo oranžen. V tekočem gojišču izloča vodotopen rdečkast pigment. Premer kolonije je 25 mm.

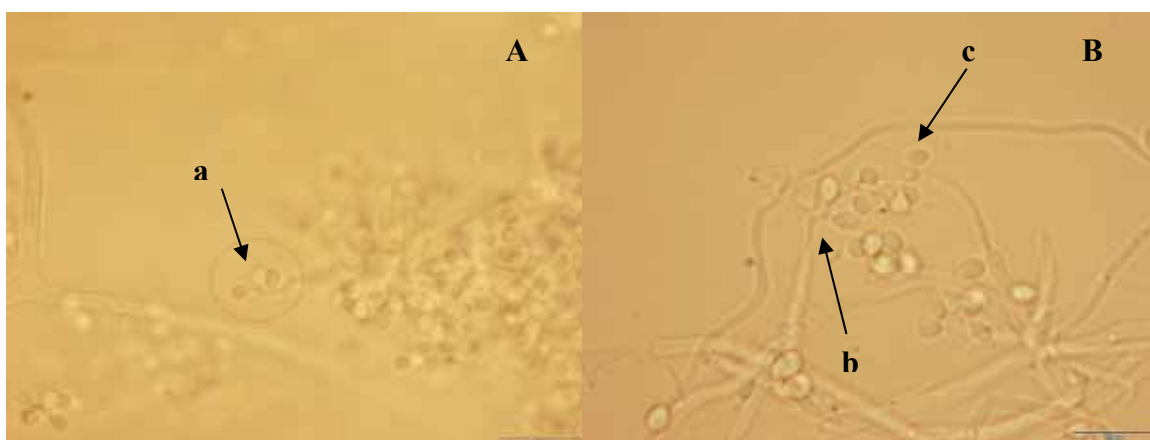
#### Tip VII

Okrogla kolonija z definiranim robom, dvignjena nad površino gojišča, micelij bel. Reverz rumenkast (predvsem v sredini kolonije). V tekočem gojišču ne izloča pigmenta. Premer kolonije je 20-23 mm.

## 4.6 MIKROMORFOLOGIJA IZOLIRANIH KULTUR

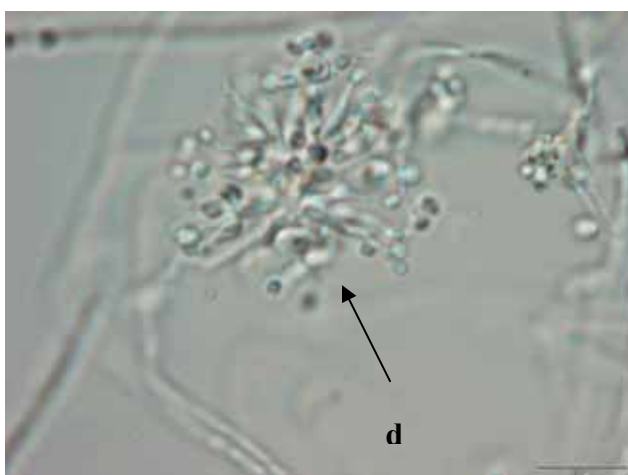
Osem sevov je pripadalo morfotipu I in trije morfotipu II (Preglednica 10).

Opis: Hialinski konidiji so globozni do subglobozni (oznaka a, Slika 11A), 2-3,5  $\mu\text{m}$  in posamič izraščajo simpodialno (oznaka b, Slika 11B) iz dentikulatnih konidiogenih celic (oznaka a, Slika 11A), ki podaljšane in so na spodnjem delu razširjene. Konidiogene celice se združujejo v skupkih (oznaka d, Slika 12). Te seve smo identificirali kot pripadnike vrste *Beauveria bassiana*



Slika 11: Fotografija preparata seva EX-F3297 pri povečavi 1000x.

Legenda: a – dentikulatne konidiogene celice, b - simpodialno izraščanje konidijev, c - konidij. Merilo v desnem kotu predstavlja 10  $\mu\text{m}$ .

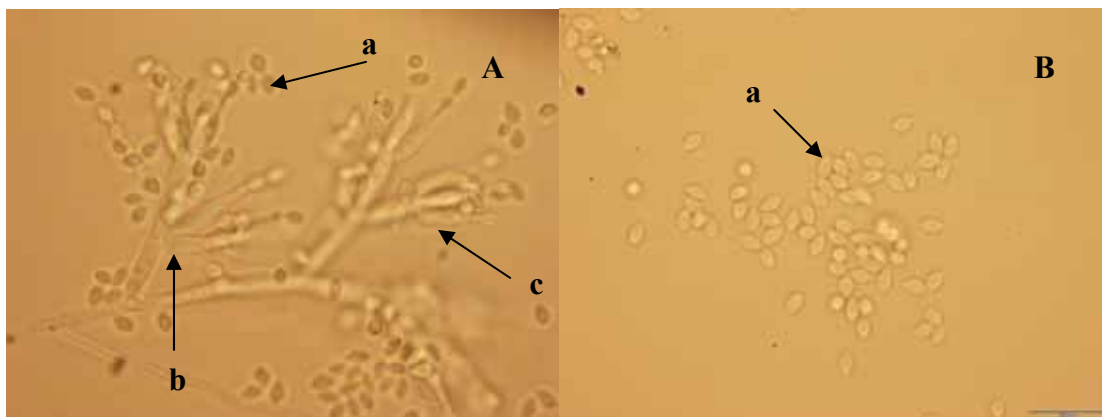


Slika 12: Fotografija preparata seva EX-F3297 pri povečavi 1000x.

Legenda: d - skupki konidiogenih celic. Merilo v desnem kotu predstavlja 10  $\mu\text{m}$ .

En sev je pripadal morfotipu V, en VII, štiri III in pet IV.

Opis: Hialinski konidiji so v obliki limone (oznaka a, Slika 13B),  $2-3 \times 1-1,8 \mu\text{m}$ , izraščajo posamič iz fialid. Konidioforji izraščajo iz zračnih hif. 2-4 stekleničasto oblikovane fialide (oznaka b, Slika 13A),  $9-15 \times 1,3-2,6 \mu\text{m}$ , se na konidioforjih združujejo v skupke (oznaka c, Slika 13A). Te seve smo identificirali kot *Paecilomyces farinosus*.

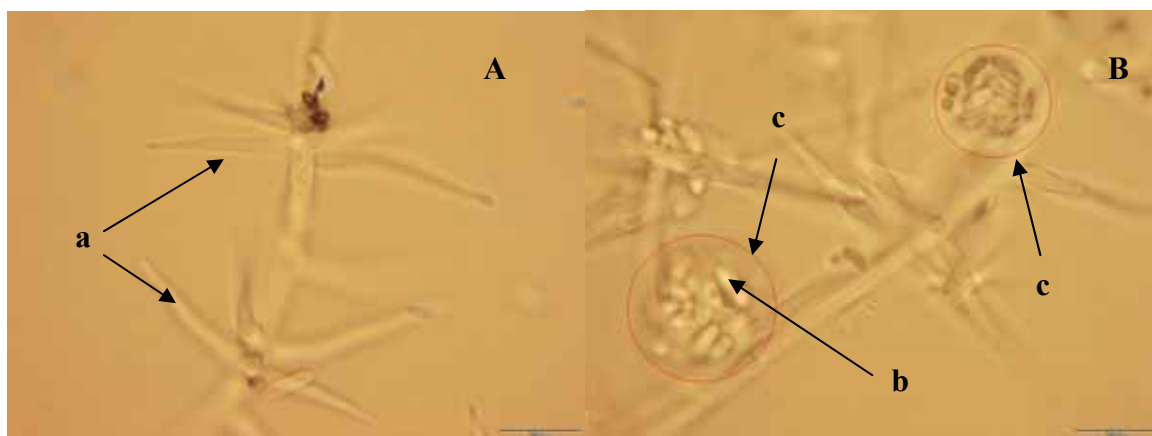


Slika 13: Fotografija preparata seva EX-F3300 pri povečavi 1000x.

Legenda: a - konidiji, b - fialide, c - skupke fialid. Merilo v desnem kotu predstavlja  $10 \mu\text{m}$ .

Dva seva sta pripadala morfotipu V

Opis: Konidiogene celice so značilno verticilatne (oznaka a, Slika 14A), dolge  $20-30 \mu\text{m}$ , široke  $1,5-2 \mu\text{m}$  in izraščajo iz hife v značilnem razporedu s stalno medsebojno razdaljo. Konidiji so podolgovati (oznaka b, Slika 14B), združujejo se v okrogle skupke (oznaka c, Slika 14B). Te seve smo identificirali kot pripadnike vrste *Lecanicillium fusisporum*.



Slika 14: Fotografija seva EX-F3325 pri povečavi 1000x..

Legenda: a – fialide, b – konidij, c – skupki konidijev. Merilo v desnem kotu predstavlja 10 µm.

Preglednica 10: Seznam izoliranih sevov in njihov izvor.

Vrsta	Oznaka seva	Gostitelj	Jama	Morfološki tip	
<i>Beauveria bassiana</i>	EX-F2611 <sup>•</sup>	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Pilanca	I	
	EX-F2612 <sup>•</sup>	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Pilanca	I	
	EX-F3290 <sup>2</sup>	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Apolonova jama	I	
	EX-F3291 <sup>*2</sup>	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Pilanca	I	
	EX-F3297	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Apolonova jama	I	
	EX-F3298	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Pilanca	I	
	EX-F3299*	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Apolonova jama	I	
	EX-F3304*	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Jama Školjka	I	
	EX-F3319*	<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	II	
	EX-F3320	<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	II	
	EX-F3329	<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	II	
	<i>Paecilomyces farinosus</i>	EX-F3293	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Apolonova jama	VI
EX-F3300		<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Jama Školjka	III	
EX-F3301		<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Jama Školjka	III	
EX-F3302		<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Jama Školjka	VII	
EX-F3303		<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Jama Školjka	III	
EX-F3305		<i>Scoliopteryx libatrix</i>	Jama Školjka	III	
EX-F3321		<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	IV	
EX-F3323		<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	IV	
EX-F3326		<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	IV	
EX-F3328		<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	IV	
EX-F3330		<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	IV	
<i>Lecanicillium fusisporum</i>		EX-F3318	<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	V
		EX-F3325	<i>Triphosa dubitata</i>	Zelške jame	V

Legenda: \* pri teh sevih smo določili del nukleotidnega zaporedja ITS1-5,8S rDNA-ITS2.

• teh sevov pri AFLP nismo uporabili

<sup>2</sup> te seve smo analizirali 2x

## 4.7 MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA

Za izbrane seve (Preglednica 10) smo izvedli verižno reakcijo s polimerazo v kateri smo uporabili oligonukleotidna začetnika ITS5 in ITS4 (White in sod., 1991). Pomnoževanje je

uspelo zgolj pri sevih, ki smo jih na podlagi morfologije identificirali kot pripadnike vrste *Beauveria bassiana*. Določena in obdelana nukleotidna zaporedja pomnožkov petih sevov smo s pomočjo iskalnika BLAST primerjali z že znanimi zaporedji v bazi podatkov GeneBank. Rezultati primerjave so potrdili identifikacijo sevov opravljeno na osnovi morfologije (Preglednica 11).

Preglednica 11: Seznam identificiranih sevov in odstotek podobnosti z zaporedji v bazi podatkov GeneBank.

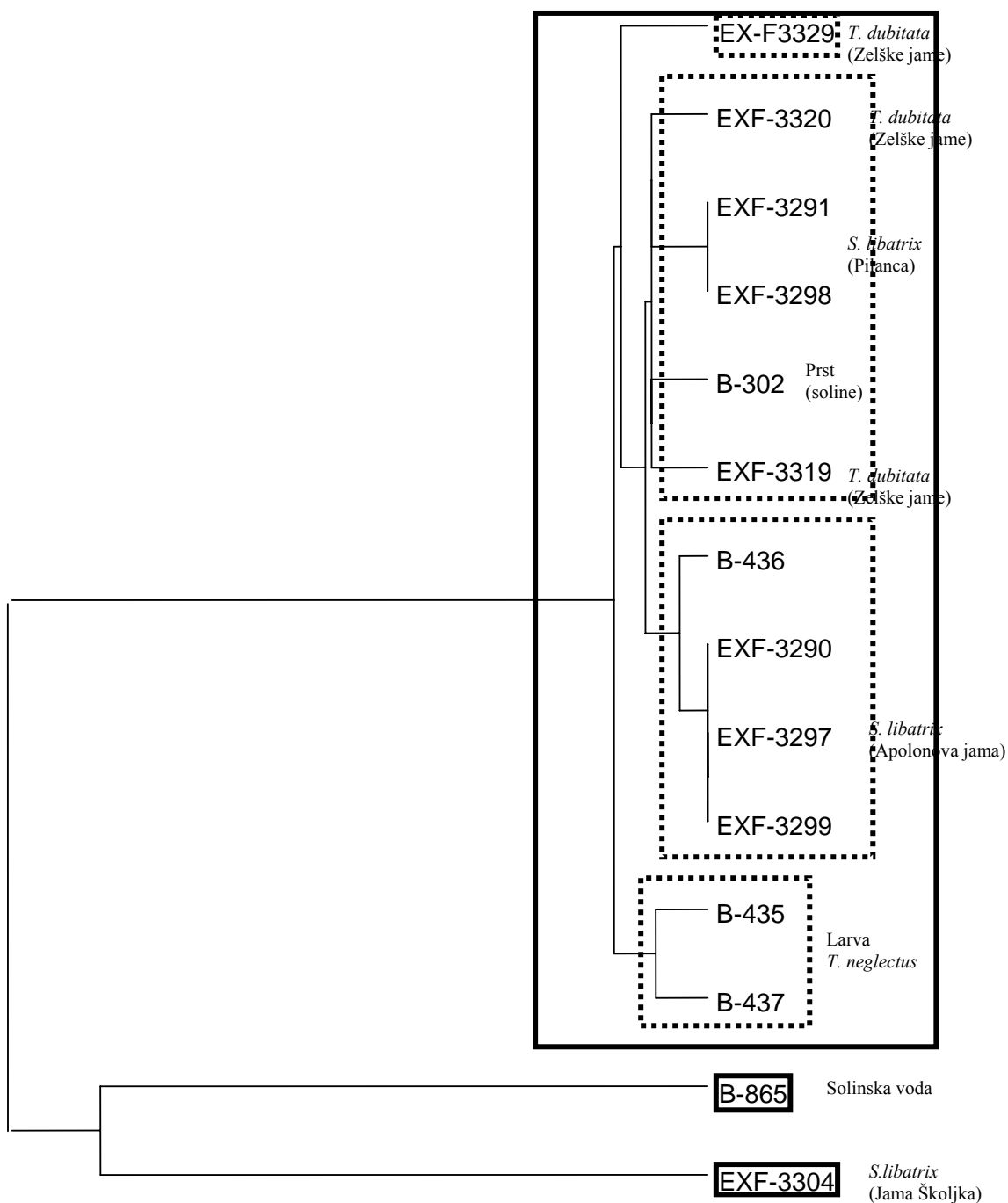
Oznaka seva	Rod	Vrsta	% podobnosti z vrsto	E-vrednost
EX-F3291	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	99 <i>Cordyceps bassiana</i>	0,0
EX-F3299	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	99 <i>Cordyceps bassiana</i>	0,0
EX-F3304	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	100 <i>Cordyceps bassiana</i>	0,0
EX-F3319	<i>Beauveria</i>	<i>bassiana</i>	100 <i>Cordyceps bassiana</i>	0,0

#### 4.8 ANALIZA POPULACIJE IZOLIRANIH SEVOV *Beauveria bassiana* Z METODO POLIMORFIZEM DOLŽINE POMNOŽENIH DELOV

Vrsta, ki smo jo najpogosteje izolirali iz obeh gostiteljev vzorčenih v vseh štirih jamah, je bila *Beauveria bassiana*. Na podlagi polimorfizma dolžine pomnoženih delov (AFLP) smo analizirali populacijo tako jamskih sevov kot sevov pridobljenih iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta (Preglednica 5).

Pri analizi elektroforegrama smo upoštevali vse pomnožene fragmente (vrhove). Večinoma smo za vsak sev določili 25 delov v razponu od 50 do 686 baznih parov. Na podlagi elektroforegrama smo oblikovali matriko  $n \times t$  (3.4.5.7) in s programom FreeTree izračunali matriko podobnosti, na podlagi katere smo oblikovali kladogram (Slika 15).

Sevi se v grobem združujejo v 3 glavne gruče. V eni je B-865 (sev izoliran iz solinske vode), v drugem je EX-F3304 (sev izoliran iz metulja vrste *S. libatrix*, Jama Školjka), v tretji gruči pa se sevi združujejo v štiri podgruče. Sevi EX-F3291 in EX-F3298 ter EX-F3290, EX-F3297 in EX-F3299 so imeli enake AFLP profile, za razliko od sevov B-865 in EX-F3304, ki sta na kladogramu močno ločena od ostalih zaradi velikega števila polimorfnihih znakov na profilu AFLP.



Slika 15: Nekoreninjeno drevo narejeno na podlagi matrike podobnosti profilov AFLP. S polno debelo črto so označene gruče, s črtkano pa podgruče.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Tekom raziskovalnega dela smo dosegli večino ciljev, naše predpostavke pa so se potrdile le delno.

### 5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo identificirali entomopatogene glive, ki se najpogosteje pojavljajo na kadavrih dveh vrst troglofilnih metuljev, *Scoliopteryx libatrix* in *Triphosa dubitata*, za najpogosteje izolirano glivno vrsto pa smo izvedli tudi molekularno študijo genetske variabilnosti. Iz črevesa žrtvovanih metuljev gliv nismo izolirali.

#### 5.1.1 Pojavljanje troglofilnih vrst *S. libatrix* in *T. dubitata* v kraških jamah

Gre za vrsti, ki ju izmed vseh vrst troglofilnih metuljev v slovenskih kraških jamah najdemo najpogosteje. V jamskih habitatih in drugih hipogeičnih okoljih kot odrastli živali preživita 8-10 mesecev. Vrsti se razlikujeta po načinu hibernacije. Vrsta *S. libatrix* je v globokem spancu, *T. dubitata* pa tekom hibernacije spreminja lokacijo v jami. Žive odrastle metulje obeh vrst smo vzorčili v trinajstih jamah, kadavre pa v štirih (glej Preglednico 9 in Sliko 8). Istih jam nismo pregledovali v različnih letnih časih in ne moremo sklepati, če jame, v katerih nismo našli ne živih in ne mrtvih metuljev, nudijo ugodne pogoje za hibernacijo.

Vrsto *T. dubitata* smo pogosteje našli v jamah (glej Preglednico 9) in za razliko od vrste *S. libatrix* tudi na dostopnejših mestih. Kot poroča Dvořak (2000), metulji vrste *T. dubitata* prezimujejo v večjih skupinah na stenah, metulji vrste *S. libatrix* pa prezimujejo posamič, večji delež na stropu jame in jih v primeru jame z visokim stropom najdemo redkeje. Tako smo v primeru vrste *T. dubitata* našli 8 kadavrov v eni sami jami (Zelške jame), medtem ko smo približno enako število kadavrov vrste *S. libatrix* pridobili šele po pregledu treh drugih jam (Pilanca, Apolonova jama in Jama Školjka) (glej Preglednico 9). V teh jamah smo opazili tudi žive metulje vrste *T. dubitata* (Pilanca, Jama Školjka, Zelške jame, glej

Preglednico 9). Dvořak (2000) v nasprotju s Turqin in sod. (1974) poroča, da najdemo vrsto *S. libatrix* bližje vhodnemu predelu. Do teh razhajanj je lahko prišlo zaradi različnih metodoloških pristopov: Dvořakova študija je trajala dlje in je spremljala stanje tekom celotnega obdobja hibernacije, Turqin in sod. (1974) pa so preučevali samo zadnje mesece hibernacije. Glede na to, da vrsta *S. libatrix* tolerira večjo temperaturno razliko kot vrsta *T. dubitata* in tekom hibernacije svoje lokacije ne spreminja, predpostavljamo, da so se metulji vrste *T. dubitata* v obdobju raziskovanja Turqina in sod. (1974) premaknili bližje vhodnemu predelu. To lahko pojasni naša opažanja. Žive metulje smo vzorčili v različnih letnih časih (glej Preglednico 9), vendar večinoma v zadnjih mesecih hibernacije.

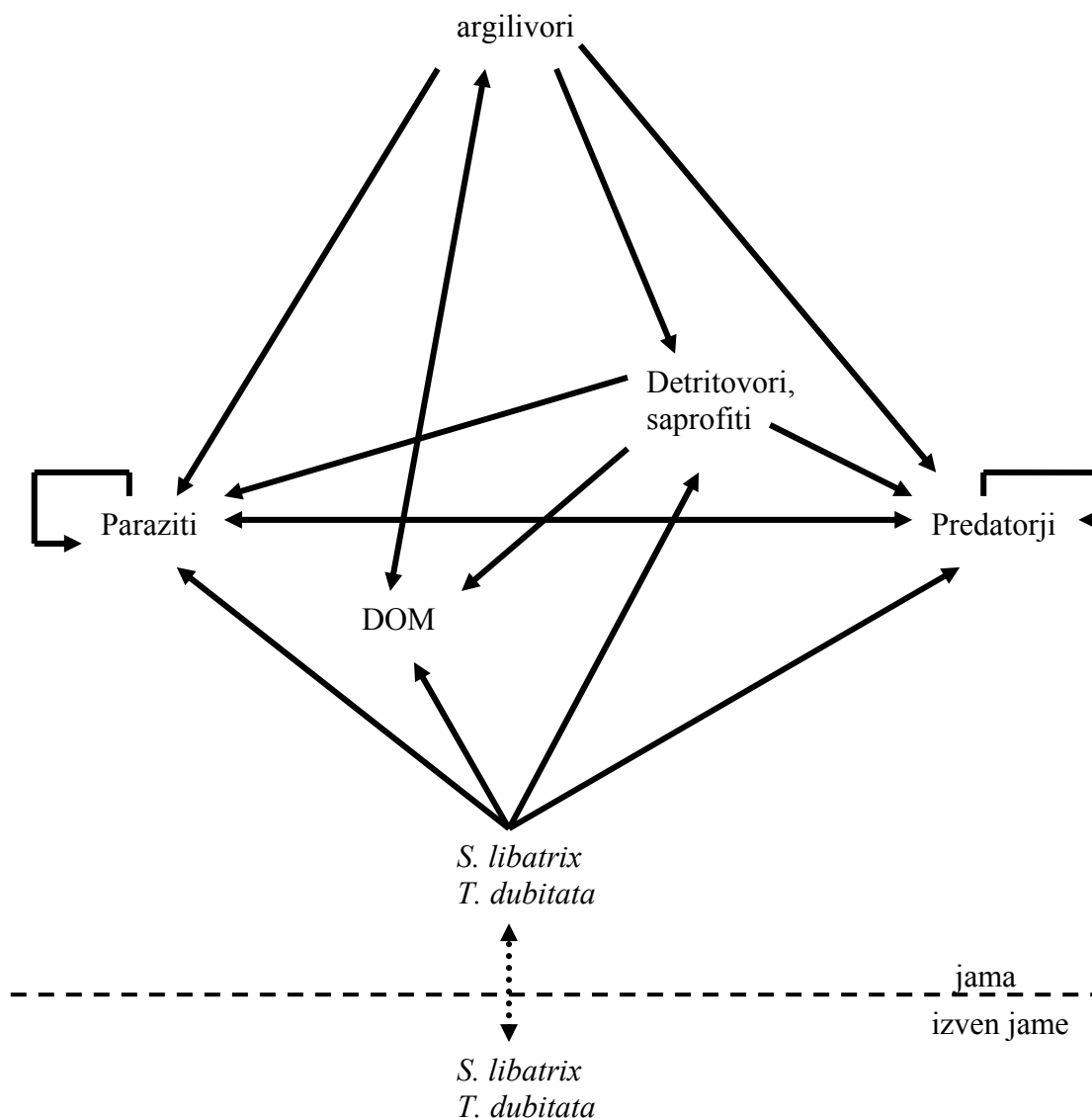
### **5.1.2 Predlagan splošni prehranjevalni splet v oligotrofnem hipogeičnem habitatu**

Za jamske habitate je razen nizke stabilne temperature, teme in (skoraj) absolutne relativne zračne vlage značilna tudi nizka vsebnost dostopnih hranil. Gre za oligotrofno okolje, kjer je primarna produkcija odsotna oziroma zanemarljiva. Organska snov je alohtona in lahko pride v jamo iz zunanosti raztopljen v tekoči vodi, ki vstopa v jamo (spiranje površja), lahko kot del sedimenta in nanosov prsti, lahko pa v obliki žive biomase. Biomaso lahko predstavljajo mikroorganizmi kot del sedimenta in vode ali pa trogloksene oziroma troglofilne živali.

Na podlagi modelov prehranjevalnih spletov, narejenih za določene jame (Stone in sod., 2005; Camassa, 2004), smo sestavili splošni prehranjevalni splet (glej Sliko 16), ki zajema vse trofične nivoje znotraj jam, s poudarkom na troglofilnih metuljih. Poudariti je potrebno, da so lahko omenjene skupine organizmov troflofilni oz. troglokseni in so tudi del prehranjevalnih spletov zunaj jam.

Troglofilni jamski metulji vstopajo v prehranjevalni splet jamskih habitatov zgolj kot vir energije in hranil predatorjem ali pa parazitom, organske snovi iz njihovega fecesa in kadavra pa izkoristijo koprofilni, detritovorni in saprofiti.





Slika 16: Predlagan prehranjevalni splet jamskih habitatov s poudarkom na hibernirajočih organizmih (npr. metulja *S. libatrix*).

Legenda: Polna puščica označuje tok energije, črtkana pa migracijo živali. Migracija je prikazana zgolj za hibernirajoče organizme, ne pa tudi za ostale. Črtkana puščica označuje mejo med jamskim in nejamskim okoljem.

Troglofilni metulji se tekom hibernacije ne prehranjujejo in živijo na račun zalog, ki so si jih nabrali v stadiju ličinke zunaj jam (Bouvet in sod, 1974). Predatorji so lahko različne troglofilne vrste pajkov (npr. *Meta spp.*, *Tegenaria spp.*), netopirji (Dvořak, 2000) idr.. Parazitske vrste, ki so bile dosedaj izolirane iz troglofilnih metuljev (Kubatova in Dvořak,

2005), so bile le entomopatogene glive, drugih entomopatogenih parazitov pa doslej še niso izolirali.

Ker je jama vmesni habitat (med terestričnim in akvatičnim), lahko govorimo o prenosu snovi in energije v raztopljeno organsko snov (DOM – *ang.* dissolved organic matter), ki se nahaja tako v tekočih vodah kot v pornih vodah sedimenta. Načinov pretvorbe žive biomase v DOM je več: pretvorba nedostopnih organskih spojin na površini kutikule žuželk zaradi delovanja kaskade encimov entomopatogenih gliv (Cooke in Whipps, 1993), predacija (npr. v primeru poškodovanja plena zaradi prisotnosti tekoče vode) ali pa naključje (npr. odtrga se del stropa in ubije metulje). DOM je lahko dostopen različnim argilivorom (t.j. organizmom, ki požirajo glino), kot so troglobiontne vrste hroščev (npr. *Leptodirus hoechenwartii*), postranic (*Nymphargus sp.*), paščipalcev (*Eucenenia austriaca*), idr.

Entomopatogene glive so pomemben ekološki dejavnik v oligotrofnih hipogeičnih okoljih, saj vplivajo na velikost in vrstno sestavo žuželk v okoljih in omogočajo prenos energije v druge trofične nivoje.

### **5.1.3 Izolacija gliv iz črevesa živih metuljev in kadavrov *S. libatrix* in *T. dubitata***

Vsebino izoliranega črevesa 40 žrtvovanih metuljev (20 vrste *S. libatrix* in 20 *T. dubitata*) smo nanesti na površino gojišča za kvasovke SDA, splošnega mikološkega gojišča MEA in revnega gojišča CMA in gojili pri sobni temperaturi in pri 10 °C. V obdobju štirih tednov se na površini gojišča ni pojavila nobena glivna kolonija (glej 4.3). Glede na to, da se metulji tekom hibernacije ne prehranjujejo in živijo na račun zaloga, ki so si jih nabrali kot ličinke (Bouvet in sod., 1974), predvidevamo, da je prišlo do zmanjšanja črevesne flore oz. izginotja gojljivih vrst gliv. O glivah v črevesu metuljev so že govorili (Rosa in sod, 1992, 1994; van der Walt, 1959; Martignoni in sod., 1969), vendar se v nobeni od teh študij niso ukvarjali s črevesno floro troglofilnih metuljev. Entomopatogene glive, ki pričnejo z

infekcijo v prebavilu, pa očitno v črevesu vzorčenih živih metuljev tudi niso bile prisotne (glej 4.3).

Pregledali smo 22 kadavrov z vidno glivno rastjo, od tega 8 kadavrov vrste *T. dubitata* in 14 vrste *S. libatrix* (glej Preglednico 7). Kadavre smo pregledovali z namenom, da bi odkrili okužbo z micelijem entomopatogenih gliv. Doslej opisane entomopatogene glive, ki parazitirajo troglofilne metulje (Kubatova in Dvořak, 2005), so fakultativni paraziti, ki so sposobni tudi saprotrofnega načina življenja. Ker je njihova strategija prenosa »sedeti in čakati«, troglofilni metulji pa zaradi abiotskih dejavnikov prezimijo na točno določenih lokacijah v jamah, so tam verjetno prisotne v večjem številu tudi infektivne oblike entomopatogenih gliv, kar močno poveča verjetnost okužbe. Domnevamo, da je verjetnost okužbe in tudi epizooze višja pri troglofilu *T. dubitata*, ker vrsta tekom hibernacije migrira in ker prezimujejo v večjih skupinah, kar olajša prenos. Prenos z gostitelja na gostitelja je lahko tudi duga strategija horizontalnega prenosa infektivnih oblik patogena. Poglobljene študije *in situ* o načinih prenosa infektivnih oblik entomopatogenih gliv v jamskih habitatih še niso bile opravljene.

#### **5.1.4 Pojavnost entomopatogenih gliv na kadavrih obeh vrst metuljev**

Iz kadavrov *S. libatrix* in *T. dubitata* smo izolirali 25 sevov (glej Preglednico 10), ki smo jih razdelili v sedem morfotipov (glej 4.5). Seve smo identificirali na nivoju makro- in mikromorfoloških značilnosti s pomočjo dihotomnih ključev in tudi na molekularnem nivoju. Ugotovili smo, da dva morfotipa pripadata vrsti *Beauveria bassiana*, štirje morfotipov vrsti *Paecilomyces farinosus* in en morfotip vrsti *Lecanicillium fusisporum* (glej 4.7). Ti rezultati potrjujejo našo hipotezo, in sicer smo predvidevali (glej 1.1), da bomo izolirali glive iz debla Ascomycota oziroma njihove ustrezne anamorfe. Izolirane glive so anamorfna oblika gliv iz debla Ascomycota in imajo zelo široko gostiteljsko območje.

Najpogosteje smo izolirali vrsto *Beauveria bassiana* (glej Preglednico 10), ki je doslej še niso izolirali iz troglofilnih metuljev vrst *S. libatrix* in *T. dubitata*. Za glivo te vrste je značilno, da je splošno razširjena in ima zelo široko gostiteljsko območje. Izolirali so jo

tudi iz troglofilnih komarjev (Kubatova in Dvořak, 2005) in muh (Rombach in Samson, 1983).

*Beauveria bassiana* predstavlja za troglofilne metulje dominantno patogeno vrsto, saj smo jo izolirali iz kadavrov obeh vrst vzorčenih v vseh štirih jamah (glej Preglednico 10). Predvidevamo, ima patogeni potencial zaradi vsesplošne razširjenosti, invazivnosti, lahkega prenosa, širokega gostiteljskega območja in ker sama infekcija ni povezana s prisotnostjo svetlobe. Kot druga najpogostejša gliva se pojavlja *Paecilomyces farinosus* (glej Preglednico 10), ki ima tudi omenjene lastnosti, poročali pa so o nujni prisotnosti svetlobe pri nespolnem razmnoževanju nekaterih vrst tega rodu (Sanchez-Murillo in sod., 2004; Kanauchi in Fukatsu, 1999). Vrsta *Lecanicillium fusisporum* v naši raziskavi ni predstavljala pomembnega patogena. Za rod *Lecanicillium* značilno pojavljanje v zmernih in toplih območjih, kar pa jama vsekakor ni. Vrsti *Lecanicillium fusisporum* in *P. farinosus* smo izolirali iz istega kadavra, in glede na to, da so bile kolonije *L. fusisporum* prisotne v manjšem številu, kot *P. farinosus*, na kadavru pa prisotna sinemata (glej Sliko 9), ki so značilna za *P. farinosus*, predvidevamo, je bila slednja vrsta odgovorna za smrt žuželke, do infekcije z *L. fusisporum* pa je prišlo naknadno (morda celo po smrti). Ti rezultati se razlikujejo od rezultatov študije, ki sta jo opravila Kubatova in Dvořak (2005). Avtorja sta raziskovala entomopatogene glive hibernirajočih žuželk v čeških jamah. Iz kadavrov vrste *S. libatrix* sta najpogosteje izolirala vrsto *P. farinosus* (iz 25 od 35 kadavrov), druga najpogostejša gliva na kadavru te vrste pa je bila *Lecanicillium muscarinum*, ki je mi nismo izolirali (glej 4.6 in Preglednico 10). Iz kadavrov vrte *Triphosa dubitata* sta najpogosteje (iz 14 od 41 kadavrov), tako kot Pacioni (1978) in Matočec in Ozimec (2001), izolirali vrsto *Cordyceps* sp., ki je bila morfološko podobna *Cordyceps rivierae*. Glivo, ki je bila druga najpogosteje izolirana iz kadavrov te vrste, so identificirali zgolj kot sterilni bel micelij. Vrste *Beauveria bassiana* iz kadavrov *S. libatrix* in *T. dubitata* niso izolirali. Ker izoliranih sevov niso shranili v mikrobiološki zbirki CCF (ang. Culture Colection of Fungi, Praga) (Kubatova Alena, osebno), populacijske primerjave drugih vrst nismo mogli izvesti.

Naša raziskava je vključevala le štiri jame (glej Preglednico 9), raziskava avtorjev Kubatova in Dvořak (2005) pa 27. Za boljšo primerljivost rezultatov bi bilo potrebno v raziskavo vključiti več mest vzorčenja.

### **5.1.5 Genotipizacija izolatov *Beauveria bassiana***

Seve vrste *B. bassiana* izolirane iz jam in seve, ki smo jih pridobili iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002) smo analizirali z genotipizacijsko metodo, da bil ugotovili kakšna sta sorodnost in polimorfizem med sevi znotraj populacij te vrste in ali obstaja povezava z okoljem iz katerega je bil sev izoliran. Polimorfizem populacij smo ugotavljali z metodo polimorfizma dolžin pomnoženih zaporedij (AFLP).

Pri analizi elektroforegrama AFLP smo upoštevali vse pomnožene fragmente. Na osnovi profilov AFLP odsekov smo z uporabo netehtane metode parnih skupin z aritmetično sredino UPGMA izdelali matriko podobnosti, na podlagi katere smo izrisali kladogram. Analiza je večino sevov združila v večjo gručo s podgručami, medtem ko je seva B-865 (solinska voda, sečoveljske soline) in EX-F3304 (kadaver vrste *S. libatrix*, Jama Školjka) jasno ločila od gruče (glej Sliko 15). Seva sta imela v primerjavi z drugimi sevi veliko več polimorfni odsekov.

V gruči so štiri podgruče (glej Sliko 15). Prva, ki je jasno ločena od ostalih, zdužuje seva izolirana iz kadavrov ličink jamske kobilice vrste *Troglophilus neglectus* (Tunel v Kozlovem robu) (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002), drugo podgručo pa so predstavljali sevi izolirani iz kadavrov vrste *S. libatrix* (Apolonova jama), katerih profili so bili enaki in zelo podobni sevu B-436 iz okončin jamske kobilice (Jama Mengore) (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002). Tretjo podgručo sta predstavljala dva izolata z enakim profilom odsekov AFLP iz kadavrov vrste *S. libatrix* (Pilanca) in trije sevi z različnim AFLP profilom: dva iz kadavrov vrste *T. dubitata* (Zelške jame) in sev B-302, izoliran iz prsti sečoveljskih solin (Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002). Četrto podgručo predstavlja le sev 3329 iz *T. dubitata* (Zelške jame)

Na podlagi kladograma (Slika 15) lahko zaključimo, da se sevi izolirani iz kadavrov vrste *S. libatrix* (Preglednica 10) grupirajo glede na geografski izvor (glede na jamo iz katere so bili izolirani), medtem ko so sevi izolirani iz *T. dubitata* veliko bolj variabilni znotraj metuljev iz ene jame. Ta ugotovitev ni popolnoma v skladu z našo predpostavko (glej 1.1). Predpostavljali smo namreč, da se bodo sevi združevali glede na gostitelja in glede na geografski izvor, *T. dubitata* se v jamah zadržuje tudi podnevi izven obdobja hibernacije, ponoči pa odletijo izven jam, kar lahko vpliva na relativno nizko mero polimorfizma glede na mesto izolacije (večja gruča na kladogramu, glej Slika 12). Dejavnik, ki bi lahko vplival na relativno visoko variabilnost znotraj Zelških jam je velik obisk s strani jamarjev in turistov, ki predstavljajo možen vir vnosa novih sevov.

De Muro in sod. (2003) so analizirali seve vrste *B. bassiana* iz različnih geografskih območij, ki pa se niso zgruževali glede na izvor in gostitelja. Metodo so potrdili kot uspešno le za ločevanje sevov vrst *Beauveria bassiana* in *B. brongniartii*. Kasneje pa so De Muro in sod. (2005) pokazali korelacijo med stopnjo polimorfizma in geografskim območjem. V diplomskem delu smo za razliko od omenjenih raziskav (De Muro in sod, 2003, 2005) preučevali le seve vzorčene v Sloveniji, kar je relativno majhno območje. Morebiti bi primerjava s sevi iz drugih območij dala popolnoma drugačno sliko.

Na prvi pogled nenavadna se zdi sorodnost solinskega izolata B-302 z drugimi sevi izoliranimi iz troglofilnih metuljev (glej Slika 15). Možni so trije načini vnosa te vrste glive v solinsko okolje: prenos infektivnih oblik z vetrom (prsotnosti entomopatogenih gliv na vhodnih oziroma zunanjih delih jam nismo preiskovali), preko gostiteljev ali pa s tokom vode (pogosto se pojavlja v talni mikrobni flori – vnos v solinske bazene iz ta je tudi možen). Jamski habitat je vmes med akvatičnim in terestričnim habitatom, in predvidevamo, da obstaja možnost pretoka zaradi povezanosti vodnih teles. Poročali so (Kachaturians, 1991) o občutljivosti solinskega rakca *Artemia salina* na beauvericin, sekundarni metabolit glive *B. bassiana*. Doslej ni bilo objavljene še nobene študije, ki bi opisala kakšnokoli razmerje med tema dvema organizmoma. Če bi se izkazalo, da je *B. bassiana* patogena tudi za solinske rakce, bi to lahko pojasnilo njen obstoj v solinskem okolju (glej Preglednico 5), kar bi nekolikanj spremenilo podobo o prehranjevalnem spletu v solinah.

Določene seve (glej Preglednico 10) smo zaradi preverjanja ponovljivosti analizirali dvakrat in obakrat smo dobili identični profil. Na podlagi lastnih rezultatov lahko potrdimo ponovljivost analize, o čemer so poročali tudi drugi (De Muro in sod., 2003; 2005; Savelkoul, 1999; Vos in sod., 1995).

Za podrobnejše študije polimorfizma bi bilo potrebno opraviti analizo AFLP z drugimi kombinacijami restrikcijskih encimov in oligonukleotidnih začetnikov. Za izbrano kombinacijo restrikcijskih endonukleaz in oligonukleotidnih začetnikov smo se odločili na podlagi AFLP analiz opravljenih v okviru katedre za Biologijo mikroorganizmov, pri katerih se je izbrana kombinacija izkazala za najuspešnejšo.

## 5.2 SKLEPI

- Iz črevesja žrtvovanih neokuženih metuljev nismo uspeli izolirati gliv.
- Iz 22 kadavrov smo izolirali 25 sevov, ki so se na podlagi makromorfologije združevali v sedem skupin, smo jih na podlagi makro- in mikromorfologije prepoznali kot pripadnike treh vrst, in sicer *Beauveria bassiana*, *Lecanicillium fusisporum* in *Paecilomyces farinosus*. Na molekularnem nivoju smo potrdili le identifikacijo glive *B. bassiana*.
- Seve vrste *B. bassiana* smo najpogosteje izolirali iz kadavrov metuljev vrst *S. libatrix* in *T. dubitata* in gre za prvi opis izolacije te vrste glive iz teh dveh gostiteljev.
- Sevi izolirani iz kadavrov istih vrst (*S. libatrix* in *Troglophilus neglectus*) in vzorčenih v določeni jami (Apolonova jama, Pilanca in Tunel v Kozlovem robu) se večinoma združujejo oz. imajo identičen AFLP profil, profili sevov izoliranih iz *T. dubitata* (Zelške jame) pa so bolj variabilni.



## 6 POVZETEK

Entomopatogene glive so polifiletska skupina gliv, ki so v parazitskem odnosu do žuželk. Znanih je več kot 750 vrst, ki jih uvrščamo v več kot 100 rodov vseh večjih taksonomskih skupin z izjemo debla Basidiomycota. Gostitelja večinoma okužijo preko integumenta in se po prodoru razširijo po telesu. Po smrti gostitelja tvorijo nove infektivne oblike. V diplomskem delu smo izolirali in identificirali entomopatogene glive iz kadavrov troglofilnih metuljev *Scoliopteryx libatrix* in *Triphosa dubitata*, ki v jamskih habitatih hibernirata 8-10 mesecev. Vrsti imata izjemen ekološki pomen, saj se v stadiju ličinke prehranjujeta z gospodarsko pomembnimi rastlinami (npr. topol), v stadiju odrasle živali pa v obliki žive biomase vnašata ogljik, dušik in druga hranila v oligotrofno jamsko okolje. Iz kadavrov smo z uporabo različnih gojišč (MEA, PDA in PCA) in pogojev gojenja osamili 22 sevov, ki so tvorili 7 različnih tipov kolonij. Seve smo opisali in identificirali na podlagi makromorfoloških in mikromorfoloških značilnosti kot pripadnike treh vrst: *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces farinosus* in *Lecanicillium fusisporum*. Seve smo shranili na genetsko stabilen način v mikrobiološki zbirko EX-F. Identifikacijo nekaterih sevov vrste *Beauveria bassiana* smo potrdili tudi z določitvijo in analizo zaporedja dela ITS1-5,8S rDNA-ITS2 regije DNA, ne pa tudi sevov vrst *Paecilomyces farinosus* in *Lecanicillium fusisporum*. Vrsto *Beauveria bassiana* smo osamili iz kadavrov obeh gostiteljev, vzorčenih v štirih jamah, vrsto *Paecilomyces farinosus* iz kadavrov obeh gostiteljev vzorčenih v treh jamah in vrsto *Lecanicillium fusisporum* iz kadavra vrste *Triphosa dubitata*, ki je bil sočasno okužen tudi z vrsto *Paecilomyces farinosus*. Najpogosteje zastopano vrsto je predstavljala *Beauveria bassiana*. Izolirane seve vrste *Beauveria bassiana* in seve iste vrste pridobljene iz Mikrobiološke zbirke Kemijskega inštituta smo analizirali z metodo AFLP, da bi ugotovili genetsko raznolikost med sevi osamljenimi iz jam in ostalimi sevi in morebitno povezavo med raznolikostjo in okoljem, od koder je bil sev izoliran. Ugotovili smo, da je med jamskimi izolati glive vrste *B. bassiana* malo polimorfizma, z izjemo seva izoliranega iz *S. libatrix* (Jama Školjka) in da sevi izolirani iz kadavrov istih vrst (*S. libatrix* in *Troglophilus neglectus*) in vzorčenih v določeni jami (Apolonova jama, Pilanca in Tunel v Kozlovem robu) kažejo manjšo stopnjo polimorfizma, kot sevi izolirani iz kadavrov vrste *T. dubitata* (Zelške jame).

## 7 VIRI

- Aden E. 2005. Adaptation to darkness. V: Encyclopedia of caves. Culver D.C., White W.B. (eds.). New York, Elsevier Academic Press: 1-3
- Andersen S.O. 1979. Biochemistry of insect cuticle. Annual Review of Entomology, 24: 29-61.
- Andersen S.O. 1985. Sclerotization and tanning of the cuticle. V: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology. Vol. 3. Kerkut G.A., Gilbert G.I. (eds.). Oxford, Pergamon Press: 59-74
- Becnel J.J., Andreadis T.G. 1999. Microsporidia of insects. V: The microsporidia and microsporidiosis. Wittner M., Weiss L.M. (eds.). Washington DC, ASM Press: 447-501
- Benoit J.B., Yoder J.A., Zettler L.W., Hobbs H.H. 2004. Mycoflora of a troglonec cave cricket, *Hadenoeus cumberlandicus* (Orthoptera: Rhaphidophoridae), from two small caves in northeastern Kentucky. Annals of the Entomological Society of America, 97, 5: 989-993
- Boucias D.G., Pendland J.C., Latge J.P. 1988. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. Applied and Environmental microbiology, 54, 7: 1795-1805
- Bouvet Y., Turquin M.J., Bornard C., Desvignes S., Notteghem P. 1974. Quelques aspects de l'écologie et de la biologie de *Triphosa* et *Scoliopteryx* lépidoptères cavernicoles. Annales de Speleologie, 29, 2: 229-236
- Camassa M.M. 2004. Food resources. V: Encyclopedia of caves and karst science. Gunn J. (ed.). New York, Fitzroy Dearborn: 365-368

- Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews*, 73: 203-266
- Chandler D. 2005. Understanding the evolution and function of entomopathogenic fungi. Wellesbourne, University of Warwick, [http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/whri/research/entomopathogenicfungi\\_](http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/whri/research/entomopathogenicfungi_) (8.9.2005): 9 str.
- Chapman P. 1993. Caves and cave life. New York, Harper Collins: 124-149 (*The New Naturalist*; 79)
- Cooke R.C., Whipps J.M. 1993. *Ecophysiology of fungi*. Oxford, Blackwell Scientific Publications: 261-272
- Dunlap C.A., Biresaw G., Jackson M.A. 2005. Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46, 4: 261-266
- Dvořák L. 2000. Poznámky k přezimování motýlů v podzemních úkrytech v oblasti Šumavy a v západních Čechách. *Silva Gabreta*, 5: 1-14
- Emly D.W. 1982. *The butterflies and moths of Keele University*. Keele, Keele University Library: 26 str.
- Ewald P.W. 1994. *Evolution of infectious disease*. Oxford, Oxford University Press: 320 str.
- Ferron P., Fargues J., Riba G. 1991. *Fungi as microbial insecticides*. V: *Handbook of applied mycology*. Vol.2: Humans, animals and insects. Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G. (eds.). New York, Marcel Dekker: 665-706

- Galloway L.D., Burges R. 1952. Applied mycology and bacteriology. London, Leonard Hill: 54-57
- Gams I. 2004. Kras v Sloveniji v prostoru in času. 2. izd. Ljubljana, Založba ZRC, ZRC SAZU: 515 str.
- Gasparo F. 1998. La Fauna delle grotte e delle acque carsiche Sotterranee della Venezia Giulia, Stato delle ricerche e check list delle specie cavernicole. Atti e Memorie della Commissione Grotte »E. Boegan«, 32: 17-42
- Gerrits van den Ende A.H.G, de Hoog G.S. 1999. Variability and molecular diagnostics of the neurotropic species *Cladophialophora bantiana*. Studies in Mycology, 43: 151–162
- Glare T.R., Milner R.J. 1991. Ecology of entomopathogenic fungi. V: Handbook of applied mycology. Vol.2: Humans, animals and insects. Arora D.K., Ajello L. Mukerji K.G. (eds.). New York, Marcel Dekker: 547-612
- Gunde-Cimerman N., Zalar P., Jeram S. 1998 Mycoflora of cave cricket *Troglophilus neglectus* cadavers. Mycopathologia, 141, 2: 111-114
- de Hoog G.S. 1972. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. Studies in Mycology, 1: 1-14
- Humber R.A. 1998. Entomopathogenic fungal identification. V: APS/ESA Joint Annual Meeting, Las Vegas, NV, 8-12. november 1998. Entomopathogenic fungal identification.  
<http://arsef.fpsnl.cornell.edu/mycology/corner/APSwkshp.pdf> (7.11.1998): 26 str.
- Ihara F. 2007. Entomopathogenic fungi database (EFDB). Tsukuba, National Institute of Fruit Tree Science  
<http://www.fruit.affrc.go.jp/kajunoheya/epfdb/Ebun/Eindex.htm> (24.8.2007)

- Kanauchi A., Fukatsu T. 1999. Light-induced fruit body formation of an entomogenous fungus *Paecilomyces tenuipes*. *Mycoscience*, 40, 40: 349-351
- Katalog mikrobiološke zbirke - MZKI. 2002. 2. izd. Ljubljana, Kemijski inštitut – MZKI: 56 str.
- Keeling P.J., Luker M.A., Palmer J.D. 2000. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 23-31
- Khachatourians G.G. 1991. Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. V: *Handbook of applied mycology. Vol.2: Humans, animals and insects.* Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G. (eds.). New York, Marcel Dekker: 613-661
- Klimchouk A. 2004. Speleogenesis. V: *Encyclopedia of caves and karst science.* Gunn J. (ed.). New York, Fitzroy Dearborn: 666-668
- Kubátová A., Dvořák L. 2005. Entomopathogenic fungi associated with insect hibernating in underground shelters. *Czech Mycology*, 57, 3-4: 221-237
- Latgé J.P., Sampedro L., Brey P., Diaquin M. 1987. Aggressiveness of *Conidiobolus obscurus* against the pea aphid. Influence of cuticular compounds on spore germination. *Journal of General Microbiology*, 133: 1987-1997
- Locke M. 1960. The cuticle and wax secretion in *Calpodex ethlius* (Lepidoptera, Hesperidae). *Quarterly Journal of Microscopical Science*, s3-101: 333-338
- Livolant F., Giraud M.M., Bouligand Y. 1978. A goniometric effect observed in secretions of twisted fibrous material. *Biology of the Cell*, 31: 159-168

- Martignoni M.E., Iwai P.J., Wickerham L.J. 1969. A candidiasis in larvae of the Douglas-fir tussock moth, *Hemerocampa pseudotsugata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14: 108-110
- Matočec N., Ozimec R. 2001. Observation on *Cordyceps rivierae* (Hypocreales, Ascomycota) in Croatian caves. *Natura Croatica*, 10, 3: 197-206
- de Muro M.A., Elliott S., Moore D., Parker B., Skinner M., Reid W., El Bouhssini M. 2005. Molecular characterization of *Beauveria bassiana* isolates obtained from overwintering sites of sunn pests (*Eurygaster* and *Aelia* species). *Mycological Research*, 109, 3: 294-306
- de Muro M.A., Mehta S., Moore D. 2003. The use of amplified fragment length polymorphism for molecular analysis of *Beauveria bassiana* isolates from Kenya and other countries, and their correlation with host and geographical origin. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 249-257
- NCBI - National Center for Biotechnology Information. 2007. Basic local alignment search tool (BLAST). Bethesda, National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> (3.6.2007): 1 stran
- Nieves-Riviera A.M. 2003. Mycological survey of Rio Camuy caves park. *Journal of Cave and Karst Studies*, 65, 1:23-28
- Pacioni G. 1978. Un nuovo ascomicete entomogeno rinvenuto in grotta: *Cordyceps rivierae*. *Giornal Botanica Italiana*, 112: 395-398
- Page R.D.M. 2000. Treeview software. Glasgow, University of Glasgow, Institute of Biomedical and Life Sciences, Division of Environmental and Evolutionary Biology <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> (31.6.2001): software

- Paris S., Ferron P. 1979. Study of the virulence of some mutants of *Beauveria brongniartii* (= *B. tenella*). *Journal of Invertebrate pathology*, 34: 71-77
- Pavliček A., Hrda S., Flegr J. 1999. FreeTre - freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and for bootstrap/jackknife analysis of the trees robustness. Application in the RAPD analysis of genus *Frenkelia*. *Folia Biologica*, 45: 97-99
- Pedras M.S.C., Zaharia L.I., Ward D.E. 2002. The destruxins: synthesis, biotransformation and biological activity. *Phytochemistry*, 59: 579-596
- Radišek, S., Jakše, J., Javornik, B. 2001. Optimisation of amplified fragment polymorphism (AFLP) analysis of hop wilt (*Verticillium alboatrum* and *Verticillium dahliae*). *Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani. Kmetijstvo*, 77, 2: 136-146
- Radišek S., Jakše J., Simončič A., Javornik B. 2003. Characterization of *Verticillium alboatrum* field isolates using pathogenicity data and AFLP analysis. *Plant Disease*, 87: 633-638
- Ramel G.J.L. 2007. Introduction to insect anatomy: What makes an insect an insect???. *Earth-life Web*.  
<http://www.earthlife.net/insects/anatomy.html> (27.2.2007): 1 str.
- Raper C.A., Raper J.R., Miller R.E. 1972. Genetic analysis of the life cycle of *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 64: 1088-1117
- Raper K.B., Thom C. 1949. *A manual of the Penicillia*. Baltimore, Wilkins and Wilkins: 875 str.
- Roberts D.W., Hajek A.E. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides. V: *Frontiers in industrial microbiology*. Leatham G.F. (ed.). London, Chapman & Hall: 144-159

- Rombach M.C., Samson R.A. 1983. Insektenshimmels uit Limburgse kalkgrotten. *Natuurhistorisch Maandblad*, 72, 3: 45-49
- Rosa C.A., Morais P.B., Hagler A.N., Mendonça-Hagler L.C., Monteiro R.F. 1994. Yeast communities of the cactus *Pilosocereus arrabidaei* and associated insects in the Sandy Coastal Plains of Southeastern Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 65: 55-62
- Rosa C.A., Norton Hagler A., Mendonça-Hagler L.C.S., Benevides de Morais P., Gomes N.C.M., Monteiro R.F. 1992. *Clavispora opuntiae* and other yeasts associated with the moth *Sigalgaita* sp. in the cactus *Pilosocereus arrabidaei* of Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 62: 267-272
- Rosenthal S.A., Furnari D. 1958. Slide agglutination as a presumptive test in the laboratory diagnosis of *Candida albicans*. *Journal of Investigational Dermatology*, 31: 251-253
- Saito T., Aoki J. 1983. Toxicity of free fatty acids on the larval surface of two lepidopterous insects towards *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Paecilomyces fumosoroseus* (Wize) Brown et Smith (Deuteromycetes: Moniliales). *Applied Entomology and Zoology*, 18: 225-233.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor: 854 str.
- Samson R.A. 1974. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. *Studies in Mycology*, 6: 1-74
- Samson R.A., Evans H.C., Latge J.P. (eds.). 1988 *Atlas of entomopathogenic fungi*. Berlin/Heidelberg/New York/London/Paris/Tokyo, Springer-Verlag: 187 str.



- Samson R.A., Rombach M.C., Seifert K.A. 1984. *Hirsutella guignardii* and *Stilbella kervillei*, two troglobiotic entomopathogenous hyphomycetes. *Persoonia*, 12, 2: 123-134
- Sanchez-Murillo R.I., de la Torre-Martínez M., Aguirre-Linares J., Herrera-Estrella A. 2004. Light-regulated asexual reproduction in *Paecilomyces fumosoroseus*. *Microbiology*, 150: 311-319
- Savelkoul P.H.M., Aarts H.J.M., de Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L.W., Schouls L., Lenstra J.A. 1999. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 10: 3083-3091
- Shah P.A., Pell J.K. 2003 Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiological Biotechnology*, 61: 413-423
- Silvonen K. 1993. *Triphosa dubitata* (May, 1993). Helsinki, Helsinki University of Technology, Circuit Theory Laboratory.  
<http://kimmos.freeshell.org/Inel/g11/Tridubit.htm> (8.6.1993): 1 str.
- Smith R.J., Grula E.A. 1982. Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 335-344
- Sonjak S., Frisvad J.C., Gunde-Cimerman N. 2007. Genetic variation among *Penicillium crustosum* isolates from Arctic and other ecological niches. *Microbial Ecology*, 54: 298-305
- Stone F.D., Howarth F.G., Hoch H., Asche M. 2005. Root communities in lava tubes. V: *Encyclopedia of caves*. Culver D.C., White W.B. (eds.). New York, Elsevier Academic Press: 477-484

Stemmer M. 2004a. Eulen (Noctuidae) 2 (02.05.2004). Vienna, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Institute of Soil Science, Department of Forrester and Soil Science.

<http://www.peppix.de/productssimple48.html> (June 2007): 1 str.

Stemmer M. 2004b. Spanner (Geometridae) 8 (02.05.2004). Vienna, University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Institute of Soil Science, Department of Forrester and Soil Science

<http://www.peppix.de/productssimple57.html> (November 2006): 1 str.

The Oxoid Manual. 1995. 7<sup>th</sup> edi. Barcelona, UNIPATH: 389 str.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882

Turquin M.J. 1996. Lepidoptera. V: *Encyclopaedia biospeleologica*. Juberthie C., Decu V. (eds.). Moulis-Bukarešta, Societe de Biospeleologie: 333-339

Van der Plaats-Niterink A.J. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Baarn, Centraalbureau voor Schimmelcultures: 242 str.

Van der Walt J.P. 1959. *Endomycopsis wickerhamii* nov. spec., a new heterothallic yeast. *Antonie van Leeuwenhoek*, 27: 362-366

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research*, 23, 21: 4407-4414

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. V: *PCR protocols: A guide to methods*

and applications. Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.). London, Academic Press: 315-322

White W.B., Culver D.C. 2005 Cave, definition of. V: Encyclopedia of caves. Culver D.C., White W.B. (eds.). New York, Elsevier Academic Press: 81-85

Zalar P., Gunde-Cimerman N. 2002. Taksonomija in identifikacija gliv. Ljubljana, Scripta, Študentska založba: 11-13

## ZAHVALA

Iskrena hvala vsem, ki ste z mano in ob meni.



