

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja ŽELKO

**PROUČEVANJE PROTIBAKTERIJSKEGA UČINKA EKSTRAKTOV  
GLIV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**STUDYING ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MUSHROOM  
EXTRACTS**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Institutu Jožef Stefan, Odseku za biotehnologijo in Nacionalnem inštitutu za biologijo, Oddelku za biotehnologijo in sistemsko biologijo, v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Ravnikar, za recenzenta pa prof. dr. Ines Mandić-Mulec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Marina DERMASTIA  
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Mentor: prof. dr. Maja RAVNIKAR  
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Član: prof. dr. Ines MANDIĆ-MULEC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je diplomska naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Datum zagovora:

Diplomska naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Mateja Želko

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	579:581.2:582.28(043.2)=163.6
KG	glive prostotrosnice/proteini/protibakterijske snovi/ <i>Erwinia amylovora</i> /bakterijske bolezni rastlin
KK	
AV	ŽELKO, Mateja
SA	RAVNIKAR, Maja
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	PREUČEVANJE PROTIBAKTERIJSKEGA UČINKA EKSTRAKTOV GLIV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 100 str., 10 pregl., 42 sl., 6 pril., 115 vir.
IJ	sl.
JI	sl./en.
AI	Bakterijske bolezni rastlin povzročajo precejšnje gospodarsko škodo in jih z obstoječimi fitofarmaceutskimi sredstvi ni mogoče učinkovito zatirati. Iskanje novih virusov protibakterijskih učinkovin z novimi mehanizmi učinkovanja je zato bistvenega pomena za varstvo rastlin. Proučili smo delovanje proteinskih ekstraktov različnih vrst gliv iz debla <i>Basidiomycota</i> (prostotrosnice) proti bakterijam, ki povzročajo gospodarsko pomembne bolezni rastlin: <i>Erwinia amylovora</i> (bakterijski hrušev ožig), <i>Erwinia chrysanthemi</i> (gnitje mnogih rastlin) in <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> (bakterijska pegavost paradižnika in paprike). Preverjali smo vpliv ekstraktov na rast bakterij ( <i>in vitro</i> ) ter njihov vpliv na izražanje bolezenskih znamenj v <i>in vivo</i> pogojih. Pri <i>in vitro</i> testih smo spremljali kinetiko rasti bakterij z merjenjem optične gostote v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči, v prisotnosti in brez ekstraktov gliv. Z optimiziranim postopkom, ki je omogočal primerno rast izbranih bakterij, smo ugotovili protibakterijsko delovanje na vsaj eno od testiranih bakterij pri devetih od sedeminsedemdesetih proteinskih ekstraktih, pripravljenih iz devetinšestdeset različnih vrst prostotrosnih gliv. Rast <i>E. amylovora</i> so zavirali le prečiščeni, skoncentrirani proteinazni inhibitorji in sicer tripsinski in papainski inhibitor iz meglenke <i>Clitocybe nebularis</i> ter papainski inhibitor iz krompirja. Rast <i>E. chrysanthemi</i> in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> so zavirali proteinski ekstrakti iz gob <i>Amanita phalloides</i> , <i>Bovista nigrescens</i> , <i>Tricholoma saponaceum</i> in <i>Clitocybe geotropa</i> . Ekstrakta iz <i>Boletus calopus</i> in <i>Cortinarius</i> sp. sta zavirala rast le <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . Ekstrakti so vplivali na izražanje bolezenskih znamenj v <i>in vivo</i> testih patogenosti na nezrelih hruškah okuženih z <i>E. amylovora</i> , posebej na hitrost razvoja nekroz in količine bakterijskega izcedka. Vpliv ekstraktov v <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> testih ni vedno koreliral, kar kaže na nujnost uporabe obeh pristopov v iskanju novih protibakterijskih učinkovin.

## KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

- DN Dn
- DC 579:581.2:582.28(043.2)=163.6
- CX basidiomycete fungi/proteins/antibacterial agents/*Erwinia amylovora*/bacterial plant diseases
- CC
- AU ŽELKO, Mateja
- AA RAVNIKAR, Maja
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2010
- TI STUDYING ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MUSHROOM EXTRACTS
- TD Graduation Thesis (University studies)
- OP XIII, 100 p., 10 tab., 42 fig., 6 ann., 115 ref.
- LA sl.
- AL sl./en.
- AB Bacterial plant diseases cause significant economic losses and cannot be effectively managed by phytochemicals. Finding new sources of antibacterial agents with novel mechanisms of action is therefore crucial for plant protection. We examined the antibacterial action of protein extracts of various basidiomycete fungi (mushrooms) against bacteria that cause economically important diseases of plants: *Erwinia amylovora* (fire blight), *Erwinia chrysanthemi* (soft rots in many plants) and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (bacterial spot of tomatoes and peppers). We tested the effect of extracts on the growth of bacteria (*in vitro*) and their effect on the expression of disease symptoms *in vivo*. We followed bacterial growth in *in vitro* tests in microplate format, by monitoring optical density of the liquid medium in the presence and without the mushroom extracts. With the optimized procedure, which allowed adequate growth of selected bacteria, antibacterial action was found against at least one of the tested bacteria in nine from seventy-seven protein extracts prepared from sixty-nine different species of mushrooms. Growth of *E. amylovora* was inhibited only by purified, concentrated proteinase inhibitors, namely trypsin and papain inhibitors from *Clitocybe nebularis* and papain inhibitor from potato. Growth of *E. chrysanthemi* and *X. campestris* pv. *vesicatoria* was inhibited by protein extracts from *Amanita phalloides*, *Bovista nigrescens*, *Tricholoma saponaceum* and *Clitocybe geotropa*. Extracts of *Boletus calopus* and *Cortinarius* sp. inhibited growth of *X. campestris* pv. *vesicatoria* only. Protein extracts affected the expression of symptoms in *in vivo* pathogenicity tests on immature pears infected with *E. amylovora*, especially in the rate of necrosis and quantities of bacterial ooze. Effect of extracts *in vitro* and *in vivo* tests were not always correlated, which indicates that both approaches are necessary and valuable in the search of new antibacterial agents.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI) .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>IX</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>XII</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN .....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 GLIVE PROSTOTROSNICE .....	3
<b>2.1.1 Protibakterijske učinkovine gliv .....</b>	<b>5</b>
2.2 <i>In vitro</i> METODE DOLOČANJA PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA SNOVI.....	6
2.3 <i>In vivo</i> DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA SNOVI.....	9
2.4 FITOPATOGENE BAKTERIJE, NJIHOVO DOLOČANJE IN KONTROLA.....	9
2.4.1 <i>Erwinia amylovora</i> .....	9
2.4.2 <i>Erwinia chrysanthemi</i> .....	11
2.4.3 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> .....	12
2.4.4 Diagnostične metode potrjevanja okužb .....	13
2.4.5 Zatiranje bakterijskih bolezni rastlin .....	14
2.5 POMEN PROTEINOV V OBRAMBNIH MEHANIZMIH RASTLIN IN MOŽNOSTI UPORABE PRI ZATIRANJU BOLEZNI .....	16
2.6 PROTEINAZE .....	18
2.6.1 Cisteinske proteinaze .....	21
2.6.2 Bakterijske proteinaze .....	21
2.7 PROTEINSKI PROTEINAZNI INHIBITORJI.....	22
2.7.1 Rastlinski proteinski proteinazni inhibitorji .....	23
2.7.2 Glivni proteinski proteinazni inhibitorji.....	25
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>27</b>
3.1 EKSTRAKTI GLIV .....	27
3.1.1 Priprava proteinskih ekstraktov gliv.....	27
3.1.2 Določanje koncentracije proteinov po metodi Bradford .....	28

3.1.3	<b>Priprava ekstraktov za preučevanje njihovega vpliva na rast in patogenost bakterij</b> .....	29
3.1.4	<b>Druge testirane snovi</b> .....	29
3.2	<b>GOJENJE BAKTERIJ</b> .....	30
3.2.1	<b>Bakterije, gojišča in pufri</b> .....	30
3.2.2	<b>Določanje koncentracije bakterij po McFarlandu in s štetjem kolonij na trdnem gojišču</b> .....	32
3.2.3	<b>Spektrofotometrično spremljanje rasti bakterij</b> .....	34
3.3	<b>VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA RAST BAKTERIJ</b> .....	36
3.3.1	<b>Spektrofotometrično spremljanje rasti bakterij v prisotnosti ekstraktov gliv</b> .....	36
3.4	<b>VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA PATOGENOST BAKTERIJ</b> .....	37
3.4.1	<b>Testi patogenosti <i>E. amylovora</i> v prisotnosti ekstraktov gliv</b> .....	37
3.4.2	<b>Testi patogenosti <i>E. chrysanthemi</i> v prisotnosti ekstraktov gliv</b> .....	39
4	<b>REZULTATI</b> .....	41
4.1	<b>EKSTRAKTI GLIV</b> .....	41
4.1.1	<b>Koncentracija proteinov ekstraktov gliv</b> .....	41
4.2	<b>PREVERJANJE METODE SPREMLJANJA RASTI BAKTERIJ Z MERJENJEM OPTIČNE GOSTOTE</b> .....	42
4.2.1	<b>McFarland, ponovljivost meritev na kontroli</b> .....	43
4.2.2	<b>OD ekstraktov gliv in njihova sterilnost</b> .....	43
4.2.3	<b>Kontrole z antibiotikom</b> .....	44
4.2.4	<b>Spektrofotometrično spremljanje rasti bakterij</b> .....	46
4.3	<b>VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA RAST BAKTERIJ</b> .....	51
4.3.1	<b>Vpliv ekstraktov gliv na rast bakterije <i>Erwinia amylovora</i></b> .....	51
4.3.2	<b>Vpliv ekstraktov gliv na rast bakterije <i>Erwinia chrysanthemi</i></b> .....	56
4.3.3	<b>Vpliv ekstraktov gliv na rast bakterije <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i></b> .....	59
4.3.4	<b>Skupni rezultati, povzetek</b> .....	63
4.4	<b>VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA PATOGENOST BAKTERIJ</b> .....	68
4.4.1	<b>Vpliv ekstraktov gliv na bolezenska znamenja v testu patogenosti bakterije <i>Erwinia amylovora</i></b> .....	68
4.4.2	<b>Vpliv ekstraktov gliv na bolezenska znamenja v testu patogenosti bakterije <i>Erwinia chrysanthemi</i></b> .....	74
5	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	79
5.1	<b>RAZPRAVA</b> .....	79
5.2	<b>SKLEPI</b> .....	87

<b>6</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>90</b>
	<b>ZAHVALA</b> .....	<b>100</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razvrstitev proteinaz glede na mehanizem katalize (Rawlings in Barrett, 1993).....	19
Preglednica 2: Priprava raztopin za določanje koncentracije bakterij po McFarlandu .....	33
Preglednica 3: Shema testiranja ekstraktov gliv na polovicah hrušk po serijah.....	38
Preglednica 4: Shema testiranja ekstraktov gliv na rezinah krompirja po serijah.....	40
Preglednica 5: Lestvica za vrednotenje vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij <i>E. amylovora</i> , <i>E. chrysanthemi</i> in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> v tekočem KB gojišču.....	64
Preglednica 6: Vpliv ekstraktov gliv na rast bakterij <i>E. amylovora</i> , <i>E. chrysanthemi</i> in <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> . .....	65
Preglednica 7: Lestvica za vrednotenje blozenskega znamenja – izcedka pri nezrelih hruškah okuženih z <i>E. amylovora</i> in ekstrakti gliv. ....	69
Preglednica 8: Lestvica za vrednotenje blozenskega znamenja – nekroze pri nezrelih hruškah okuženih z <i>E. amylovora</i> in ekstrakti gliv. ....	69
Preglednica 9: Razvoj bolezenskih znamenj (izcedek, količina izcedka – vbodi, nekroza) pri nezrelih hruškah okuženih z <i>E. amylovora</i> in ekstrakti gliv, pozitivno in negativno kontrolo z antibiotikom, drugi, tretji in peti dan po inokulaciji glede na oblikovane lestvice ocene bolezenskih znamenj izcedka in nekroze. ....	71
Preglednica 10: Utežni delež nekroze rezin gomoljev krompirja okuženih z <i>E. chrysanthemi</i> in ekstrakti gliv.. ....	75



## KAZALO SLIK

Slika 1: Osnovne morfološke značilnosti gobe (Arzenšek, 2002).....	4
Slika 2: Shema kemijske signalizacije med rastlino in patogenom (purves in sod., 2001).	17
Slika 3: Razdelitev proteinaz po NC-IUBMB (NC-IUBMB, 2007). .....	20
Slika 4: Umeritvena krivulja proteinskega standarda na podlagi katere smo določili koncentracijo proteinov ekstraktov gliv. ....	28
Slika 5: Primer umeritvene krivulje McFarland standardov s pomočjo katere izračunano koncentracijo bakterij v suspenziji. ....	33
Slika 6: Shema pipetiranja na mikrotitrsko ploščo za preliminarno preverjanje rasti bakterij. ....	35
Slika 7: Shema pipetiranja na mikrotitrsko ploščo za spremljanje rasti bakterij v prisotnosti ekstraktov gliv. ....	36
Slika 8: Načrt nanosa posameznega inokuluma na polovico hruške v štiri paralelne vbode	38
Slika 9: Načrt nanosa posameznega inokuluma na rezino krompirja.....	39
Slika 10: Koncentracija proteinov ekstraktov gliv (metoda po Bradfordu, Bio-Rad kit) najpogosteje zastopanih rodov.....	42
Slika 11: Povprečne vrednosti optične gostote posameznih suspenzij lestvice po McFarlandu ( $9 \times 10^8$ cfu/ml itd.) pri 595 nm .....	43
Slika 12: Primerjava krivulj ekstraktov gliv od oznake 1 do 30 (Priloga C) s krivuljami rasti <i>E. amylovora</i> – pozitivno kontrolo (PK) in kontrolo s streptomycin sulfatom (Ks) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).....	44
Slika 13: Rast bakterije <i>E. amylovora</i> z začetno koncentracijo $10^5$ cfu/ml v prisotnosti antibiotika streptomycin sulfata (kontrola s streptomycin sulfatom, Ks; založna koncentracija 10mg/ml, končna koncentracija 50 µg/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	45
Slika 14: Rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> z začetno koncentracijo $10^5$ cfu/ml v prisotnosti antibiotika streptomycin sulfata (kontrola s streptomycin sulfatom, Ks; založna koncentracija 10mg/ml, končna koncentracija 50 µg/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) ..	45
Slika 15: Rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> z začetno koncentracijo $10^5$ cfu/ml v prisotnosti antibiotika streptomycin sulfata (kontrola s streptomycin sulfatom, Ks; založna	

koncentracija 10mg/ml, končna koncentracija 50 µg/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	46
Slika 16: Rast bakterije <i>E. amylovora</i> v tekočem gojišču KB (20 h (čez noč) v hladilniku; nato 25°C, 400 obr./min) glede na različno začetno koncentracijo.....	47
Slika 17: Rast bakterije <i>E. amylovora</i> z začetno koncentracijo 10 <sup>5</sup> cfu/ml v tekočem gojišču KB .....	47
Slika 18: Rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> v tekočem gojišču Kb (20 h (čez noč) v hladilniku; nato 25°C, 400 obr./min) glede na različno začetno koncentracijo .....	48
Slika 19: Rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> z začetno koncentracijo 10 <sup>5</sup> cfu/ml v tekočem gojišču KB. ....	48
Slika 20: Rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> v tekočem gojišču KB (20 h (čez noč) v hladilniku; nato 25°C, 400 obr./min) glede na različno začetno koncentracijo .....	49
Slika 21: Rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> z začetno koncentracijo 10 <sup>5</sup> cfu/ml v tekočem gojišču KB. ....	49
Slika 22: Vpliv ekstraktov gliv (1-14, Priloga C) na rast bakterije <i>E. amylovora</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). ....	52
Slika 23: Vpliv ekstraktov gliv (15-30, Priloga C) na rast bakterije <i>E. amylovora</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). ....	53
Slika 24: Vpliv ekstraktov gliv (31-45, Priloga C) na rast bakterije <i>E. amylovora</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	53
Slika 25: Vpliv ekstraktov gliv (46-61, Priloga C) na rast bakterije <i>E. amylovora</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). ....	54
Slika 26: Vpliv ekstraktov gliv (62-h, Priloga C) na rast bakterije <i>E. amylovora</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). ....	54
Slika 27: Vpliv ekstraktov gliv 7, 10, 27, D, G in H (Priloga C) na rast bakterije <i>E. amylovora</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). ....	55
Slika 28: Vpliv ekstraktov gliv (1-14, Priloga C) na rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	56
Slika 29: Vpliv ekstraktov gliv (15-30, Priloga C) na rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). ....	57
Slika 30: Vpliv ekstraktov gliv (31-45, Priloga C) na rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> (10 <sup>5</sup> cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	57

Slika 31: Vpliv ekstraktov gliv (46-61, Priloga C) na rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	58
Slika 32: Vpliv ekstraktov gliv (62-h, Priloga C) na rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	58
Slika 33: Vpliv ekstraktov gliv 7, 10, 11, 58, G27, D in G (Priloga C) na rast bakterije <i>E. chrysanthemi</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).....	59
Slika 34: Vpliv ekstraktov gliv (1-14, Priloga C) na rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).....	60
Slika 35: Vpliv ekstraktov gliv (15-30, Priloga C) na rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).....	61
Slika 36: Vpliv ekstraktov gliv (31-45, Priloga C) na rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).....	61
Slika 37: Vpliv ekstraktov gliv (46-61, Priloga C) na rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).....	62
Slika 38: Vpliv ekstraktov gliv (62-h, Priloga C) na rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).....	62
Slika 39: Vpliv ekstraktov gliv 7, 10, 11, 18, 58 in G27 (Priloga C) na rast bakterije <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> ( $10^5$ cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min) .....	63
Slika 40: Dendrogram podobnosti v stopnji razvoja bolezenskih znamenj (izcedek, količina izcedka – vbodi, nekroza) pri nezrelah hruškah okuženih z <i>E. amylovora</i> in ekstrakti gliv, pozitivno in negativno kontrolo z antibiotikom, drugi, tretji in peti dan po inokulaciji. ....	72
Slika 41: Povprečni delež nekroze na rezinah gomoljev krompirja okuženih z <i>E. chrysanthemi</i> in ekstrakti gliv (vzorci), pozitivne kontrole (PK) in kontrole z antibiotikom streptomycin sulfatom (Ks). .....	77
Slika 42: Test patogenosti za <i>E. chrysanthemi</i> na rezini gomolja krompirja, okuženi z inokulumom bakterije in ekstraktom (9), drugi dan po inokulaciji. ....	77

## KAZALO PRILOG

Priloga A1: Sistematika uporabljenih vrst gliv prostotrosnic.

Priloga A2: Pripravljeni proteinski ekstrakti gliv z lokacijo in vrsto materiala.

Priloga B: Koncentracija proteinov v ekstraktih gliv določena z metodo po Bradfordu (Bio-Rad kit).

Priloga C: Uporabljeni proteinski ekstrakti gliv v *in vitro* in *in vivo* testih.

Priloga D: OD ekstraktov gliv: Primerjava krivulj ekstraktov gliv (Priloga C) s krivuljami rasti *E. amylovora* – pozitivno kontrolo (PK) in kontrolo s streptomycin sulfatom (Ks) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min).

Priloga E: Razvoj bolezenskih znamenj (izcedek, količina izcedka – vbodi, nekroza) pri nezrelih hruškah okuženih z *E. amylovora* in ekstrakti gliv, pozitivno in negativno kontrolo z antibiotikom, drugi, tretji in peti dan po inokulaciji glede na oblikovane lestvice ocene bolezenskih znamenj izcedka in nekroze (Preglednici 7 in 8). Stolpec vbodi: 0 (vsi vbodi prazni), 1 (en vbod poln), 2 (dva vboda polna), 3 (trije ali vsi vbodi polni).

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AU	angl. approximately unbiased
BP	angl. bootstrap probability
cfu/ml	število bakterij v mililitru iz katerih na ustreznem gojišču zrastejo kolonije (angl. colony forming unit per mililiter)
CP	cisteinska proteinaza (angl. cysteine proteinase)
CPI	cisteinski proteinazni inhibitor (angl. cysteine proteinase inhibitor)
CNSPI	angl. <i>Clitocybe nebularis</i> serine protease inhibitor
DNA	deoksiribonukleinska kislina, DNK (angl. deoxyribonucleic acid)
EC	encimska klasifikacijska številka (angl. enzyme classification)
ELISA	encimskoimunski test (angl. enzyme-linked immunosorbent assay)
EPPO	Evropska organizacija za varstvo rastlin (angl. European and Mediterranean Plant Protection Organization)
EUCAST	angl. European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
KB	gojišče King B
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimum inhibitory concentration)
NC-IUBMB	angl. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
NCPPB	angl. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Central Science Laboratory, York, Great Britain
OD <sub>595</sub>	optična gostota pri valovni dolžini 595 nm (angl. optical density)
PBS	fosfatni pufer z dodanim natrijevim kloridom (angl. phosphate buffer saline)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. pulsed-field gel-electrophoresis)
pH	negativni logaritem koncentracije vodikovih ionov
YPGA	agar s kvasnim ekstraktom, peptonom in glukozo (angl. yeast peptone glucose agar)

## 1 UVOD

Bakterijskih boleznih rastlin, ki povzročajo precejšnjo gospodarsko in ekonomsko škodo, z obstoječimi fitofarmaceutskimi sredstvi ni mogoče učinkovito in varno zatirati. Zaradi tega je nemalo pozornosti namenjene raziskavam snovi s protibakterijskim delovanjem, večinoma so le te rastlinskega izvora.

Med gospodarsko pomembnejšimi rastlinskimi patogenimi bakterijami je gram negativna, aerobna bakterija *Erwinia amylovora*, ki povzroča hrušev ožig številnih rastlinskih vrst iz družine rožnic *Rosaceae*; *Erwinia chrysanthemi*, ki povzroča mehko gnilobo številnih kulturnih (krompir, korenje, paradižnik, tobak...) in okrasnih rastlin (tulipani, krizanteme, begonije...) ter nekaterih vrst tropskega sadja ter *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, tudi gram negativna, aerobna bakterija, ki povzroča bakterijsko pegavost paradižnika (*Lycopersicon esculentum* L.) in paprike (*Capsicum annuum* L.) (OEPP/EPPO/CABI, 1997).

Rastline, četudi občutljive, so tekom evolucije razvile kompleksne zaščitne mehanizme za obrambo pred različnimi škodljivimi vplivi, mehanskimi poškodbami, patogenimi mikroorganizmi, žuželkami in drugimi škodljivci (Valueva in Mosolov, 2004; Abramovitch in Martin, 2004). Eden pomembnejših obrambnih mehanizmov so proteinaze in različne inhibitorne snovi, med njimi tudi inhibitorji proteinaz (Peumans in Van Damme, 1995; Dangl in Jones, 2001; Taiz in Zeiger, 2002; Agrios, 2005). Znano je protimikrobno delovanje snovi iz ekstraktov številnih rastlin (Burt, 2004). Med ekstrakti s protimikrobnim delovanjem iz drugih organizmov, poročajo tudi o ekstraktih nekaterih prostotrosnih gliv (Hirasawa in sod., 1999; Ishikawa in sod., 2001; Jonathan in Fasidi, 2003; Tambekar in sod., 2006; Turkoglu in sod., 2006, 2007a, 2007b; Jagadish in sod., 2008; Akyuz in Kirbag, 2009). Primer glivne protimikrobne snovi je klitocipin, stabilni cisteinski proteinazni inhibitor, izoliran iz micelija poprhnjene livke *Clytocybe nebularis* (Brzin in sod., 2000).

Različne glivne snovi s protibakterijskim učinkovanjem bi bile lahko uporabne pri nadaljnjih biotehnoloških raziskavah in zatiranju povzročiteljev bakterijskih boleznih rastlin.

## 1.1 NAMEN

Namen diplomske naloge je bil ugotoviti ali imajo proteinski ekstrakti različnih vrst prostotrosnih gliv (v nadaljevanju glivni ekstrakti oz. ekstrakti) protibakterijske učinke proti izbranim bakterijam, ki povzročajo bolezni rastlin: *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi* in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Preverjali smo vpliv ekstraktov tako na rast bakterij kot tudi njihov vpliv na izražanje bolezenskih znamenj v *in vivo* pogojih. Preverili smo ustreznost spremljanja optične gostote bakterij, uveljavljene metode za ugotavljanje *in vitro* protibakterijskega učinkovanja snovi, za izbrane bakterije ter metodo optimizirali. Z analizo rastnih krivulj bakterijske kulture z in brez glivnih ekstraktov, smo ugotovili vpliv ekstraktov na rast bakterij. Vpliv ekstraktov na izražanje bolezenskih znamenj rastlin smo preverili *in vivo*, v testih patogenosti za bakterijo *E. amylovora* in *E. chrysanthemi*.

Glede na literaturo in predhodno opravljene teste, predvidevamo, da bomo med različnimi proteinskimi ekstrakti prostotrosnih gliv našli takšne s protibakterijskim delovanjem, ki bodo vplivali na rast in/ali na patogenost izbranih bakterij. Pri tem pričakujemo bodisi zmanjšanje, bodisi povečanje rasti bakterij, slednje predvsem zaradi proteinske narave glivnih ekstraktov, saj lahko delujejo kot stimulatorji rasti ali kot dodaten vir hranil za bakterije. Razvita presejalna metodologija ugotavljanja protibakterijskih učinkov glivnih ekstraktov bo uporabna tudi pri testiranju drugih protimikrobnih snovi. Rezultati presejalnega testa protibakterijskega učinkovanja različnih glivnih ekstraktov bodo osnova za nadaljnje podrobnejše raziskave.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 GLIVE PROSTOTROSNIČE

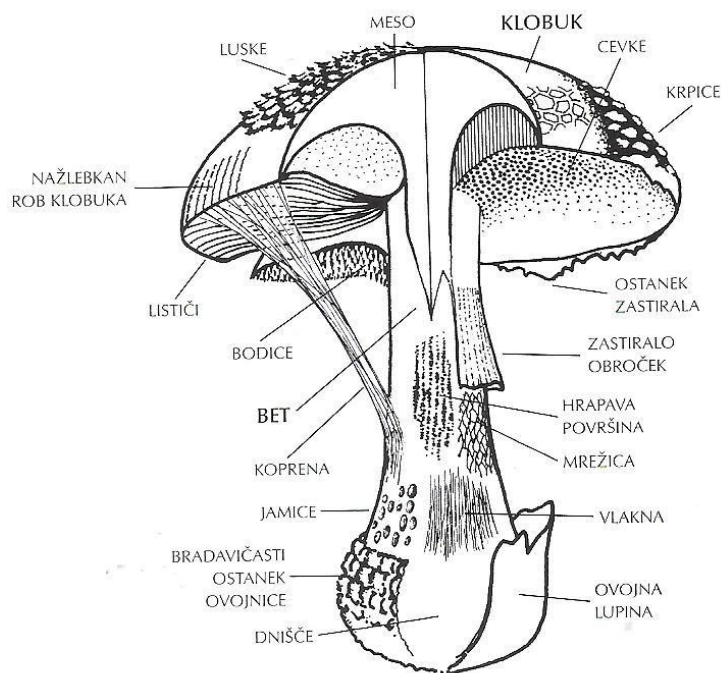
Glive predstavljajo eno izmed štirih kraljestev znotraj domene *Eucarya* (Woese, 1990), najdemo jih v vseh ekosistemih. Od preostalih evkariontov se na edinstven način razlikujejo v strukturi organiziranosti, načinu prehranjevanja, rasti in razmnoževanju. Na podlagi molekularne filogenetike delijo mikologi glive na sedem debel: *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, *Blastocladiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Glomeromycota*, *Ascomycota* in *Basidiomycota* (Hibbett in sod., 2007). Prostotrosniče ali *Basidiomycota*, kamor spadajo tudi v diplomskem delu uporabljene glive, so samostojna skupina gliv, ki so med glivami dosegle največjo kompleksnost tako v zgradbi hif in plodišč, kot v strukturi razvojnega kroga.

Celice gliv so obdane s celično steno, katere osnovne gradbene enote so, z izjemo nekaterih vrst, hitin ( $\beta$ -1,4 homopolimer N-acetilglukozamina v kristaliničnem stanju) in glukani ( $\alpha$ -1,3 in  $\beta$ -1,6 vezi). Celice gliv so brez plastidov, klorofila in tipičnega Golgijevega aparata, pogosto pa je razvit lomasom, vezikularna struktura, ki sodeluje pri sekreciji in nastanku glivne celične stene. Vakuole se pojavljajo le v starejših celicah. Jedro vsebuje razmeroma malo DNA, kromosomov je malo (3-15) in med mitozo se le-ti ne skrčijo. Vegetativno obliko večine gliv - z izjemo enoceličnih kvasovk - sestavljajo nitasti nizi celic, hife, v velikosti 5 do 10  $\mu$ m. Delijo se le končne celice vsake hife, kar omogoča rast glive v dolžino. Posamezne hife se vzdolžno povezujejo in razpredajo po substratu ter tvorijo podgobje ali micelij. Razmnoževanje gliv poteka vegetativno z brstenjem in razraščanjem, nespolno s tvorjenjem konidijev in spor ali trosov, ki se raznašajo s pomočjo vetra ali vode in spolno (somatogamija) (Jogan, 2001).

Ko nastopijo primerne razmere za razmnoževanje gliv, iz podgobja, ki se razrašča v rizoferi, vzkljujejo trosnjaki ali gobe - razmnoževalna oblika glive in pogosto edini nadzemni, s prostim očesom vidni del glive. Po obliki so trosnjaki zelo raznovrstni, od najbolj znanih z razločnim betom in klobukom, do tistih z manj razpoznavno morfologijo. Na vsakem trosnjaku je trosovnica ali plodišče ali himenij (pogosto je v mesnatem delu



klobuka ali beta) - plodovno tkivo v katerem se razvijejo trosi spolnega razmnoževanja. Ob zrelosti se trosi razširjajo pasivno s pomočjo vetra, vode ali živali ali aktivno s pomočjo posebnega mehanizma v trosnjaku, ki trosi izstrelji ali izvrže v okolico (Lassoe, 2006). Oblike trosnjakov, trosovnice, oblika klobuka, beta in povezave med klobukom in betom ter ostale posebnosti v zgradbi glive so zelo raznovrstne in vrstno značilne (Arzenšek, 2002). Osnovne morfološke značilnosti gobe so prikazane na sliki 1.



Slika 1: Osnovne morfološke značilnosti gobe (Arzenšek, 2002).

Glive vstopajo v številne interakcije v okolju in predstavljajo pomemben biotski element pri kroženju snovi. Prehranjujejo se kot sožiteljice (simbionti), kot gniloživke (saprofiti) ali kot zajedavke (paraziti). Simbiotske glive (mikorizne glive, lišaji) živijo v sožitju s partnerjem, pri višjih glivah so to drevesa in trave. Saprofitske glive se prehranjujejo z odmrliimi ogranskimi snovmi rastlinskega izvora in kot razkrojevalci sodelujejo pri prenosu mineralov in energije ter s tem vplivajo tudi na vrstno sestavo drugih organizmov v ekosistemu. Parazitske glive zajedajo drugo živo bitje (rastlino, žival ali glivo) in izkoriščajo njegove snovi (Arzenšek in sod., 2002).

### 2.1.1 Protibakterijske učinkovine gliv

Glive iz debla *Basidiomycota* (prostotrošnice) so zaradi hranilne vrednosti in številnih farmakoloških lastnosti, predmet številnih obsežnih raziskav (Chang, 1996; Manzi in sod., 1996; Wasser in Weis, 1999; Lindequist in sod., 2005; Barros in sod., 2007a, ). V vzhodno-azijskih državah ima uporaba gliv v medicinske namene tisočletno tradicijo.

Sama kemijska sestava gobe (trosnjaka) je med drugim odvisna od vrste gobe, rastišča in zrelosti, pri čemer je morda presenetljivo, da imajo lahko sestavine mlajših gob večji protimikrobni učinek kakor zreli trosnjaki (Barros in sod., 2007b). Analize gob so pokazale visoko vsebnost proteinov (Barros in sod., 2008a; Beluhan in Ranogajec, v tisku), pa tudi fenolov, tokoferolov, askorbinske kisljine in karotenoidov (Barros in sod., 2008) in imajo pogosto antioksidativni učinek (Ribeiro in sod., 2006). Raziskave sestave gojenih in divjih gob nakazujejo, da je v slednjih več proteinov, nasičenih maščobnih kislin,  $\alpha$ -tokoferola in fenolov ter manj maščob in sladkorjev (Barros in sod., 2008b). Študija različnih vrst prostotrošnic je pokazala, da vsebujejo različne proteinaze vseh štirih katalitskih razredov med katerimi so prevladovale serinske proteaze (Sabotič in sod., 2007a).

Med sestavinami gliv so številni bioaktivni sekundarni metaboliti, med katerimi so najbolj znani toksini (npr. amatoksin, faloidin, muskarin, psilocibin, giromitrin, ibotenska kislina, volvotoksin), antibiotiki (npr. penicilini, cefalosporini, grisoefulvin) in druge farmakološko aktivne učinkovine (ciklosporin A, lovastatin) (Poler, 1986; [www.gobe.si](http://www.gobe.si); [www.tolweb.org/Fungi](http://www.tolweb.org/Fungi)). Bioaktivne učinkovine gliv pripadajo različnim kemijskim skupinam, najpogosteje so to triterpeni, polisaharidi, (Lindequist, 2005), lektini, protiglivni proteini ter drugi proteini (Ng, 2004).

Podobno kot rastline, potrebujejo tudi glive za preživetje v naravnem okolju protibakterijske in protiglivne snovi (Lindequist in sod., 2005). V primerjavi z rastlinskimi viri protimikrobnih snovi, so viri protimikrobnih snovi gliv manj raziskani. Primer glivne protimikrobne učinkovine je klitocipin, iz glive *Clitocybe nebularis* (Batsch) P. Kumm. izolirani cisteinski proteinazni inhibitor (Brzin, 2000). Potencialne protimikrobne

učinkovine iz gliv so tudi lektini, ki kažejo protitumorno, antiproliferativno (Wang in sod., 1998; Pohleven in sod., 2009) ter tudi protivirusno učinkovanje (Sun in sod., 2003).

Raziskovalci poročajo o protibakterijski aktivnosti večih vrst prostotrosnih gliv. O protibakterijski aktivnosti glive *Letinus edodes* (Berk.) Sing. poročajo Hirasawa in sod. (1999) ter Ishikawa in sod. (2001). Turkoglu in sod. poročajo o protibakterijski in antioksidativni aktivnosti večih etanolnih ekstraktov gliv: *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill (2007a), *Morchella conica* Pers. (2006) in *Russula delica* Fr. (2007b). Podobno poročajo o protibakterijski aktivnosti vodnih in organskih ekstraktov gliv *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach in *Pleurotus sajor caju* (Fr.) Singer (Tambekar in sod., 2006), etanolnih ekstraktov *P. florida* in *P. aureovillosus* (Jagadish in sod., 2008), ekstraktov *P. eryngii* var. *ferulae* (Akyuz in Kirbag, 2009), *Lycoperdon pusillum* (Bat. Ex) in *Lycoperdon giganteum* Pers. (Jonathan in Fasidi, 2003) ter nekaterih drugih vrst gliv (Rossa in sod., 2003; Imtiaj in Lee, 2007).

## 2.2 *In vitro* METODE DOLOČANJA PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA SNOVI

Metode določanja protibakterijskega delovanja snovi temeljijo na spremembah fenotipskih in genotipskih lastnostih mikroorganizmov. Genotipske metode (sekveniranje tarčnih genov, tehnike na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR)) so specifične in se izvajajo v manjši meri kot fenotipske metode, ki so cenejše, hitrejše ter omogočajo zaznavo povsem novih snovi. Med fenotipske metode sodijo (1) metode s končno točko merjenja (difuzijske in dilucijske metode, metode z uporabo plošč z gradientom koncentracije protimikrobne snovi) in (2) deskriptivne metode, pri katerih spremljamo kinetiko (trajanje in hitrost) protimikrobne aktivnosti oz. spremljamo rezultate v odvisnosti od časa (Vigil in sod., 2005). Izbira metode je odvisna od občutljivosti, enostavnosti, fleksibilnosti in ponovljivosti metode (Woods in Washington, 1999).

Metoda difuzije v agarju ali t.i. Kirby-Bauerjev test je preprosta metoda ugotavljanja odpornosti posameznih testnih bakterij na različna protimikrobna sredstva. Na gojišče z že nacepljeno bakterijsko kulturo položimo papirnate diske, prepojene s protimikrobno

snovjo, ki nato difundira v gojišče. Koncentracija protimikrobnega sredstva logaritemsko pada z razdaljo od diska. Po končani inkubaciji merimo inhibicijske cone mikrobnе rasti, katerih premer je odvisen od koncentracije in odpornosti mikroorganizma na testirano protimikrobno snov. Uporaba kontrolnega vzorca je obvezna, saj na velikost inhibicijske cone vpliva tudi količina agarja, koncentracija testnega inokuluma, temperatura, čas inkubacije ter topnost in difuznost aktivne snovi. Čim večja je inhibicijska cona, tem večji je učinek protibakterijske snovi (Vigil in sod., 2005). Metoda difuzije v agarju je tehnično enostavna, lahko ponovljiva, cenovno ugodna, ne zahteva posebne laboratorijske opreme in omogoča določanje kvalitativnih rezultatov (občutljiv, vmesen ali odporen mikroorganizem). Slabosti metode sta ozek spekter mikroorganizmov za katere je metoda standardizirana, kvalitativen rezultat – pri določanju protimikrobnega delovanja snovi so bolj zaželeni kvantitativni rezultati (Woods in Washington, 1999) ter neprimernost metode za ocenjevanje učinkov v vodi netopnih in/ali velikih molekul.

Dilucijske metode se uporabljajo za določanje minimalne inhibitorne koncentracije ali MIC (ang. minimum inhibitory concentration) protimikrobne snovi. MIC predstavlja najmanjšo koncentracijo protimikrobne snovi ( $\mu\text{g/ml}$ ), ki pod nadzorovanimi pogoji in v določenem časovnem intervalu prepreči vidno rast mikroorganizmov. Območje MIC je odvisno od testirane protimikrobne snovi, mikroorganizma, velikosti inokuluma, sestave medija, inkubacijskega časa in inkubacijskih pogojev (pH, temperatura, zračnost). Protokoli za določanje MIC se izvajajo na trdnih gojiščih (dilucijska metoda v agarju) ali v tekočih gojiščih (makrodilucijska in mikrodilucijska metoda v bujonu) (Madigan in Martinko, 2006; EUCAST, 2003; Woods in Washington, 1999).

Dilucijska metoda v agarju je standardizirana in zanesljiva tehnika, ki se pogosto uporablja kot referenčna metoda – tudi za vrednotenje točnosti drugih metod. Metodo izvajamo tako, da v neselektivni agar vključimo različne koncentracije protimikrobne snovi ter nacepimo bakterijsko kulturo (EUCAST, 2000). Prednosti metode so sočasno testiranje velikega števila vzorcev, testiranje bakterij, ki v tekočih gojiščih slabo rastejo in hitra detekcija kontaminacije. Slabost metode sta zamudnost in velika poraba materiala (Woods in Washington, 1999).

Pri dilucijskih metodah v bujonu ločimo glede na volumen gojišča makrodilucijsko (1-2 ml gojišča) in mikrodilucijsko metodo (500  $\mu$ l). Makrodilucijska metoda poteka v epruveh, vključuje pripravo serijskih razreditev protimikrobne snovi v tekočem mediju, sledi inokulacija medija s standardizirano bakterijsko suspenzijo, inkubacija in kvantitativno določanje koncentracije protimikrobne snovi, ki še inhibira rast mikroorganizmov (Jorgensen in Ferraro, 1998; EUCAST, 2003). Tudi tu sta slabosti metode zamudnost in velika poraba reagentov. Zaradi dolgotrajne ročne priprave, je dodatna slabost velika verjetnost napake pri pripravi ustreznih razreditev ter, v primerjavi z dilucijsko metodo v agarju, počasnejša detekcija kontaminacije (Woods in Washington, 1999; Jorgensen in Ferraro, 1998).

Pri mikrodilucijski metodi se uporablja mikrotitrsko ploščo s 96-timi vdolbinicami, v katere dodajamo hranilno juho, različne koncentracije ustrezno redčene protimikrobne snovi in bakterijsko suspenzijo znane koncentracije (običajno  $10E5$  cfu/ml). Po končani inkubaciji ugotavljamo učinkovanje protimikrobnih snovi z merjenjem fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so optična gostota (temelji na merjenju motnosti), fluorescenca ali luminiscenca. Protimikrobna sredstva običajno testiramo v 2-kratnih serijskih razreditvah (EUCAST, 2003; Woods in Washington, 1999). Metoda je časovno ekonomična, poraba reagentov je majhna, število opravljenih analiz v primerjavi z makrodilucijsko metodo je običajno v enakem časovnem obdobju večje, metoda je ponovljiva in mogoče jo je avtomatizirati.

Metoda spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja omogoča določiti hitrost in/ali trajanje protimikrobnega učinka snovi z analizo rastne krivulje (ali krivulje inhibirane rasti oz. krivulje odmiranja) mikrobne kulture v odvisnosti od časa. Mikrobno rast najpogosteje določamo spektrofotometrično (pri karakterističnih valovnih dolžinah) z merjenjem optične gostote mikrobnih celic v prisotnosti protimikrobne snovi, kjer je intenziteta prepuščene sipane svetlobe odvisna od koncentracije celic v merjeni suspenziji. Po končanem merjenju dobljene rezultate primerjamo z referenčnimi vzorci. Metoda je omejena z občutljivostjo spektrofotometra. Rast mikroorganizmov dodatno spremljamo tudi z nacepljanjem vzorcev na agarске plošče, kjer po inkubaciji preštejemo kolonijske enote oz. viabilne celice (cfu/ml) (Vigil in sod., 2005).

Raziskovalci, ki poročajo o protibakterijski aktivnosti glivnih ekstraktov različnih vrst prostotrosnih gliv, so kot metodo uporabili metodo difuzije v agarju (Rosa in sod., 2003; Tambekar in sod., 2006; Turkkoglu in sod., 2006; Imitaj in Lee, 2007; Turkoglu in sod., 2007a; Turkoglu in sod., 2007b; Jagadish in sod., 2008; Akyuz in Kirbag, 2009).

V diplomskem delu smo iskali aktivne snovi v proteinskih ekstraktih trosnjakov. Zaradi možnosti večjega števila hkrati analiziranih vzorcev ter želje, da ne spregledamo aktivne snovi z večjo molekulsko maso (slabšo sposobnostjo difundiranja), smo izbrali metodo spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja.

### 2.3 *In vivo* DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKEGA DELOVANJA SNOVI

Učinkovitost protimikrobnega delovanja snovi najprej preizkušamo *in vitro*, šele nato sledijo *in vivo* raziskave. Kljub temu, da se večinoma sklepa, da bo snov, ki je delovala *in vitro*, učinkovala tudi *in vivo*, to vedno ne drži.

Medtem ko je znano *in vivo* (na miših) protivnetno (Kim in sod., 2004), protialergijsko (Sano in sod., 2002) in protitumorno (Burczyk in sod., 1996; Wu in sod., 2007) delovanje snovi glivnega izvora, je *in vivo* protibakterijsko delovanje tovrstnih snovi slabo raziskano. O *in vivo* delovanju protimikrobne učinkovine iz vrste glive *Lentinula edodes* in s tem povečani odpornosti miši na infekcijo poročajo Sakamoto in sod. (1983). Figueiredo in sod. (2010) pa poročajo o *in vitro* ter *in vivo* antagonističnemu delovanju izolata iz glive *Trichoderma spp.* proti fitopatogenu *Sclerotinia sclerotiorum* v testih patogenosti na rastlinah fižola.

### 2.4 FITOPATOGENE BAKTERIJE, NJIHOVO DOLOČANJE IN KONTROLA

#### 2.4.1 *Erwinia amylovora*

*Erwinia amylovora* (Burrill, 1882) Winslow et al. 1920, je gram negativna, aerobna, paličasta bakterija v velikosti  $1,1-1,6 \times 0,6-0,9 \mu\text{m}$  in gibljiva z 2-7 peritrihimi bički. Taksonomsko jo uvrščamo med bakterije, deblo Gracilicutes, razred Proteobacteria, red

*Enterobacteriales*, družino *Enterobacteriaceae* in rod *Erwinia* (Van der Zwet in sod., 1990; OEPP/EPPO/CABI, 1997).

*Erwinia amylovora* povzroča hrušev ožig - karantensko bolezen sadnega drevja in nekaterih okrasnih rastlin. Okužuje okrog 200 vrst rastlin iz 40 vrst rodov iz družine rožnic *Rosaceae*. Glavne gostiteljske vrste rastlin so jablana (*Malus*), hruška (*Pyrus*), kutina (*Cydonia*), nešplja (*Mespilus*), glog (*Crataegus*), jerebika (*Sorbus*), šmarna hrušica (*Amelanchier*), japonska kutina (*Chaenomeles*), panešplja (*Cotoneaster*), ognjeni trn (*Pyracantha*), japonska nešplja (*Eriobotrya*) in fotinija (*Photinia davidiana*) (Lešnik in sod., 2008; Vanneste, 2000; [www.furs.si](http://www.furs.si)).

Obseg in hitrost širjenja bolezní sta odvisna od vremenskih razmer, okužba se dobro prenaša v času cvetenja, temperaturi nad 15 °C in visoki zračni vlagi. Za razvoj bolezní so najpomembnejše temperature nad 18 °C oziroma hitro nihanje temperatur, do katerega lahko pride v poletnem času ob nevihtah. V rastlino prodrejo bakterije skozi rane, naravne odprtine nadzemnih delov rastline ali skozi cvet. Razmnožujejo se v medceličnem prostoru in povzročajo propadanje celic. Po rastlini se lahko širijo tudi po prevodnem tkivu (Lešnik in sod., 2008; Vanneste, 2000; [www.furs.si](http://www.furs.si)).

Bolezenska znamenja vključujejo kapljice izcedka (vir nadaljne okužbe), ki je sprva brezbarven do mlečno bel, kasneje potemni do oranžne ali celo temno rjave barve, venenje, sušenje in temnenje listov, ukrivljanje vršičkov okuženih poganjkov ter sušenje in temnenje cvetov, plodičev in plodov, ki ostanejo na rastlini tudi pozimi. Zaradi propadanja in sušenja tkiv so prizadeti poganjki in veje videti, kot bi bili ožgani. Kambij pod lubjem je marmoriran in lisičje rdečerjavo obarvan. Pri najbolj občutljivih gostiteljskih rastlinah (hruška, jablana, kutina) lahko pride do propada celotne rastline, medtem ko se pri manj občutljivih (glog, panešpla, ognjeni trn) posušijo le posamezni okuženi deli in rastlina lahko še več let normalno uspeva, preden se okužbo opazi (Vanneste, 2000) ter služi kot rezervoar novih okužb.

Najpogostejši način širjenja bolezni je okužen sadilni material in orodje, zlasti ob rezih. Na velike razdalje se prenaša s pticami selivkami in prometom, na krajše razdalje se širi kapljično s pomočjo dežja, vetra in žuželk (Vanneste, 2000).

Bolezen povzroča precejšnjo ekonomsko škodo pri pridelavi sadik, sadja in okrasnih grmovnic, saj lahko uniči pridelek v letu okužbe, celotne rastline, zaradi zakonskega nadzora pa povzroča tudi posredno ekonomsko škodo ([www.fito-info.si](http://www.fito-info.si)).

Hrušev ožig je razširjen na celotnem ozemlju EU z izjemo varovanih območij. V Sloveniji je prišlo do prvega izbruha v letu 2003, ko je bila bolezen širše navzoča na Gorenjskem in v okolici Maribora, posamične najdbe pa so bile tudi drugod. V kasnejših letih se je bolezen predvsem v letih z ugodnimi pogoji za razvoj bolezni, razširila tudi na nekatera druga območja ([http://www.furs.si/svn/zvr/hr\\_ozig.asp](http://www.furs.si/svn/zvr/hr_ozig.asp)).

#### **2.4.2 *Erwinia chrysanthemi***

*Erwinia chrysanthemi* (Burkh.) Young et al. 1978, s sinonimoma *Dickeya chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Samson et al. 2005, in *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973, je gram negativna, aerobna, paličasta bakterija v povprečni velikosti  $1,8 \times 0,6 \mu\text{m}$  in gibljiva z 8-11 peritrihimi bički. Taksonomsko jo uvrščamo med bakterije, v deblo Gracilicutes, razred Proteobacteria, red *Enterobacteriales*, družino *Enterobacteriaceae* in rod *Erwinia*. Bakterija ima na podlagi gostiteljskih rastlin 6 patovarjev: pv. *chrysanthemi*, pv. *dianthicola*, pv. *dieffenbachiae*, pv. *paradisiaca*, pv. *parthenii* in pv. *zoeae* (OEPP/EPPO/CABI, 1997).

*Erwinia chrysanthemi* je splošno razširjena, povzroča mehko gnilobo nekaterih vrst sadja (ananas, banane) ter številnih kulturnih (korenje, cikorija, peteršilj, krompir, sladki krompir, čebula, radič, riž, tobak, paradižnik, zelje, lucerna...) in okrasnih rastlin (tulipani, anemone, begonije, pelargonije, primule, dalije, krizanteme, kalanhoje, opuncije...) (OEPP/EPPO/CABI, 1997).



Ervinije mehkih gnilob, med katere poleg *E. chrysanthemi* spadata bakteriji *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, s pomočjo pektolitčnih encimov, ki jih izločajo v okolje, razgradijo celične stene med celicami gomoljev in korenin, kar se kaže kot mehčanje, utekočinjanje in gnitje tkiva (OEPP/EPPO/CABI, 1997). V založna tkiva, kot so na primer gomolji krompirja, vstopijo skozi lenticеле. Sprva nastanejo manjše vodene lezije, te se nadalje razširijo in poglobijo, tkivo se zmehta in postane kašasto. V 3 – 5 dneh se celoten sadež, korenina ali gomolj popolnoma zmehta, utekočini in razkroji. Okuženo tkivo številnih vrst rastlin je sprva brez vonja, po kolapsu razpadajočega tkiva in razvoju sekundarnih bakterij se razvije močan smrad. Bakterije se lahko razmnožujejo in so aktivne v razponu od 5 °C do 35 °C, medtem ko jih temperatura nad 50 °C uniči. Preživijo tudi v tleh med ostanki okuženih rastlin. Bakterije se širijo z vodo in s pomočjo žuželk (Agrios, 2005).

Obseg in hitrost širjenja bolezni sta odvisna predvsem od okoljskih pogojev. Okužba se dobro prenaša v visoki vlagi, ob prisotnosti vode in temperaturi 25-30 °C (OEPP/EPPO/CABI, 1997). Bolezenska znamenja so odvisna od gostiteljske rastline, patovarja bakterije in ekoloških razmer, značilna bolezenska znamenja so počasnejša rast in venenje rastline, gniloba stebel, korenin in gomoljev.

#### **2.4.3 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria***

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dodge) Dye 1978, s sinonimom *Xanthomonas vesicatoria* (ex Doidge) Vauterin et al., je gram negativna, aerobna, paličasta bakterija v velikosti  $0,6 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$ , gibljiva z 1 polarnim bičkom. Taksonomsko jo uvrščamo med bakterije, deblo Gracilicutes, razred Proteobacteria, red *Pseudomonadales*, družino *Pseudomonadaceae* in rod *Xanthomonas* (OEPP/EPPO/CABI, 1997).

*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* je splošno razširjena bakterija, ki povzroča bakterijsko pegavost paradižnika (*Lycopersicon esculentum*) in paprike (*Capsicum annuum*), okužuje pa lahko tudi druge rastlinske vrste iz družine razhudnikovk *Solanaceae* (kmečki tobak *Nicotiana rustica*, vrste iz rodov *Datura* spp., *Physalis* spp., *Solanum* spp., *Lycium* spp. in *Hyoscyamus* spp.) (OEPP/EPPO/CABI, 1997).

Bakterijska pegavost se razvije na sejančkih in odraslih rastlinah. Na sejančkih povzroči močno odpadanje listov, na odraslih rastlinah pa pege na listih, steblih in plodovih ([www.dvrs.bf.uni-lj.si](http://www.dvrs.bf.uni-lj.si)). Pri okužbi se najprej pojavijo oljnate pege na listih s premerom 2-10 mm, ki kmalu potemniijo, se med seboj združujejo in so omejene z listnimi žilami. Z razvojem bolezni nekrotično tkivo izpade, tam ostanejo luknjice z nazobčanim robom. Okuženo listje se suši. Ko bakterija okuži tudi pecelj lista le-ta odpade. Podobno kot na listih, se tudi na steblih pojavijo črne nekrotične pege iz katerih se občasno cedi sluzast bakterijski eksudat. Okuženi cvetovi odpadejo. Najznačilnejša bolezenska znamenja se pojavijo na plodovih, kjer se pojavijo sprva temnozeleno pege, ki kmalu počrniijo in zvezdasto razpokajo. Nastale hrastave pege poškodujejo le povrhnjico, zato je zmanjšana le tržna vrednost plodov. Medtem ko so plodovi paradižnika dovzetni za bakterijsko pegavost, plodovi paprike ponavadi ne kažejo bolezenskih znamenj, največkrat odpadejo, preden dozoriijo (OEPP/EPPO/CABI, 1997; [www.furs.si](http://www.furs.si)).

Do naslednje rastne sezone se bakterija ohranja na ostankih okuženih rastlin, plevelih in na semenu. Razvoj bolezni pospešuje toplo in vlažno vreme (OEPP/EPPO/CABI, 1997). Najpomembnejši način prenosa bolezni je vnos in uvoz okuženega semena in sadik ([www.furs.si](http://www.furs.si)).

Podobna bolezenska znamenja kot jih povzročata *X. campestris* pv. *vesicatoria* na paradižniku in papriki, povzročata tudi patogeni bakteriji *Clavibacter michiganensis* pv. *michiganensis* in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, vendar jih le po bolezenskih znamenjih med seboj ne moremo ločiti (OEPP/EPPO/CABI, 1997).

#### **2.4.4 Diagnostične metode potrjevanja okužb**

Za dokazovanje bakterij se uporabljajo številne diagnostične metode. Bolezen rastlin diagnosticiramo na osnovi značilnih bolezenskih znamenj, izolacije čiste bakterijske kulture na semiselektivnih in neselektivnih gojiščih, morfologije kolonij, seroloških tehnik (aglutinacijski, imunofluorescenčni in ELISA testi), biokemijskih testov, profiliranja maščobnih kislin, molekularnih metod (PFGE analiza, PCR – omogoča potrditev izolirane kulture *E. amylovora* in razlikovanje od bakterije *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*,

povzročitelja bolezni z zelo podobnimi bolezenskimi znamenji kot hrušev ožig) in testa patogenosti, za *E. amylovora* na nezrelah plodovih hrušk za potrjevanje patogenosti bakterije, pri čemer opazujemo pojav bolezenskih znamenj (OEPP/EPPO Standards, 2004).

Za dokazovanje *E. chrysanthemi*, se podobno kot za *E. amylovora*, uporabljajo različne diagnostične metode: diagnostika značilnih bolezenskih znamenj, izolacija čiste bakterijske kulture na neselektivnih in selektivnih pektinskih gojiščih, določanje morfologije bakterijskih kolonij, serološki in biokemijski testi, profiliranje maščobnih kislin, molekularne metode (PCR, PFGE) in test patogenosti oz. test pektolitične razgradnje rezin krompirja (Lelliot in Stead 1987; De Boer in Kelman, 2001), kjer opazujemo mehčanje in utekočinjanje tkiva (OEPP/EPPO Standards, 2004).

Za presejalno metodo se za dokazovanje *X. campestris* pv. *vesicatoria* uporablja testiranje semenskega ekstrakta z imunofluorescenco, nadalje pa izolacija čiste bakterijske kulture na splošnih in selektivnih gojiščih, serološki testi (ELISA...) in testi patogenosti na listih mladih sadik paradižnika, kjer se opazuje karakteristične lezije (OEPP/EPPO/CABI, 1997).

#### **2.4.5 Zatiranje bakterijskih bolezni rastlin**

Bakterijske bolezni rastlin so povezane z ekonomskimi in okoljskimi posledicami in za njihovo preprečevanje, za razliko od bolezni, ki jih povzročajo glive, ni na voljo učinkovitih fitofarmaceutskih sredstev. Zaradi tega je iskanje novih virov in razvoj novih protimikrobnih učinkovin bistvenega pomena.

Za varstvo pred bakterijo *E. amylovora* se priporoča kemična kontrola s fitotoksičnimi bakrovimi pripravki ob brstenju in v času cvetenja (Lešnik, 2007) v kombinaciji s fitosanitarnimi ukrepi (preventivni ukrepi; nadzor s pregledi, skrb za zdrav sadilni material, gojenje odpornejših rastlin...), ukrepi varstva rastlin (opazovanje, napovedovanje bolezni, diagnostika obolelih rastlin, zadrževanje širjenja bakterije) in tehnološkimi ukrepi (gnojenje, rez, odstranjevanje obolelih delov rastlin...) (OEPP/EPPO/CABI, 1997; Lešnik in sod., 2008).

Uporaba antibiotikov in drugih baktericidov za namen varstva rastlin v Sloveniji in državah članicah EU ni dovoljena, predvsem zaradi možnosti hitrega razvoja odpornosti pri bakterijah različnih vrst, tudi pri bakteriji *E. amylovora* (Werner in Aldwinckle, 2006), raba antibiotikov v času cvetenja pa je sporna tudi zaradi čebelarstva (Seljak, 2004). Na *E. amylovora* preizkušajo nekatere baktericide (capropamid, cetilpiridin-klorid, vodikov peroksid vezan s srebrom, benzojeva kislina, DB918), vendar so le ti lahko fitotoksični, zaradi česar je njihova raba za tretiranje kmetijskih rastlin še nejasna (Adaskaveg in sod., 2006).

Nove možnosti zatiranja bakterije *E. amylovora* predstavlja uporaba biotičnih antagonistov in kompetitorjev (za rastline nepatogene bakterije in glive), ki jih je v realnih pridelovalnih razmerah mogoče uporabiti za zatiranje bakterije oz. varstvo cvetov (Aldwinckle in sod., 2002), pri čemer so takšen antagonistični učinek našli tudi pri glivah *Aureobasidium pullulans* in *Metschnikowia pulcherrima* (Lešnik, 2007).

Poglavitni ukrepi za varstvo pred bakterijo *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* so uporaba zdravega semena, toplotno tretiranje ali sterilizacija semena, sajenje ob primernem času, kolobar z negostiteljskimi rastlinami in uporaba odpornih kultivarjev rastlin (paprika, paradižnik). Za zatiranje bolezni se lahko uporablja fitotoksične bakrove pripravke, pri čemer je pomembno predhodno ugotoviti odpornost izolata na baker, ki lahko variira (OEPP/EPPO/CABI, 1997; Ravnikar in sod., 2001).

Za varstvo pred bakterijo *Erwinia chrysanthemi* ni na voljo učinkovitih fitofarmaceutskih sredstev, zato so poglavitni preventivni fitosanitarni ukrepi (nadzor s pregledi, skrb za zdrav sadilni material), ukrepi varstva rastlin (diagnostika obolelih rastlin, zadrževanje širjenja bakterije...) in tehnološki ukrepi (skladiščenje rastlin v suhih in hladnih prostorih, odstranjevanje obolelih rastlin...) (OEPP/EPPO/CABI, 1997).

## 2.5 POMEN PROTEINOV V OBRAMBNIH MEHANIZMIH RASTLIN IN MOŽNOSTI UPORABE PRI ZATIRANJU BOLEZNI

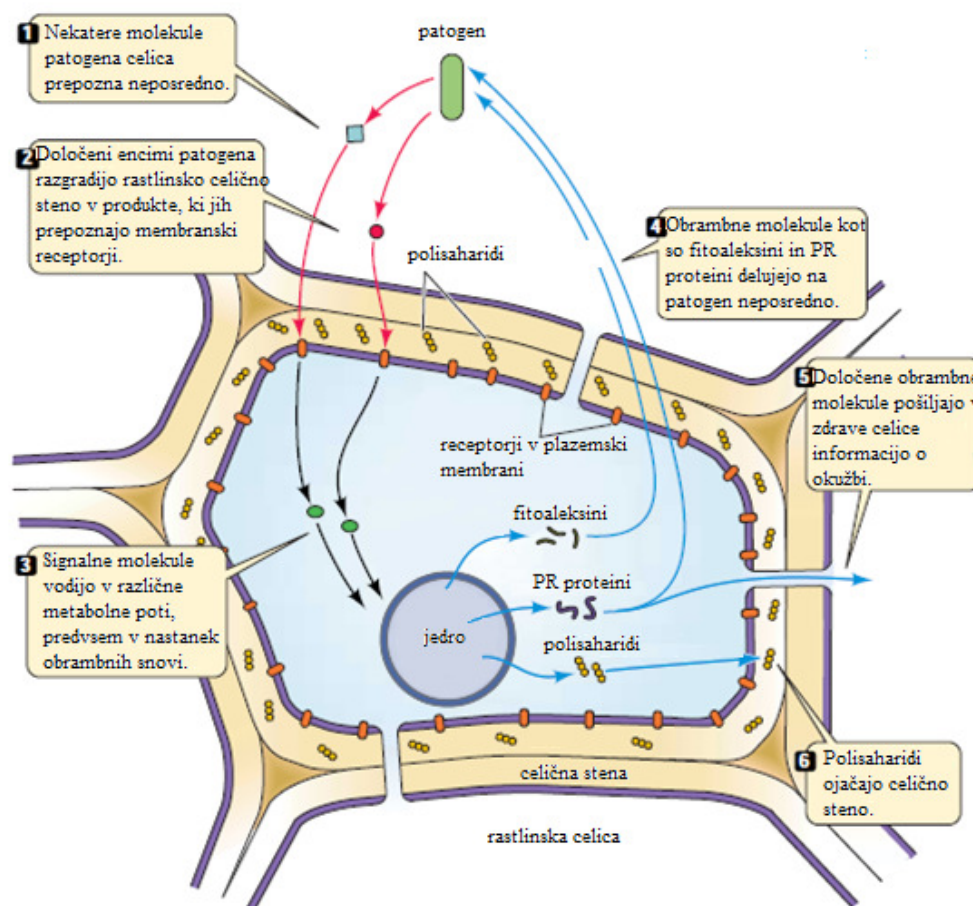
V več kot sto milijonih let evolucije, so rastline razvile številne mehanizme za obrambo pred različnimi stresnimi dejavniki, mehanskimi poškodbami, fitopatogeni in drugimi škodljivci. Podobno se povzročitelji rastlinskih bolezni v procesu koevolucije temu prilagajajo tako, da obidejo obrambne mehanizme rastlin (Valueva in Mosolov, 2004; Abramovitch in Martin, 2004).

Številni splošni in visoko specializirani obrambni mehanizmi rastlin temeljijo na kombinaciji konstitutivne in inducirane obrambe. Konstitutivna obramba predstavlja obstoječo (1) strukturno zaščito rastline (kutikula, voski, trihomi, debelejše stene epidermalnih celic...), ki deluje kot fizična ovira in onemogoča penetracijo in razširjanje patogenega mikroorganizma po rastlini ter (2) biokemijsko zaščito rastline, kar predstavlja konstitutivno sintezo številnih snovi, ki so bodisi za patogena toksične, bodisi ustvarjajo neustrezno okolje za rast patogenega mikroorganizma (sinteza fitoanticipinov - snovi z antimikrobnim delovanjem; alkaloidov, flavonoidov, lignina, saponinov, lektinov, prostih kisikovih radikalov...) (Agrios, 2005; Taiz in Zeiger, 2002).

Inducirana obramba rastline temelji na prepoznavi vrste patogena, procesih prenosa signala in ekspresiji številnih genov. V osnovi je inducirana obramba bodisi (1) strukturna (citoplazemska obrambna reakcija, tvorba amorfnih in fibrilarnih struktur v celični steni, tvorba abscizinske plasti v mladih listih, tvorba plutaste plasti med zdravim in inficiranim tkivom, nastanek tilov v ksilemu...), bodisi (2) biokemijska (okrepitev celične stene s kalozo, detoksifikacija toksinov patogena, tvorba antimikrobnih komponent: proteinov povezanih s patogenostjo (ang. pathogenesis related proteins ali PR-proteini), fitoaleksinov – nespecifičnih stresnih metabolitov z antibiotičnim učinkovanjem, fenolnih snovi, kinonov, taninov, saponinov) (Agrios, 2005; Taiz in Zeiger, 2002).

Najpomembnejše komponente obrambnih mehanizmov rastlin so proteinske narave, večinoma so to encimi (beta-1,3-glukanaze, hitinaze), inhibitorji proteinaz in alfa-amilaz, tionini, lektini ter drugi proteini in peptidi s protimikrobnim učinkovanjem (Peumans in

Van Damme, 1995; Dangl in Jones, 2001; Taiz in Zeiger, 2002; Agrios, 2005). O vlogi proteinaz in inhibitorjev proteinaz pri obrambnih odgovorih rastline poročajo številni avtorji. Tornero s sod. (1995) poroča o akumulaciji subtilisinu-podobne proteinaze (P69) v krompirju okuženim z virusom; Pautot s sod. (1993) poroča o povečani aktivnosti leucin aminopeptidaze (Lap A) med napadom insektov; Ryan (2000, cit. po Valueva in Mosolov, 2004) pa navaja, da je zaradi poškodb listov paradižnika (*Lycopersicon esculentum* Mill.), ki so jih povzročili insekti in mikroorganizmi, prišlo do indukcije sinteze več kot dvajset različnih proteinov, vključno inhibitorjev cisteinskih, serinskih in aspartatnih proteinaz ter metalokarboksipeptidaz.



Slika 2: Shema kemijske signalizacije med rastlino in patogenom (Purves in sod., 2001).

## 2.6 PROTEINAZE

Proteoliza je encimska razgradnja beljakovin, pri kateri pride do hidrolize ene ali več peptidnih vezi. Proteolitični encimi, proteinaze oziroma proteaze (EC 3.4. po pravilih NC-IUBMB ali Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1984) so hidrolitični encimi, ki v polipeptidih in proteinih cepijo peptidno vez. Lahko delujejo intra- ali ekstracelularno (npr. v telesnih tekočinah, prebavilih). Proteinaze so povsod navzoče in so posredno ali neposredno udeležene v katabolne in anabolne procese (Callis, 1995). Lizosomske proteinaze z nespecifično razgradnjo proteinov zagotavljajo vir aminokislin in omogočajo biosintezo proteinov.

Proteinaze imajo pri rastlinah številne regulatorne funkcije. Pri kalitvi in senescenci skrbijo za mobilizacijo proteinskih zalog in s tem omogočajo rast novih vegetativnih rastlinskih organov. Pomembne so pri usmerjanju novo nastalih proteinov do tarčnih organelov znotraj celice, pri spremembah v sestavi proteinov, pri celičnih procesih, relokalizaciji organskega dušika, znotrajcelični razgradnji denaturiranih, nenormalnih in toksičnih proteinov, pri procesih diferenciacije tkiv in celične smrti ter procesih odziva na abiotske spremembe, ranitev ali napad patogenega mikroorganizma (Viestra, 1996; Schaller, 2004; Van der Hoorn in Jones, 2004).

Glavni kriteriji klasifikacije proteinaz so:

- izvor (mikrobni, glivni, rastlinski, živalski)
- mesto delovanja (intra-, ekstracelularno)
- velikost (visoko-, nizkomolekularnost)
- mesto cepitve peptidne vezi (ednopeptidaze cepijo peptidno vez v notranjosti peptidne verige, eksopeptidaze pa cepijo peptidno vez bodisi na N ali na C koncu)
- način delovanja (različni katalitski tipi)

Sodobna klasifikacija proteinaz je je MEROPS klasifikacija ([www.merops.sanger.ac.uk](http://www.merops.sanger.ac.uk)), ki sta jo osnovala Barrett in Rawlings. Proteinaze so razvrščene na osnovi njihove evolucijske sorodnosti. Posamezna proteinaza je najprej razvrščena glede na katalitski tip, nadalje so proteinaze razvrščene na osnovi terciarne strukture, ki je evolucijsko starejša od

primarne, v klane, slednji pa so sestavljeni in ene ali več družin (na osnovi ujemanja v aminokislinskem zaporedju, primarni strukturi – tu se upošteva predvsem ujemanje v segmentih, ki sodelujejo pri tvorbi aktivnega mesta) (Rawlings in Barrett, 1993).

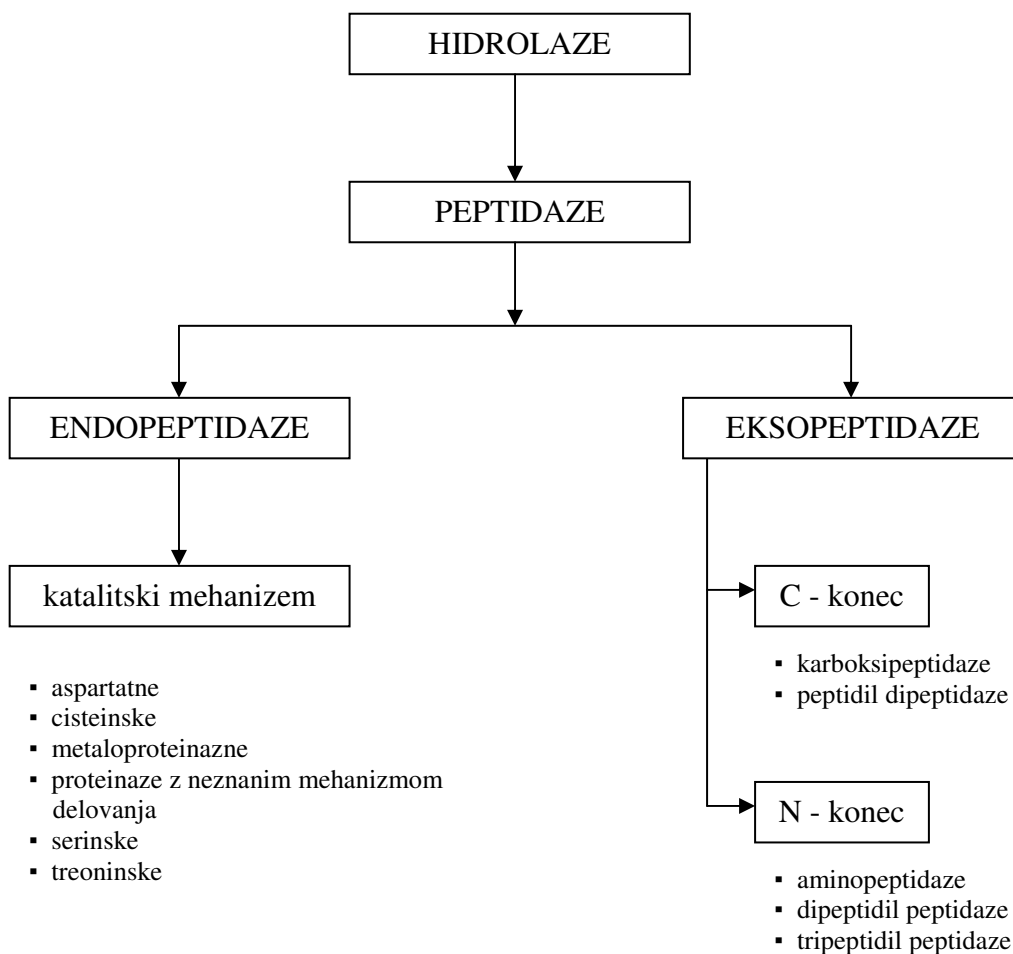
Katalitski tip proteinaze določa aminokislina v aktivnem mestu, ki s kisikom kot nukleofilom napade peptidno vez (S – serinske proteinaze (EC 3.4.21), T – treoninske (EC 3.4.25), C – cisteinske (EC 3.4.22) in P - klan mešanih proteinaz, C-, S-, ali T-), oziroma aminokislina ali kovinski ion, ki za nukleofilni napad aktivira molekulo vode (A – aspartatne proteinaze (EC 3.4.23), G - glutamatne, M – metaloproteaze (EC 3.4.24)). Proteinaze z neznanim mehanizmom delovanja so uvrščene v neznani katalitski tip U (EC 3.4.99). Do danes je identificiranih več kot 2.300 družin proteinaz (Rawlings in Barrett, 1993).

Preglednica 1: Razvrstitev proteinaz glede na mehanizem katalize (Rawlings in Barrett, 1993).

SKUPINA PROTEINAZ	št. družin v skupini
aspartatne proteinaze	14
cisteinske proteinaze	72
glutaminske	1
metaloproteinazne	56
proteinaze z neznanim mehanizmom delovanja	10
serinske	45
treoninske	5

Poleg zgoraj omenjene klasifikacije, obstajajo še drugi sistemi kalsifikacije. NC-IUBMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) uvršča proteinaze med hidrolaze, ki delujejo na peptidno vez, nadalje pa peptidaze (EC 3.4) razvršča na endopeptidaze (EC 3.4.21-99) in eksopeptidaze (EC 3.4.11-19) (<http://www.chem.qmul.ac.uk>).





Slika 3: Razdelitev proteinaz po NC-IUBMB (NC-IUBMB, 2007).

Endopeptidaze cepijo peptino vez znotraj verige in so nadalje razvrščene po Rawlingsu in Barrettu na različne katalitske tipe proteinaz.

Eksopeptidaze pa cepijo različno velike fragmente bodisi s karboksilnega, bodisi z amino terminalnega konca polipeptidne verige in so na podlagi tega razdeljene na aminopeptidaze (EC 3.4.11), dipeptidil peptidaze (EC 3.4.14), tripeptidil peptidaze (EC 3.4.-), karboksipeptidaze (EC 3.4.6.18), peptidil peptidaze (EC 3.4.15), dipeptidaze (EC 3.4.11.3), tripeptidaze (EC 3.4.11.4) in omegapeptidaze (EC 3.4.19) (Barrett, 1994).

### 2.6.1 Cisteinske proteinaze

Cisteinske proteinaze (CP) so odkrili v skoraj vseh kraljestvih živega sveta; pri virusih, mikroorganizmih, glivah, rastlinah in živalih (Barrett, 1986; Berti in Storer, 1995). V aktivnem mestu sta aminokislini cistein (Cys) in histidin (His), ki pa v primarni strukturi pri različnih družinah kažeta različno zaporedje (Cys/His ali His/Cys), kar kaže na to, da CP nimajo enotnega evolucijskega izvora (Rawlings in Barrett, 1994).

### 2.6.2 Bakterijske proteinaze

Patogeni mikroorganizmi uporabljajo proteolitične encime za penetracijo v rastlinsko tkivo, infekcijo in razvoj patogeneze (npr. pektoliaz, ksilanaze, poligalakturonaze), degradacijo rastlinskih obrambnih proteinov (hitinaze, beta-1,3-glukanaze), za transformacijo patogenom lastnih proteinov (Valueva in Mosolov, 2004), proteinazne inhibitorje pa za zaviranje rastlinske obrambe (Dunaevsky in sod., 2005b; Habib in sod., 2007). Pri proteinazah prevladujejo tiste iz skupine serinskih proteinaz, širše zastopane so tudi proteinaze iz skupine aspartatnih proteinaz, cisteinskih proteinaz in celo metaloproteinaz (Valueva in Mosolov, 2004).

Po podatkih MEROPS-a ([www.merops.sanger.ac.uk](http://www.merops.sanger.ac.uk)) ima rastlinska patogena bakterija *Erwinia amylovora* proteinaze zastopane v skupini aspartatnih, cisteinskih, serinskih proteinaz, metaloproteinaz in v skupini proteinaz z neznanim mehanizmom delovanja – skupno 7 različnih proteinaz in 1 nepeptidazni homolog. V istih skupinah kot *E. amylovora* ima zastopane proteinaze rastlinska patogena bakterija *Erwinia chrysanthemi* – skupno 11 različnih proteinaz. *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, ki je tudi rastlinska patogena bakterija pa ima proteinaze zastopane v skupini aspartatnih, cisteinskih, serinskih, treoninskih in metaloproteinaz ter v skupini proteinaz z naznanim mehanizmom delovanja – skupno 286 različnih proteinaz in 94 nepeptidaznih homologov.

## 2.7 PROTEINSKI PROTEINAZNI INHIBITORJI

Proteinaze so vključene v številne pomembne intra- in ekstracelularne procese, zato je nujno potrebno, da je njihova aktivnost strogo regulirana. Neprimerno proteolizo regulirajo številni kontrolni mehanizmi, bodisi gre za regulacijo ekspresije proteinaznih genov, izločanja in zorenja proteinaz, regulacijo pH okolja, redoks potenciala pri cisteinskih proteinazah, prisotnosti kovinskih ionov pri metaloproteinazah. Med pomembnejšimi kontrolnimi mehanizmi pa je sinteza proteinaznih inhibitorjev (PI) (Rawlings in sod., 2004).

Proteinski proteinazni inhibitorji so prisotni tako pri mikroorganizmih, kot glivah, rastlinah in živalih (Valueva in Mosolov, 2004; Haq in sod., 2004; Christeller, 2005). Nahajajo se lahko ekstracelularno ali intracelularno. Proteinazni inhibitorji se v naravi kopičijo v različnih tkivih in organih, npr. v listih, založnih tkivih, gomoljih, semenih, jajcih ptic, tekočinah, ki omogočajo prenos povzročitelja bolezni, npr. v serumu sesalcev, hemolimfi nevretenčarjev in floemu rastlin (De Leo in sod. 2002; Christeller, 2005).

Do nedavnega so bili proteinazni inhibitorji razvrščeni glede na katalitski tip proteinaze, ki so jo inhibirali. Do zapletov je prišlo pri razvrščanju inhibitorjev, ki so inhibirali več različnih katalitskih tipov proteinaz. Po sodobni klasifikaciji - MEROPS-u, se proteinazni inhibitorji, po enakem sistemu kot proteinaze, delijo glede na evolucijsko sorodnost na klane ali naddružine in družine (Rawlings in sod., 2006; [www.merops.sanger.ac.uk](http://www.merops.sanger.ac.uk)).

Glede na tip inhibiranih proteinaz, se inhibitorji delijo na:

- inhibitorje serinskih proteinaz
- inhibitorje cisteinskih proteinaz
- inhibitorje aspartatnih proteinaz
- inhibitorje metaloproteinaz (Laskowski in Kato, 1980).

Za posamezne skupine proteinaz obstajajo različni mehanizmi inhibicije, v osnovi gre za:

- inhibicijo s cepitvijo notranje peptidne vezi ali
- inhibicijo s konformacijsko spremembo ali za

- inhibicijo z vezavo na aktivno mesto encima (Rawlings in sod., 2004).

Vezava inhibitorja na encim je specifična in reverzibilna. Molekula inhibitorja se vsede na aktivno mesto encima, ga s tem blokira in delovanje proteinaze je preprečeno. Nastali kompleks encim-inhibitor je dodatno stabiliziran s številnimi vodikovimi, ionskimi in hidrofobnimi vezmi, zaradi česar le počasi disociira (Barrett in sod., 1986).

### 2.7.1 Rastlinski proteinski proteinazni inhibitorji

V več kot sto milijonih let koevolucije, so rastline razvile številne mehanizme za obrambo pred različnimi stresnimi dejavniki, fitopatogeni in drugimi škodljivci. Eden pomembnejših obrambnih mehanizmov so rastlinske proteinaze in proteinazni inhibitorji (Valueva in Mosolov, 2004).

Večina rastlinskih proteinskih proteinaznih inhibitorjev je bila izoliranih iz semen stročnic, žitaric, bučk in gomoljev krompirja. Pri rastlinah so zastopani vsi štirje katalitski tipi proteinaznih inhibitorjev: serinski, cisteinski, aspartatni in metaloproteinazni; prevladujejo pa serinski in cisteinski inhibitorji (fitocistatini) (Dunaevsky in sod., 2005b; Lawrence in Koundal, 2002). Slednji so bili izolirani iz avokada (*Persea americana* Mill) (Kimura in sod., 1995, cit. po Mosolov in Valueva, 2005), soje (*Glycine max* (L.) Merr) (Hines, 1991, cit. po Mosolov in Valueva, 2005), riža (*Oryza sativa* L.) (Kondo, 1990), pšenice (*Triticum aestivum* L.) (Kuroda, 2001), koruze (*Zea mays* L.) (Abe in sod., 1992), kitajskega fožola (*Vigna unguiculata* L.) (Fernandes in sod., 1991, cit. po Mosolov in Valueva, 2005), ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.) (Rogers in sod., 1993, cit. po Mosolov in Valueva, 2005), glicinije (*Wisteria floribunda* L.) (Hirashiki in sod., 1990, cit. po Mosolov in Valueva, 2005), krompirja (*Solanum tuberosum* L.) (Walsh, 1993) ipd.

Že leta 1976 so znanstveniki odkrili, da tripsinski in kimotripsinski inhibitorji (vsi so serinski proteinazni inhibitorji) iz soje, semen fižola in krompirjevih gomoljev zavirajo aktivnost proteinaz fitopatogene glive *Fusarium solani* (Mosolov in sod., 1976, cit po Valueva in Mosolov, 2004). Kasneje so številni raziskovalci prišli do podobnih rezultatov pri preučevanju delovanja nekaterih rastlinskih proteinaznih inhibitorjev na ekstracelularne

encime ter na rast in razvoj fitopatogenih mikroorganizmov. Npr. tripsinski inhibitor iz semen koroze zavira rast hif ter razmnoževanje konidijev številnih fitopatogenih gliv, npr. *Aspergillus flavus* (Chen in sod., 1999); tripsinski inhibitor iz semen ajde pa zavira proteinazno aktivnost glive *Alternaria alternata* ter germinacijo spor in rast micelija fitopatogene glive *F. oxysporum*. (Valueva in Mosolov, 2004).

Izolirani so bili številni rastlinski inhibitorji mikrobnih proteinaz. Prvi takšen je bil izoliran iz ječmena (*Hordeum vulgare* L.) in zavira proteinazno aktivnost *Aps. oryzae*, *Bacillus subtilis* ter nekaterih drugih mikrobov (Mikola in sod., 1971, cit. po Valueva in Mosolov, 2004). Iz buče (*Cucurbita maxima* L.) je bil izoliran aspartatni proteinazni inhibitor, ki zavira aktivnost pepsina in ekstracelularne aspartatne proteinaze glive *Glomerella cingulata* (Christeller in sod., 1998); iz kostanja (*Castanea sativa* L.) je bil izoliran cistatin s protiglivno aktivnostjo, zavira pa tudi rast patogena *Botrytis cinerea* (Pernas, 1999); iz prosa (*Pennisetum glaucum* L.) je bil izoliran cisteinski proteinazni inhibitor, tudi s protiglivno aktivnostjo (Joshi in sod., 1999) ipd.

Pri številnih virusih imajo cisteinske proteinaze pomembno vlogo pri procesiranju proteinov, zaradi česar so cisteinski proteinazni inhibitorji zelo zanimivi za preučevanje in razvoj učinkovitega zatiranja številnih rastlinskih in živalskih virusnih boleznih (Gorbalenya in sod., 1996, cit. po Valueva in Mosolov, 2004). V ta namen je bil vzgojen transgeni tobak (*Nicotiana tabacum* L.) z genom za rastlinski cisteinski proteinazni inhibitor orizacistatin I - iz semen riža ga je leta 1987 izoliral Abe s sod., kasneje so podobno izolirali tudi orizacistatin II (Kondo in sod., 1992) -, s povečano odpornostjo na virus jedkanja tobaka (ang. Tobacco etch virus ali TEV) in krompirjev virus Y (ang. Potato virus Y ali PVY) (Gutierrez-Campos in sod., 1999, cit. po Valueva in Mosolov, 2004). Orizacistatini (I in II) zavirajo replikacijo živalskih virusov iz družine picornavirusov (Kondo in sod., 1992).

Podobno so bile vzgojene številne transgene rastline z izraženimi geni za proteinazne inhibitorje oz. s povečano odpornostjo na insekte (Valueva in sod., 2001, cit. po Habib in Fazili, 2007). Insekti, ki povzročajo največ gospodarske škode prihajajo iz redov Diptera, Coleoptera in Lepidoptera. Za razgradnjo proteinov v prebavnem sistemu uporabljajo

serinske in cisteinske proteinaze, zaradi česar so transgene rastline izražale gene bodisi za serinske ali cisteinske proteinazne inhibitorje (Boulter, 1993, cit. po Habib in Fazili, 2007); vzgojen jr bil npr. transgeni tobak (*Nicotiana tabacum* L.) z rezistenco na tobakov veščec (*Manduca sexta* Johannsen) (Hilder in sod., 1987, cit. po Valueva in Mosolov, 2004), transgeni grah (*Pisum sativum* L.) z rezistenco na grahov rilčkar (*Bruchus pisorum* L.) (Roger in sod., 2000), transgeni krompir (*Solanum tuberosum* L.) z rezistenco na ogrčice ter insekte iz redu Coleoptera (Cowgill in sod., 2002, cit. po Habib in Fazili, 2007), transgena paradižnik (*Solanum lycopersicum* L.) in repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) z genom za orizacistatin I in rezistenco na nematode (Urwin in sod., 1995) ipd.

### 2.7.2 Glivni proteinski proteinazni inhibitorji

Glivne proteinaze so pomembne pri fiziologiji, morfogenezi in metabolizmu gliv; z razgradnjo mrtvega organskega materiala oskrbujejo z nutrienti saprofitne in mikorizne glive, pri patogenih glivah pa so virulentni faktorji. Kljub temu, da so raziskave proteolitske aktivnosti gliv maloštevilne, so iz micelijev nekaterih bazidiomicet izolirali ali opisali različne proteinaze, pri čemer so zastopani vsi štirje katalitski tipi: serinski, aspartatni, metaloproteinazni in domnevno tudi cisteinski tip proteinaz (Sabotič in sod., 2007b).

Raziskave na glivnih proteinskih proteinaznih inhibitorjih in njihovi vlogi pri kontroli endogenih procesov so tudi maloštevilne. Do danes izolirani in opisani proteinazni inhibitorji so: inhibitor endogene serinske proteinaze A iz bukovega ostrigarja (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) Quél.) (Dohmae in sod., 1995, cit. po Sabotič, 2007b), tripsinski/kimotripsinski inhibitor iz užitnega nazobčanca (*Lentinus edodes* (Berk.) Singer.) (Odani in sod., 1999), klitocipin, specifični cisteinski proteinazni inhibitor (Brzin in sod., 2000) in knispin, eden izmed serinskih proteinaznih inhibitorjev CnSPI (ang. *Clitocybe nebularis* serine protease inhibitors) (Avanzo in sod., 2009), oba iz poprhnjene livke ali meglenke (*C. nebularis* (Batsch) Quél.) ter makrocipini, družina cisteinskih proteinaznih inhibitorjev iz orjaškega dežnika (*Macrolepiota procera*) (Sabotič in sod., 2009).

### 2.7.2.1 Klitocipin

Klitocipin je cisteinski proteinazni inhibitor (CPI) izoliran iz micelija glive *C. nebularis* (Brzin in sod., 2000) in je prvi opisan proteinazni inhibitor pri višjih glivah. Je 34-kDa homodimer, stabilen pri visoki temperaturi ter odporen na denaturacijska sredstva in proteolitsko razgradnjo. Inhibira papain, katepsin L, katepsin B in bromelain, vendar je neaktiven proti katepsinu H, tripsinu in pepsinu A. Analiza sekvence je pokazala, da molekula monomera ni glikozilirana in ne vsebuje cisteina ali metionina, zaradi česar nima disulfidnih vezi, kar je v nasprotju z lastnostmi drugih družin cisteinskih proteinaznih inhibitorjev (Kidrič in sod., 2002). Zaradi tega je po MEROPS klasifikaciji (Rawlings in sod., 2004) klitocipin uvrščen v novo družino cisteinskih proteinaznih inhibitorjev I48 (Sabotič in sod., 2007a).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 EKSTRAKTI GLIV

##### 3.1.1 Priprava proteinskih ekstraktov gliv

Uporabljene vrste prostotrosnih gliv so bile nabrane na različnih krajih po Sloveniji v jesenskem ali spomladanskem času. Nabral jih je Jože Brzin (Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija), določila sta jih Tine Grebenc (Gozdarski inštitut Slovenije, Ljubljana, Slovenija) in Andrej Piltaver (Inštitut za sistematiko višjih gliv, Ljubljana, Slovenija). Glive so bile nato zamrznjene in shranjene pri  $-20^{\circ}\text{C}$  in/ali pri  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Preglednica sistematike uporabljenih vrst gliv prostotrosnic je prikazana v prilogi A1. Nekatere vrste gliv so užitne ali pogojno užitne, druge so strupene. Iz poddebla prostotrosnic *Basidiomycotina* so zastopani vsi trije podrazredi: listarice *Agaricomycetidae* (52 vrst gliv), nelistarice *Aphyllorphoromycetidae* (8 vrst gliv) in trebuharice *Gasteromycetidae* (4 vrste gliv). Skupno smo uporabili 64 različnih vrst gliv.

Ekstrakte gliv smo pripravili iz zamrznjenih trosnjakov. Manjše trosnjake smo odmrznili pri sobni temperaturi, večje pa s postopnim blagim segrevanjem v mikrovalovni pečici. S pomočjo ročne kuhinjske stiskalnice, ki smo jo obložili s sterilno gazo, smo iz odmrznjenih trosnjakov iztisnili sok. Za pripravo 5 ml glivnega soka smo porabili ali del večjega trosnjaka ali več manjših trosnjakov, odvisno od velikosti in sočnosti glive.

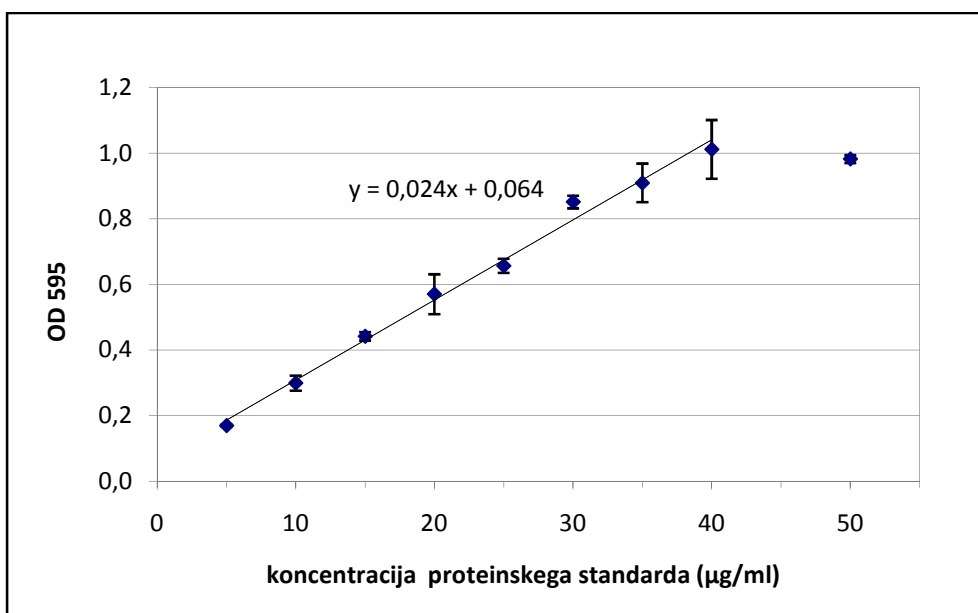
Z namenom ekstrakcije predvsem proteinskih snovi smo glivne sokove ekstrahirali s hladnim acetonom: 5 ml glivnega soka smo dodali 20 ml hladnega acetona ( $-20^{\circ}\text{C}$ ), s pomočjo vorteksa dobro premešali in inkubirali 40 min na ledu. Po končani inkubaciji smo glivne sokove centrifugirali v plastičnih epruvetah 30 min pri 4000 obratih/min in temperaturi  $4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant smo zavrgli, pelet pa prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke. Vzorce (suhi ekstrakti gliv) smo v odprtih mikrocentrifugirkah čez noč sušili v hladni sobi pri  $4^{\circ}\text{C}$  in jih nato do nadaljnjega dela zamrznili na  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Seznam pripravljenih proteinskih ekstraktov gliv z lokacijami (nabranih vrst gliv) in vrsto materiala je prikazan v Prilogi A2.

### 3.1.2 Določanje koncentracije proteinov po metodi Bradford

Ekstraktom gliv smo določili koncentracijo proteinov s testom Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, ZDA), ki temelji na spektrofotometrični metodi določanja proteinov po Bradfordu (1976). Za pripravo umeritvene krivulje (slika 4) smo uporabili konjski serumski albumin, obravan z barvilom (Serva, Nemčija). V mikrotitrsko ploščo smo nanegli po 160  $\mu$ l predhodno pripravljenih različnih koncentracij konjskega serumskega albumina (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 in 50  $\mu$ g/ml) ter jim dodali po 40  $\mu$ l Bio-Rad reagenta (kat. št. 500-0006), vse v treh paralelakah. Za slepi vzorec smo uporabili 160  $\mu$ l 1:5 redčenega fosfatnega pufru (0,01 M PBS pufer). Mikrotitrsko ploščo smo inkubirali 15 min na sobni temperaturi. Nato smo s čitalcem mikrotitrskih plošč (Tecan Spectra Microplate Reader, ZDA) in programa Biolise 1.65 Ex116 izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 595 nm (v nadaljevanju OD<sub>595</sub>).



Slika 4: Umeritvena krivulja proteinskega standarda na podlagi katere smo določili koncentracijo proteinov ekstraktov gliv. Točke predstavljajo povprečno vrednost optične gostote posameznih koncentracij proteinskega standarda pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon.

Suhe ekstrakte gliv smo čez noč odmrznili v hladni sobi pri 4°C ter jih raztopili v 1 ml 1:5 redčenega 0,01 M PBS pufra. Raztopljene in premešane ekstrakte smo centrifugirali 3 min pri 14000 obr/min (Eppendorf 5424) in 25°C. Vzorec ekstrakta za določitev koncentracije proteinov smo vzeli iz supernatanta. Koncentracije proteinov v vzorcih glivnih ekstraktov smo določili najprej iz raztopljenih koncentriranih vzorcev, v zelo gostih vzorcih pa smo proteine določili tudi po 10-kratnem redčenju.

V mikrotitrsko ploščo smo nanесли po 5, 10 in 20 µl posameznega ekstrakta, jih s fosfatnim pufrom (0,01 M PBS, redčenim 1:5 v vodi) dopolnili do volumna 160 µl in jim dodali po 40 µl Bio-Rad reagenta. Po 15 min inkubaciji smo s čitalcem mikrotitrskih plošč (Tecan Spectra Microplate Reader, ZDA) in programom Biolise 1.65 Ex116 izmerili optično gostoto pri valovni dolžini 595 nm in iz primerjave z umeritveno krivuljo izračunali koncentracije proteinov v mg/ml.

### **3.1.3 Priprava ekstraktov za preučevanje njihovega vpliva na rast in patogenost bakterij**

Raztopljene glivne ekstrakte smo zaradi precejšnje gostote 10-krat redčili v 0,01 M PBS pufri. Ekstrakte smo filtrirali preko filtrov 4 mm Millex Syringe Filter Unit (ZDA) z 0,2 µm porami. Filtrirane ekstrakte smo do nadaljnjega dela shranili na -70°C.

Proteinski ekstrakti gliv uporabljeni pri preučevanju vpliva na rast in patogenost bakterij so prikazani v Prilogi C.

### **3.1.4 Druge testirane snovi**

Poleg pripravljenih proteinskih ekstraktov gliv smo uporabili tudi 6 proteinskih ekstraktov iz laboratorija Odseka za biotehnologijo, Inštituta Jožef Stefan, Ljubljana, z oznakami G15 (proteinski ekstrakt iz mlečnic), G19 (*Tricholoma bufonium*), G27 (*Clitocybe geotropa*), D (tripsinski inhibitor iz meglenke), G (papainski inhibitor iz krompirja) in H (papainski inhibitor iz meglenke) (Priloga C).

## 3.2 GOJENJE BAKTERIJ

### 3.2.1 Bakterije, gojišča in pufri

Uporabili smo bakterijske kulture *Erwinia amylovora* (Burrill, 1882) Winslow et al. 1920, sev NCPPB 683, *Erwinia chrysanthemi* (Burkh.) Young et al. 1978 sin. *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973, sev NCPPB 402 in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Dodge, 1920) Dye 1978, sev NCPPB 2573.

Bakteriji *E. amylovora* in *E. chrysanthemi* smo tekom poskusov vzdrževali v čisti kulturi na trdnem King B gojišču pri temperaturi 25°C, bakterijo *X. campestris* pv. *vesicatoria* pa na trdnem Wilbrink gojišču. Kulture smo precepljali vsaj vsake 7 dni.

Trdno gojišče King B smo uporabili za izolacijo in namnoževanje bakterijskih kultur *Erwinia amylovora* in *Erwinia chrysanthemi*. Tekoče gojišče King B smo uporabili za spremljanje rasti bakterij z merjenjem absorbance in za spremljanje rasti bakterij z merjenjem absorbance v prisotnosti ekstraktov gliv za kulture *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi* in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* ter za preverjanje vpliva ekstraktov na patogenost bakterij s pomočjo testa patogenosti za kulture *E. amylovora* in *E. chrysanthemi*.

Trdni gojišči YPGA in Wilbrink smo uporabili za namnoževanje bakterijske kulture *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* tekom spremljanja rasti bakterije z merjenjem absorbance v prisotnosti ekstraktov gliv.

Pripravili smo tekoči gojišči King B in YPGA, za pripravo trdnih gojišč smo dodali še agar. Za pripravo vseh gojišč in pufra smo uporabili deionizirano vodo, dobljeno s sistemom Milli QUF Plus (Millipore, ZDA).

## 3.2.1.1 Gojišče King B

Sestava tekočega gojišča:

proteozni pepton (Oxoid, L85)	20 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Kemika/Merck)	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O (Kemika/Merck)	1,5 g
glicerol (Difco glicerol 228220)	15 ml (18,9 g)
voda	1000 ml

## 3.2.1.2 Gojišče YPGA

Sestava tekočega gojišča:

kvasni ekstrakt (Difco, 0127)	5,0 g
proteozni pepton (Oxoid, L85)	5,0 g
glukoza	10,0 g
voda	1000 ml

## 3.2.1.3 Gojišče Wilbrink

Sestava trdnega gojišča:

proteozni pepton (Oxoid, L85)	5,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Kemika/Merck)	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O (Kemika/Merck)	0,25 g
saharoza	10,0 g
agar (Oxoid, tehnični)	18,0 g
voda	1000 mL

Z dodajanjem 1 M NaOH raztopine smo gojiščem umerili pH, gojišču King B na vrednost 7,0-7,2, gojišču YPGA na 7,2-7,4, gojišču Wilbrink pa na 7,0. Pollitrne steklenice z gojišči smo avtoklavirali 15 min pri 121°C in pritisku  $2,34 \times 10^5$  Pa. Tekoča gojišča smo do nadaljne uporabe shranili neprodušno zaprta v steklenicah pri sobni temperaturi. Trdna gojišča smo razlili v petrijevke.

#### 3.2.1.4 Fosfatni pufer (0,01 M PBS)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,08 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	0,4 g
NaCl	8,0 g
voda	1000 ml

Pufri smo pH umerili na 7,2 in ga avtoklavirali 20 min pri 121°C in pritisku  $2,34 \times 10^5$  Pa. Uporabljali smo ga za določanje koncentracije proteinov glivnih ekstraktov, za pripravo bakterijskih suspenzij, za spremljanje rasti bakterij z merjenjem absorbance, za spremljanje rasti bakterij z merjenjem optične gostote v prisotnosti ekstraktov gliv ter za preverjanje vpliva ekstraktov na patogenost bakterij s pomočjo testa patogenosti.

#### 3.2.2 Določanje koncentracije bakterij po McFarlandu in s štetjem kolonij na trdnem gojišču

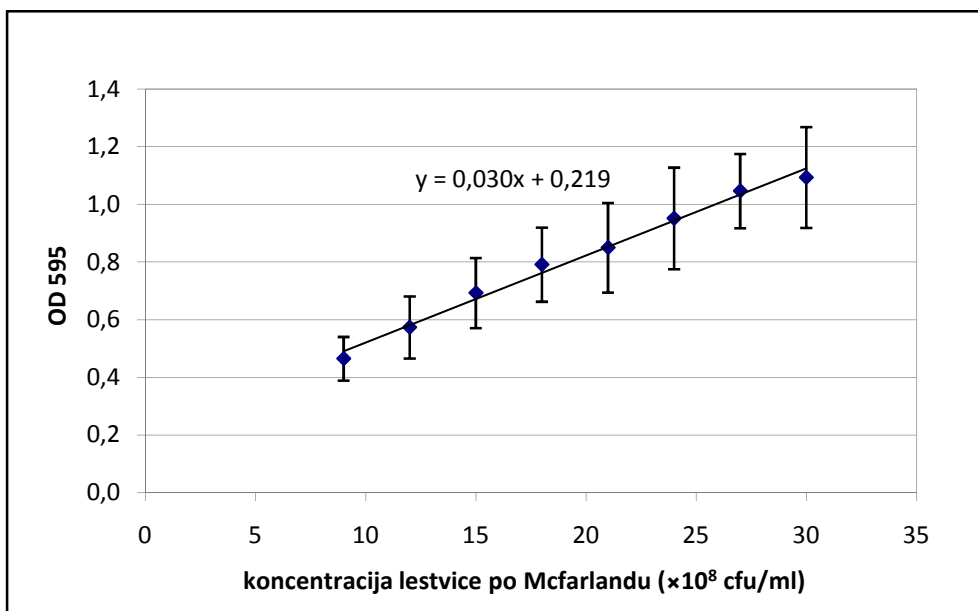
Pripravo bakterijskih suspenzij z znano koncentracijo nam je omogočala uporaba lestvice po McFarlandu – suspenzije z raztopino BaCl<sub>2</sub> v H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> z različno optično gostoto (preglednica 2). Suspenzije bakterij smo pripravili v 0,01 M PBS pufri. Najprej smo pripravili suspenzijo s približno koncentracijo  $10^8$  cfu/ml, kar je ustrezalo motnosti bakterijskih suspenzij pripravljenih po McFarlandu z oznakami od 1 do 3. Suspenzijo smo nato v istem pufri redčili do želene koncentracije.

Za grobo oceno koncentracije bakterij je temeljil postopek na vizualni primerjavi optične gostote bakterijske suspenzije s standardom po McFarlandu. Za natančnejše določanje koncentracije smo standard po McFarlandu vključili v merjenje optične gostote pri valovni dolžini 595 nm in meritve uporabili pri izračunu koncentracije v enako izmerjenih vzorcih.

Preglednica 2: Priprava raztopin za določanje koncentracije bakterij po McFarlandu

McFarlandova lestvica	1% BaCl <sub>2</sub> (ml)	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Koncentracija bakterij (x 10 <sup>8</sup> cfu/ml)
1	0.1	9.9	3.0
2	0.2	9.8	6.0
3	0.3	9.7	9.0
4	0.4	9.6	12.0
5	0.5	9.5	15.0
6	0.6	9.4	18.0
7	0.7	9.3	21.0
8	0.8	9.2	24.0
9	0.9	9.1	27.0
10	1.0	9.0	30.0

Želene koncentracije bakterijskih suspenzij smo pripravili s pomočjo umeritvene krivulje iz lestvice po McFarlandu (slika 5). Po izračunih smo dobili koncentracijo bakterij v suspenziji, to smo nato redčili do želene koncentracije, odvisno od vrste testiranja. Eksperimentalno smo določili še ponovljivost meritev na kontroli (lestvica McFarland) oz. nihanje rezultatov (slika 5). Za merjenje OD<sub>595</sub> smo uporabili spektrofotometer Tecan Genios in program Magellan 6.2.



Slika 5: Primer umeritvene krivulje McFarland standardov s pomočjo katere izračunano koncentracijo bakterij v suspenziji. Točke predstavljajo povprečno vrednost devetih ločenih meritev optične gostote posameznih suspenzij lestvice po McFarlandu pri 595 nm, pripravljenih ob različnem času. Napaka predstavlja en standardni odklon.

Število živih, za reprodukcijo sposobnih bakterijskih celic (cfu ang. colony forming unit) smo določili s štetjem kolonij na agarških ploščah, vzporedno s spremljanjem rasti bakterij z merjenjem optične gostote ter testi patogenosti. Za izračun cfu smo bakterijsko suspenzijo s koncentracijo  $10^4$  cfu/ml razmazali pet-krat po 10  $\mu$ l na trdno gojišče (King B, Wilbrink). Kolonije smo prešteli po 7 dnevni inkubaciji pri 25°C.

### 3.2.3 Spektrofotometrično spremljanje rasti bakterij

Rast bakterij smo določali spektrofotometrično z merjenjem optične gostote mikrobnih celic, kjer je bila intenziteta absorbirane svetlobe določene valovne dolžine odvisna od koncentracije celic v merjeni suspenziji. Motnost bakterijske suspenzije smo ocenjevali z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 595 nm. Pri spremljanju kinetike mikrobne rasti smo kot rezultat dobili rastno krivuljo mikrobne kulture v odvisnosti od časa.

Ker smo za metodo preverjanja protimikrobnega delovanja ekstraktov gliv uporabili mikrotitrsko ploščo in tekoče gojišče, smo najprej naredili preliminarne meritve rasti za vse tri bakterije. Eksperimentalno smo določili optimalne pogoje merjenja kinetike: najnižjo koncentracijo bakterij (cfu/ml), kjer je še opazna optimalna rast, trajanje merjenja rasti bakterij ter značilno vrednost  $OD_{595}$ , ki jo je mogoče razumeti kot rast bakterij oz. kot inhibitorno delovanje ekstraktov. Preverili smo rast bakterij s koncentracijami  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$  ter  $10^1$  cfu/ml. Kot kontrole smo uporabili suspenzije McFarland standardov in kontrolo gojišča. Shema pipetiranja na mikrotitrsko ploščo je prikazana na sliki 6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	KB + PBS
B	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	KB + PBS
C	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	KB + PBS
D	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	KB + PBS
E	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	McF $9 \times 10^8$ cfu/ml
F	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	McF $9 \times 10^8$ cfu/ml
G	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	McF $9 \times 10^8$ cfu/ml
H	McF standard	McF standard	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	izbr. konc. bakt.	McF $9 \times 10^8$ cfu/ml

McF standard = lestvica McFarland standardov

izbr. konc. bakt. = izbrana koncentracija bakterije (npr.  $10^4$  cfu/ml itd.)

KB + PBS = King B gojišče + 0,1 M PBS

McF  $9 \times 10^8$  cfu/ml = McFarland standard

Slika 6: Shema pipetiranja na mikrotitrsko ploščo za preliminarno preverjanje rasti bakterij.

V stolpca 1 in 2 smo v dve paraleli odpipetirali po 50  $\mu$ l 0,01 M PBS, 75  $\mu$ l King B gojišča in 75  $\mu$ l posamezne koncentracija McFarland suspenzije. V stolpce od 3 do 11 smo v 72 paralel odpipetirali 50  $\mu$ l 0,01 M PBS, 75  $\mu$ l King B gojišča in 75  $\mu$ l posamezne bakterije različnih koncentracij – v stolpce 3, 4 in 5 smo v 24 paralel odpipetirali bakterijo s koncentracijo  $10^4$  cfu/ml, v stolpce 6, 7 in 8 s koncentracijo  $10^5$  cfu/ml ter v stolpce 9, 10 in 11 s koncentracijo  $10^6$  cfu/ml. Negativno kontrolo smo nanesti v 4 paralele (stolpec 12) po 125  $\mu$ l 0,01 M PBS in 75  $\mu$ l King B gojišča. V štiri paralele (stolpec 12) smo še dodatno nanesti 50  $\mu$ l 0,01 M PBS, 75  $\mu$ l gojišča in 75  $\mu$ l  $9 \times 10^8$  cfu/ml McFarland suspenzije.

Plošče smo stresali na termo stresalniku (Thermo Shaker, PST-60-HL-4, Biosan) pri temperaturi 28°C in 400 obr./min. Meritve OD<sub>595</sub> smo izvajali (ročno) čez noč in tekom dneva, med 8.00 in 20.00 uro, v enournih intervalih 2 do 3 dni.



### 3.3 VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA RAST BAKTERIJ

#### 3.3.1 Spektrofotometrično spremljanje rasti bakterij v prisotnosti ekstraktov gliv

Za preverjanje vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij smo uporabili metodo spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja v mikrotitrski plošči. Z analizo rastne krivulje bakterijske kulture v odvisnosti od časa, smo določili vpliv ekstraktov na rast bakterij.

Za spektrofotometrično spremljanje rasti bakterij v prisotnosti glivnih ekstraktov smo pripravili bakterijske suspenzije *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesivatoria* v koncentraciji  $10^5$  cfu/ml in koncentracijo cfu določili z nanosom na trdna gojišča in štetjem zraslih kolonij. Testirali smo 77 ekstraktov gliv (Priloga C). Za kontrolo z antibiotikom smo uporabili streptomycin sulfat (Sigma P3664) – antibiotik s širokim spektrom delovanja, ki v dovolj visoki koncentraciji deluje baktericidno. Shema pipetiranja na mikrotitrsko ploščo je bila za vse tri bakterije enaka in je prikazana na sliki 7.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	PK	PK	PK	PK
B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	PK	PK	PK	PK
C	E	E	E	E	E	E	E	E	PK	PK	PK	PK
D	E	E	E	E	E	E	E	E	PK	PK	PK	PK
E	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	Ks	Ks	McF	McF
F	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	E+B	Ks	Ks	McF	McF
G	E	E	E	E	E	E	E	E	Ks	Ks	McF	McF
H	E	E	E	E	E	E	E	E	Ks	Ks	McF	McF

E+B = glivni ekstrakt + bakterija

E = glivni ekstrakt

PK = pozitivna kontrola

Ks = kontrola z antibiotikom streptomycin sulfatom

McF = standard po McFarlandu  $30 \times 10^8$  cfu/ml

Slika 7: Shema pipetiranja na mikrotitrsko ploščo za spremljanje rasti bakterij v prisotnosti ekstraktov gliv.

V del mikrotitrne plošče (E+B) smo v dve paraleli nanesti po 75  $\mu$ l King B gojišča, 42,5  $\mu$ l 0,1 M PBS pufra, 7,5  $\mu$ l glivnega ekstrakta in 75  $\mu$ l bakterijske suspenzije. Za kontrolo ekstrakta (E) smo nanesti v dve paraleli po 75  $\mu$ l King B gojišča, 117,5  $\mu$ l 0,1 M PBS pufra in 7,5  $\mu$ l glivnega ekstrakta. V šestnajst paralel smo za pozitivno kontrolo (PK) nanesti po 75  $\mu$ l King B gojišča, 50  $\mu$ l 0,1 M PBS pufra in 75  $\mu$ l bakterijske suspenzije. Za kontrolo z antibiotikom (Ks) smo v osem paralel nanesti po 75  $\mu$ l King B gojišča, 49  $\mu$ l 0,1 M PBS pufra, 1  $\mu$ l antibiotika streptomycin sulfata (založna koncentracija 10mg/ml, končna koncentracija 50  $\mu$ g/ml; Sigma, P3664) ter 75  $\mu$ l bakterijske suspenzije.  $30 \times 10^8$  cfu/ml suspenzije McFarland (McF) smo nanesti v osem paralel po 200  $\mu$ l.

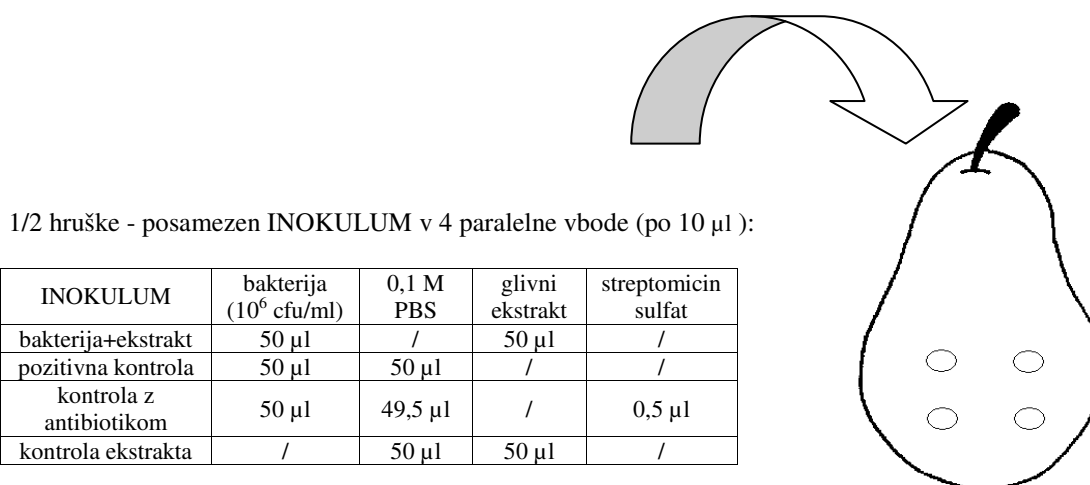
Plošče smo stresali na termo stresalniku pri temperaturi 28°C in 400 obr./min, dva dni in pol. Meritve OD<sub>595</sub> smo izvajali čez dan, med 8.00 in 20.00 uro, v intervalih na 2 uri. Slike rezultatov vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij v tekočem gojišču prikazujejo povprečne vrednosti OD<sub>595</sub> bakterije in ekstrakta (OD<sub>595</sub> ekstrakta ni odšteta).

### 3.4 VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA PATOGENOST BAKTERIJ

Vpliv ekstraktov na patogenost bakterij smo želeli preveriti *in vivo*, za kar smo uporabili uveljavljene teste patogenosti na delih gostiteljskih rastlin, opisane za bakteriji *E. amylovora* in *E. chrysanthemi*. Vzporedno smo skušali oceniti tudi ali so testi patogenosti primerni za tovrstno preverjanje.

#### 3.4.1 Testi patogenosti *E. amylovora* v prisotnosti ekstraktov gliv

Patogenost bakterije hruševega ožiga *E. amylovora* se najpogosteje potrjuje z inokulacijo majhnih nezrelih hrušk (OEPP/EPPO, 2004). Hruške smo dobili iz neokuženega nasada (Lešnik, Univerza v Mariboru), do uporabe smo jih hranili v hladilniku. Posamezen ekstrakt smo nanesti na polovico hruške v štiri paralelne inokulacijske vbode. Podobno smo nanesti na ločene polovice hrušk kontrole ekstraktov, pozitivno kontrolo in kontrolo z antibiotikom streptomycin sulfatom (slika 8). Na hruškah smo testirali vseh 77 ekstraktov gliv (Priloga C) v štirih serijah (brez ponovitev) po shemi, kot je prikazano v preglednici 3.



Slika 8: Načrt nanosa posameznega inokuluma na polovico hruške v štiri paralelne vbode.

Preglednica 3: Shema testiranja ekstraktov gliv na polovicah hrušk po serijah.

TEST PATOGENOSTI NA HRUŠKAH PO SERIJAH				
INOKULUM	SERIJA 1 (ekstrakti 1-16)	SERIJA 2 (ekstrakti 17-34)	SERIJA 3 (ekstrakti 35-52)	SERIJA 4 (ekstrakti 53-H)
bakterija+ekstrakt	✓	✓	✓	✓
pozitivna kontrola	✓	✓	✓	✓
kontrola z antibiotikom	/	✓	✓	✓
kontrola ekstrakta	✓	/	/	/

Za inokulacijo hrušk smo pripravili bakterijsko suspenzijo *E. amylovora* v koncentraciji 10<sup>6</sup> cfu/ml, z nanosom na trdno gojišče smo določili dejansko koncentracijo cfu. Hruške smo inokulirali z mešanico bakterije in ekstraktov (50 µl bakterijske suspenzije in 50 µl ekstrakta), s kontrolami ekstraktov (50 µl ekstrakta in 50 µl 0,1 M PBS), s pozitivno kontrolo (50 µl bakterijske suspenzije in 50 µl 0,1 M PBS pufra) in kontrolo z antibiotikom, ki je vsebovala 50 µl bakterijske suspenzije, 49,5 µl 0,1 M PBS in 0,5 µl antibiotika (streptomicin sulfat, Sigma P3664).

Sadeže smo površinsko sterilizirali s 70% etanolom, jih posušili v laminariju, razrezali na polovice ter jih dali v petrijeve posode na vlažen filter papir. S konico nastavka pipete smo naredili na površini približno 5 mm globoko luknjico. Vanjo smo vnesli 10 µl inokuluma. V vsako polovico hruške smo naredili 4 paralelne inokulacijske vbode. Inokulirane sadeže

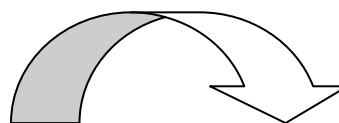
smo pokrili z alufolijo in inkubirali pri 28°C, ter 70% relativni zračni vlagi. Razvoj bolezenskih znamenj smo ocenili drugi, tretji in peti dan po inokulaciji.

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili program R Statistical (R Development Core Team, 2008; www.statmethods.net), paket Pvclost (Suzuki in Shimodaira, 2006) s pomočjo katerega smo podatke zbrali v skupke (klastre) z metodo vezanja. Paket Pvcclust izračuna verjetnost vsakega skupka po metodi ponavljajočega vezanja (angl. bootstrap resampling) in sicer vrednosti AU (angl. approximately unbiased) in BP (angl. bootstrap probability). Podatke smo razvrstili po podobnosti razvoja bolezenskih znamenj in jih prikazali v obliki tabele in klasterkega dendrograma.

### 3.4.2 Testi patogenosti *E. chrysanthemi* v prisotnosti ekstraktov gliv

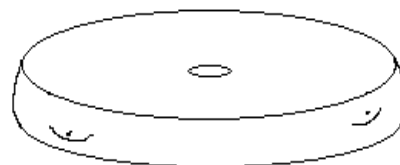
Patogenost bakterije *E. chrysanthemi* lahko potrjujemo z okuževanjem gomoljev krompirja na kateri povzroča gnilobo (Lelliot in Stead 1987; De Boer in Kelman, 2001).

Posamezen ekstrakt smo nanесли na rezino krompirja v nekaj mm globoko luknjico. Podobno smo nanесли kontrole ekstraktov, pozitivno kontrolo, kontrolo z antibiotikom streptomycin sulfatom ter kontrolo s pufrom (slika 9). Na rezinah krompirja smo testirali vseh 77 ekstraktov gliv (priloga C) v petih serijah po shemi, kot je prikazano v preglednici 4.



rezina krompirja - posamezen INOKULUM (25 µl) v 1 vbod:

INOKULUM	bakterija (10 <sup>6</sup> cfu/ml)	0,1 M PBS	glivni ekstrakt	streptomycin sulfat
bakterija+ekstrakt	50 µl	/	50 µl	/
pozitivna kontrola	50 µl	50 µl	/	/
kontrola z antibiotikom	50 µl	49,5 µl	/	0,5 µl
kontrola ekstrakta	/	50 µl	50 µl	/
kontrola s pufrom	/	50 µl	/	/



Slika 9: Načrt nanosa posameznega inokuluma na rezino krompirja.

Preglednica 4: Shema testiranja ekstraktov gliv na rezinah krompirja po serijah.

TEST PATOGENOSTI NA KROMPIRJU PO SERIJAH					
INOKULUM	SERIJA 1 (ekstrakti 1-16)	SERIJA 2 (ekstrakti 17-34)	SERIJA 3 (ekstrakti 35-54)	SERIJA 4 (ekstrakti 55-H)	SERIJA 5 (ponovitev, ekstrakti 1-H)
bakterija+ekstrakt	✓	✓	✓	✓	✓
pozitivna kontrola	✓	✓	✓	✓	/
kontrola z antibiotikom	/	✓	✓	✓	/
kontrola ekstrakta	✓	✓	✓	✓	/
kontrola s pufrom	✓	✓	✓	✓	/
	test 1				test 2

Za inokulacijo gomoljev krompirja smo pripravili bakterijsko suspenzijo *E. chrysanthemi* v koncentraciji  $10^6$  cfu/ml, z nanosom na trdno gojišče smo določili dejansko koncentracijo cfu. Gomolje smo inokulirali z mešanico bakterije in ekstraktov, s pozitivno kontrolo, kontrolo z antibiotikom, s kontrolo ekstrakta ter z 0,1 M PBS pufrom. Vse inokulume smo namešali v mikrotitrski plošči. Inokulum bakterije z glivnim ekstraktom je vseboval 50  $\mu$ l bakterije in 50  $\mu$ l ekstrakta. Pozitivna kontrola je vsebovala 50  $\mu$ l bakterije in 50  $\mu$ l 0,1 M PBS pufra. Kontrola z antibiotikom je vsebovala 50  $\mu$ l bakterije, 49,5  $\mu$ l 0,1 M PBS in 0,5  $\mu$ l antibiotika (streptomycin sulfat, Sigma P3664). Za kontrolo ekstrakta smo namešali 50  $\mu$ l ekstrakta in 50  $\mu$ l 0,1 M PBS pufra.

Gomolje krompirja smo dobro oprali, površinsko sterilizirali s 70 % etanolom, posušili v laminariju in prečno narezali na približno 5 mm debele rezine. Vsako rezino smo položili na navlažen filter papir v petrijevki. S konico nastavka pipete smo na površini naredili nekaj mm globoko luknjico. Vanjo smo nanесли 25  $\mu$ l inokuluma. Petrijevke smo oblepili s parafilmom in inkubirali pri 25°C, tri dni. Razvoj bolezenskih znamenj smo ocenili drugi in tretji dan. Tretji dan smo rezine krompirja tudi stehali ter določili utežni delež zdravega in razgrajenega tkiva.

Za ponovitev testa patogenosti smo uporabili inokulume, ki smo jih imeli po testu 1 shranjene brez dodanega glicerola, mesec dni na - 20°C. Ponovili smo le inokulacijo rezin krompirjev z mešanico bakterije in ekstraktov.

## 4 REZULTATI

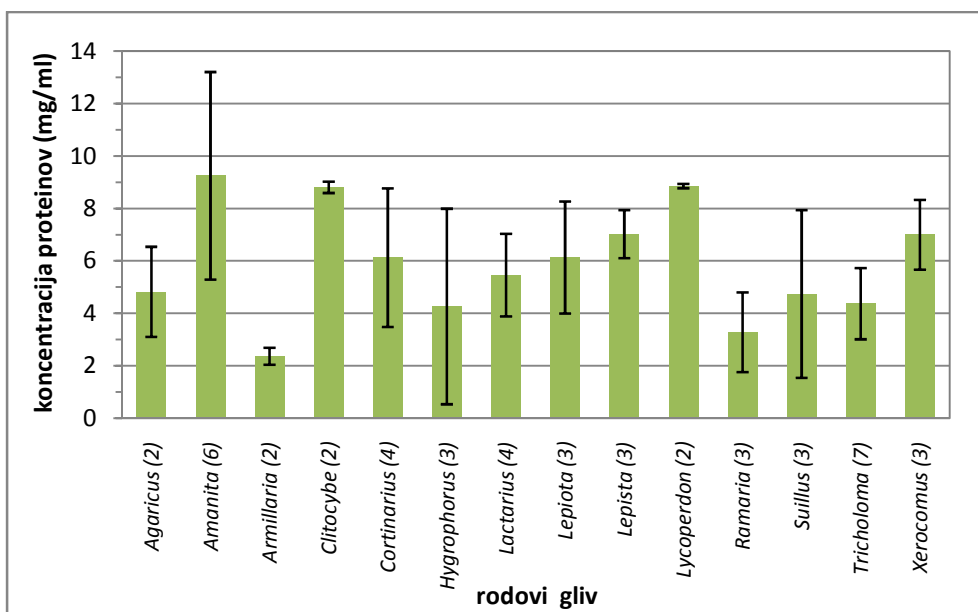
### 4.1 EKSTRAKTI GLIV

Seznam pripravljenih proteinskih ekstraktov gliv je prikazan v Prilogi A2. Proteinski ekstrakti gliv, uporabljeni pri preučevanju vpliva na rast in patogenost bakterij so v prikazani v Prilogi C.

#### 4.1.1 Koncentracija proteinov ekstraktov gliv

Ekstraktom gliv smo določili koncentracijo proteinov z metodo po Bradfordu, s testom Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, ZDA). Rezultati so prikazani v prilogi B. Preglednica prikazuje oceno koncentracije proteinov (mg/ml) v končnem ekstraktu, pripravljenem iz 5 ml glivnega soka. Ker smo ekstrakte gliv pripravili z enojno precipitacijo proteinov s hladnim acetonom (glivni sok smo obarjali le enkrat), pri tem nismo odstranili popolnoma vseh primesi (soli, lipidi), kar je vplivalo na natančnost določanja koncentracije proteinov, saj je metoda po Bradfordu občutljiva na številne kemijske snovi, ki povzročajo velika odstopanja.

Ocene koncentracij proteinov v ekstraktih so različne, v povprečju  $5,87 \pm 2,6$  mg/ml. Najnižjo koncentracijo proteinov ( $0,28 \pm 0,3$  mg/ml) je imel ekstrakt iz *Hygrophorus erubescens* (30), najvišjo ( $13,76 \pm 10,2$  mg/ml) pa ekstrakt iz *Amanita vaginata* (8). Razlike v koncentraciji so pričakovane tako med posameznimi vrstami prostotrosnih gliv, kot med posameznimi trosnjaki iste vrste. Iz literature je znano, da je koncentracija proteinov vezana na starost trosnjakov, vrsto in kvaliteto rastišča ter na količino razpoložljive vode v okolju.



Slika 10: Koncentracija proteinov ekstraktov gliv (metoda po Bradfordu, Bio-Rad kit) najpogosteje zastopanih rodov. Stolpec prikazuje povprečno vrednost koncentracije proteinov ekstraktov gliv posameznega rodu. Napaka predstavlja en standardni odklon. Pri posameznem rodu je v oklepaju navedeno število posameznih ekstraktov.

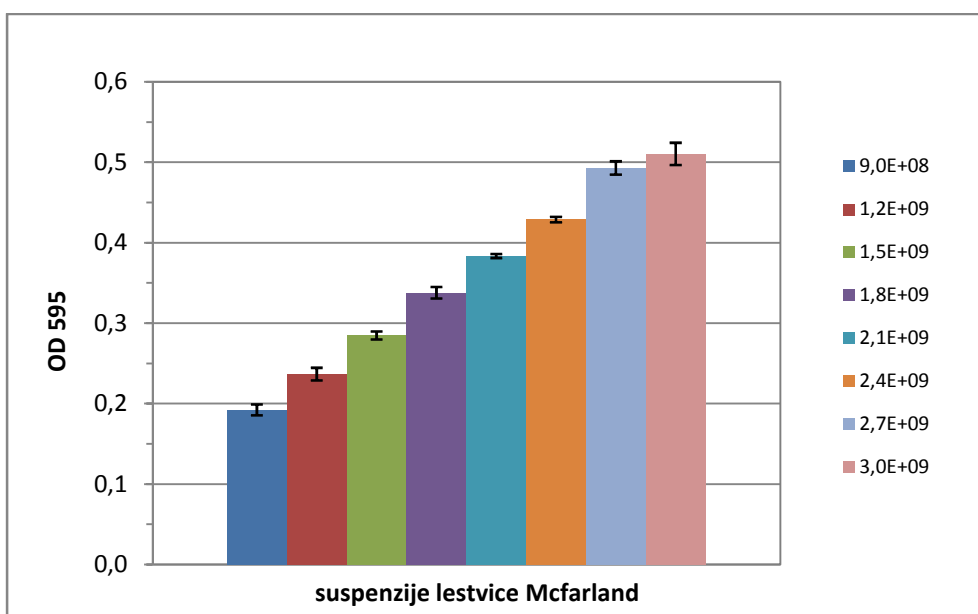
Slika 10 prikazuje koncentracijo proteinov v ekstraktih najpogosteje zastopanih rodov gliv. Največja raznolikost v koncentraciji proteinov znotraj rodu kažejo: rod mušnic *Amanita* (pet različnih ekstraktov;  $9,25 \pm 3,9$  mg/ml), polževk *Hygrophorus* (trije ekstrakti;  $4,27 \pm 3,7$  mg/ml) in lupljivk *Suillus* (trije ekstrakti;  $4,74 \pm 3,2$  mg/ml), medtem ko je najmanjša raznolikost v koncentraciji proteinov znotraj rodu prašnic *Lycoperdon* (dva ekstrakta;  $8,86 \pm 0,1$  mg/ml), livk *Clitocybe* (dva ekstrakta;  $8,81 \pm 0,2$  mg/ml) in mraznic *Armillaria* (dva ekstrakta;  $2,37 \pm 0,3$  mg/ml).

#### 4.2 PREVERJANJE METODE SPREMLJANJA RASTI BAKTERIJ Z MERJENJEM OPTIČNE GOSTOTE

Namen preliminarnih poskusov je bil eksperimentalno določiti optimalne pogoje metode spremljanja rasti bakterij z merjenjem OD<sub>595</sub>: najnižjo koncentracijo bakterij (cfu/ml), kjer je še opazna optimalna rast, trajanje merjenja rasti bakterij ter značilno vrednost OD<sub>595</sub>, ki jo je mogoče razumeti kot rast bakterij oz. kot inhibitorno delovanje ekstraktov. Zanimala nas je tudi ponovljivost meritev na kontroli – suspenzijah McFarland lestvice.

#### 4.2.1 McFarland, ponovljivost meritev na kontroli

Slika 11 prikazuje nihanje rezultatov meritev OD<sub>595</sub> na kontrolnih suspenzijah McFarland lestvice.



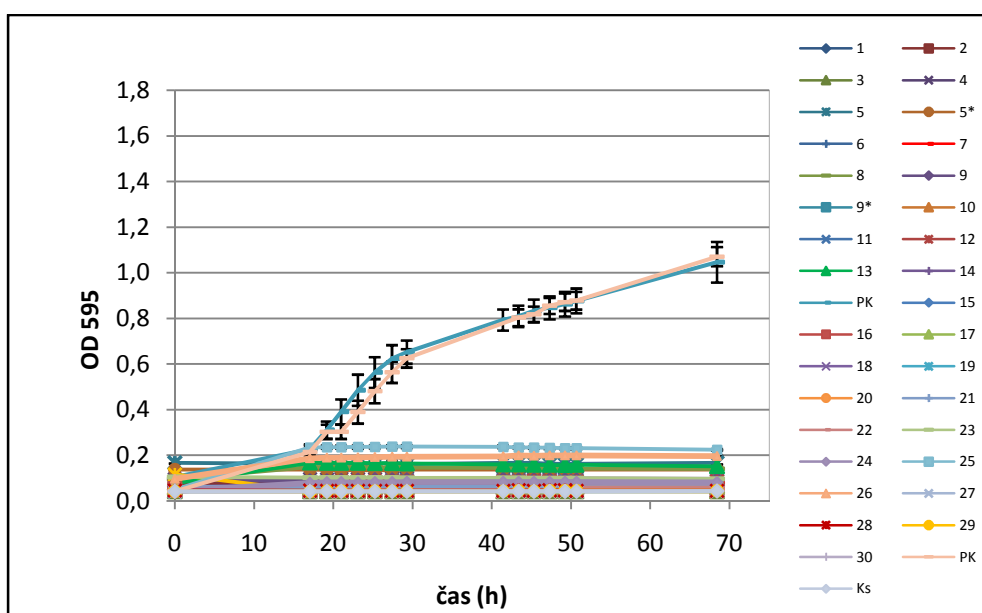
Slika 11: Povprečne vrednosti optične gostote posameznih suspenzij lestvice po McFarlandu ( $9 \times 10^8$  cfu/ml itd.) pri 595 nm. Posamezni stolpec predstavlja povprečno vrednost dvajsetih meritev optične gostote posamezne suspenzije po McFarlandu pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon.

Vrednosti OD<sub>595</sub> suspenzij po McFarlandu so imele tekom meritev pričakovano nizko standardno deviacijo, v povprečju za vrednost 0,006. Nekoliko večje nihanje je kazala najgostejša suspenzija  $30 \times 10^8$  cfu/ml – vrednost standardne deviacije je 0,01 –, najbrž zaradi usedanja barijeve soli, ki moti merjenje OD.

#### 4.2.2 OD ekstraktov gliv in njihova sterilnost

Pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij v tekočem gojišču King B, smo na mikrotitrsko ploščo nanesti tudi kontrole ekstraktov. Pri vseh serijah meritev (slika 12, Priloga D) so vrednosti OD<sub>595</sub> kontrol ekstraktov ostale negativne in se tekom inkubacije niso spreminjale (zanemarljivo nizka standardna deviacija), kar kaže na to, da so bili pripravljene ekstrakti sterilni.



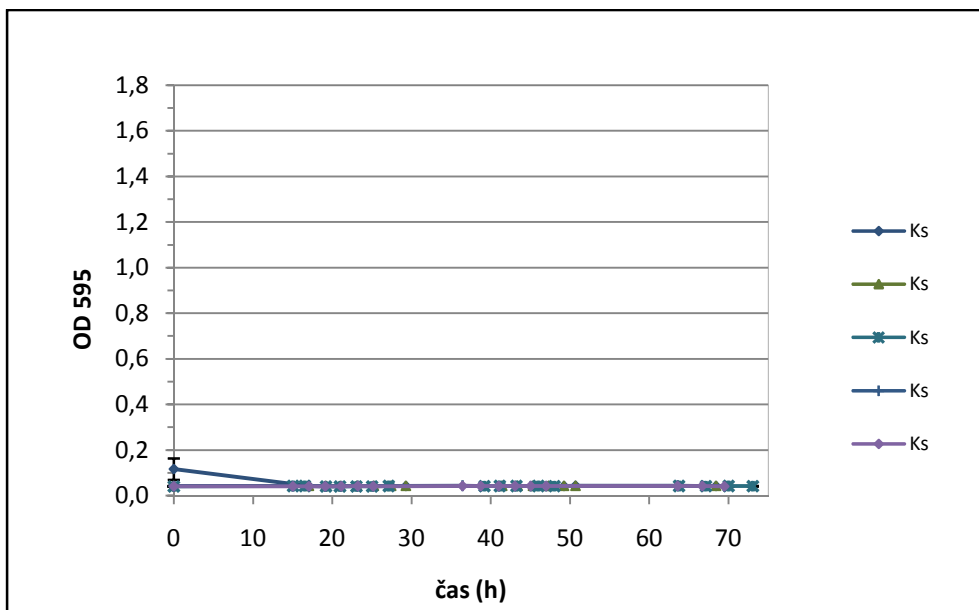


Slika 12: Primerjava krivulj ekstraktov gliv od oznake 1 do 30 (Priloga C) s krivuljami rasti *E. amylovora* – pozitivno kontrolo (PK) in kontrolo s streptomycin sulfatom (Ks) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. Standardni odkloni pri ekstraktih gliv so minimalni, zato iz grafa niso razvidni. Slike krivulj preostalih ekstraktov gliv so prikazane v prilogi D.

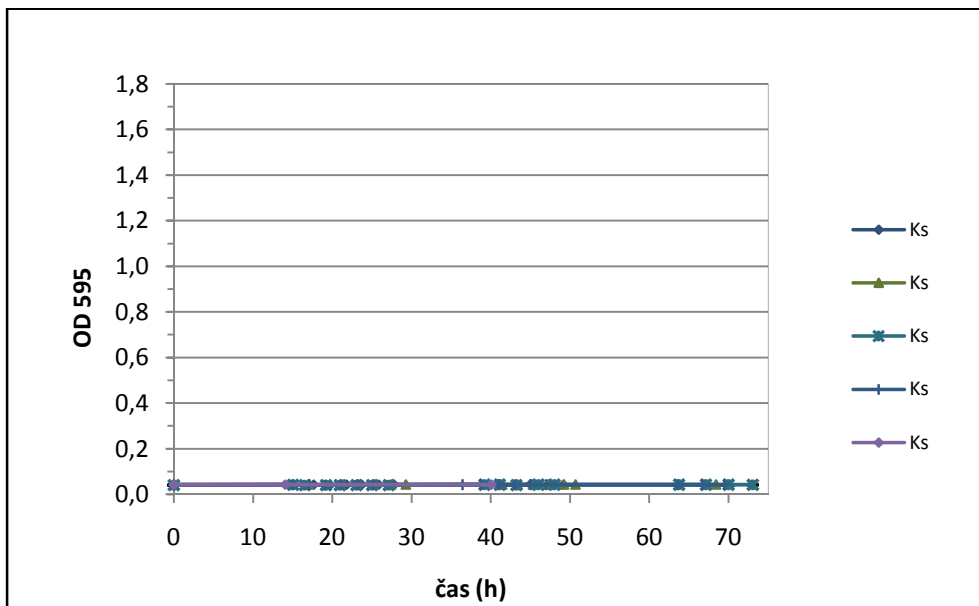
Zaradi različnih koncentracij proteinov ekstraktov gliv, so se tudi vrednosti OD<sub>595</sub> ekstraktov razlikovale, v povprečju so znašale  $0,072 \pm 0,04$ , pri čemer je najvišje vrednosti ( $0,235 \pm 0,004$ ) dosegel ekstrakt iz *Hebeloma crustuliniforme* (25), najnižje ( $0,042 \pm 0,0002$ ) pa očiščen in koncentriran pripravek, papainski inhibitor iz meglenke *C. nebularis* (H). Zanimivo je, da so ekstrakti z najvišjimi vrednostmi OD<sub>595</sub> sicer imeli koncentracijo proteinov nad povprečjem, vendar ne hkrati tudi najvišje (Priloga B, Priloga D).

#### 4.2.3 Kontrole z antibiotikom

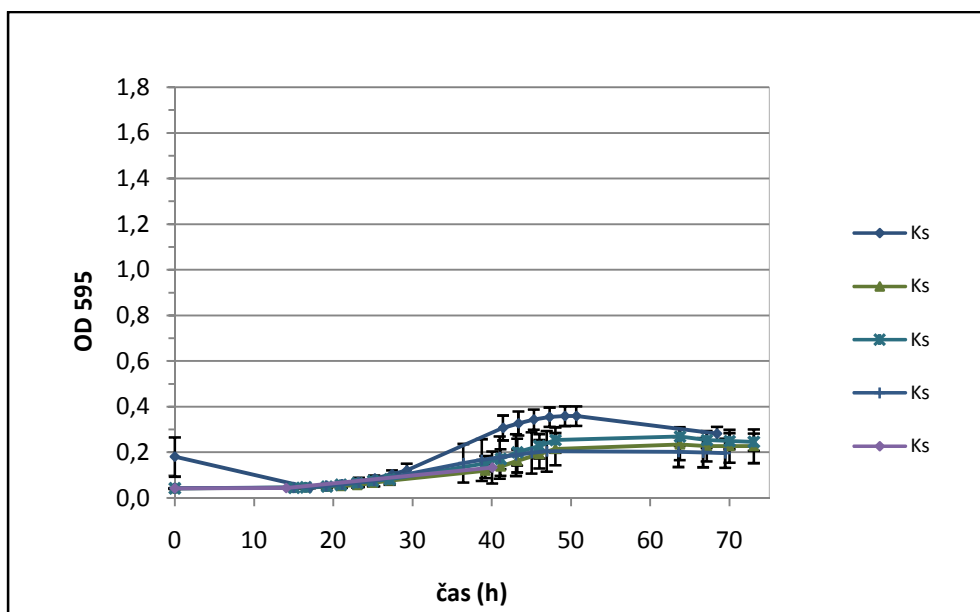
Pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij v tekočem gojišču King B, smo za kontrolo z antibiotikom (Ks) uporabili streptomycin sulfat (Sigma P3664), antibiotik s širokim spektrom delovanja, ki v dovolj visoki koncentraciji deluje baktericidno.



Slika 13: Rast bakterije *E. amylovora* z začetno koncentracijo  $10^5$  cfu/ml v prisotnosti antibiotika streptomicin sulfata (kontrola z antibiotikom, Ks; založna koncentracija 10mg/ml, končna koncentracija 50  $\mu$ g/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. Standardni odkloni pri negativnih kontrolah so minimalni, zato iz grafa niso razvidni.



Slika 14: Rast bakterije *E. chrysanthemi* z začetno koncentracijo  $10^5$  cfu/ml v prisotnosti antibiotika streptomicin sulfata (kontrola z antibiotikom, Ks; založna koncentracija 10mg/ml, končna koncentracija 50  $\mu$ g/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. Standardni odkloni pri negativnih kontrolah so minimalni, zato iz grafa niso razvidni.

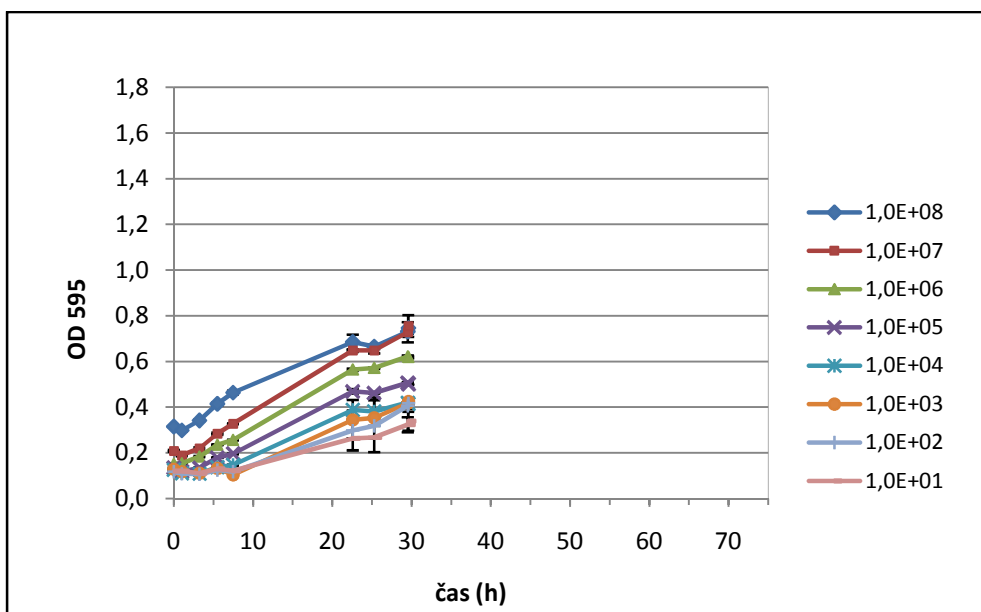


Slika 15: Rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* z začetno koncentracijo  $10^5$  cfu/ml v prisotnosti antibiotika streptomycin sulfata (kontrola z antibiotikom, Ks; založna koncentracija 10mg/ml, končna koncentracija 50  $\mu$ g/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon.

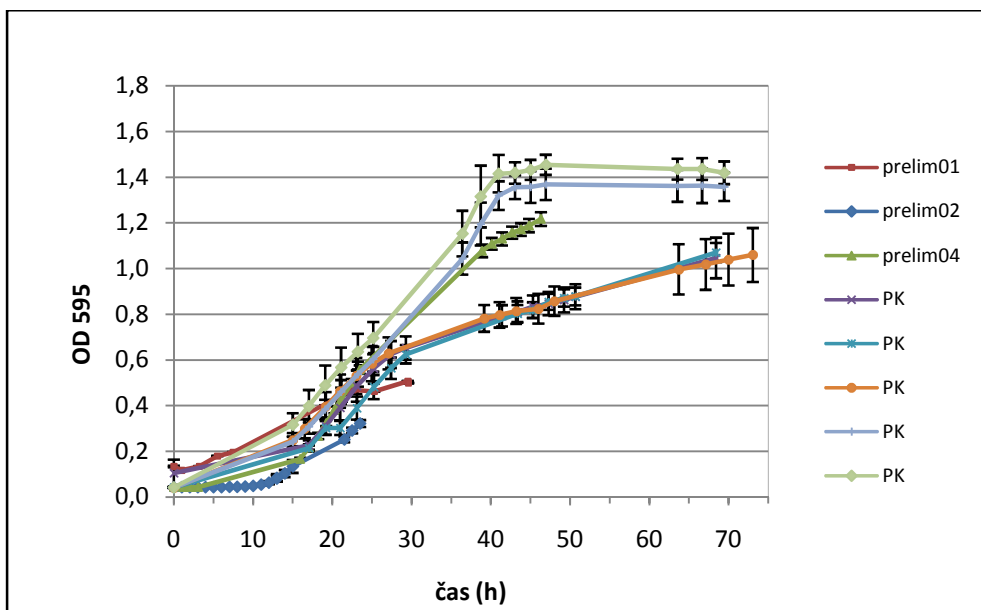
Vse serije kontrol z antibiotikom (Ks) so v primerjavi s pozitivno kontrolo, tako pri bakteriji *E. amylovora* (slika 13), kot pri *E. chrysanthemi* (slika 14), ostale ustrezno negativne (rast bakterij je bila zavrtta), standardne deviacije povprečnih vrednosti OD<sub>595</sub> so bile zanemarljivo nizke. Iz slike 15 je razvidno, da streptomycin sulfat ni uspešno zaviral rasti bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria*, kar pomeni, da je bila uporabljena koncentracija antibiotika za to bakterijo prenizka.

#### 4.2.4 Spektrofotometrično spremljanje rasti bakterij

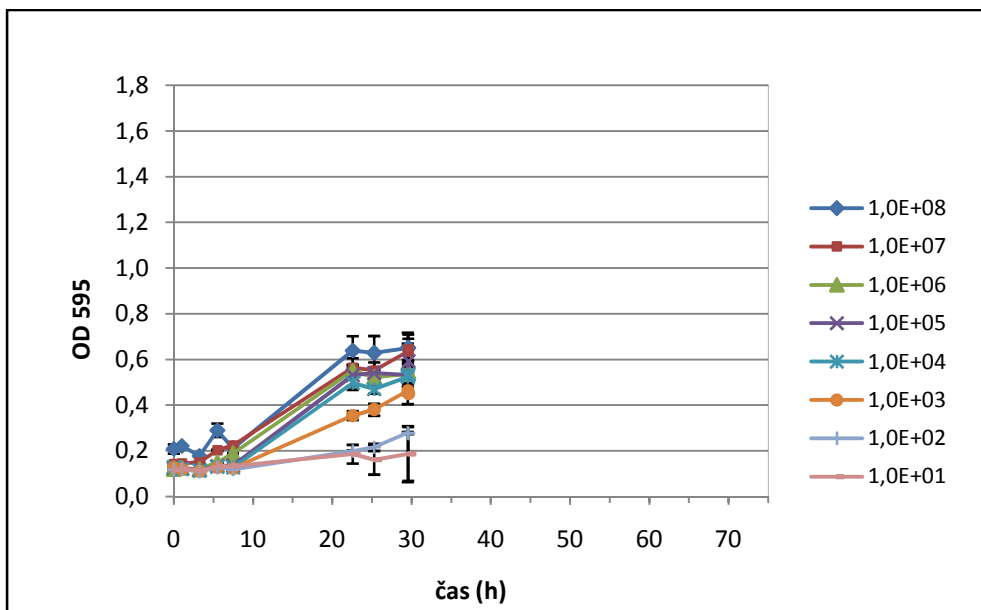
Z merjenjem optične gostote smo spremljali dinamiko rasti bakterij *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* v tekočem gojišču King B ter določili parametre optimalne izvedbe testa, predvsem najnižjo začetno koncentracijo (cfu/ml), ki še omogoča časovno primerno izvedbo testa. Rezultati meritev so prikazani za vsako bakterijo posebej na slikah od 16 do 21, posamezne točke pa so zaradi boljše preglednosti podatkov povezane v krivuljo.



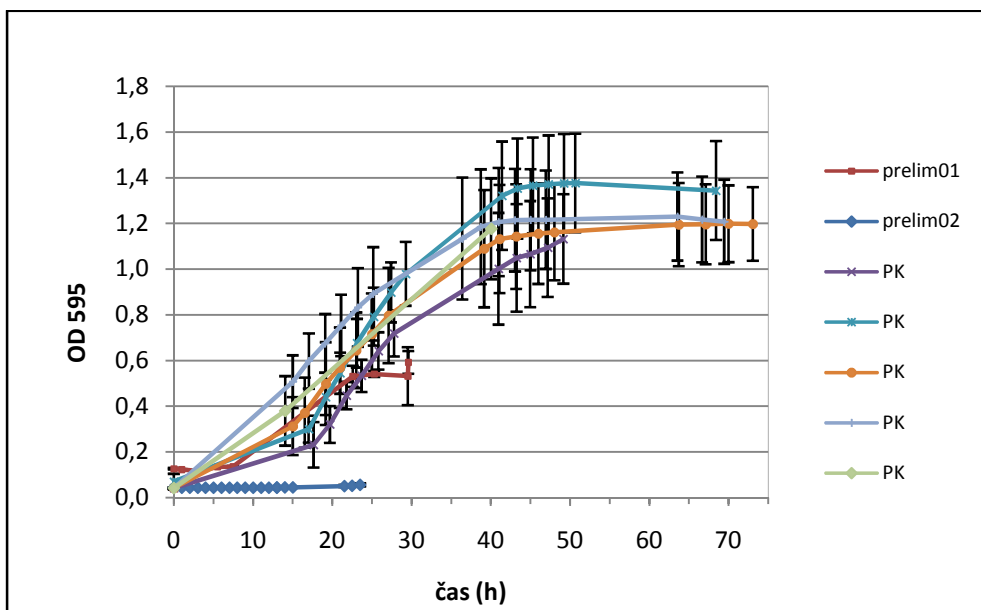
Slika 16: Rast bakterije *E. amylovora* v tekočem gojišču KB (20 h (čez noč) v hladilniku; nato 25°C, 400 obr./min) glede na različno začetno koncentracijo. Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm pri različnih začetnih koncentracijah. Napaka predstavlja en standardni odklon.



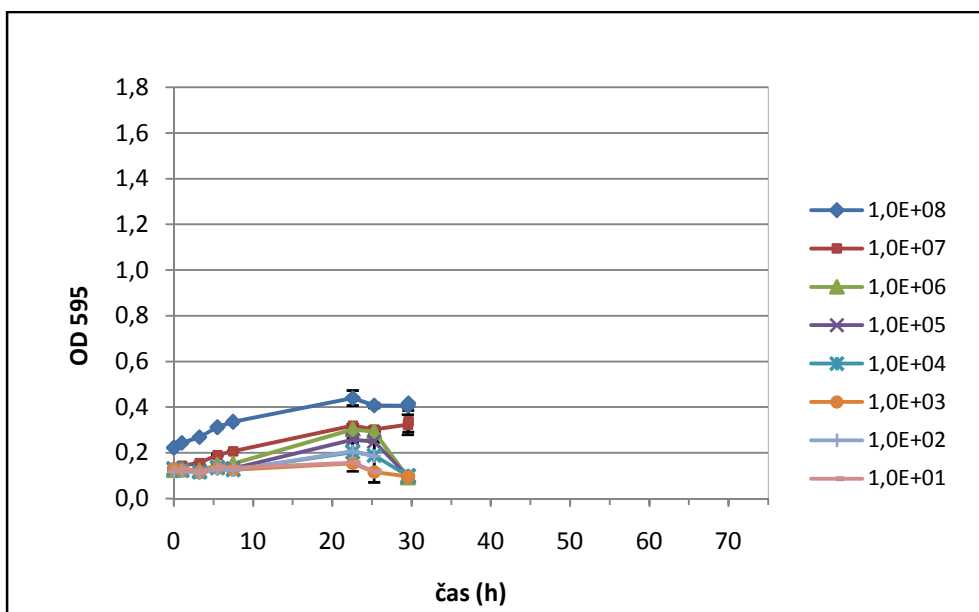
Slika 17: Rast bakterije *E. amylovora* z začetno koncentracijo 10<sup>5</sup> cfu/ml v tekočem gojišču KB. Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv na rast bakterije *E. amylovora* pri 28°C, 400 obr./min), prelim01 (rezultat rasti bakterije po 20 h (čez noč) inkubaciji v hladilniku, nato 25°C, 400 obr./min), prelim02 in prelim04 (rezultat rasti bakterije pri 28°C, 400 obr./min).



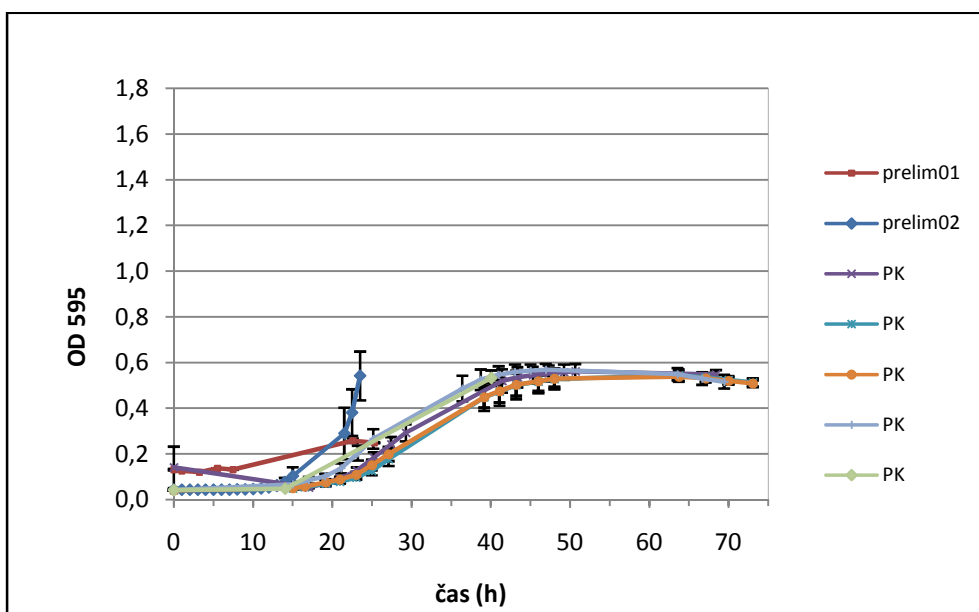
Slika 18: Rast bakterije *E. chrysanthemi* v tekočem gojišču KB (20 h (čez noč) v hladilniku; nato 25°C, 400 obr./min) glede na različno začetno koncentracijo. Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm pri različnih začetnih koncentracijah. Napaka predstavlja en standardni odklon.



Slika 19: Rast bakterije *E. chrysanthemi* z začetno koncentracijo  $10^5$  cfu/ml v tekočem gojišču KB. Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv na rast bakterije *E. chrysanthemi* pri 28°C, 400 obr./min), prelim01 (rezultat rasti bakterije po 20 h (čez noč) inkubaciji v hladilniku, nato 25°C, 400 obr./min), prelim02 (rezultat rasti bakterije pri 28°C, 400 obr./min).



Slika 20: Rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* v tekočem gojišču KB (20 h (čez noč) v hladilniku; nato 25°C, 400 obr./min) glede na različno začetno koncentracijo. Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm pri različnih začetnih koncentracijah. Napaka predstavlja en standardni odklon. Zaradi kontaminacije smo izločili točki zadnje meritve pri koncentraciji  $10^1$  cfu/ml in  $10^2$  cfu/ml.



Slika 21: Rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* z začetno koncentracijo  $10^5$  cfu/ml v tekočem gojišču KB. Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* pri 28°C, 400 obr./min), prelim01 (rezultat rasti bakterije po 20 h (čez noč) inkubaciji v hladilniku, nato 25°C, 400 obr./min), prelim02 (rezultat rasti bakterije pri 28°C, 400 obr./min).

Iz slik 16 in 17 je razvidno, da je trajala prilagoditvena faza *E. amylovora* približno 10 ur, faza aktivne rasti dan in pol z maksimalno vrednostjo  $OD_{595} 1,5 \pm 0,05$ , stacionarno fazo rastne krivulje pa je bakterija dosegla po dveh dneh. Maksimalne vrednosti  $OD_{595}$  na koncu eksponencialne faze so se pri pozitivnih kontrolah *E. amylovora* bistveno razlikovale – pozitivne kontrole z višjimi vrednostmi  $OD_{595}$  so vsebovale sveže nacepljeno bakterijsko kulturo. Prilagoditvena faza *E. chrysanthemi* je trajala podobno, približno 10 ur, faza eksponencialne rasti dan in pol z maksimalno vrednostjo  $OD_{595} 1,4 \pm 0,22$ , stacionarno fazo je bakterija dosegla po dobrih dveh dneh (slika 18 in 19). *X. campestris* pv. *vesicatoria* je imel v primerjavi z obema ervinijama nekoliko daljšo prilagoditveno fazo, ki trajala približno 15 ur, faza aktivne rasti bakterije je trajala podobno, dan in pol z maksimalno vrednostjo  $OD_{595} 0,6 \pm 0,03$ , stacionarno fazo je dosegla bakterija po dobrih dveh dneh (slika 20 in 21).

Osredotočili smo se na morebitno inhibicijo aktivno rastočih bakterij, torej eksponencialni del krivulje. Iz Slik 17, 18 in 19 je razvidno, da smo dobili pri izbranih pogojih gojenja izrisan večji del eksponencialne rastne krivulje bakterij šele po dveh dneh, zato smo meritve rasti izvajali v povprečju dva dni in pol.

Predvidevali smo, da se bo vpliv ekstraktov gliv na rast bakterij (oz. obliko rasti krivulj) v primerjavi s pozitivno kontrolo kazal bodisi kot podaljšana prilagoditvena faza ali počasnejše namnoževanje v eksponencialni fazi z nižjimi  $OD_{595}$  vrednostmi, bodisi kot izrazita inhibicija rasti bakterij. Najmanjšo spremembo v vrednosti  $OD_{595}$  v eksponencialni fazi, ki smo jo lahko vrednotili kot spremembo v rasti bakterije, smo določili vizualno. V primeru, ko se krivulja rasti posamezne bakterije z ekstraktom ni pokrivala s krivuljo pozitivne kontrole vključno z njenim standardnim odklonom, smo upoštevali, da ima ekstrakt gliv vpliv na rast bakterije.

Na podlagi rezultatov (slika 16, 18 in 20) smo za preverjanje vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij, uporabili najnižjo koncentracijo (cfu/ml), kjer je bila še opazna optimalna rast bakterij, t.j.  $10^5$  cfu/ml. Za preverjanje vpliva ekstraktov na patogenost bakterij (*in vivo* testi patogenosti *E. amylovora* in *E. chrysanthemi*) smo uporabili nekoliko višjo koncentracijo  $10^6$  cfu/ml, ki je zagotavljala razvoj znamenj bolezn.

### 4.3 VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA RAST BAKTERIJ

Vpliv 77-ih proteinskih ekstraktov gliv (Priloga C) smo za vsako bakterijo posebej preverjali v mikrotitrskih ploščah v petih serijah. Rezultati vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij v tekočem gojišču King B so za posamezne bakterije in mikrotitrskе plošče prikazani posebej na slikah od 22 do 39. Posamezne točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev OD<sub>595</sub> bakterije in ekstrakta (OD<sub>595</sub> ekstrakta ni odšteta) in so zaradi boljše preglednosti podatkov povezane v krivuljo. Pri posamezni sliki so v legendi navedene oznake ekstraktov gliv (Priloga C), pozitivna kontrola (PK) in kontrola z antibiotikom (Ks).

Kot je že omenjeno v točki 4.2.3 so vse serije kontrol z antibiotikom pri bakterijah *E. amylovora* in *E. chrysanthemi* ostale ustrezne, pri bakteriji *X. campestris* pv. *vesicatoria* pa antibiotik streptomycin sulfat ni uspešno zaviral rasti, ker je bila uporabljena koncentracije antibiotika za to bakterijo prenizka.

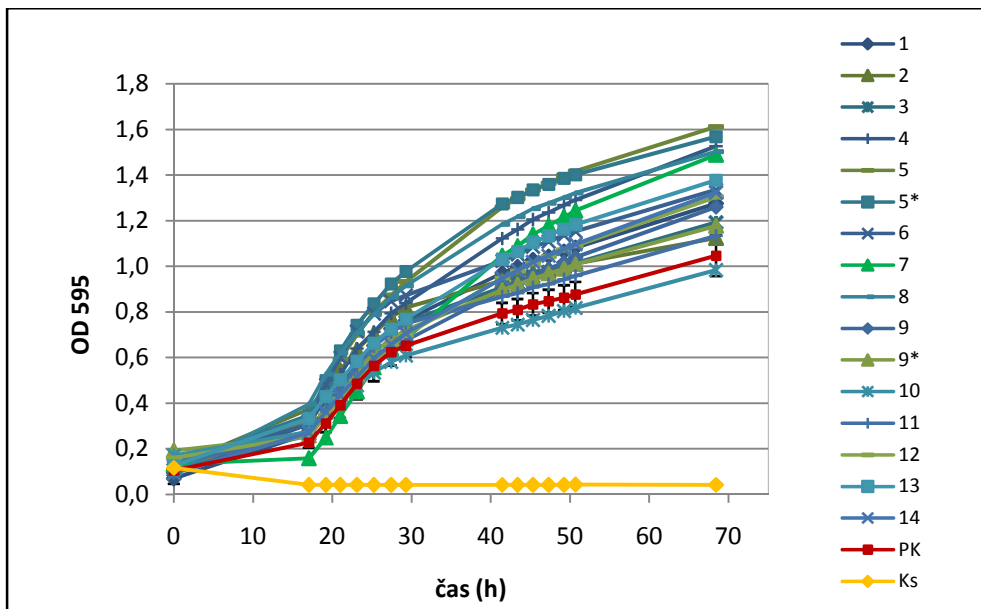
Vrednosti OD<sub>595</sub> ekstraktov gliv so v povprečju znašale  $0,072 \pm 0,04$ . Tekom meritev so vrednosti ekstraktov gliv ostajale ustrezno negativne, torej so bili ekstrakti gliv sterilni, kar je omogočalo ugotavljanje inhibitornega učinkovanja ekstraktov (poglavje 4.2.2). Vrednosti OD<sub>595</sub> suspenzij po McFarlandu so imele tekom meritev pričakovano nizko standardno deviacijo, v povprečju za vrednost 0,006 (poglavje 4.2.1).

#### 4.3.1 Vpliv ekstraktov gliv na rast bakterije *Erwinia amylovora*

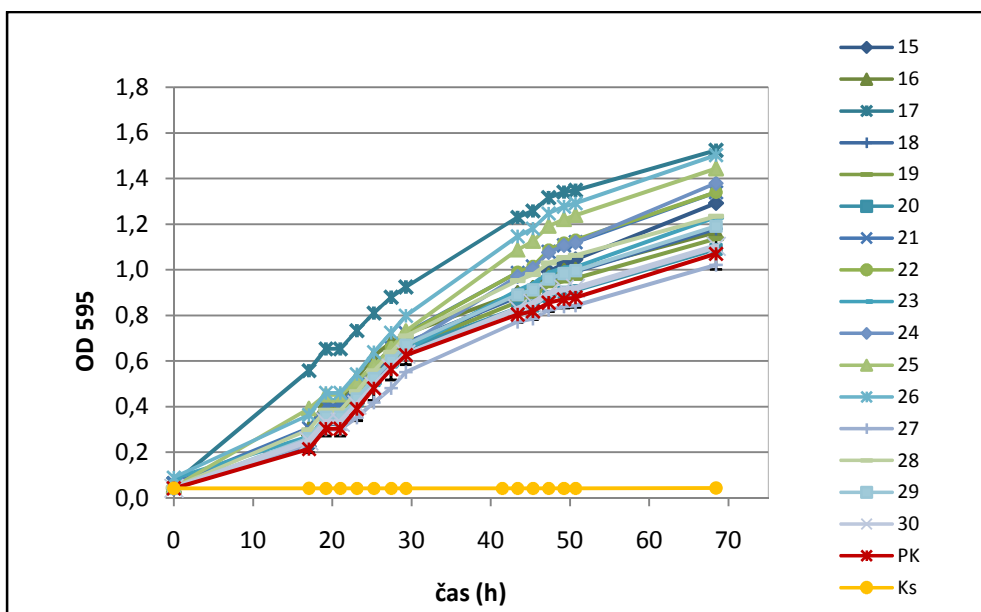
Na slikah od 22 do 27 so prikazani rezultati vpliva ekstraktov gliv na rast bakterije *E. amylovora* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču King B. Med posameznimi serijami meritev je velika razlika v obliki rastnih krivulj, ki je verjetno posledica različne svežosti bakterijske kulture, zaradi sprememb v zasnovi poskusa. Mikrotitrskе plošče četrte (slika 25) in pete serije (slika 26) so vsebovale sveže nacepljeno bakterijsko kulturo, zaradi česar so bile tu vrednosti OD<sub>595</sub> bistveno višje od vrednosti prve (slika 22), druge (slika 23) in tretje serije meritev (slika 24).



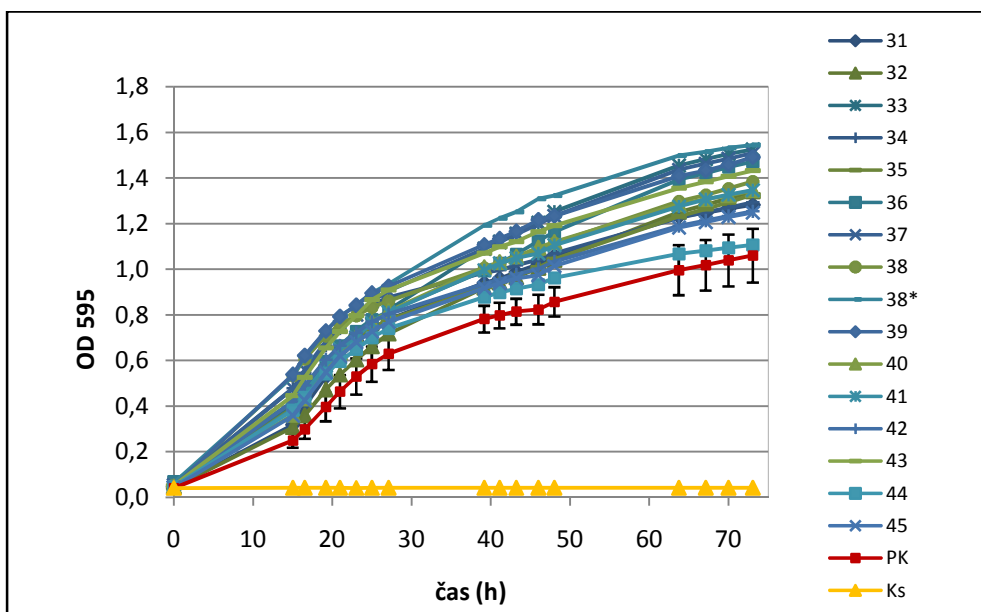
V bakterijski suspenziji s koncentracijo  $10^5$  cfu/ml je bilo v prvi in drugi seriji meritev  $1,9 \times 10^5$  cfu, tretji seriji  $4,6 \times 10^5$  cfu, četrti in peti seriji pa  $3,7 \times 10^5$  cfu.



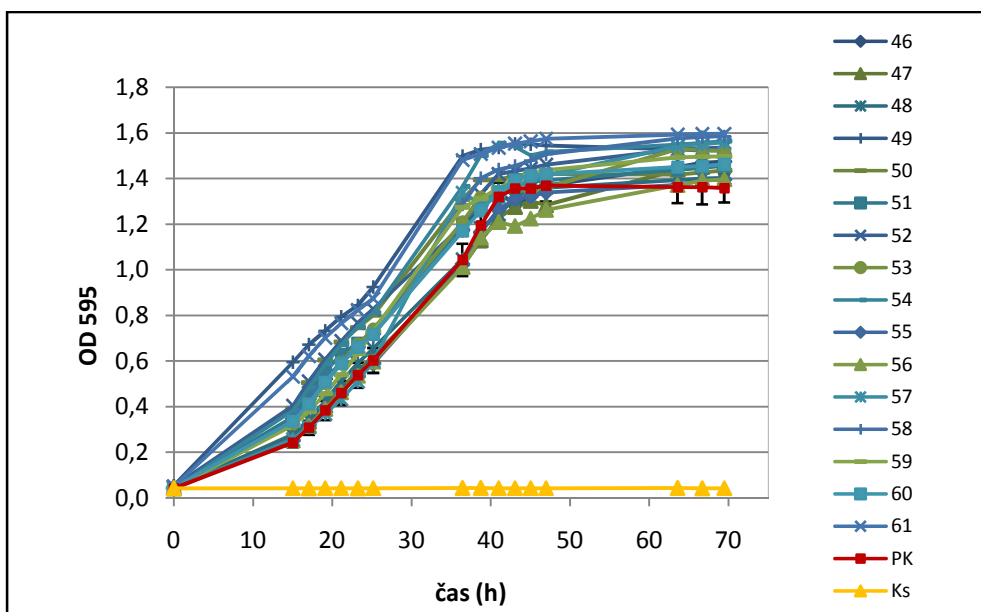
Slika 22: Vpliv ekstraktov gliv (1-14, Priloga C) na rast bakterije *E. amylovora* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Prva serija.



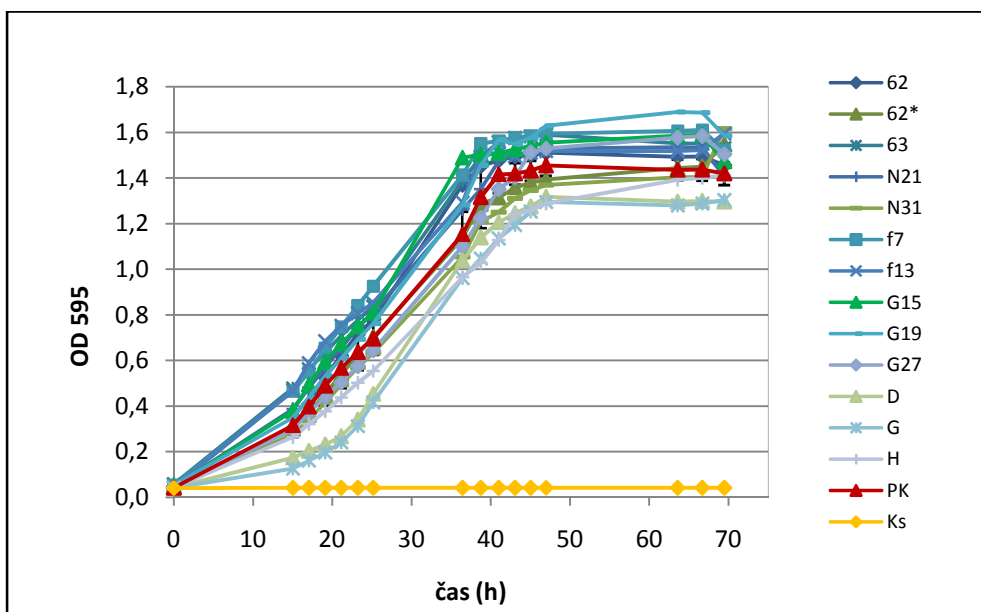
Slika 23: Vpliv ekstraktov gliv (15-30, Priloga C) na rast bakterije *E. amylovora* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^{\circ}\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. Zaradi napake čitalca smo, izjemoma pri NKs, izločili točke meritev pri 41 h. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Druga serija.



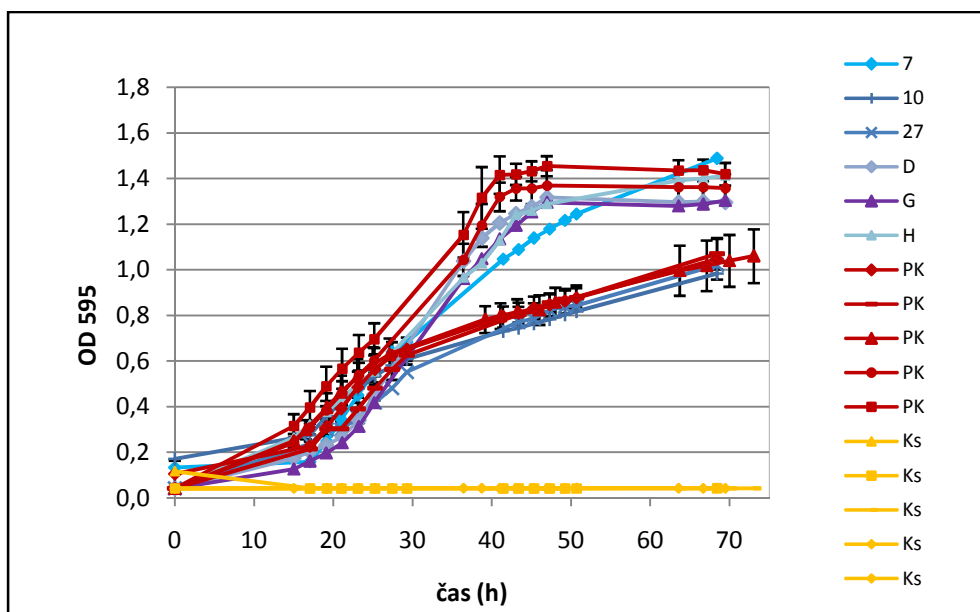
Slika 24: Vpliv ekstraktov gliv (31-45, Priloga C) na rast bakterije *E. amylovora* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^{\circ}\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Tretja serija.



Slika 25: Vpliv ekstraktov gliv (46-61, Priloga C) na rast bakterije *E. amylovora* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Četrta serija.



Slika 26: Vpliv ekstraktov gliv (62-H, Priloga C) na rast bakterije *E. amylovora* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Peta serija.



Slika 27: Vpliv ekstraktov gliv 7, 10, 27, D, G in H (Priloga C) na rast bakterije *E. amylovora* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^{\circ}\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom).

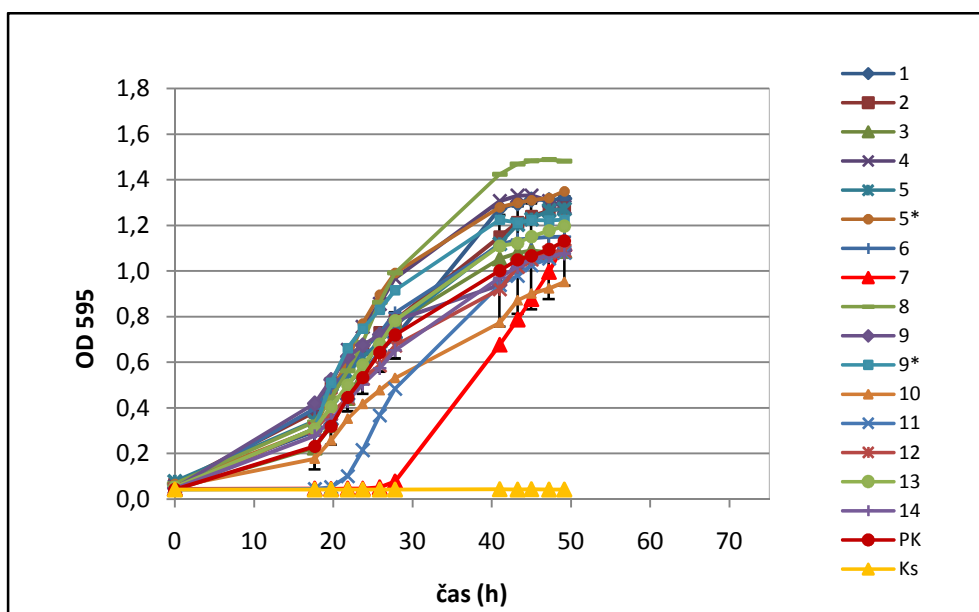
Iz rezultatov je razvidno, da je bila rast bakterij v prisotnosti večine (v 73-ih od 77-ih) ekstraktov – npr. ekstrakt iz *Cortinarius coerulescentium* (17), slika 23; iz *Lepista glaucocana* (39), slika 24; *Sarcodon imbricatus* (49), slika 25 itd. – v primerjavi s pozitivno kontrolo posamezne serije intenzivnejša, kar je lahko posledica prisotnosti stimulatorjev rasti v ekstraktih gliv ali delovanja ekstraktov kot dodatne hranilne snovi.

Ekstrakti, ki kažejo zaviranje rasti bakterije *E. amylovora* v primerjavi s pozitivno kontrolo posamezne serije, so prikazani na sliki 27. Očiščeni in koncentrirani pripravki, tripsinski in papainski inhibitor iz meglenke (D in H) ter papainski inhibitor in krompirja (G) kažejo počasnejše namnoževanje bakterije v eksponencialni fazi in nižje maksimalne vrednosti OD<sub>595</sub> v primerjavi s pozitivno kontrolo, vendar učinki niso zelo izraziti. Ekstrakt iz *Hydnum repandum* (27) kaže nekoliko počasnejše namnoževanje bakterije z nižjimi OD<sub>595</sub> vrednostmi le na začetku eksponencialne faze, kasneje pa rast podobno rasti pozitivne kontrole. Ekstrakta iz *Amanita phalloides* (7) in *Boletus calopus* (10) ne vplivata na rast bakterije.

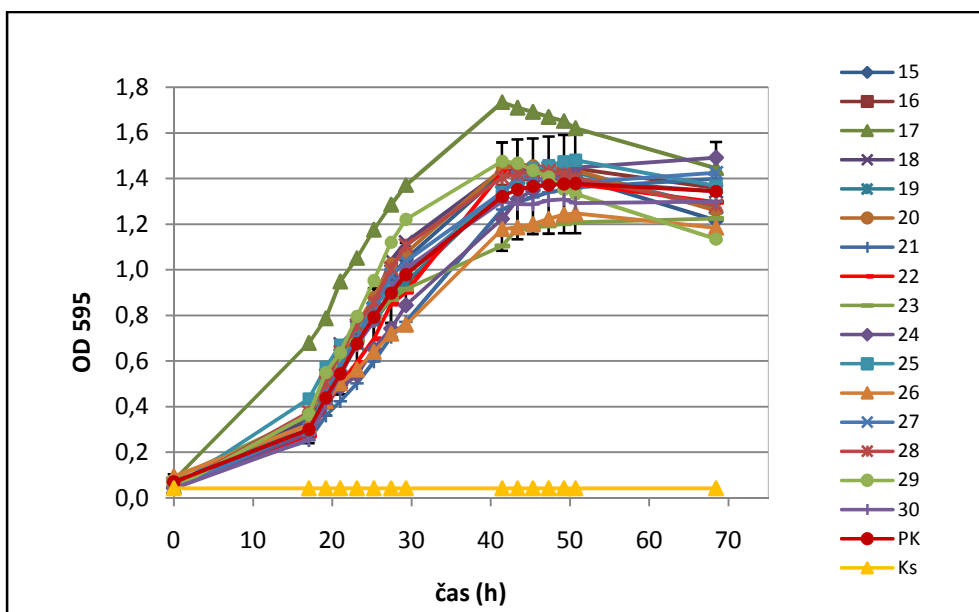
### 4.3.2 Vpliv ekstraktov gliv na rast bakterije *Erwinia chrysanthemi*

Na slikah od 28 do 33 so prikazani rezultati vpliva ekstraktov gliv na rast bakterije *E. chrysanthemi* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču King B. Rast bakterije je bila v prisotnosti večine (v 71-ih od 77-ih) ekstraktov v primerjavi s pozitivno kontrolo posamezne serije intenzivnejša, kar je lahko tudi tukaj lahko posledica prisotnosti stimulatorjev rasti v ekstraktih gliv ali delovanja ekstraktov kot dodatne hranilne snovi.

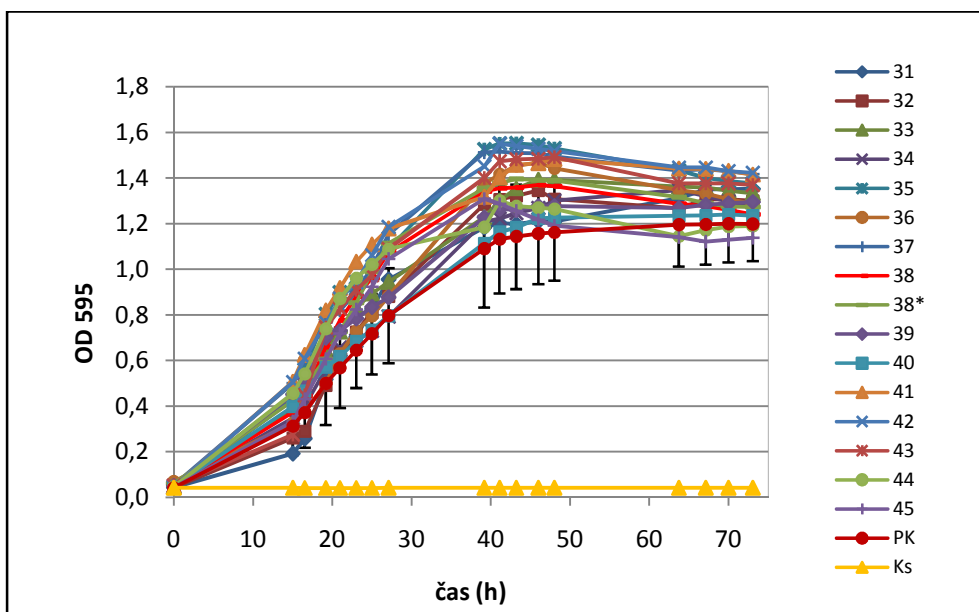
V bakterijski suspenziji s koncentracijo  $10^5$  cfu/ml je bilo v prvi seriji meritev  $4,1 \times 10^4$  cfu, v drugi seriji  $4,4 \times 10^4$  cfu, v tretji  $2,2 \times 10^4$ , v četrti  $5,7 \times 10^4$ , v peti pa  $4,2 \times 10^4$  cfu.



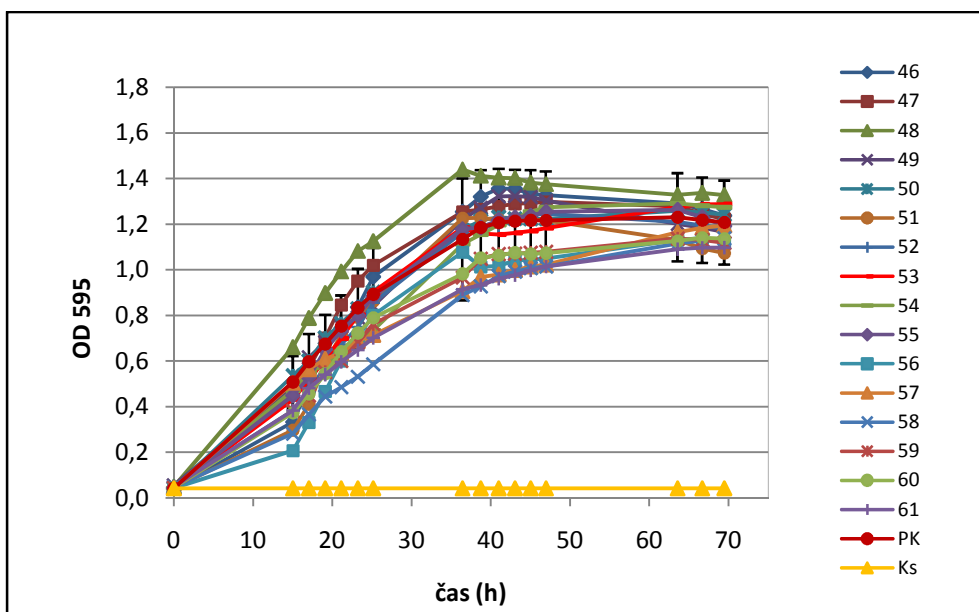
Slika 28: Vpliv ekstraktov gliv (1-14, Priloga C) na rast bakterije *E. chrysanthemi* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Prva serija.



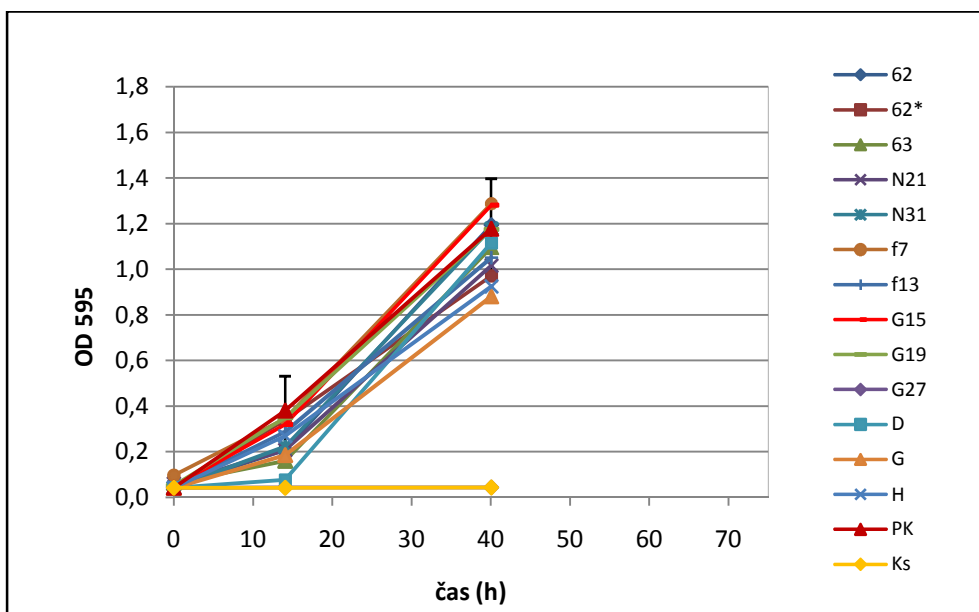
Slika 29: Vpliv ekstraktov gliv (15-30, Priloga C) na rast bakterije *E. chrysanthemi* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Druga serija.



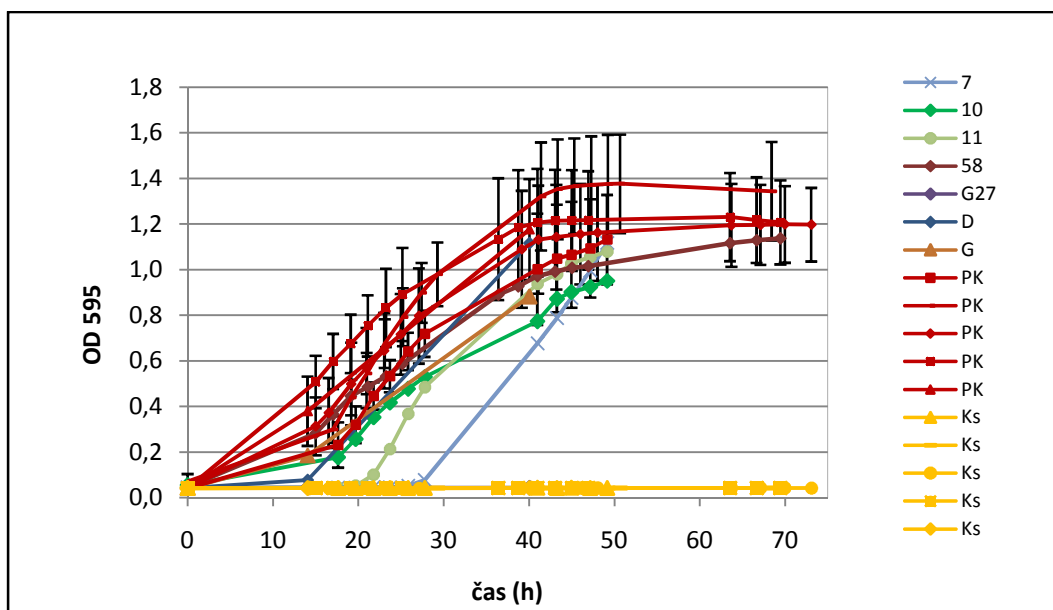
Slika 30: Vpliv ekstraktov gliv (31-45, Priloga C) na rast bakterije *E. chrysanthemi* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Tretja serija.



Slika 31: Vpliv ekstraktov gliv (46-61, Priloga C) na rast bakterije *E. chrysanthemi* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Četrta serija.



Slika 32: Vpliv ekstraktov gliv (62-H, Priloga C) na rast bakterije *E. chrysanthemi* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Meritev po 40 h ni. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Peta serija.



Slika 33: Vpliv ekstraktov gliv 7, 10, 11, 58, G27, D in G (Priloga C) na rast bakterije *E. chrysanthemi* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom).

Ekstrakti, ki kažejo zaviranje rasti bakterije *E. chrysanthemi* v primerjavi s pozitivno kontrolo posamezne serije, so prikazani na sliki 33. Ekstrakt iz *Clitocybe geotropa* (G27) kaže izrazito zaviranje rasti skozi celotno rastno krivuljo, najvišja vrednost OD<sub>595</sub> je 0,044, kar je enako vrednostim OD<sub>595</sub> negativnih kontrol z antibiotikom (poglavje 4.2.1). Ekstrakt iz *Amanita phalloides* (7) kaže izrazito počasnejše namnoževanje bakterije v prvi polovici eksponencialne faze, kasneje je rast podobna rasti pozitivne kontrole. Ekstrakta iz *Bovista nigrescens* (11) in *Tricholoma saponaceum* (58) ter tripsinski inhibitor iz melgenke *C. nebularis* (D) in papainski inhibitor iz krompirja (G) kažejo počasnejše namnoževanje bakterije z nižjimi OD<sub>595</sub> vrednostmi le na začetku eksponencialne faze, kasneje pa rast podobno rasti pozitivne kontrole.

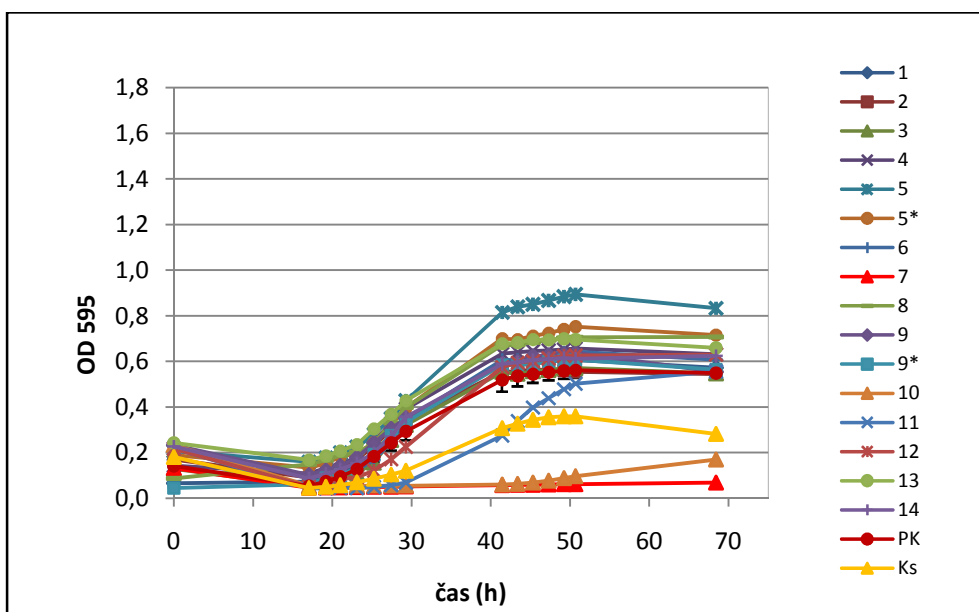
#### 4.3.3 Vpliv ekstraktov gliv na rast bakterije *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*

Na slikah od 34 do 39 so prikazani rezultati vpliva ekstraktov gliv na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču King B. Rast bakterije je bila v prisotnosti večine (v 71-ih od 77-ih) ekstraktov v primerjavi s pozitivno kontrolo

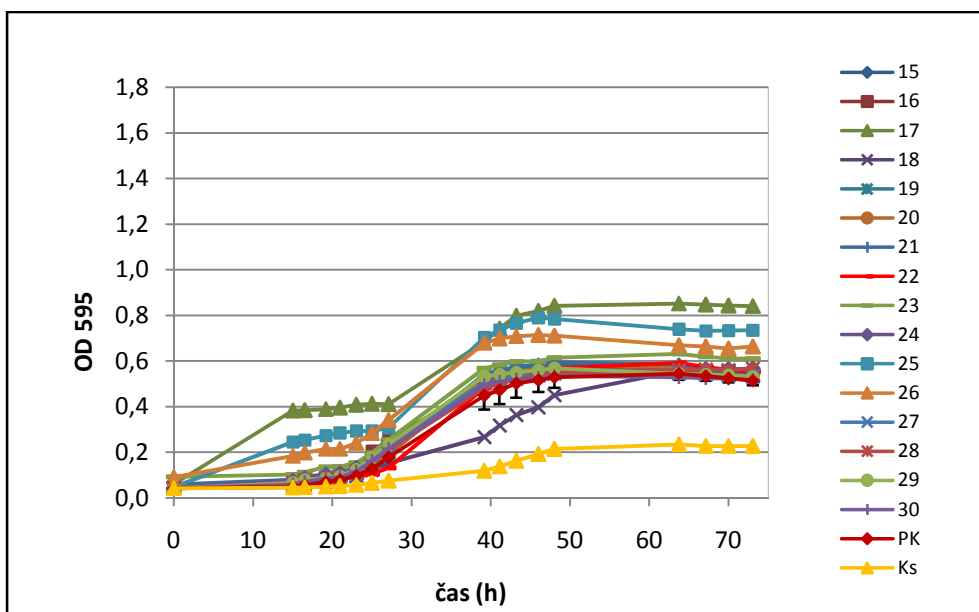


posamezne serije intenzivnejša, kar je lahko ponovno lahko posledica prisotnosti stimulatorjev rasti v ekstraktih gliv ali delovanja ekstraktov kot dodatne hranilne snovi.

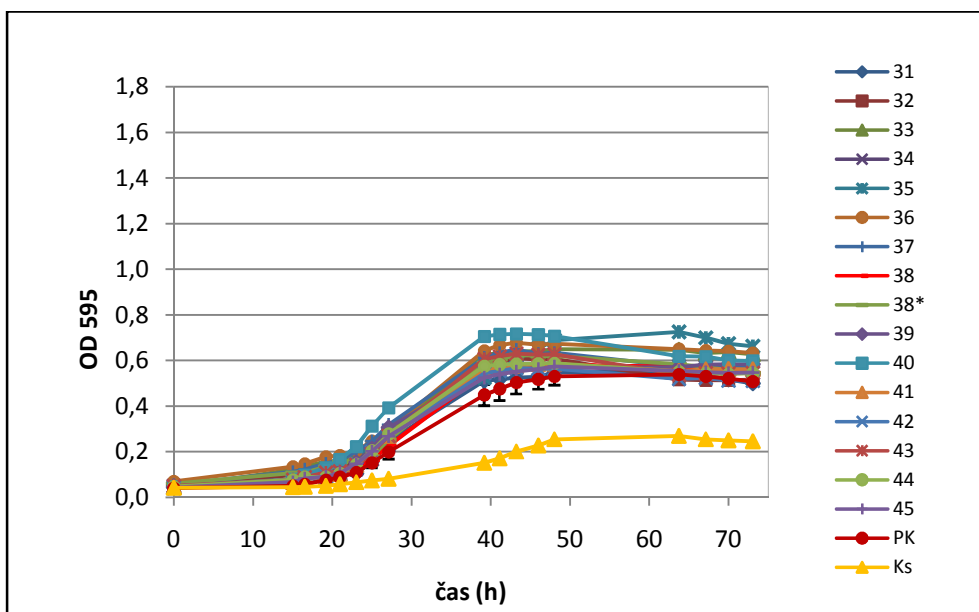
V bakterijski suspenziji s koncentracijo  $10^5$  cfu/ml je bilo v prvi seriji meritev  $1,2 \times 10^5$  cfu, v drugi in tretji seriji  $2,1 \times 10^4$  cfu, v četrti  $2,2 \times 10^4$ , v četrti pa  $2,5 \times 10^5$  cfu, v peti seriji pa  $3,2 \times 10^5$ .



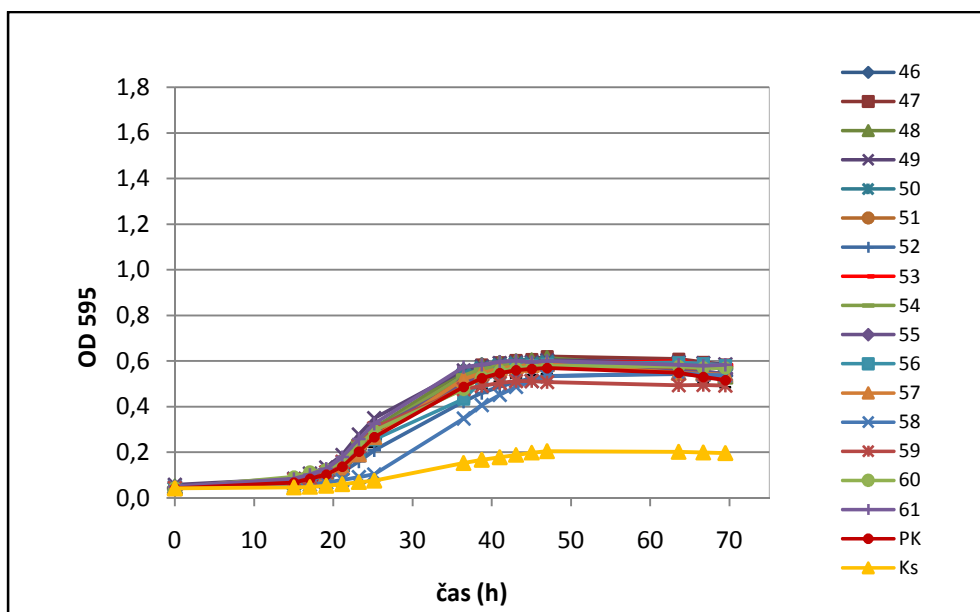
Slika 34: Vpliv ekstraktov gliv (1-14, Priloga C) na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^\circ\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Prva serija.



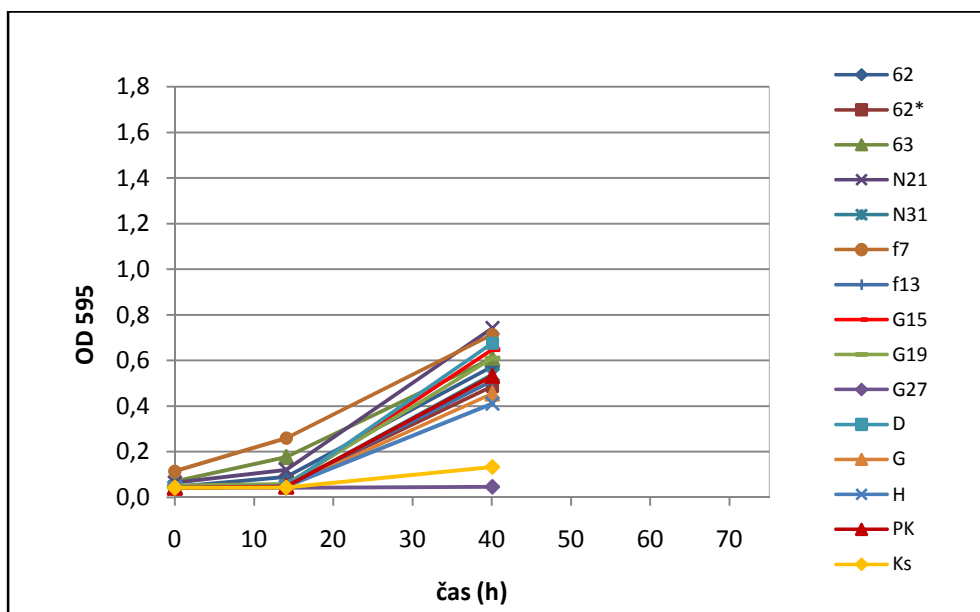
Slika 35: Vpliv ekstraktov gliv (15-30, Priloga C) na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^{\circ}\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Druga serija.



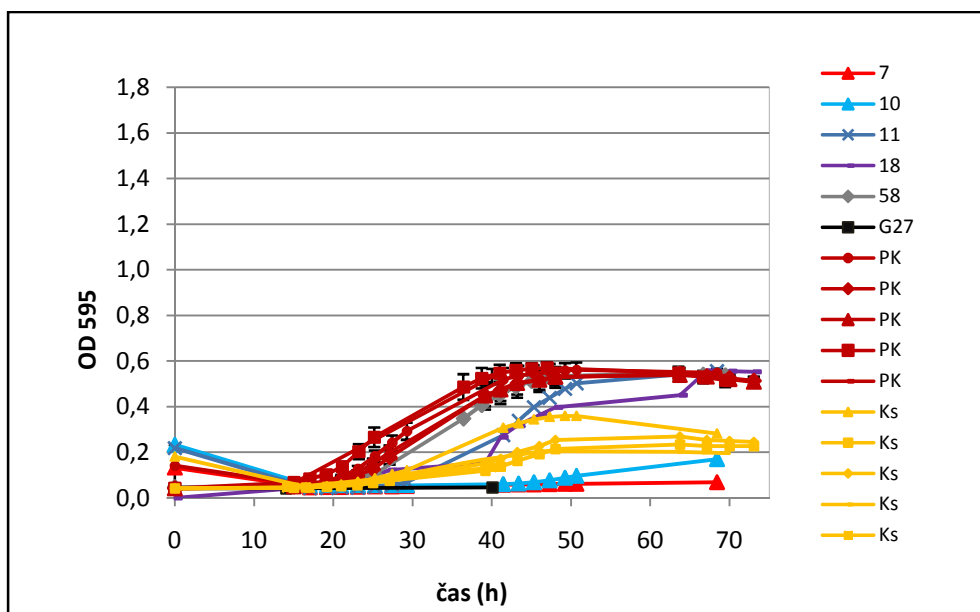
Slika 36: Vpliv ekstraktov gliv (31-45, Priloga C) na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^{\circ}\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Tretja serija.



Slika 37: Vpliv ekstraktov gliv (46-61, Priloga C) na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^\circ\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Četrta serija.



Slika 38: Vpliv ekstraktov gliv (62-H, Priloga C) na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^\circ\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Meritev po 40 h ni. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Peta serija.



Slika 39: Vpliv ekstraktov gliv 7, 10, 11, 18, 58 in G27 (Priloga C) na rast bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* ( $10^5$  cfu/ml) v tekočem gojišču KB ( $28^{\circ}\text{C}$ , 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom).

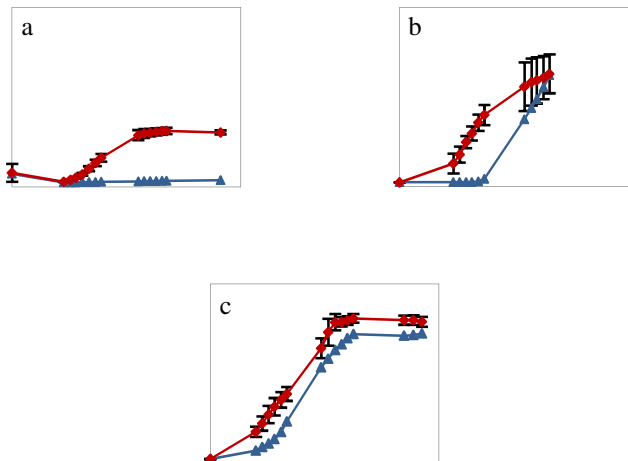
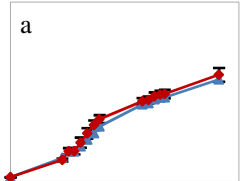
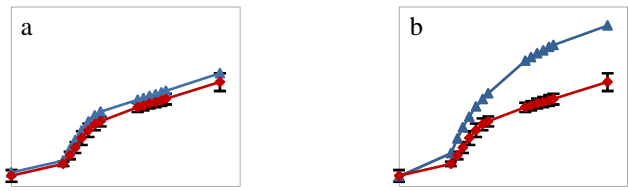
Ekstrakti, ki kažejo zaviranje rasti bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* v primerjavi s pozitivno kontrolo posamezne serije, so prikazani na sliki 39. Ekstrakti iz *Amanita phalloides* (7), *Boletus calopus* (10) in *Clitocybe geotropa* (G27) kažejo zaviranje rasti skozi celotno rastno krivuljo, npr. maksimalna vrednost  $\text{OD}_{595}$  ekstrakta 10 je na koncu eksponencialne faze  $0,167 \pm 0,02$ , pozitivne kontrole pa  $0,558 \pm 0,3$ . Ekstrakta iz *Cortinarius* sp. (18) in *Tricholoma saponaceum* (58) kažeta počasnejše namnoževanje bakterije z nižjimi  $\text{OD}_{595}$  vrednostmi v eksponencialni fazi, kasneje pa rast podobno rasti pozitivne kontrole. Podobno je z ekstraktom iz *Bovista nigrescens* (11), vendar ima le ta tudi podaljšano prilagoditveno fazo (25 ur).

#### 4.3.4 Skupni rezultati, povzetek

Na podlagi rezultatov vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij v tekočem gojišču King B, ki so za posamezne bakterije in mikrotitrne plošče prikazani posebej na slikah od 22 do 39, smo za njihovo vrednotenje pripravili lestvico, ki je prikazana v preglednici 5. Opazovali smo rast bakterije z ekstraktom gliv (modra rastna krivulja) v primerjavi z rastjo pozitivne

kontrolne (rdeča rastna krivulja) posamezne serije meritev. Vpliv ekstrakta gliv smo ocenili z vrednostmi -1 (zaviranje rasti skozi celotno rastno krivuljo ali daljša lag faza in/ali počasnejše namnoževanje v log fazi kot pri rasti pozitivne kontrole), 0 (rast podobna kinetiki rasti pozitivne kontrole) ali 1 (intenzivnejša rast ali izrazito intenzivna rast kot pri kinetiki rasti pozitivne kontrole). Rezultati vrednotenja so prikazani v preglednici 6, kjer so prikazani le tisti ekstrakti gliv, ki so imeli inhibitorni učinek na rast bakterij.

Preglednica 5: Lestvica za vrednotenje vpliva ekstraktov gliv na rast bakterij *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* v tekočem KB gojišču. Rdeča krivulja (pozitivna kontrola), modra krivulja (bakterija z ekstraktom gliv).

OCENA	OPIS	SLIKA
-1	zaviranje rasti (a) skozi celotno rastno krivuljo ali (b) daljša lag faza in/ali (c) počasnejše namnoževanje v log fazi kot pri rasti pozitivne kontrole	
0	rast podobna rasti pozitivne kontrole	
1	intenzivnejša rast od rasti pozitivne kontrole (a, b)	

Preglednica 6: Vpliv proteinskih ekstraktov gliv na rast bakterij *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. V preglednici so prikazani ekstrakti gliv, ki so imeli zaviralni učinek na rast bakterij. Za vrednotenje vpliva ekstraktov na rast bakterij je uporabljena lestvica iz preglednice 5.

EKSTRAKT		KONCENTRACIJA BAKTERIJ 10 <sup>5</sup> cfu/ml		
		<i>E. amylovora</i>	<i>E. chrysanthemi</i>	<i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>
7	<i>Amanita phalloides</i>	0	-1b	-1a
G	papainski inhibitor iz krompirja (NIB)	-1c	-1c	0
D	tripsinski inhibitor iz meglenke (NIB)	-1c	-1c	1a
G27	<i>Clitocybe geotropa</i> (NIB)	1a	-1a	-1a
11	<i>Bovista nigrescens</i>	1a	-1b	-1b
58	<i>Tricholoma saponaceum</i>	1a	-1c	-1c
10	<i>Boletus calopus</i>	0	0	-1a
H	papainski inhibitor iz meglenke (NIB)	-1c	0	0
18	<i>Cortinarius sp.</i>	1a	1a	-1c

Devet proteinskih ekstraktov gliv in proteinskih inhibitorjev od skupaj 77-ih je učinkovalo zaviralno na rast bakterij *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* v primerjavi z rastjo bakterij na kontrolnem gojišču. Preostali ekstrakti gliv (68 ekstraktov) so učinkovali bodisi tako, da je bila rast bakterije podobna rasti njene pozitivne kontrole (preglednica 5, slika 0a), bodisi tako, da je bila rast bakterije intenzivnejša od rasti njene pozitivne kontrole (preglednica 5, slika 1a in 1b). Ekstrakti gliv, ki so na rast bakterij učinkovali zaviralno, imajo koncentracije proteinov v povprečju ( $5,87 \pm 2,6$  mg/ml) (poglavje 4.1.1).

Rast *E. amylovora* so zavirali trije očiščeni in koncentrirani proteinski pripravki: tripsinski in papainski inhibitor iz meglenke *Clitocybe nebularis* (D in H) ter papainski inhibitor iz krompirja (G). Vsi trije inhibitorji proteinaz so kazali počasnejše namnoževanje bakterije v eksponencialni fazi in nižje maksimalne vrednosti OD<sub>595</sub> v primerjavi s pozitivno kontrolo. Tripsinski inhibitor iz meglenke *Clitocybe nebularis* (D) in papainski inhibitor iz krompirja (G) sta zavirala tudi rast *E. chrysanthemi* in sicer s počasnejšim namnoževanjem bakterije le na začetku eksponencialne faze in nižjimi OD<sub>595</sub> vrednostmi.

Proteinski ekstrakti iz *Amanita phalloides* (7), *Bovista nigrescens* (11), *Tricholoma saponaceum* (58) in *Clitocybe geotropa* (G27) so zavirali rast *E. chrysanthemi* in *X.*

*campestris* pv. *vesicatoria*. Proteinska ekstrakta iz *Boletus calopus* (10) in *Cortinarius* sp.(18) pa sta zavirala rast le *X. campestris* pv. *vesicatoria*.

Počasnejše namnoževanje bakterij *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* na začetku eksponentne faze in nižjimi OD<sub>595</sub> vrednostmi (kasneje je bila rast podobna rasti pozitivne kontrole) sta kazala ekstrakta iz *Bovista nigrescens* (11) in *Tricholoma saponaceum* (58). Enak učinek je pri *E. chrysanthemi* pokazal ekstrakt iz *Amanita phalloides* (7), pri *X. campestris* pv. *vesicatoria* pa ekstrakt iz *Cortinarius* sp. (18).

Nekateri ekstrakti gliv so se še posebej izkazali za uspešne, saj so zavirali rast bakterije do takšne mere, da do namnoževanja v eksponentni fazi sploh ni prišlo (rast je podobna rasti negativne kontrole z antibiotikom). Pri *X. campestris* pv. *vesicatoria* so imeli takšen učinek ekstrakti iz *Amanita phalloides* (7), *Boletus calopus* (10) in *Clitocybe geotropa* (G27). Slednji je imel izrazito zaviralen učinek tudi na *E. chrysanthemi*.

Ekstrakti iz *Amanita lividopallescens* (5\*), *Amanita vaginata* (8) in *Cortinarius coerulescentium* (17) so pri vseh treh bakterijah povzročili izrazito intenzivno rast v primerjavi z rastjo pozitivne kontrole (nad njenimi mejami standardne deviacije; preglednica 5, slika 1b), ekstrakta iz *Amanita lividopallescens* (5) in *Hygrocybe ovina* (26) pa pri *E. amylovora* in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Omenjeni ekstrakti so dosegli tudi najvišje vrednosti OD<sub>595</sub> pri posamezni bakteriji. Na podlagi rezultatov iz točke 4.1.1 Koncentracija proteinov ekstraktov gliv vidimo, da so ekstrakti, ki so vzpodbujali rast bakterij, imeli nadpovprečno (povprečna vrednost je  $5,87 \pm 2,6$  mg/ml) visoke koncentracije proteinov, najvišje vrednosti pa prav ekstrakta 5\* ( $13,29 \pm 9,2$  mg/ml) in 8 ( $13,76 \pm 10,2$  mg/ml). To podpira domnevo, da je intenzivnejša rast bakterij v primerjavi s pozitivno kontrolo, posledica prisotnosti stimulatorjev rasti v ekstraktih gliv ob hkratni odsotnosti učinkovitih inhibitorjev ali delovanja ekstraktov gliv kot dodatne hranilne snovi.

Med ekstrakti gliv nismo našli takšnega, ki bi pri določeni bakteriji spodbujal njeno rast (npr. slika 1b v preglednici 5), drugo bakterijo pa zaviral (npr. slika -1a, -1b ali -1c v preglednici 5).

Če pogledamo učinkovanje ekstraktov gliv na rast bakterij znotraj rodov posameznih ekstraktov oz. vrst gliv, vidimo, da pri tem izstopajo ekstrakti iz rodov *Amanita* (mušnice), *Cortinarius* (koprenke) in *Tricholoma* (kolobarnice), ki so rast določenih bakterij pospeševali, določenih pa zavirali. Znotraj posameznih rodov lahko različne vrste gliv in različni ekstrakti kažejo različen vpliv na rast bakterij.

Ekstrakt iz *Cortinarius coerulescentium* (višnjeva koprenka; ekstrakt 17) je intenzivno spodbujal rast vseh treh bakterij, pri ekstraktih iz *Cortinarius glaucopus* (kolobarniška koprenka; ekstrakt 19) in *Cortinarius saginus* (ekstrakt 20) je bila rast bakterij podobna rasti pozitivne kontrole, medtem ko je ekstrakt iz *Cortinarius sp.* (koprenka; ekstrakt 17) povzročil počasnejše namnoževanje *X. campestris* pv. *vesicatoria* v eksponencialni fazi.

Ekstrakta iz *Amanita lividopallescens* (bledični lupinar; ekstrakta 5 in 5\*) in *Amanita vaginata* (sivi lupinar; ekstrakt 8) sta intenzivno spodbujali rast bakterij, ekstrakta iz *Amanita caesarea* (knežja mušnica; ekstrakt 4) in *Amanita muscaria* (rdeča mušnica; ekstrakt 6) sta rast *E. amylovora* spodbujala, pri *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* pa je bila rast podobna rasti pozitivne kontrole. Ekstrakt iz *Amanita phalloides* (zelena mušnica; ekstrakt 7) je bil eden izmed najuspešnejših ekstraktov, saj je zaviral rast *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, pri *E. amylovora* pa je bila rast podobna rasti pozitivne kontrole.

Ekstrakt iz *Tricholoma saponaceum* je zaviral rast *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, pri *E. amylovora* pa je rast spodbudil. Pri vseh ostalih sedmih ekstraktih iz rodu *Tricholoma* (*T. atrosquamosum*, *T. bufonium*, *T. imbricatum*, *T. mutabile*, *T. pardinum*, *T. vaccinum*, *T. rutilans*) je bila rast pri vseh treh bakterijah bodisi intenzivnejša, bodisi podobna rasti pozitivne kontrole.



#### 4.4 VPLIV EKSTRAKTOV GLIV NA PATOGENOST BAKTERIJ

Vpliv proteinskih ekstraktov gliv na izražanje bolezenskih znamenj smo preverjali v uveljavljenih testih patogenosti: na nezrelah hruškah za bakterijo *Erwinia amylovora* (OEPP/EPPO, 2004) in rezinah gomoljev krompirja za bakterijo *Erwinia chrysanthemi* (Lelliot in Stead 1987; De Boer in Kelman, 2001). Vzporedno s testiranjem ekstraktov smo skušali oceniti primernost teh testov patogenosti za takšno uporabo.

##### 4.4.1 Vpliv ekstraktov gliv na bolezenska znamenja v testu patogenosti bakterije *Erwinia amylovora*


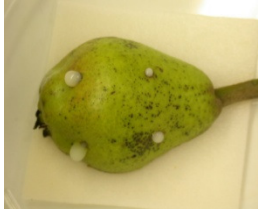


Na hruškah smo testirali vseh 77 proteinskih ekstraktov gliv (Priloga C) v štirih serijah po shemi, kot je prikazano v preglednici 3 (poglavje 3.4.1). Razvoj bolezenskih znamenj smo ocenili drugi, tretji in peti dan po inokulaciji.

V bakterijski suspenziji *E. amylovora* s koncentracijo  $10^6$  cfu/ml, s katero smo inokulirali nezrele hruške, je bilo v prvi seriji testiranja (poglavje 3.4.1, preglednica X)  $5,3 \times 10^5$  cfu, v tretji pa  $2,0 \times 10^6$  cfu.

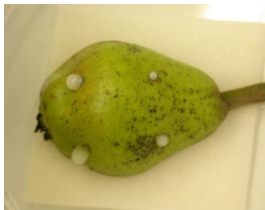
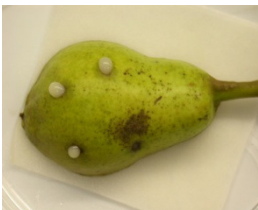


Zaradi obsežnega testiranja in kratke razpoložljivosti nezrelah hrušk, smo uporabili tudi že nekoliko zrelejše hruške, ki so se izkazale za neprimerne, zato teh serij pri rezultatih nismo uporabili oz. smo jih izločili iz analiz.

Na podlagi opazovanja razvoja bolezenskih znamenj pri nezrelah hruškah okuženih z *E. amylovora* in ekstrakti gliv, smo za njihovo vrednotenje pripravili lestvici. Opazovali smo tri parametre: obarvanost izcedka (Preglednica 7), količino izcedka (vbodi) ter razvoj nekroze okrog vbodov (Preglednica 8) drugi, tretji in peti dan po inokulaciji. Količino izcedka smo ovrednotili z vrednostmi od 0 do 3 glede na število vbodov, ki so bili napolnjeni z izcedkom: 0 (vsi vbodi prazni), 1 (en vbod poln), 2 (dva vboda prazna, dva polna), 3 (vsi vbodi polni).

Preglednica 7: Lestvica za vrednotenje blozenskega znamenja – izcedka pri nezrelih hruškah okuženih z *E. amylovora* in ekstrakti gliv.

OPIS BOLEZENSKEGA ZNAMENJA – IZCEDEK				
OCENA	0	1	2	3
OPIS	ni izcedka	prozoren do mlečno bel, tekoč izcedek	belo rumen do rumen, gosto tekoč izcedek	temno rumen do prozorno oker, rjav, tekoč izcedek
SLIKA				

Preglednica 8: Lestvica za vrednotenje blozenskega znamenja – nekroze pri nezrelih hruškah okuženih z *E. amylovora* in ekstrakti gliv.

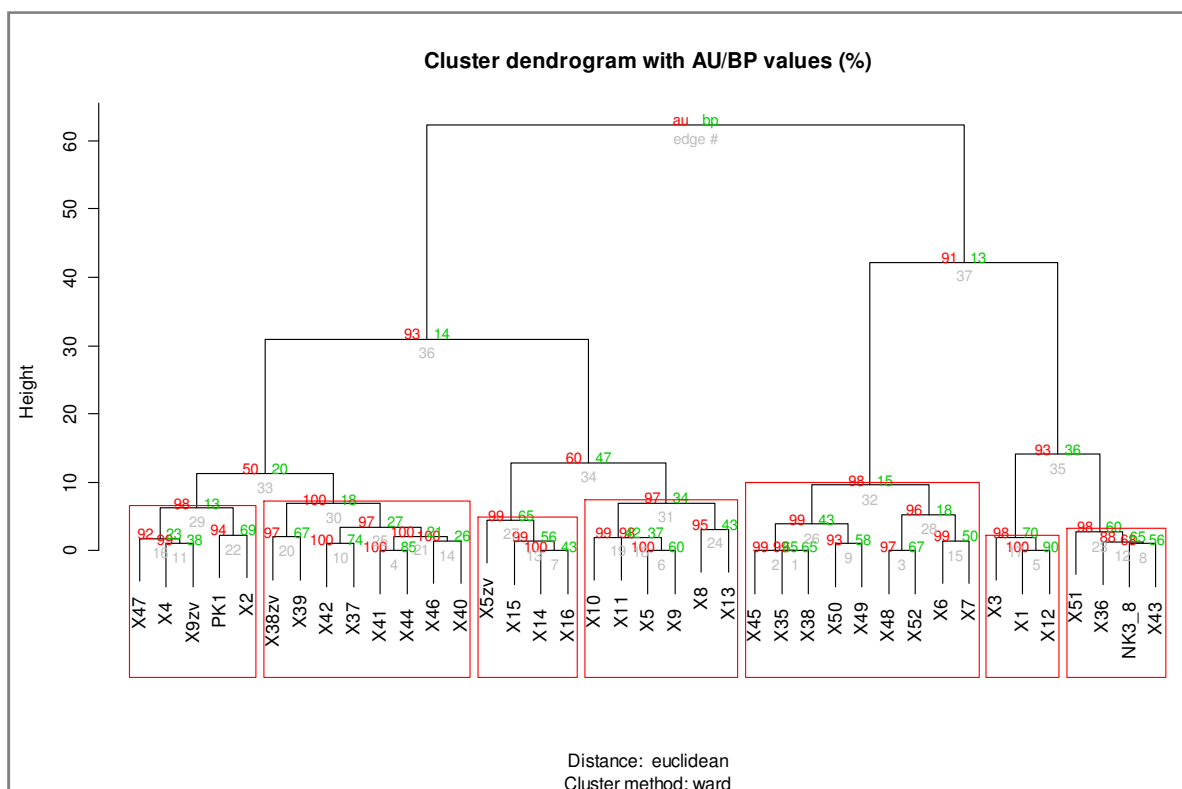
OPIS BOLEZENSKEGA ZNAMENJA – NEKROZA				
OCENA	0	1	2	3
OPIS	ni nekroze	nekroza nakazana kot ožji, 1 - 3 mm voden temno zelen ali rjav kolobar okrog enega ali več vbodov	močno vodena temno zelena ali srednje razširjena temno rjava nekroza, 3 - 5 mm rjavi kolobarji okrog vbodov, nekroze se ne stikajo	močno razširjena temno rjava nekroza, nekroze okrog vbodov se lahko stikajo, nekroza s kapljicami izcedka
SLIKA				

Rezultati vrednotenja so prikazani v preglednici v Prilogi E, ki predstavlja matriko, na osnovi katere smo s pomočjo programa R Statistical (R Development Core Team, 2008; [www.statmethods.net](http://www.statmethods.net)), paketa Pvcust (Suzuki in Shimodaira, 2006) izvedli statistično analizo, pri čemer smo podatke zbrali v gruče (angl. »cluster«) z metodo vezanja. Paket Pvcust je izračunal verjetnost vsakega skupka po metodi ponavljajočega vezanja (angl. bootstrap resampling) in sicer vrednosti AU (angl. approximately unbiased) in BP (angl. bootstrap probability). Posamezne ekstrakte, pozitivno (PK) in kontrolo z antibiotikom

(Ks) smo razvrstili po podobnosti glede na izražena bolezenska znamenja - izcedek in njegovo količino (izcedek×vbodi) ter na stopnjo razvoja nekroze drugi, tretji in peti dan po inokulaciji. Ker obstaja povezava med barvo izcedka in njegovo količino (bolj napreduje okužba, temnejši je izcedek in količinsko ga je več), smo pri statistični analizi bolezenskih znamenj združili postavki izcedek in vbodi. Rezultati analize so prikazani v obliki dendrograma na sliki 40, večje štiri skupine pa so označene tudi v preglednici 9.

Preglednica 9: Razvoj bolezenskih znamenj (izcedek, količina izcedka – vbodi, nekroza) pri nezrelah hruškah okuženih z *E. amylovora* in ekstrakti gliv, pozitivno in negativno kontrolo z antibiotikom, drugi, tretji in peti dan po inokulaciji glede na oblikovane lestvice ocene bolezenskih znamenj izcedka in nekroze (Preglednici 7 in 8). Stolpec vbodi: 0 (vsi vbodi prazni), 1 (en vbod poln), 2 (dva vboda polna), 3 (treje ali vsi vbodi polni). Vrednosti v stolpcu "izcedek x vbodi" so zmnožki vrednosti "izcedka" in vrednosti "vboda". Ekstrakti so razvrščeni glede na podobnost vpliva ekstraktov na razvoj bolezenskih znamenj; razmejeni so v štiri večje skupine določene z metodo razvrščanja v gruče (glej sliko 40). PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom). Vrednosti so označene z barvami, pri čemer rdeča pomeni večjo vrednost (izrazitejša bolezenska znamenja), rumena srednjo, zelena nižjo (manj izrazita bolezenska znamenja).

OZNAKA EKSTRAKTA	SAMPLE	SPECIES	GROUP	SUB GROUP	IZCEDEK			VBODI			NEKROZA			IZCEDEK x VBODI		
					iz2	iz3	iz5	vb2	vb3	vb5	n2	n3	n5	IzVb2	IzVb3	IzVb5
PK	PK1	pozitivna kontrola	A	A	1	2	2	1	3	3	1	2	3	1	6	6
2	2	<i>Agaricus silvaticus</i>	A	A	1	2	2	3	3	3	1	1	3	3	6	6
47	47	<i>Ramaria formosa</i>	A	A	1	2	3	3	3	3	1	2	2	3	6	9
4	4	<i>Amanita caesarea</i>	A	A	1	2	3	3	3	3	2	2	3	3	6	9
9*	9zv	<i>Armillaria mellea</i>	A	A	1	2	3	3	3	3	2	3	3	3	6	9
42	42	<i>Lycoperdon perlatum</i>	A	B	0	2	3	0	3	3	0	0	2	0	6	9
38*	38zv	<i>Lepiota naucina</i>	A	B	0	3	3	0	3	3	0	0	1	0	9	9
37	37	<i>Lepiota ignivolvata</i>	A	B	1	2	3	1	3	3	0	0	2	1	6	9
39	39	<i>Lepista glaucocana</i>	A	B	1	3	3	2	3	3	0	0	1	2	9	9
41	41	<i>Lepista nuda</i>	A	B	1	2	3	2	3	3	0	0	1	2	6	9
44	44	<i>Mycena galericulata</i>	A	B	1	2	3	2	3	3	0	0	1	2	6	9
46	46	<i>Ramaria botrytis</i>	A	B	1	2	3	2	3	3	0	1	2	2	6	9
40	40	<i>Lepista nebularis</i>	A	B	1	2	3	3	3	3	0	0	2	3	6	9
15	15	<i>Collybia confluens</i>	A	C	2	3	3	3	3	3	1	3	3	6	9	9
14	14	<i>Clitocybe odora</i>	A	C	2	3	3	3	3	3	2	3	3	6	9	9
16	16	<i>Coprinus comatus</i>	A	C	2	3	3	3	3	3	2	3	3	6	9	9
5*	5zv	<i>Amanita lividopallesc.</i>	A	C	3	3	3	3	3	3	2	2	3	9	9	9
8	8	<i>Amanita vaginata</i>	A	D	2	1	3	3	3	3	1	3	3	6	3	9
10	10	<i>Boletus calopus</i>	A	D	2	2	3	3	3	3	1	3	3	6	6	9
11	11	<i>Bovista nigrescens</i>	A	D	2	2	3	3	3	3	1	1	3	6	6	9
5	5	<i>Amanita lividopallescens</i>	A	D	2	2	3	3	3	3	2	2	3	6	6	9
9	9	<i>Armillaria mellea</i>	A	D	2	2	3	3	3	3	2	2	3	6	6	9
13	13	<i>Clitocybe alexandri</i>	A	D	2	1	2	3	3	3	2	3	3	6	3	6
35	35	<i>Lactarius illyricus</i>	B	E	0	0	3	0	0	3	0	1	2	0	0	9
38	38	<i>Lepiota naucina</i>	B	E	0	0	3	0	0	3	0	1	2	0	0	9
45	45	<i>Paxillus atrotomentosus</i>	B	E	0	0	3	0	0	3	0	1	2	0	0	9
48	48	<i>Russula albonigra</i>	B	E	0	1	3	0	3	3	0	1	2	0	3	9
50	50	<i>Suillus bovinus</i>	B	E	0	1	3	0	1	3	0	0	1	0	1	9
52	52	<i>Suillus variegatus</i>	B	E	0	1	3	0	3	3	0	1	2	0	3	9
49	49	<i>Sarcodon imbricatus</i>	B	E	1	1	3	1	1	3	0	0	1	1	1	9
6	6	<i>Amanita muscaria</i>	B	E	1	1	3	2	3	3	1	2	3	2	3	9
7	7	<i>Amanita phalloides</i>	B	E	1	1	3	3	3	3	1	1	3	3	3	9
3	3	<i>Albatrellus pes-caprae</i>	B	F	1	1	1	2	3	3	1	2	2	2	3	3
1	1	<i>Agaricus campestris</i>	B	F	1	1	1	3	3	3	1	1	2	3	3	3
12	12	<i>Clavaria flava</i>	B	F	1	1	1	3	3	3	1	1	2	3	3	3
Ks	Ks3_8	kontrola z antibiotikom	B	G	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
36	36	<i>Leccinum scabrum</i>	B	G	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0
43	43	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	B	G	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
51	51	<i>Suillus granulatus</i>	B	G	0	0	2	0	0	1	0	1	2	0	0	2



Slika 40: Dendrogram podobnosti v stopnji razvoja bolezenskih znamenj (izcedek, količina izcedka – vbodi, nekroza) pri nezrelah hruškah okuženih z *E. amylovora* in ekstrakti gliv, pozitivno in negativno kontrolo z antibiotikom, drugi, tretji in peti dan po inokulaciji. X47, X4 itd. (oznake ekstraktov gliv, Priloga C); PK1 (pozitivna kontrola); NK3\_8 (kontrola s streptomycin sulfatom). Ekstrakti so razvrščeni na osnovi evklidske razdalje z uporabo metode ward. S pravokotniki so označeni ekstrakti, pri katerih je verjetnost razvrstitve v določeno podskupino nad 95%. Za pomen AU in BP glej besedilo na str. 69.

Zbiranje v gruče po metodi ponavljajočega vezanja je ekstrakte gliv in kontrole glede na izražanje bolezenskih znamenj razvrstilo (verjetnost razvrstitve nad 95%) v sedem skupin (A, B, C, D, E, F, G), ki oblikujejo štiri večje skupine (A, B-D, E-F, G), ki se razlikujejo po dinamiki razvoja bakterijskega izcedka in nekroz.

Glede na rezultate na sliki 40, so se pri 4-ih ekstraktih (2 *Agaricus silavticus*, 9\* *Armillaria mellea*, 4 *Amanita caesarea*, 47 *Ramaria formosa*) od skupno 37-ih bolezenska znamenja razvijala podobno kot pri PK, pri 18-ih ekstraktih (podskupine B, C in D) pa intenzivneje kot pri PK. Verjetno so ti ekstrakti – podobno kot pri preverjanju vpliva ekstraktov na rast bakterij v tekočem gojišču King B – tudi tu povzročili hitrejše namnoževanje bakterije in intenzivnejši razvoj simptomov zaradi prisotnosti stimulatorjev rasti v ekstraktih ali

delovanja ekstraktov kot dodatne hranilne snovi. Pri skupno 15 ekstraktih (od 37) so se bolezenska znamenja razvila počasneje kot pri PK, med njimi tudi ekstrakt iz *Amanita phalloides* (7), ki je sicer na rast *E. amylovora* *in vitro* učinkoval tako, da je bila rast bakterije podobna PK, a je na rast *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* *in vitro* deloval inhibitorno (poglavje 4.3.4).

Ekstrakti iz *Leccinum scabrum* (36), *Lycoperdon pyriforme* (43) in *Suillus granulatus* (51) (podskupina G; slika 40) so kazali podobnost razvoja bolezenskih znamenj s kontrolo s streptomycin sulfatom (Ks). Ti ekstrakti niso imeli vpliva na rast bakterije *E. amylovora* v *in vitro* testu. Zanimivo je, da je koncentracija proteinov pri ekstraktu iz *Suillus granulatus* (51) le  $2,74 \pm 0,5$  mg/ml, kar je pod povprečjem ( $5,87 \pm 2,6$  mg/ml) (poglavje 4.1.1), kar bi lahko pomenilo, da je aktivna snov, ki zavira razvoj bolezenskih znamenj, prisotna v visokem deležu. Vsekakor so ti ekstrakti zanimivi z vidika nadaljnjih analiz.

Ekstrakt iz *Bovista nigrescens* (11), ki je učinkoval zaviralno na rast *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* ter ekstrakt iz *Boletus calopus* (10), ki je učinkoval zaviralno le na rast *X. campestris* pv. *vesicatoria* (poglavje 4.3.4), sta pri testu patogenosti za *E. amylovora* povzročila intenzivnejši razvoj bolezenskih znamenj kot pri PK (slika 40).

Med ekstrakti, ki so bili testirani v *in vivo* ter *in vitro* testih, so nekateri ekstrakti pri testih patogenosti kazali zaviranje bolezenskih znamenj, hkrati pa so rast bakterij v tekočem gojišču spodbujali. O vplivu očiščenih in koncentriranih pripravkov, tripsinskega in papainskega inhibitorja iz meglenke *Clitocybe nebularis* (D in H) ter papainski inhibitor iz krompirja (G), ki so zaviralno učinkovali na *E. amylovora* v *in vitro* testu, nimamo podatkov za test patogenosti (test ni bil ustrezen zaradi neprernih hrušk). Glede na rezultate lahko zaključimo, da ni nujno, da obstaja korelacija med vplivom ekstraktov gliv na rast bakterije *E. amylovora* v tekočem gojišču in vplivom ekstraktov na njeno patogenost (razvoj bolezenskih znamenj). Za trditev ali je tovrsten test primeren za ugotavljanje vpliva ekstraktov gliv na izražanje bolezenskih znamenj *E. amylovora*, bi morali test ponoviti na ustrezno nezrelih sadežih hrušk.

#### **4.4.2 Vpliv ekstraktov gliv na bolezenska znamenja v testu patogenosti bakterije *Erwinia chrysanthemi***

Na rezinah gomoljev krompirja smo testirali vseh 77 proteinskih ekstraktov gliv (Priloga C) v petih serijah po shemi, kot je prikazano v preglednici 4 (poglavje 3.4.2). Test patogenosti smo ponovili (t.i. test 2) le s 73-imi inokulumi bakterije in ekstraktov, ki so bili shranjeni mesec dni pri - 20°C, brez dodanega glicerola. Razvoj bolezenskih znamenj smo ocenili drugi in tretji dan po inokulaciji. Tretji dan smo rezine krompirja stehali ter določili utežni delež zdravega in razgrajenega tkiva.

V bakterijski suspenziji *E. chrysanthemi* s koncentracijo  $10^6$  cfu/ml, s katero smo inokulirali rezine gomoljev krompirja, je bilo v prvi seriji testiranja (poglavje 3.4.2, preglednica 4)  $5,6 \times 10^5$  cfu, v drugi  $4,1 \times 10^4$  cfu, tretji  $4,4 \times 10^4$  cfu, v četrti pa  $9,2 \times 10^5$  cfu. Kljub temu, da je bil cfu v prvih treh serijah testiranja nižji, kot je za postopek testa patogenosti pri krompirju na NIB običajno, to nebi smelo vplivati na razvoj bolezenskih znamenj.

Rezultati utežnega deleža nekroze rezin gomoljev krompirja okuženih z *E. chrysanthemi* in ekstrakti gliv so prikazani v preglednici 10 in na sliki 41. Na sliki 42 je prikazan razvoj bolezenskih znamenj na rezini krompirja, okuženi z inokulumom bakterije in ekstrakta, drugi dan po inokulaciji.

Preglednica 10: Utežni delež nekroze rezin gomoljev krompirja okuženih z *E. chrysanthemi* in ekstrakti gliv. PK (pozitivna kontrola), Ks (kontrola s streptomycin sulfatom), / (tretma ni bil testiran), - (ni prišlo do razvoja bolezenskih znamenj).

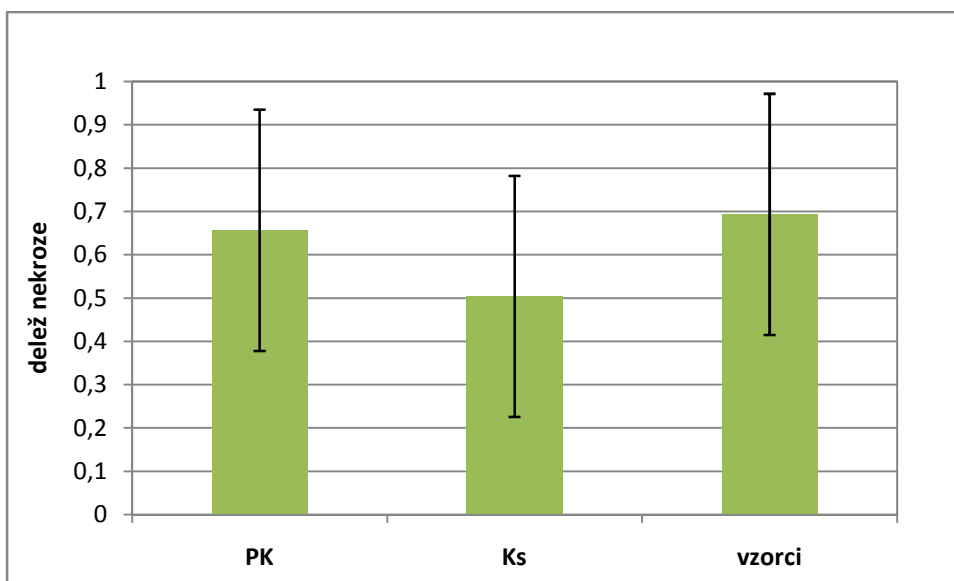
EKSTRAKT		UTEŽNI DELEŽ NEKROZE				
oznaka	lat. ime	test 1	test 2	povprečje	±	standardni odklon
1	<i>Agaricus campestris</i>	0,73	0,88	0,81	±	0,11
2	<i>Agaricus silvaticus</i>	0,73	0,38	0,56	±	0,25
3	<i>Albatrellus pes-caprae</i>	0,87		-		
4	<i>Amanita caesarea</i>	0,61	0,98	0,80	±	0,26
5	<i>Amanita lividopallescens</i>	0,66	0,96	0,81	±	0,21
5*	<i>Amanita lividopallescens</i>	0,03	0,07	0,05	±	0,03
6	<i>Amanita muscaria</i>	0,87	0,89	0,88	±	0,01
7	<i>Amanita phalloides</i>	0,35	0,74	0,55	±	0,28
8	<i>Amanita vaginata</i>	0,46	0,18	0,32	±	0,20
9	<i>Armillaria mellea</i>	0,70	0,93	0,81	±	0,16
9*	<i>Armillaria mellea</i>	0,68	0,77	0,72	±	0,06
10	<i>Boletus calopus</i>	0,98	0,42	0,70	±	0,40
11	<i>Bovista nigrescens</i>	0,95		-		
12	<i>Clavaria flava/Ramaria flava</i>	0,94	0,94	0,94	±	0,00
13	<i>Clitocybe alexandri</i>	0,72	0,96	0,84	±	0,17
14	<i>Clitocybe odora</i>	0,91	0,94	0,92	±	0,02
15	<i>Collybia confluens</i>	0,17	0,77	0,47	±	0,43
16	<i>Coprinus comatus</i>	0,69	0,46	0,58	±	0,16
17	<i>Cortinarius coerulescentium</i>	0,39		-		
18	<i>Cortinarius sp.</i>	0,85		-		
19	<i>Cortinarius glaucopus</i>	0,26	0,12	0,19	±	0,10
20	<i>Cortinarius saginus</i>	0,77	0,30	0,54	±	0,33
21	<i>Craterellus cornucopioides</i>	0,68	0,86	0,77	±	0,13
22	<i>Entoloma rhodopolium</i>	0,97		-		
23	<i>Fistulina hepatica</i>	0,93		-		
24	<i>Gaestrum rufescens</i>	0,92		-		
25	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	0,95		-		
26	<i>Hygrocybe ovina</i>	0,94	0,50	0,72	±	0,31
27	<i>Hydnum repandum</i>	0,28		-		
28	<i>Hygrophorus eburneus</i>	0,94		-		
29	<i>Hygrophorus fagi</i>	0,46		-		
30	<i>Hygrophorus erubescens</i>	0,17	0,85	0,51	±	0,48
31	<i>Hypholoma fasciculare</i>	0,34		-		
32	<i>Lactarius blennius</i>	0,89	0,56	0,72	±	0,23
33	<i>Lactarius citriolens</i>	0,88		-		
34	<i>Lactarius deterrimus</i>	0,92		-		
35	<i>Lactarius illyricus</i>	0,98	0,51	0,75	±	0,33
36	<i>Leccinum scabrum</i>	0,52	0,40	0,46	±	0,08
37	<i>Lepiota ignivolvata</i>	0,94	0,46	0,70	±	0,34
38	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	0,16	0,26	0,21	±	0,07

preglednica 10 se nadaljuje

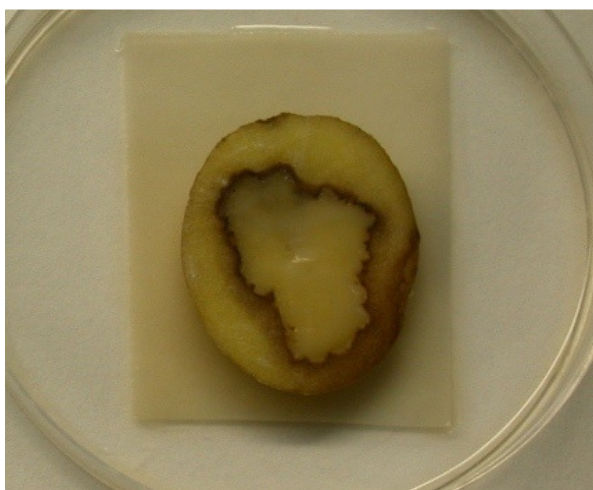


nadaljevanje preglednice 10

EKSTRAKT		DELEŽ NEKROZE			
oznaka	lat. ime	test 1	test 2	povprečje ±	standardni odklon
38*	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	0,95	0,98	0,96 ±	0,02
39	<i>Lepista glaucocana</i>	0,79	0,19	0,49 ±	0,42
40	<i>Lepista nebularis/Clitocybe nebularis</i>	0,92	0,17	0,55 ±	0,53
41	<i>Lepista nuda</i>	0,92	0,35	0,64 ±	0,41
42	<i>Lycoperdon perlatum</i>	0,95	0,96	0,95 ±	0,00
43	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	0,50	0,35	0,42 ±	0,11
44	<i>Mycena galericulata</i>	0,91		-	
45	<i>Paxillus atrotomentosus</i>	0,83	0,68	0,76 ±	0,11
46	<i>Ramaria botrytis</i>	0,54		-	
47	<i>Ramaria formosa</i>	0,58	0,94	0,76 ±	0,25
48	<i>Russula albonigra</i>	0,69		-	
49	<i>Sarcodon imbricatus</i>	0,62	0,33	0,47 ±	0,20
50	<i>Suillus bovinus</i>	0,84	0,19	0,52 ±	0,46
51	<i>Suillus granulatus</i>	0,89	0,25	0,57 ±	0,45
52	<i>Suillus variegatus</i>	0,92	0,28	0,60 ±	0,45
53	<i>Tricholoma atosquamosum</i>	0,80	0,25	0,52 ±	0,38
54	<i>Tricholoma bufonium</i>	0,56	0,45	0,51 ±	0,08
55	<i>Tricholoma imbricatum</i>	0,73	0,89	0,81 ±	0,11
56	<i>Tricholoma mutabile</i>	0,83	0,21	0,52 ±	0,44
57	<i>Tricholoma pardinum</i>	0,93	0,65	0,79 ±	0,20
58	<i>Tricholoma saponaceum</i>	0,93	0,79	0,86 ±	0,10
59	<i>Tricholoma vaccinum</i>	0,96	0,85	0,91 ±	0,07
60	<i>Tricholomopsis rutilans</i>	0,51	0,46	0,49 ±	0,03
61	<i>Volvariella speciosa/Volvariella gloiocephala</i>	0,96	0,90	0,93 ±	0,04
62	<i>Xerocomus badius</i>	0,50	0,20	0,35 ±	0,22
62*	<i>Xerocomus badius</i>	0,60	0,62	0,61 ±	0,01
63	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	0,51	0,34	0,43 ±	0,12
D	NIB ekstrakt	0,71		/	
G	NIB ekstrakt	0,39		/	
H	NIB ekstrakt	0,78		/	
f7	foto 7 (oznaka glive)	0,53	0,23	0,38 ±	0,22
f13	foto 13 (oznaka glive)	0,67	0,44	0,56 ±	0,16
N21	N21 (oznaka glive)	0,30		-	
N31	N31 (oznaka glive)	0,39		-	
G15	NIB ekstrakt	0,64		-	
G19	NIB ekstrakt, <i>Tricholoma bufonium</i>	0,88		-	
G27	NIB ekstrakt, <i>Clitocybe geotropa</i>	0,64		-	
Ks	kontrola z antibiotikom	0,50	/	0,50 ±	0,28
PK	pozitivna kontrola	0,66	/	0,66 ±	0,28



Slika 41: Povprečni delež nekroze na rezinah gomoljev krompirja okuženih z *E. chrysanthemi* in ekstrakti gliv (vzorci), pozitivnimi kontrolami (PK) in kontrolami z antibiotikom streptomycin sulfatom (Ks).



Slika 42: Test patogenosti za *E. chrysanthemi* na rezini gomolja krompirja, okuženi z inokulumom bakterije in ekstraktom (9; Priloga C), drugi dan po inokulaciji.

Bolezenska znamenja, značilna za okužbo gomoljev krompirja z *E. chrysanthemi* (zmehčano in utekočinjeno tkivo, nekroza) so se pojavila pri vseh rezinah krompirja, testiranih s 77-imi ekstrakti gliv ter pri vseh pozitivnih (PK) (14 paralel) in kontrolah z antibiotikom streptomycin sulfatom (Ks) (13 paralel). Pri ponovitvi testa patogenosti (test 2) so se bolezenska znamenja pojavila le pri 51-ih rezinah krompirja oz. 51-ih ekstraktih od 73-ih testiranih. Razlog tega je lahko popokanje bakterijskih celic med shranjevanjem

inokulumov mesec dni pri - 20°C, brez dodanega glicerola, zaradi česar so imeli inokulumi zmanjšano koncentracijo bakterij (cfu/ml).

Vse kontrole ekstraktov gliv in kontrole s pufrom so tekom opazovanja ostale brez sprememb, po petih in več dneh po inokulaciji pa so rezine krompirja začele rjaveti (oksidacija tkiva), ponekod se je razvila plesen, zaradi inkubacije v toplem in vlažnem okolju.

Ks (*E. chrysanthemi* in antibiotik streptomycin sulfat) so razvile bolezenska znamenja (utežni delež nekroze Ks je bil  $0,50 \pm 0,28$ ), kar kaže na to, da je bila uporabljena koncentracija antibiotika prenizka. Streptomycin sulfat je antibiotik s širokim spektrom delovanja, vendar učinkuje le v dovolj visoki koncentraciji. V nasprotju s tem je bila uporabljena koncentracija antibiotika pri preverjanju vpliva ekstraktov na rast bakterije v tekočem gojišču dovolj visoka.

Iz slike 41 je razvidno, da so standardni odkloni vrednosti utežnih deležev nekroze tako pri PK ( $0,66 \pm 0,28$ ) in Ks ( $0,50 \pm 0,28$ ), kot pri vzorcih ( $0,67 \pm 0,25$ ) velike in da je ponovljivost testa razmeroma slaba in ne omogoča ugotavljanja kvantitativnih razlik med ekstrati gliv. Test patogenosti za *E. chrysanthemi* na rezinah gomoljev krompirja je primeren za potrjevanje okužbe z bakterijo, ker pa so nihanja rezultatov prevelika, tovrsten test brez posebnih prilagoditev za preverjanje vpliva ekstraktov gliv na izražanje bolezenskih znamenj ni primeren.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Bakterijskih boleznih rastlin, ki povzročajo precejšnjo gospodarsko in ekonomsko škodo, za razliko od boleznih, ki jih povzročajo glive in plesni, z obstoječimi fitofarmaceutskimi sredstvi ni mogoče učinkovito in varno zatirati. Zaradi tega je iskanje novih virov in razvoj novih protimikrobnih učinkovin bistvenega pomena.

Glive iz debla *Basidiomycota* so zaradi hranilne vrednosti in številnih farmakoloških lastnosti, predmet številnih raziskav (Chang, 1996; Manzi in sod., 1996; Wasser in Weis, 1999; Lindequist in sod., 2005; Barros in sod., 2007), poleg tega so glive znane tudi po produkciji številnih bioaktivnih učinkovin, ki pripadajo različnim kemijskim skupinam, (Ng, 2004). Podobno kot rastline, potrebujejo tudi glive za preživetje v naravnem okolju protibakterijske in protiglivne snovi (Lindequist in sod., 2005). Raziskovalci poročajo o protibakterijski aktivnosti različnih vrst gliv prostotrosnic, vendar so gobe kot vir proteinskih protimikrobnih snovi v primerjavi z rastlinskimi in drugimi viri slabo raziskani. Primer glivne protimikrobne snovi je klitocipin, iz glive *Clitocybe nebularis* (Batsch) P. Kumm. izolirani cisteinski proteinazni inhibitor (Brzin, 2000), ki je kazal protibakterijsko aktivnost tudi proti nekaterim fitopatogenim bakterijam (osebni vir: Dreo, 2010). Potencialne protimikrobne učinkovine iz gliv so tudi lektini, ki kažejo protitumorno, antiproliferativno (Wang in sod., 1998; Pohleven in sod., 2009) ter tudi protivirusno učinkovanje (Sun in sod., 2003).

Namen diplomskega dela je bil raziskati protibakterijske učinke ekstraktov različnih vrst gliv prostotrosnic na izbrane bakterije, ki povzročajo bolezni rastlin. Kot modelne bakterije smo izbrali nekatere povzročitelje najpomembnejših in najbolj razširjenih boleznih rastlin: *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Poleg neposredne škode, ki jo povzročajo, sta *E. amylovora* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* tudi nadzorovana škodljiva organizma, kar pomeni, da njuna prisotnost pomeni tudi omejevanje trgovine in s tem dodatno škodo. Sam nadzor vključuje predvsem preventivne ukrepe preprečevanja

okužb ter odstranjevanje in uničevanje obolelih rastlin, medtem ko so možnosti njihovega kemičnega zatiranja zelo omejene.

Pri pripravi ekstraktov gliv smo se osredotočili na proteinske učinkovine, saj proteini predstavljajo velik del trosnjaka (Manzi in sod., 1996; Barros in sod., 2007a) in poleg možnosti direktnega tretiranja rastlin, dolgoročno omogočajo tudi razvoj odpornih, transgenih rastlin (Mourgues in sod., 1998; Montesinos in sod., 2002). Delno selektivno izolacijo snovi iz gliv smo zagotovili s samim načinom priprave ekstrakta z enojno precipitacijo proteinov s hladnim acetonom. Koncentracija proteinov v pripravljenih ekstraktih se je razlikovala, tako med posameznimi vrstami prostotrosnih gliv, kot med posameznimi trosnjaki iste vrste. To smo pričakovali, saj je iz literature znano, da je koncentracija proteinov pri glivah vezana na starost trosnjkov, vrsto in kvaliteto rastišča ter na razpoložljivo vodo v okolju in je zato dokaj variabilna ter, da lahko snovi proteinske narave predstavljajo tudi do 30% suhe teže glive (Manzi in sod., 1996; Barros in sod., 2007a).

Preverjali smo vpliv glivnih ekstraktov na rast izbranih bakterij ter njihov vpliv na izražanje bolezenskih znamenj v uveljavljenih sistemih za potrjevanje patogenosti bakterij *E. amylovora* in *E. chrysanthemi*.

Raziskovalci, ki poročajo o protibakterijski aktivnosti vodnih ali organskih glivnih ekstraktov različnih vrst prostotrosnih gliv, so kot metodo uporabili metodo difuzije v agarju (Rosa in sod., 2003; Tambekar in sod., 2006; Turkkoglu in sod., 2006; Imitaj in Lee, 2007; Turkoglu in sod., 2007a; Turkoglu in sod., 2007b; Jagadish in sod., 2008; Akyuz in Kirbag, 2009). Difuzijska metoda v agarju je sicer tehnično enostavna, ponovljiva in cenovno ugodna, vendar je zamudna in zato neprimerna za presejalno preverjanje protibakterijskega učinkovanja večjega števila snovi. Ravno tako ne omogoča detekcije molekularno večjih aktivnih snovi in/ali snovi, ki slabše difundirajo skozi gojišče.

V naši študiji smo za presejalno metodo vpliva proteinskih ekstraktov gliv na rast bakterij uporabili metodo spremljanja kinetike rasti bakterij v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 595 nanometrov. Inhibitorni učinek

ekstraktov smo ugotavljali s primerjavo rasti med bakterijami, ki so rastle brez ekstrakta in bakterijami, ki so rastle v prisotnosti ekstrakta. Vrednosti OD<sub>595</sub> kontrol ekstraktov gliv so pri vseh serijah meritev ostale negativne (slika 12, Priloga D), kar kaže na to, da so bili po opisanem postopku pripravljene ekstrakti sterilni in primerni za analizo.

Samo metodo, posebej gojišče, koncentracijo bakterij ter čas inkubacije, smo optimizirali za izbrane bakterije. Rast *E. amylovora* in *E. chrysanthemi* je bila pri izbranih pogojih gojenja optimalna (pri obeh bakterijah so bile maksimalne vrednosti OD<sub>595</sub> pozitivnih kontrol nad vrednostjo 1,0; slika 27 in 33).

Ponovljivost rasti bakterij znotraj posamične mikrotitrne plošče je bila zelo dobra pri vseh testiranih bakterijah in ekstraktih. Ponovljivost med posameznimi mikrotitrskimi ploščami zaradi tehničnih pogojev izvajanja, predvsem manjše možnosti nadzorovanja pogojev inkubacije v uporabljenem modelu stresalnika in večkratnega prestavljanja plošče iz stresalnika v čitalec optične gostote, ni bila zadovoljiva. V naši študiji smo zato rezultate posamezne mikrotitrne plošče vrednotili glede na rastne krivulje bakterij na isti plošči. Z uporabo naprednejših aparatov, na primer aparature BioScreen (Oy Growth Curves Ab Ltd, Finska), pri kateri meritve optične gostote potekajo v samem inkubatorju, bi predvidoma dosegli večjo ponovljivost med ploščami. Vse serije kontrol z antibiotikom streptomycin sulfatom so tako pri bakteriji *E. amylovora* (slika 13), kot pri bakteriji *E. chrysanthemi* (slika 14) ostale ustrezno negativne.

V primerjavi s pogoji, ki se uporabljajo v testiranju medicinsko pomembnih bakterij, je pogoje za testiranje bakterij, ki povzročajo bolezni rastlin, potrebno optimizirati. V naši študiji je bila optimizacija testa za bakteriji *E. amylovora* in *E. chrysanthemi* hitra in uspešna. V primeru bakterije *X. campestris* pv. *vesicatoria* je v prihodnje potrebna dodatna optimizacija, kar je povezano s tvorbo velike količine sluzi, počasnejšo rastjo in večjo potrebo po kisiku. Ob testiranju v mikrotitrskih ploščah lahko ob dolgotrajnejši inkubaciji pride do pomanjkanja kisika in izhlapevanja gojišča (Dreo in sod., 2007).

Testiranje protimikrobnega učinka v mikrotitrskih ploščah se je izkazalo za praktično in, zaradi manjše količine potrebnega materiala, cenovno ugodno tudi v primeru večjega števila vzorcev.

Pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv smo se osredotočili na morebitno inhibicijo aktivno rastočih bakterij – eksponencialni del rastne krivulje. Najmanjšo spremembo v vrednosti OD<sub>595</sub> v eksponencialni fazi, ki smo jo vrednotili kot spremembo v rasti bakterije, smo določili vizualno. V primeru, ko se krivulja rasti posamezne bakterije z ekstraktom ni pokrivala s krivuljo pozitivne kontrole vključno z njenim standardnim odklonom, smo upoštevali, da ima ekstrakt gliv vpliv na rast bakterije (preglednica 5).

Iz rezultatov vpliva ekstraktov gliv (Priloga C) na rast bakterij v tekočem gojišču King B (slike 22-39) je razvidno, da so ekstrakti gliv (68 od 77tih) učinkovali bodisi tako, da je bila rast bakterije podobna rasti njene pozitivne kontrole, bodisi tako, da je bila rast bakterije intenzivnejša od rasti njene pozitivne kontrole. Npr. ekstrakti iz *Amanita lividopallescens* (5\*), *Amanita vaginata* (8) in *Cortinarius coerulescentium* (17) so pri vseh treh bakterijah povzročili izrazito intenzivno rast v primerjavi z rastjo pozitivne kontrole (preglednica 5, slika 1b), hkrati so dosegli tudi najvišje vrednosti OD<sub>595</sub> pri posamezni bakteriji. Zanimivo je, da so ekstrakti, ki so vzpodbujali rast bakterij, imeli nadpovprečno visoke koncentracije proteinov (točka 4.1.1), najvišje vrednosti pa prav ekstrakta iz *Amanita lividopallescens* (5\*) in *Amanita vaginata* (8). Intenzivnejša rast bakterij v primerjavi s pozitivno kontrolo je bolj verjetno posledica prisotnosti stimulatorjev rasti bakterij v ekstraktih gliv ob hkratni odsotnosti učinkovitih inhibitorjev, kot posledica delovanja ekstraktov gliv kot dodatne hranilne snovi, saj slednje ne morejo učinkovati tako izrazito.

Devet ekstraktov gliv in proteinskih inhibitorjev od skupaj 77tih je učinkovalo zaviralno na rast vsaj ene od bakterij *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* v primerjavi z rastjo pozitivne kontrole posamezne bakterije.

Rast *E. amylovora* so zavirali le prečiščeni in skoncentrirani pripravki, tripsinski inhibitor iz meglenke *Clitocybe nebularis* (D), papainski inhibitor iz krompirja (G) in papainski

inhibitor iz meglenske *Clitocybe nebularis* (H). Ekstrakti celokupnih proteinov niso kazali zaviralnega učinka proti tej bakteriji, kar kaže na pričakovan vpliv koncentracije posamezne snovi. Protibakterijsko učinkovanje glivnih ekstraktov v tekočem gojišču bi bilo verjetno izrazitejše, če bi v testu uporabili neredčene ekstrakte (ekstrakte smo 10-krat redčili), saj bi s tem povečali koncentracijo protibakterijske učinkovine. Vendar bi pri neredčenih ekstraktih gliv imeli težave tako z njihovo sterilnostjo, saj so bili le ti zelo koncentrirani, kar je onemogočalo njihovo filtracijo in s tem sterilnost, kot tudi z izrazitejšimi stranskimi učinki. Dodatno pa mora biti snov učinkovita pri nižjih koncentracijah, da je zanimiva za uporabo.

Tripsinski inhibitor iz meglenske *Clitocybe nebularis* (D) in papainski inhibitor iz krompirja (G) sta delovala zaviralno tudi na rast *E. chrysanthemi*. Rast *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* so zavirali ekstrakti iz *Amanita phalloides* (7), *Bovista nigrescens* (11), *Tricholoma saponaceum* (58) in *Clitocybe geotropa* (G27). Ekstrakta iz *Boletus calopus* (10) in *Cortinarius* sp. (18) sta zavirala rast le *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Nekateri ekstrakti gliv so se izkazali za izrazito uspešne, saj so zavirali rast bakterije do takšne mere, da do namnoževanja v eksponencialni fazi sploh ni prišlo – rast bakterije z ekstraktom je bila podobna rasti kontrole z antibiotikom, pri *X. campestris* pv. *vesicatoria* je bil vpliv ekstrakta celo bolj zaviralen od uporabljene koncentracije antibiotika. Izrazito zaviranje rasti *X. campestris* pv. *vesicatoria* so kazali ekstrakti iz *Amanita phalloides* (7), *Boletus calopus* (10) in *Clitocybe geotropa* (G27). Slednji je imel izrazito zaviralen učinek tudi na *E. chrysanthemi*.

O protibakterijskem učinkovanju proteinskih glivnih ekstraktov poroča tudi Skubic (2007). Nekateri od ekstraktov, ki so kazali protibakterijske učinke v naši študiji, so delovali zaviralno tudi proti nekaterim drugim bakterijskim povzročiteljem bolezni rastlin. Ekstrakti iz *Amanita phalloides* (7), *Bovista nigrescens* (11) in *Tricholoma saponaceum* (58) so v tekočem gojišču zaviralno učinkovali na bakterijo *Ralstonia solanaceum*, ekstrakt iz *Amanita phalloides* (7) pa na trdnem gojišču na bakterijo *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Rezultati kažejo, da je vpliv nekaterih ekstraktov nespecifičen, saj učinkujejo na zelo različne bakterije iz skupine gram pozitivnih in gram negativnih bakterij (npr. ekstrakt iz *Bovista nigrescens* (11) in *Tricholoma saponaceum* (58) sta zaviralno



učinkovala na *E. chrysanthemi*, *X. campestris* pv. *vesicatoria* in *Ralstonia solanacearum*, ekstrakt iz *Amanita phalloides* (7) pa na vse tri omenjene bakterije ter tudi na *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*), pri drugih pa so lahko vključeni bolj specifični mehanizmi delovanja (ekstrakta iz *Boletus calopus* (10) in *Cortinarius* sp. (18) sta zaviralno učinkovala le na *X. campestris* pv. *vesicatoria*).

Ježek (2010) pa poroča o zaviranju pojava bolezenskih znamenj na rastlini krompirja inokulirani z bakterijo *R. solanacearum* in proteinskim ekstraktom iz *Tricholoma* sp. Pričujoči rezultati protibakterijskega učinkovanja ekstraktov gliv v tekočem gojišču kažejo, da so ekstrakti gliv iz preglednice 5 primerni za nadaljne podrobnejše raziskave ter določanje protibakterijskih učinkovin v ekstraktih gliv.

Kljub temu, da naravo substanc, ki povzročajo zaviranje rasti bakterij še ni mogoče določiti, lahko glede na to, da so med proteinskimi ekstrakti gliv zaviralno učinkovali tudi vzorci, ki so očiščeni inhibitorji proteinaz (ekstrakt D je tripsinski inhibitor iz glive *C. nebularis* oz. serinski proteinazni inhibitor CnSPI, ekstrakt H je papainski inhibitor iz *C. nebularis* oz. cisteinski proteinazni inhibitor klitocipin, ekstrakt G pa cisteinski proteinazni inhibitor iz krompirja) ter, da imajo po podatkih MEROPS-a, *E. amylovora* in *E. chrysanthemi* proteinaze zastopane tudi v skupini cisteinskih in serinskih proteinaz ([www.merops.sanger.ac.uk](http://www.merops.sanger.ac.uk)), predvidevamo, da so aktivne učinkovine v proteinskih ekstraktih gliv inhibitorji proteinaz.

Pri testiranju večine ekstraktov iz gliv posameznega rodu smo opazili različne vplive na rast bakterij. Ekstrakti iz rodov *Amanita* (mušnice), *Cortinarius* (koprenke) in *Tricholoma* (kolobarnice) so rast določenih bakterij pospeševali, določenih pa zavirali. Npr. ekstrakt iz *Amanita phalloides* (zelena mušnica; ekstrakt 7) je zaviral rast *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria*, pri *E. amylovora* pa je bila rast podobna rasti pozitivne kontrole, medtem ko je bila pri ostalih petih ekstraktih iz rodu *Amanita* (*A. caesarea*, *A. lividopallenscens*, *Amanita muscaria*, *A. vaginata*) rast pri vseh treh bakterijah bodisi intenzivnejša, bodisi podobna rasti pozitivne kontrole. Raznolikost v protibakterijskem učinkovanju ni presenetljiva in je posledica različne biokemijske sestave posameznega trosnjaka, ki je odvisna tako od vrste, kot od njegove zrelosti in rastišča (Barros in sod.,

2007b). Za pripravo ekstraktov smo uporabili cele in različno stare trosnjake. Glede na to, da imajo lahko sestavine mlajših trosnjakov večji protimikrobni učinek kakor zreli trosnjaki (Barros in sod., 2007), bi bilo v nadaljne študije smiselno vključiti predvsem mlajše trosnjake.

Poleg vpliva proteinskih ekstraktov gliv na rast bakterij v *in vitro* pogojih, smo v študiji želeli preveriti tudi njihov vpliva na izražanje bolezenskih znamenj v *in vivo* pogojih. V ta namen smo uporabili in ovrednotili primernost uveljavljenih testov patogenosti in sicer na nezrelih hruškah za bakterijo *E. amylovora* (OEPP/EPPO, 2004) in rezinah gomoljev krompirja za *E. chrysanthemi* (Lelliot in Stead 1987; De Boer in Kelman, 2001).

Pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv na izražanje bolezenskih znamenj v testu patogenosti za *E. amylovora* je prišlo do razvoja bolezenskih znamenj pri vseh nezrelih hruškah, testiranih s 37-imi izbranimi ekstrakti gliv in pozitivno kontrolo. Zaradi pomanjkanje hrušk in ozkega časovnega okvira, primerne za testiranje hrušk, ni bilo možnosti, da bi preverili ponovljivost testa na pozitivni kontroli in ekstraktih. Rezultati kažejo, da bi ekstrakti gliv lahko vplivali na razvoj bolezenskih znamenj, predvsem hitrost nekroz in količino bakterijskega izcedka, pri čemer smo opazili tako ekstrakte, ki so razvoj bolezenskih znamenj pospeševali, kot tudi ekstrakte, ki so njihov razvoj zavirali. Kritična točka tega testa patogenosti je fiziološka zrelosti rastlinskega materiala, ki jo je izredno težko zagotavljati, saj že majhne razlike lahko vplivajo na razvoj bolezenskih znamenj. Iz tega razloga bi bilo za potrditev rezultatov vpliva ekstraktov gliv na razvoj bolezenskih znamenj v testu okuževanja nezrelih hrušk z bakterijo *E. amylovora*, potrebno testiranja ponoviti.

Za nadaljne tovrstne raziskave je obetaven ekstrakt iz *Suillus granulatus* (51), za katerega rezultati opravljenih testov patogenosti nakazujejo močno zaviranje bolezenskih znamenj v nezrelih hruškah. Po poročanju Ježek (2010) je ekstrakt iz *Suillus sp.* kazal zaviralne učinke tudi v *in vivo* testu patogenosti bakterije *Ralstonia solanacearum* na rastlinah krompirja. Zanimivo je, da ekstrakt iz *Suillus granulatus* (51) v *in vitro* testu ni učinkoval zaviralno.

Pri preverjanju vpliva ekstraktov gliv na izražanje bolezenskih znamenj v testu patogenosti za *E. chrysanthemi* je prišlo do razvoja bolezenskih znamenj pri vseh rezinah gomoljev krompirja, testiranih s 77-imi ekstrakti gliv ter pri vseh pozitivnih kontrolah in kontrolah z antibiotikom. Standardni odkloni vrednosti utežnih deležev nekroze pri rezinah gomoljev krompirja so bili veliki tako pri pozitivni kontroli, kot pri kontroli z antibiotikom in vzorcih (slika 41), zato smo zaključili, da je ponovljivost testa nezadovoljiva. Test patogenosti za *E. chrysanthemi* na rezinah gomoljev krompirja zaradi velikih nihanj rezultatov brez posebnih prilagoditev za preverjanje vpliva proteinskih ekstraktov gliv na izražanje bolezenskih znamenj ni primeren.

Tekom študije smo potrdili uporabnost *in vitro* testiranja protimikrobnega učinkovanja proteinskih ekstraktov iz gliv prostotrosov na izbrane bakterije, ki povzročajo bolezni gospodarsko pomembnih rastlin. Potrdili smo različno učinkovanje posameznih proteinskih ekstraktov na rast bakterije v *in vitro* testih in njihov vpliv na razvoj bolezenskih znamenj, kar kaže na pomembnost uporabe obeh pristopov pri določanju novih protimikrobnih snovi. Iz nabora 69-ih različnih vrst gliv smo našli ekstrakte, ki so kazali *in vitro* ali *in vivo* učinek proti testiranim bakterijam in so zanimivi za nadaljne študije karakterizacije aktivnih snovi, raziskave mehanizmov delovanja, uporabo v kontroli boleznih rastlin ter za morebiten razvoj na bakterijske boleznih odpornih rastlin.

## 5.2 SKLEPI

1. Metoda spremljanja kinetike protimikrobnega delovanja ekstraktov gliv v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči je primerna za preverjanje vpliva proteinskih ekstraktov gliv na rast bakterij *E. amylovora*, *E. chrysanthemi* in *X. campestris* pv. *vesicatoria* v tekočem gojišču.

2. Nekateri proteinski ekstrakti iz trosnjakov prostotrosnih vrst gliv so na rast fitopatogenih bakterij v tekočem gojišču učinkovali zaviralno.

2.1 Na rast bakterije *E. amylovora in vitro* so zaviralno učinkovali le prečiščeni in skoncentrirani pripravki, tripsinski in papainski inhibitor iz meglenke *Clitocybe nebularis* (D in H) ter papainski inhibitor iz krompirja (G).

2.2 Na rast bakterije *E. chrysanthemi in vitro* so zaviralno učinkovali prečiščeni in skoncentrirani tripsinski inhibitor iz meglenke *Clitocybe nebularis* (D) in papainski inhibitor iz krompirja (G) ter proteinski ekstrakti iz *Amanita phalloides* (7), *Bovista nigrescens* (11), *Tricholoma saponaceum* (58) in *Clitocybe geotropa* (G27), slednji je popolnoma zavrnil rast bakterije.

2.3 Na rast *X. campestris* pv. *vesicatoria in vitro* so zaviralno učinkovali proteinski ekstrakti iz *Bovista nigrescens* (11), *Cortinarius* sp.(18), *Tricholoma saponaceum* (58) ter iz *Amanita phalloides* (7), *Boletus calopus* (10) in *Clitocybe geotropa* (G27). Ekstrakti 7, 10 in G27 so popolnoma zavrli rast te bakterije.

3. Izražanje bolezenskih znamenj v testih patogenosti na nezrelih plodovih hrušk za *E. amylovora* se je razlikovalo v odvisnosti od vrste prostotrosne glive in fiziološke starosti rastlinskega tkiva.

3.1 Velik vpliv fiziološke starosti rastlinskega tkiva otežuje izvedbo in intepretacijo testa. Za potrditev rezultatov testa na nezrelih hruškah, bi bilo potrebno test ponoviti in ob tem spremljati fiziološko starost uporabljenih plodov.

3.2 Ponovljivost testa na rezinah gomoljev krompirja okuženih z bakterijo *E. chrysanthemi* je bila nezadostna za preverjanje *in vivo* učinka protimikrobnih snovi.

4. Primerjava rezultatov med *in vitro* ter *in vivo* testom za bakterijo *E. amylovora* kaže, da ni nujno, da proteinski ekstrakt gliv, ki zaviralno učinkuje *in vitro*, učinkuje zaviralno tudi *in vivo*. To kaže na pomembnost uporabe obeh pristopov pri iskanju novih protimikrobnih učinkovin.

## 6 POVZETEK

Bakterijskih boleznih rastlin, ki povzročajo precejšnjo gospodarsko in ekonomsko škodo, za razliko od boleznih, ki jih povzročajo glive in plesni, z obstoječimi fitofarmaceutskimi sredstvi ni mogoče učinkovito zatirati. Zaradi tega je iskanje novih virov in razvoj novih protimikrobnih učinkovin bistvenega pomena. Glive iz debla *Basidiomycota* so obetaven vir protimikrobnih učinkovin, saj dosedanje raziskave kažejo na raznolikost in učinkovitost njihovih bioaktivnih učinkovin, tudi takšnih proteinske narave in s protimikrobnim delovanjem. Proučili smo protibakterijsko učinkovanje ekstraktov različnih vrst gliv prostotrošnic proti izbranim fitopatogenim bakterijam: *Erwinia amylovora*, *Erwinia chrysanthemi* in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, pri čemer smo proučili vpliv ekstraktov na rast bakterij (*in vitro*) ter njihov vpliv na izražanje bolezenskih znamenj v *in vivo* pogojih. Uveljavljeno metodo za preverjanje *in vitro* protibakterijskega učinkovanja snovi smo za izbrane bakterije optimizirali ter potrdili njeno primernost za tovrstno rabo. Z analizo rastnih krivulj bakterijske kulture z in brez glivnih ekstraktov, smo identificirali proteinske ekstrakte gliv prostotrošnic z zaviralnimi učinki na rast vsaj ene ali več izbranih bakterij. Ugotovili smo tudi, da proteinski ekstrakti gliv vplivajo na izražanje bolezenskih znamenj *in vivo*, v testih patogenosti na nezrelih hruškah za *E. amylovora*. Učinkovanje proteinskega ekstrakta gliv v *in vitro* in *in vivo* pogojih se lahko razlikuje, kar kaže na pomembnost uporabe obeh pristopov pri iskanju novih protimikrobnih učinkovin.

## 7 VIRI

Abe M., Abe K., Kuroda M., Arai S. 1992. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur. Journal Biochemistry*, 209: 933-937.

Abramovitch R. B., Martin G. B. 2004. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 356-364.

Aldwinckle H. S., Bhaskara Reddy M. V., Norelli J. L. 2002. Evaluation of control of fire blight of apple blossom and shoots with SAR inducers, biological agents, a growth regulator, copper compounds, and other materials. *Acta Hort. (ISHS)* 590:325-331

Agrios G. N. 2005. *Plant pathology. V: How plants defend themselves against pathogens. V: Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. 5th Edition.* London, Elsevier Academic Press: 207-248, 615-703.

Akyuz M., Kirbag S. 2009. Antimicrobial activity of *Pleurotus eryngii* var. *ferulae* grown on various agro-wastes. *Eurasian Journal of Biosciences*, 3: 58-63.

Arzenšek B., Tratnik B., Malovrh B. 2002. *Naše gobe.* Ljubljana, Modrijan, str. 16.

Avanzo P., Sabotič J., Anžlovar S., Popovič T., Leonardi A., Pain R. H., Kos J., Brzin J. 2009. Trypsin-specific inhibitors from the basidiomycete *Clitocybe nebularis* with regulatory and defensive functions. *Microbiology*, 155 (Pt 12): 3971-3981.

Barrett A. J. 1986. An introduction to the proteins. V: Proteinase inhibitors (Barrett A. J. and Salvens G.). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, New York, 3-22.

Barrett A. J. 1994. Classification of peptidases. *Methods in enzymology*, 244: 3-15.

Barros L., Baptista P., Correia D. M., Casal S., Oliveira B., Ferreira I. C. F. R. 2007a. Fatty acid and sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, 105: 140-145.

Barros L., Baptista P., Estevinho L. M., Ferreira I. C. F. R. 2007b. Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius* sp. mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (21): 8766-8771.

Barros L., Venturini B. A., Baptista P., Estevinho L. M., Ferreira I. C. F. R. 2008a. Chemical composition and biological properties of portuguese wild mushrooms: A comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (10): 3856-3862.

Barros L., Cruz T., Baptista P., Estevinho L. M., Ferreira I. C. F. R. 2008b. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology* 46 (8): 2742-2747.

Beluhan S., Ranogajec A. Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. *Food Chemistry In Press, Corrected Proof* (n.d.).

Berden Zrimec M., Zrimec A., Slanc P., Kac J., Kreft S. 2004. Screening for antibacterial activity in 72 species of wood-colonizing fungi by the *Vibrio fischeri* bioluminescence method. *J Basic Microbiol*, 44 (5): 407—412.

Berti P. J., Storer A. C. 1995. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *Journal of Molecular Biology*, 246: 276-283.

Brzin J., Rogelj B., Popovič T., Štrukelj B., Ritonja A. 2000. Clitocyprin, a new type of cysteine proteinase inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 20104-20109.

Burczyk J., Gawron A., Slotwinska M., Smietana B., Terminska K. 1996. Antimitotic activity of aqueous extracts of *Inonotus obliquus*. *Boll. Chim. Farm.*, 135: 306–309.

Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential application in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.

Cabrefiga J., Montesinos E. 2005. Analysis of aggressiveness of *Erwinia amylovora* using disease-dose and time relationships. *Phytopathology*, 95:1430-1437.

Callis J. 1995. Regulation of protein degradation. *The Plant Cell*, 7: 845-857.

Chang R. 1996. Functional properties of edible mushrooms. *Nutrition Review*, 54 (2): S91-S93.

Chen Z.-Y., Brown R., Lax A. R., Cleveland T. E., Russin J. S. 1999. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1320-1324.

Christeller J. T. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *The FEBS Journal*, 272: 5710-5722.

Christeller J. T., Farley P. C., Ramsay R. J., Sullivan P. A., Laing W. A. 1998. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. Journal of Biochemistry*, 254: 265-269.



Dangl J. L., Jones J. D. G. 2001. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411: 826-833.

De Boer S. H., Kelman A. 2001. *Erwinia soft rot group*. V: *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*, Third Edition. Schaad NW, Jones JB, Chun W (ur.). St. Paul, Minnesota, APS Press: 62.

De Leo F., Volpicella M., Licciulli F., Liuni S., Gallerani R., Ceco L. R. 2002. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res.*, 30 (1): 347-348.

Dreo T., Želko M., Skubic J., Brzin J. in Ravnikar M. 2007. Antibacterial activity of proteinaceous extracts of higher basidiomycetes mushrooms against plant pathogenic bacteria. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 227-228.

Dreo T. 2010. »Protibakterijski učinki klitocipina«. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo, tanja.dreo@nib.si (osebni vir, 17. 11. 2010).

Dunaevsky Y. E., Elpidina E. N., Vinokurov K. S., Belozersky M. A. 2005b. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Molecular Biology*, 39: 608-613.

EUCAST, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2000. Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. *ESCMID, Clinica. Microbiology and Infection*, 6 (9): 509-515.

EUCAST, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2003. Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *ESCMID, Clinical Microbiology and Infection*, 9: 1-7.

Habib H., Fazili K. M. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2 (3): 68-85.

Haq S. K., Atif S. M., Khan R. H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 431: 145-159.

Hibbett D. S., Binder M., Bischoff J. F., Blackwell M., Cannon P. F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P. M., Lücking R., Lumbsch H. T., Lutzoni, F., Matheny P. B., McLaughlin, D. J., Powell M. J., Redhead, S., Schoch C. L. et al. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.

Hirasawa M., Shouji N., Neta T., Fukushima K., Takada K. 1999. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake, an edible mushroom). *International Journal of Antibacterial Agents* 11: 151-157.

Imitaj A., Lee T.-S. 2007. Screening of antibacterial and antifungal activities from korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3 (3): 316-321.

Ishikawa N. K., Megumi Kasuya M. C. M., Dantas Vanetti M. C. 2001. Antibacterial activity of *Lentinula edodes* grown in liquid medium. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 206-210.

Jagadish L. K., Shenbhagaraman R., Venkatakrishnan V., Kaviyaran V. 2008. Studies on the Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Properties of Three indigenous *Pleurotus* Species. *Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 1: 20-29.

Janeš D. 2007. Raziskave gliv kot virov novih protimikrobnih učinkovin. Doktorska disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo.

Ježek I. 2010. Vpliv vnosa glivnih ekstraktov v rastline paradižnika in krompirja na razvoj bolezenskih znamenj, ki jih povzroča bakterija *Ralstonia solanacearum*. Diplomsko delo, Fakulteta za znanosti o okolju Univerze v Novi Gorici.

Jonathan S. G., Fasidi I. O. 2003. Antimicrobial activities of two nigerian edible macro fungi *Lycoperdon pusillum* (Bat. Ex) and *Lycoperdon giganteum* (Pers.). *African Journal of Biomedical Research*, 6: 80- 90.

Jorgensen J. H., Ferraro M. J. 1998. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 26: 973-980.

Joshi B. N., Sainani M. N., Bastawade K. B., Deshpande V. V., Gupta V. S., Ranjekar P. K. 1999. Pearl millet cysteine protease inhibitor: evidence for the presence of two distinct sites responsible for ant-fungal and anti-feedent activities. *Eur. Journal Biochemistry*, 265: 556-563.

Kidrič M., Fabian H., Brzin J., Popovič T., Pain R. H. 2002. Folding, stability, and secondary structure of a new dimeric cysteine proteinase inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297: 962-967.

Kim S. H., Song Y. S., Kim S. K., Kim B. C., Lim C. J., Park E. H. 2004. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of the n-BuOH subfraction of mushroom *Phellinus linteus*. *Journal of Ethnopharmacology*, 93:141–146.

Kondo H., Ijiri S., Abe K., Maeda H., Arai S. 1990. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. *The Journal of Biological Chemistry*, 265 (26): 15832-15837.

Kondo H., Ijiri S., Abe K., Maeda H., Arai S. 1992. Inhibitory effect of oryzacystatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected Vero cells. *FEBS Lett.*, 299: 48-50.

Kuroda M., Kiyosaki T., Matsumoto I., Misaka T., Arai S., Abe K. 2001. Molecular cloning, characterization and expression of wheat cystatins. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 65 (1): 22-28.

Laskowski M. Jr., Kato I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 593-626.

Lassoe T. 2006. Gobe. Ljubljana, Prešernova družba d.d.: 25-30 str.

Lawrence P.K., Koudal K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*. 5: 93-109.

Lelliot, Stead. 1987. *Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants* (Edit. T.F. Preece). Blackwell Scientific Publications, Oxford p: 163-164.

Lešnik, M. 2007. Ocena možnosti zatiranja hruševega ožiga v Sloveniji in predlogi za oblikovanje navodil za neposredno zatiranje v okuženih nasadih. Strokovno mnenje, Fitosanitarna uprava RS, 14 s.

Lešnik M., Knapič V., Orešek E., Ravnikar M., Jerman Cvelbar J., Potočnik A., Seljak G., Miklavc J., Viršček Marn M.. 2008. Obvladovanje hruševega ožiga (*Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.*). Ljubljana. MKGP, FURS, str: 3-4.

Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Jlich W. D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *eCAM* 2 (3): 285-299.

Madigan M. T., Martinko, J. M. 2006. Brock: *Biology of Microorganisms*. 11th Edition, Pearson Prentice Hall Education, Inc.

Manzi P., Gambelli L., Marconi S., Vivanti V., Pizzogerrato L. 1996. Nutrients in edible mushrooms: an inter species comparative study. *Food Chemistry*, 65: 477-482.

Montesinos E., Bonaterra A., Badosa E., frances J., Alemany J., Llorente I., Moragrega C. 2002. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. *Int. Microbiology* 5:169-175.

Mosolov V. V., Valueva T. V. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 41 (3): 227-246.

Mourgues F., Brisset M. N., Chevreau E. 1998. Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. *Trends in Biotechnology*, 16 (5): 203-210.

Ng T. B. 2004. Peptides and proteins from fungi. *Peptides*, 25: 1055-1073.

Odani S., Tominaga K., Kondou S., Hori H., Koide T., Hara S., Isemura M., Tsunasawa S. 1999. The inhibitory properties and primary structure of a novel serine proteinase inhibitor from the fruiting body of the basidiomycete *Lentinus edodes*. *FEBS, Eur. J. Biochem.*, 262: 915-923.

OEPP/EPPO/CABI. 1997. Quarantine Pests for Europe. Smith I.M., McNamara D. G., Scott P.R., Holderness M. (eds.). V: Data sheets on quarantine pests: *Erwinia amylovora*. V: Data sheets on quarantine pests: *Erwinia chrysanthemi*. V: Data sheets on quarantine pests: *Xanthomonas vesicatoria*. 2nd Edition. CABI International, Wallingford, UK, 1425 pp. ([www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm](http://www.eppo.org/QUARANTINE/listA2.htm))

OEPP/EPPO Standards. 2004. Diagnostic protocols for regulated pests, PM7/20: *Erwinia amylovora*. *Bulletin OEPP/EPPO, Bulletin* 34: 155-167.

Pautot V., Holzer F. M., Reischt B., Wallingt L. L. 1993. Leucine aminopeptidase: An inducible component of the defense response in *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Plant Biology*, 90: 9906-9910.

Pernas M., López-Solanilla E., Sanchez-Monge R., Salcedo G., Rodriguez-Palenzuela P. 1999. Antifungal activity of a plant cystatin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12 (7): 624-627.

Peumans W. J., Van Damme E. J. M. 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*, 109: 347-352.

Pohleven J., Obermajer N., Sabotič J., Anžlovar S., Sepčič K., Kos J, Kralj B., Štrukelj B., Brzin J. 2009. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790: 173–181.

Poler A. 1986. Obvarujmo se strupenih gob. Maribor, Založba Obzorja.

Purves W. K., Sadava D., Orians G. H., Heller H. C. 2001. Life, the science of biology. Sunderland, U.S.A, Sinauer Associates, Inc.

R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ravnikar M., Demšar T., Dreo T. 2001. Laboratorijska diagnostika bakterijske pegavosti na paradižniku in paprika. Zbornik predavanj in referatov 5. Slovenskega posvetovanja o varstvu rastlin v Čatežu ob Savi. Dobrovoljc D., Urek G. (ur.). DVRS, Ljubljana

Rawlings N. D., Barrett A. J. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*, 290: 205-218.

Rawlings N. D., Morton F. R., Barrett A. J. 2006. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*, 34: D270-D272.

Rawlings N. D., Tolle D. P., Barrett A. J. 2004. Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochemical Journal*, 378: 705-716.

Ribeiro B., Rangel J., Valentão P., Baptista P., Seabra R. M., Andrade P. B. 2006. Contents of carboxylic acids and two phenolics and antioxidant activity of dried portuguese wild edible mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54 (22): 8530-8537.

Roger L. M., Hart E. S., Kaye S. B., Maarte J. C., Eric A., Thomas J. H. V. 2000. Bean alfa-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *PNAS*, 97 (8): 3820-3825.

Rosa L. H., Gomes Machado K. M., Jacob C. C., Capelari M., Rosa C. A., Zani C. L. 2003. Screening of brazilian basidiomycetes for antimicrobial activity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 98 (87): 967-974.

Sabotič J., Trček T., Popovič T., Brzin J. 2007a. Basidiomycetes harbour a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128: 297-307.

Sabotič J., Galeša K., Popovič T., Leonardi A., Brzin J. 2007b. Comparison of natural and recombinant cliticypins, the fungal cysteine protease inhibitors. *Protein Expression and Purification*, 53: 104-111.

Sabotič J., Popovič T., Puizdar V., Brzin J. 2009. Macrocypins, a family of cysteine protease inhibitors from the basidiomycete *Macrolepiota procera*. FEBS J, 276 (16): 4334-4345.

Sakamoto M., Ishii S., Nishioka K. 1983. Heightened resistance against *Listeria monocytogenes* infection in malnourished rats after lentinan treatment: correlation with C3 levels. Nutr. Res., 3: 705-718.

Sano M., Yoshino K., Matsuzawa T., Ikekawa T. 2002. Inhibitory effects of edible higher basidiomycetes mushroom extracts on mouse type IV allergy. International Journal of Medicinal Mushrooms, 4: 37-41.

Schaller A. 2004. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta 220: 183-197.

Seljak G. 2004. Možnosti uporabe fitofarmaceutskih sredstev. V: Knapič, V. (ur.), Jankovič, I. (ur.). *Hrušev ožig = Erwinia amylovora*. 1. izd. Krško: Alex, 2004, s.

Skubic J. 2007. Vpliv ekstraktov gliv na rastlinske patogene bakterije. Diplomsko delo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani.

Sun H., Zhao C. G., Tong X., Qi J. P. 2003. A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 36, No. 2: 214-222

Suzuki R., Shimodaira H. 2006. Pvcust: an R package for assessing the uncertainty in hierarchical clustering. Bioinformatics 22 (12): 1540-1542.

Taiz T., Zeiger E. 2002. Plant Physiology. 3rd Edition. Sunderland, Sinauer Associates, Inc..

Tambekar D. H., Sonar T. P., Khodke M. V., Khante B. S. 2006. The novel antibacterials from two edible mushrooms: *Agaricus bisporus* and *Pleurotus sajor caju*. International Journal Of Pharmacology, 2 (5): 584-587.

Tornero P., Conejero V., Vera P. 1995. Primary structure and expression of a pathogen - induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. Plant Biology, 93: 6332-6337.

Turkoglu A., Kivrak I., Mercan N., Duru M. E., Gezer K., Turkoglu H. 2006. Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers. African Journal of Biotechnology, 5 (11): 1146-1150.

Turkoglu A., Duru M. E., Mercan N., Kivrak I., Gezer K. 2007a. Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. Food Chemistry, 101: 267-273.

Turkoglu A., Duru M. E., Mercan N. 2007b. Antioxidant and antimicrobial activity of *Russula delica* Fr.: an edible wild mushroom. Eurasian Journal of Analytical Chemistry, 2 (1): 54-66.

Urwin P. E., Atkinson H. J., Waller D., A., McPherson M. J. 1995. Plant Journal, 8 (1): 212-223.

Van der Hoorn R. A. L., Jones J. D. G. 2004. The plant proteolytic machinery and its role in defence. Current Opinion in Plant Biology, 7: 400-407.

Van der Zwet T., Thomson S. V., Covey R. P., Bonn W. G. 1990. Population of *Erwinia amylovora* on external and internal apple fruit tissues. Plant Diseases, 74: 711-716.

Vanneste J. L. (ed.). 2000. Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. London, CABI Publishing.

Valueva T. V., Mosolov V. V. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. Biochemistry, 69 (11): 1605-1309.

Viestra R. D. 1995. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. Plant Molecular Biology, 32: 275-302.

Vigil A. L. M., Palou E., Parish M. E., Davidson P. M. 2005. Methods for activity assay and evaluation of results. V: Antimicrobials in food. Davidson P. M., Sofos J. N., Branen A. L. (eds.). New York, CRC Press, 659-680.

Walsh T. A., Strickland J. A. 1993. Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. Plant Physiology, 103: 1227-1234.

Wang H. X., Ng T. B., Ooi V. E. C. 1998. Lectins from mushrooms. Mycol. Res., 102: 897-906.

Wasser S. P., Weis A. L. 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: modern perspective. Critical Reviews in Immunology 19: 65-96.

Werner N. A, Aldwinckle H. S. 2006. Biological control of Fire blight. *Biocontrol of Bacterial Plant Diseases*, 1st Symposium 2005, *Mitteilungen BBA*, 408, 220-223.

Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L. 1990. Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4576-4579.

Woods G. L., Washington J. A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. V: *Manual of clinical microbiology*. Murrey P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover F. C., Tenover F. C., Yolken R. R. (eds.). Washington, American Society for Microbiology: 1327-1341.

Wu D., Pae M., Ren Z., Guo Z., Smith D., Meydani S. N. 2007. Dietary supplementation with white button mushroom enhances natural killer cell activity in c57bl/6 mice. *The Journal of Nutrition, Mushroom and immunity*, 1472-1477.

[www.chem.qmul.ac.uk](http://www.chem.qmul.ac.uk) feb., 2009.

[www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/](http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/4/) feb., 2009.

[www.dvrs.bf.uni-lj.si](http://www.dvrs.bf.uni-lj.si), nov. 2009.

[www.fito-info.si/index1.asp?ID=OrgCirs\OpisiSkod/Bolezni/erw\\_amyl.htm](http://www.fito-info.si/index1.asp?ID=OrgCirs\OpisiSkod/Bolezni/erw_amyl.htm), nov. 2009

[www.furs.si/law/slo/zvr/Fito\\_pravilnik/FitoPravSeznamiSOEU\\_IIAII\\_bakterije.asp](http://www.furs.si/law/slo/zvr/Fito_pravilnik/FitoPravSeznamiSOEU_IIAII_bakterije.asp), nov. 2009.

[www.furs.si/law/slo/zvr/Fito\\_pravilnik/FitoPravSeznamiSOEU\\_IIAII\\_erwinia\\_amylovora\\_podatki.asp](http://www.furs.si/law/slo/zvr/Fito_pravilnik/FitoPravSeznamiSOEU_IIAII_erwinia_amylovora_podatki.asp), nov. 2009.

[www.furs.si/svn/zvr/hr\\_ozig.asp](http://www.furs.si/svn/zvr/hr_ozig.asp) nov. 2009

[www.gobe.si](http://www.gobe.si) okt., 2009.

[www.merops.sanger.ac.uk](http://www.merops.sanger.ac.uk) feb., 2009.

[www.tolweb.org/Fungi](http://www.tolweb.org/Fungi) feb. 2009.



## **ZAHVALA**

Najlepša hvala mentorici prof. dr. Maji Ravnikar za strokovno pomoč, nasvete pri pisanju naloge in pregled teksta, dr. Jožetu Brzinu za strokovne nasvete, pregled teksta in pomoč pri delu v laboratoriju ter recenzentki prof. dr. Ines Mandić-Mulec za skrben in natančen pregled naloge.

Najlepša hvala dr. Tanji Dreo za uvajanje v laboratorijsko delo, strokovno pomoč, nasvete pri pisanju naloge, poglobljen pregled teksta in nenazadnje za vso podporo, potrpljenje in razumevanje.

Hvala dr. Tatjani Popovič in Lidiji Matičič za tehnično pomoč in praktične nasvete pri delu v laboratoriju.

Hvala tudi vsem mojim. Za podporo, mecenstvo in jeklene živce.

## **PRILOGA A1: Sistematika uporabljenih vrst gliv prostotrosnic.**

Mycota (prave glive)

Ascomicotyna (zaprtotrosnice)

Basidiomycotina (prostotrosnice)

Basidiomycetes (podstavkovnice)

Agaricomycetidae (listarice)

Agaricales (listarji)

*Agaricaceae* (kukmarke)

*Agaricus campestris* (travniški kukmak)

*Agaricus silvaticus* (gozdni kukmak)

*Lepiota ignivolvata* (rdečedniščni dežniček)

*Leucoagaricus leucothites*, sinonim *Lepiota naucina* (rožnolistni kukmakovec)

*Leucoagaricus leucothites*, sinonim *Lepiota naucina* (rožnolistni kukmakovec)

Bolbitiaceae

*Hebeloma crustuliniforme* (solzeča medlenka)

*Coprinaceae* (tintarke)

*Coprinus comatus* (velika tintnica)

*Amanitaceae* (mušničarke)

*Amanita caesarea* (knežja mušnica)

*Amanita lividopallescens* (bledični lupinar)

*Amanita lividopallescens* (bledični lupinar)

*Amanita muscaria* (rdeča mušnica)

*Amanita phalloides* (zelena mušnica)

*Amanita vaginata* (sivi lupinar)

Boletales (cevarji)

*Boletaceae* (cevarke)

*Boletus calopus* (leponogi goban)

*Leccinum scabrum* (brezov ded)

*Suillus bovinus* (prožna lupljivka)

*Suillus granulatus* (ovčarska lupljivka)

*Suillus variegatus* (peščena lupljivka)

*Xerocomus badius* (kostanjeva polstenka)

*Xerocomus badius* (kostanjeva polstenka)

*Xerocomus chrysenteron* (rdečebetna polstenka)

*Paxillaceae* (podviharke)

*Paxillus atrotomentosus* (žametna podvihanka)

Cortinariales (koprenarji)

*Cortinariaceae* (koprenarke)

*Cortinarius coerulescentium* (višnjeva koprenka)

*Cortinarius* sp. (koprenka)

*Cortinarius glaucopus* (kolobarniška koprenka)

*Cortinarius saginus*

*Strophariaceae* (strniščarke)

*Hypholoma fasciculare* (navadna žveplenjača)

Pluteales (ščitarji)

*Entolomataceae* (rdečelistarke)

*Priloga A1 se nadaljuje*

nadaljevanje Priloge A1

- Entoloma rhodopolium* (nizka rdečelistka)
- Pluteaceae (ščitarke)
  - Volvariella gloiocephala*, sinonim *Volvariella speciosa* (velika nožničarka)
- Russulales (golobičarji)
  - Russulaceae (golobičarke)
    - Lactarius blennius* (bukova mlečnica)
    - Lactarius citriolens* (mlečnica)
    - Lactarius deterrimus* (smrekova sirovka)
    - Lactarius illyricus* (ilirski mlečnica)
    - Russula albonigra* (črnjava golobica)
  - Tricholomatales (kolobarničarji)
    - Hygrophoraceae (polževke)
      - Hygrocybe ovina* (ovčja vlažnica)
      - Hygrophorus eburneus* (bela polževka)
      - Hygrophorus fagi* (bukova polževka)
      - Hygrophorus erubescens* (pordečela polževka)
    - Tricholomataceae (kolobarničarke)
      - Armillaria mellea* (sivorumena mraznica)
      - Armillaria mellea* (sivorumena mraznica)
      - Clitocybe alexandri* (zelenikasta livka)
      - Clitocybe geotropa* (pozna livka)
      - Clitocybe nebularis*, sinonim *Lepista nebularis* (poprhnjena livka, meglenka)
      - Clitocybe odora* (janeževa livka)
      - Lepista glaucocana* (bledovijoličasta kolesnica)
      - Lepista nuda* (vijoličasta kolesnica)
      - Tricholoma atosquamosum* (črnoluska kolobarnica)
      - Tricholoma bufonium* (krastačja kolobarnica)
      - Tricholoma bufonium* (krastačja kolobarnica)
      - Tricholoma imbricatum* (mekinasta kolobarnica)
      - Tricholoma mutabile*
      - Tricholoma pardinum* (pegasta kolobarnica)
      - Tricholoma saponaceum* (milnata kolobarnica)
      - Tricholoma vaccinum* (kocasta kolobarnica)
      - Tricholomopsis rutilans* (rdečkasta trhlenka)
    - Marasmiaceae (sehličarke)
      - Collybia confluens* (šopasta korenovka)
      - Mycena galericulata* (nagubana čeladica)
- Aphylophoromycetidae (nelistarice)
  - Cantharellales (lisičkarji)
    - Cantharellaceae (lisičarke)
      - Craterellus cornucopioides* (črna trobenta)
    - Clavariaceae (kijarke)
      - Ramaria flava*, sinonim *Clavaria flava* (rumena griva)
      - Ramaria botrytis* (rdeča griva)
      - Ramaria formosa* (lepa griva)

Priloga A1 se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A1

- Polyporales (luknjičarji)
  - Polyporaceae* (luknjarke)
    - Albatrellus pes-caprae* (kozjenogi mesnatovec)
  - Fistulinaceae* (cevačarke)
    - Fistulina hepatica* (jetrasta cevača)
- Telephorales (bodičarji)
  - Bankeraceae* (bodičarke)
    - Sarcodon imbricatus* (rjavi ježek)
  - Hydnaceae* (ježarke)
    - Hydnum repandum* (rumeni ježek)
- Gasteromycetidae (trebuharice)
- Lycoperdales (trebuharji)
  - Lycoperdaceae* (prašničarke)
    - Lycoperdon perlatum* (betičastna prašnica)
    - Lycoperdon pyriforme* (hruškasta prašnica)
    - Bovista nigrescens* (jajčasti kadilček)
  - Geastraceae* (zvezdarske)
    - Gaeastrum rufescens* (rusa zvezdica)

**PRILOGA A2:** Pripravljeni proteinski ekstrakti gliv z lokacijo in vrsto materiala.

OZNAKA VZORCA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME	LOKACIJA	NABRANO	VRSTA MATERIALA	ZAMRZNJENO
1	<i>Agaricus campestris</i>	travniški kukmak	/	2003	glivni sok	- 20°C
2	<i>Agaricus silvaticus</i>	gozdni kukmak	Kras	2004	trošnjak	- 70°C
3	<i>Albatrellus pes-caprae</i>	kozjenogi mesnatovec	Grosuplje	2004	trošnjak	- 70°C
4	<i>Amanita caesarea</i>	knežja mušnica/karželj	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
5	<i>Amanita lividopallescens</i>	bledični lupinar	Dolenjska	2003	trošnjak	- 70°C
5*	<i>Amanita lividopallescens</i>	bledični lupinar	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
6	<i>Amanita muscaria</i>	rdeča mušnica	/	/	trošnjak	- 70°C
7	<i>Amanita phalloides</i>	zelená mušnica	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
8	<i>Amanita vaginata</i>	sivi lupinar	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
9	<i>Armillaria mellea</i>	sivorumena mraznica	Dolenjska	2003	glivni sok	- 20°C
9*	<i>Armillaria mellea</i>	sivorumena mraznica	Dolenjska	2003	trošnjak	- 70°C
10	<i>Boletus calopus</i>	leponogi goban	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
11	<i>Bovista nigrescens</i>	jajčasti kadilček	Vojsko	20.10.2005	trošnjak	- 20°C
12	<i>Clavaria flava/Ramaria flava</i>	rumena griva	/	Maj, 2004	glivni sok	- 20°C
13	<i>Clitocybe alexandri</i>	zelenikasta livka	Kras	24.10.2005	trošnjak	- 20°C
14	<i>Clitocybe odora</i>	janeževa livka	Janče	2005	trošnjak	- 20°C
15	<i>Collybia confluens</i>	šopasta korenovka	Vojsko	20.10.2005	trošnjak	- 20°C
16	<i>Coprinus comatus</i>	velika tintnica	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
17	<i>Cortinarius coerulescentium</i>	višnjeva koprenka	/	/	trošnjak	- 20°C
18	<i>Cortinarius sp.</i>	"x" koprenka <sup>1</sup>	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
19	<i>Cortinarius glaucopus</i>	kolobarniška koprenka	/	/		- 20°C
20	<i>Cortinarius saginus</i>	/	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
21	<i>Craterellus cornucopioides</i>	črna trobenta	Dolenjska	2003	trošnjak	- 70°C
22	<i>Entoloma rhodopolium</i>	nizka rdečelistka	Dolenjska	24.10.2004	trošnjak	- 20°C
23	<i>Fistulina hepatica</i>	jetrasta cevača	Kras	27.10.2005	trošnjak	- 20°C
24	<i>Gaestrum rufescens</i>	rusa zvezdica	Kras	27.10.2005	trošnjak	- 20°C
25	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	solzeča medlenka	Dolenjska	2003	glivni sok	- 20°C

Priloga A2 se nadaljuje

nadaljevanje Priloge A2

OZNAKA VZORCA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME	LOKACIJA	NABRANO	VRSTA MATERIALA	ZAMRZNJENO
26	<i>Hygrocybe ovina</i>	ovčja vlažnica	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
27	<i>Hydnum repandum</i>	rumeni ježek	Janče	12.10.2005	trošnjak	- 20°C
28	<i>Hygrophorus eburneus</i>	bela polževka	Vrh	14.11.2004	trošnjak	- 70°C
29	<i>Hygrophorus fagi</i>	bukova polževka	Kras	24.10.2005	trošnjak	- 20°C
30	<i>Hygrophorus erubescens</i>	pordečela polževka	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
31	<i>Hypholoma fasciculare</i>	navadna žvepljenača	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
32	<i>Lactarius blennius</i>	bukova mlečnica	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
33	<i>Lactarius citriolens</i>	mlečnica	/	/	glivni sok	- 20°C
34	<i>Lactarius deterrimus</i>	smrekova mlečnica	/	/	trošnjak	- 20°C
35	<i>Lactarius illyricus</i>	ilirski mlečnica	/	/	glivni sok	- 20°C
36	<i>Leccinum scabrum</i>	brezov ded, goban	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
37	<i>Lepiota ignivolvata</i>	rdečednišni dežniček	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
38	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	gozdne marele/rožnolistni kukmakovec	/	/	trošnjak	- 20°C
38*	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	poljske marele/rožnolistni kukmakovec	/	/	trošnjak	- 20°C
39	<i>Lepista glaucocana</i>	bledovijolična kolesnica	Vojsko	20.10.2005	trošnjak	- 20°C
40	<i>Lepista nebularis/Clitocybe nebularis</i>	poprhnjena livka, meglenka	/	/	trošnjak	- 20°C
41	<i>Lepista nuda</i>	vijoličasta kolesnica	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
42	<i>Lycoperdon perlatum</i>	betičasta prašnica	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
43	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	hruškasta prašnica	Vojsko	20.10.2005	trošnjak	- 20°C
44	<i>Mycena galericulata</i>	nagubana čeladica	Vojsko	20.10.2005	trošnjak	- 20°C
45	<i>Paxillus atrotomentosus</i>	žametna podvihanka	/	/	trošnjak	- 20°C
46	<i>Ramaria botrytis</i>	rdeča griva	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
47	<i>Ramaria formosa</i>	lepa griva	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
48	<i>Russula albonigra</i>	črnjava golobica	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
49	<i>Sarcodon imbricatus</i>	rjavi ježek	Kranjska gora	2003	glivni sok	- 20°C

Priloga A2 se nadaljuje

Želko M. Proučevanje protibakterijskega učinka ekstraktov gliv.

Diplomska naloga. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo, 2010

nadaljevanje Priloge A2

OZNAKA VZORCA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME	LOKACIJA	NABRANO	VRSTA MATERIALA	ZAMRZNJENO
50	<i>Suillus bovinus</i>	prožna lupljivka, ovčje vime	Grosuplje	2004	trošnjak	- 70°C
51	<i>Suillus granulatus</i>	ovčarska lupljivka, maslenke	/	/	trošnjak	- 20°C
52	<i>Suillus variegatus</i>	peščena lupljivka, peščenska	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
53	<i>Tricholoma atrosquamosum</i>	črnoluska kolobarnica	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
54	<i>Tricholoma bufonium</i>	krastača kolobarnica	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
55	<i>Tricholoma imbricatum</i>	mekinasta kolobarnica	/	/	trošnjak	- 20°C
56	<i>Tricholoma mutabile</i>	/	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
57	<i>Tricholoma pardinum</i>	pegasta kolobarnica	/	/	trošnjak	- 70°C
58	<i>Tricholoma saponaceum</i>	milnata kolobarnica	Dolenjska	24.10.2004	trošnjak	- 20°C
59	<i>Tricholoma vaccinum</i>	kocasta kolobarnica	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
60	<i>Tricholomopsis rutilans</i>	rdečkasta trhlenka	Grosuplje	2004	trošnjak	- 70°C
61	<i>Volvariella speciosa/Volvariella gloiocephala</i>	velika nožičarka	Jušto njiva	14.11.2004	trošnjak	- 20°C
62	<i>Xerocomus badius</i>	kostanjasta polstenka, kostanjevka	Dolenjska	26.10.2004	trošnjak	- 70°C
62*	<i>Xerocomus badius</i>	kostanjasta polstenka, kostanjevka	Vrh	10.10.2005	trošnjak	- 20°C
63	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	rdečebetna polstenka	Vojsko	20.10.2005	trošnjak	- 20°C
N21	N21 (oznaka glive)	"goban", nedoločena vrsta glive	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
N31	N31 (oznaka glive)	nedoločena vrsta glive	Vrh	14.11.2004	trošnjak	- 70°C
f13	foto 13 (oznaka glive)	nedoločena vrsta glive	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C
f7	foto 7 (oznaka glive)	"golobica", nedoločena vrsta glive	Pivka	14.9.2005	trošnjak	- 20°C

**PRILOGA B:** Ocena koncentracije proteinov v ekstraktih gliv določena z metodo po Bradfordu (Bio-Rad kit).

OZNAKA VZORCA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME	KONCENTRACIJA PROTEINOV (mg/ml)
1	<i>Agaricus campestris</i>	travniški kukmak	3,62 ± 0,4
2	<i>Agaricus silvaticus</i>	gozdni kukmak	6,04 ± 1,5
3	<i>Albatrellus pes-caprae</i>	kozjenogi mesnatovec	2,71 ± 0,3
4	<i>Amanita caesarea</i>	knežja mušnica/karželj	3,82 ± 0,6
5	<i>Amanita lividopallescens</i>	bledični lupinar	9,91 ± 5,1
5*	<i>Amanita lividopallescens</i>	bledični lupinar	13,29 ± 9,2
6	<i>Amanita muscaria</i>	rdeča mušnica	8,87 ± 5,1
7	<i>Amanita phalloides</i>	zelena mušnica	5,86 ± 2,3
8	<i>Amanita vaginata</i>	sivi lupinar	13,76 ± 10,2
9	<i>Armillaria mellea</i>	sivorumena mraznica	2,14 ± 0,5
9*	<i>Armillaria mellea</i>	sivorumena mraznica	2,60 ± 0,6
10	<i>Boletus calopus</i>	leponogi goban	7,65 ± 4,0
11	<i>Bovista nigrescens</i>	jajčasti kadilček	5,96 ± 1,5
12	<i>Clavaria flava/Ramaria flava</i>	rumena griva	4,77 ± 1,7
13	<i>Clitocybe alexandri</i>	zelenikasta livka	8,66 ± 4,5
14	<i>Clitocybe odora</i>	janeževa livka	8,97 ± 3,9
15	<i>Collybia confluens</i>	šopasta korenovka	10,50 ± 5,8
16	<i>Coprinus comatus</i>	velika tintnica	7,54 ± 2,8
17	<i>Cortinarius coerulescentium</i>	višnjeva koprenka	9,41 ± 4,9
18	<i>Cortinarius sp.</i>	koprenka	3,80 ± 1,2
19	<i>Cortinarius glaucopus</i>	kolobarniška koprenka	7,14 ± 3,8
20	<i>Cortinarius saginus</i>	/	4,19 ± 1,7
21	<i>Craterellus cornucopioides</i>	črna trobenta	6,75 ± 2,3
22	<i>Entoloma rhodopolium</i>	nizka rdečelistka	6,58 ± 3,0
23	<i>Fistulina hepatica</i>	jetrasta cevača	3,82 ± 0,5
24	<i>Gaestrum rufescens</i>	rusa zvezdica	4,27 ± 1,3
25	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	solzeča medlenka	6,35 ± 2,4
26	<i>Hygrocybe ovina</i>	ovčja vlažnica	8,54 ± 3,3
27	<i>Hydnum repandum</i>	rumeni ježek	1,94 ± 0,5
28	<i>Hygrophorus eburneus</i>	bela polževka	7,67 ± 4,2
29	<i>Hygrophorus fagi</i>	bukova polževka	4,86 ± 1,9
30	<i>Hygrophorus erubescens</i>	pordečela polževka	0,28 ± 0,3
31	<i>Hypholoma fasciculare</i>	navadna žvepljenača	6,10 ± 2,1
32	<i>Lactarius blennius</i>	bukova mlečnica	4,44 ± 0,9
33	<i>Lactarius citriolens</i>	mlečnica	5,66 ± 1,8
34	<i>Lactarius deterrimus</i>	smrekova mlečnica	7,61 ± 4,2
35	<i>Lactarius illyricus</i>	ilirska mlečnica	4,15 ± 0,7
36	<i>Leccinum scabrum</i>	brezov ded, goban	7,84 ± 3,0
37	<i>Lepiota ignivolvata</i>	rdečednišni dežniček	8,46 ± 4,3
38	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	gozdne marele/rožnolistni kukmakovec	4,27 ± 1,2
38*	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	poljske marele/rožnolistni kukmakovec	5,68 ± 1,6



nadaljevanje Priloge B

OZNAKA VZORCA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME	KONCENTRACIJA PROTEINOV (mg/ml)
39	<i>Lepista glaucocana</i>	bledovijolična kolesnica	7,59 ± 2,4
40	<i>Lepista nebularis/Clitocybe nebularis</i>	poprhnjena livka, meglenska	7,53 ± 2,4
41	<i>Lepista nuda</i>	vijoličasta kolesnica	5,97 ± 2,0
42	<i>Lycoperdon perlatum</i>	betičasta prašnica	8,92 ± 3,8
43	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	hruškasta prašnica	8,81 ± 4,3
44	<i>Mycena galericulata</i>	nagubana čeladica	7,21 ± 3,8
45	<i>Paxillus atrotomentosus</i>	žametna podvihanka	4,84 ± 0,8
46	<i>Ramaria botrytis</i>	rdeča griva	1,73 ± 0,0
47	<i>Ramaria formosa</i>	lepa griva	3,37 ± 1,7
48	<i>Russula albonigra</i>	črnjava golobica	5,66 ± 1,8
49	<i>Sarcodon imbricatus</i>	rjavi ježek	3,02 ± 1,3
50	<i>Suillus bovinus</i>	prožna lupljivka, ovčje vime	3,07 ± 0,2
51	<i>Suillus granulatus</i>	ovčarska lupljivka, maslenke	2,74 ± 0,5
52	<i>Suillus variegatus</i>	peščena lupljivka, peščenka	8,43 ± 4,8
53	<i>Tricholoma atosquamosum</i>	črnoľuska kolobarnica	3,37 ± 0,7
54	<i>Tricholoma bufonium</i>	krastačja kolobarnica	4,26 ± 1,0
55	<i>Tricholoma imbricatum</i>	mekinasta kolobarnica	3,29 ± 0,9
56	<i>Tricholoma mutabile</i>	/	3,68 ± 1,0
57	<i>Tricholoma pardinum</i>	pegasta kolobarnica	5,13 ± 1,9
58	<i>Tricholoma saponaceum</i>	milnata kolobarnica	7,11 ± 3,5
59	<i>Tricholoma vaccinum</i>	kocasta kolobarnica	3,80 ± 1,1
60	<i>Tricholomopsis rutilans</i>	rdečkasta trhlenka	4,49 ± 1,2
61	<i>Volvariella speciosa/Volvariella gloiocephala</i>	velika nožičarka	7,48 ± 3,8
62	<i>Xerocomus badius</i>	kostanjasta polstenka, kostanjevka	5,99 ± 2,3
62*	<i>Xerocomus badius</i>	kostanjasta polstenka, kostanjevka	6,52 ± 3,0
63	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	rdečebetna polstenka	8,51 ± 5,1
N21	<i>N21 (IJS oznaka vzorca glive)</i>	nedoločena vrsta glive, "goban"	5,96 ± 2,3
N31	<i>N31 (IJS oznaka vzorca glive)</i>	nedoločena vrsta glive	2,11 ± 0,1
f13	<i>foto 13 (IJS oznaka vzorca glive)</i>	nedoločena vrsta glive	7,43 ± 3,3
f7	<i>foto 7 (IJS oznaka vzorca glive)</i>	nedoločena vrsta glive, "golobica"	2,64 ± 0,3

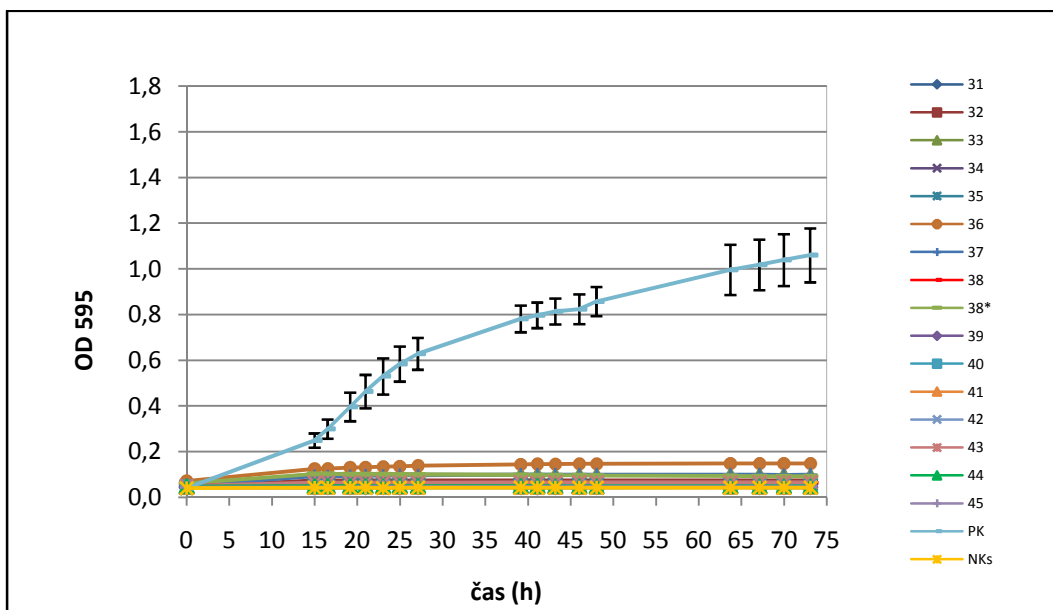
**PRILOGA C:** Uporabljeni proteinski ekstrakti gliv v *in vitro* in *in vivo* testih.

OZNAKA VZORCA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME
1	<i>Agaricus campestris</i>	travniški kukmak
2	<i>Agaricus silvaticus</i>	gozdni kukmak
3	<i>Albatrellus pes-caprae</i>	kozjenogi mesnatovec
4	<i>Amanita caesarea</i>	knežja mušnica/karželj
5	<i>Amanita lividopallescens</i>	bledični lupinar
5*	<i>Amanita lividopallescens</i>	bledični lupinar
6	<i>Amanita muscaria</i>	rdeča mušnica
7	<i>Amanita phalloides</i>	zelena mušnica
8	<i>Amanita vaginata</i>	sivi lupinar
9	<i>Armillaria mellea</i>	sivorumena mraznica
9*	<i>Armillaria mellea</i>	sivorumena mraznica
10	<i>Boletus calopus</i>	leponogi goban
11	<i>Bovista nigrescens</i>	jajčasti kadilček
12	<i>Clavaria flava/Ramaria flava</i>	rumena griva
13	<i>Clitocybe alexandri</i>	zelenikasta livka
14	<i>Clitocybe odora</i>	janeževa livka
15	<i>Collybia confluens</i>	šopasta korenovka
16	<i>Coprinus comatus</i>	velika tintnica
17	<i>Cortinarius coerulescentium</i>	višnjeva koprenka
18	<i>Cortinarius sp.</i>	koprenka
19	<i>Cortinarius glaucopus</i>	kolobarniška koprenka
20	<i>Cortinarius saginus</i>	/
21	<i>Craterellus cornucopioides</i>	črna trobenta
22	<i>Entoloma rhodopolium</i>	nizka rdečelistka
23	<i>Fistulina hepatica</i>	jetrasta cevača
24	<i>Gaeastrum rufescens</i>	rusa zvezdica
25	<i>Hebeloma crustuliniforme</i>	solzeča medlenka
26	<i>Hygrocybe ovina</i>	ovčja vlažnica
27	<i>Hydnum repandum</i>	rumeni ježek
28	<i>Hygrophorus eburneus</i>	bela polževka
29	<i>Hygrophorus fagi</i>	bukova polževka
30	<i>Hygrophorus erubescens</i>	pordečela polževka
31	<i>Hypholoma fasciculare</i>	navadna žvepljenača
32	<i>Lactarius blennius</i>	bukova mlečnica
33	<i>Lactarius citriolens</i>	mlečnica
34	<i>Lactarius deterrimus</i>	smrekova mlečnica
35	<i>Lactarius illyricus</i>	ilirskva mlečnica
36	<i>Leccinum scabrum</i>	brezov ded, goban
37	<i>Lepiota ignivolvata</i>	rdečedniščni dežniček
38	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	gozdne marele/rožnolistni kukmakovec
38*	<i>Lepiota naucina/Leucoagaricus leucothites</i>	poljske marele/rožnolistni kukmakovec
39	<i>Lepista glaucocana</i>	bledovijolična kolesnica
40	<i>Lepista nebularis/Clitocybe nebularis</i>	poprhnjena livka, meglenka
41	<i>Lepista nuda</i>	vijoličasta kolesnica

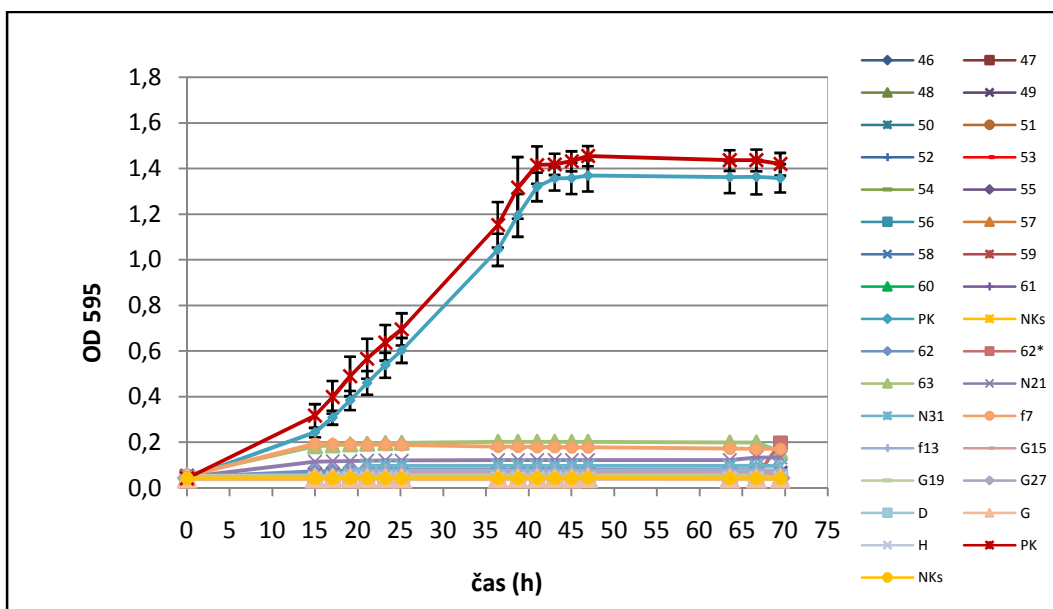
*Priloga C se nadaljuje*

OZNAKA VZORCA	LATINSKO IME	SLOVENSKO IME
42	<i>Lycoperdon perlatum</i>	betičasta prašnica
43	<i>Lycoperdon pyriforme</i>	hruškasta prašnica
44	<i>Mycena galericulata</i>	nagubana čeladica
45	<i>Paxillus atrotomentosus</i>	žametna podvihanka
46	<i>Ramaria botrytis</i>	rdeča griva
47	<i>Ramaria formosa</i>	lepa griva
48	<i>Russula albonigra</i>	črnjava golobica
49	<i>Sarcodon imbricatus</i>	rjavi ježek
50	<i>Suillus bovinus</i>	prožna lupljivka, ovčje vime
51	<i>Suillus granulatus</i>	ovčarska lupljivka, maslenke
52	<i>Suillus variegatus</i>	peščena lupljivka, peščenka
53	<i>Tricholoma atosquamosum</i>	črnoluska kolobarnica
54	<i>Tricholoma bufonium</i>	krastačja kolobarnica
55	<i>Tricholoma imbricatum</i>	mekinasta kolobarnica
56	<i>Tricholoma mutabile</i>	/
57	<i>Tricholoma pardinum</i>	pegasta kolobarnica
58	<i>Tricholoma saponaceum</i>	milnata kolobarnica
59	<i>Tricholoma vaccinum</i>	kocasta kolobarnica
60	<i>Tricholomopsis rutilans</i>	rdečkasta trhlenka
61	<i>Volvariella speciosa/Volvariella gloiocephala</i>	velika nožičarka
62	<i>Xerocomus badius</i>	kostanjasta polstenka, kostanjevka
62*	<i>Xerocomus badius</i>	kostanjasta polstenka, kostanjevka
63	<i>Xerocomus chrysenteron</i>	rdečebetna polstenka
N21	N21 (oznaka glive)	"goban", nedoločena vrsta glive
N31	N31 (oznaka glive)	nedoločena vrsta glive
f13	foto 13 (oznaka glive)	nedoločena vrsta glive
f7	foto 7 (oznaka glive)	"golobica", nedoločena vrsta glive
G15	ekstrakt iz mlečnic (Inštitut Jožef Stefan)	mlečnice
G19	<i>Tricholoma bufonium</i> (Inštitut Jožef Stefan)	krastačja kolobarnica
G27	<i>Clitocybe geotropa</i> (Inštitut Jožef Stefan)	pozna livka
D	ekstrakt (Inštitut Jožef Stefan)	tripsinski inhibitor iz meglenke
G	ekstrakt (Inštitut Jožef Stefan)	papainski inhibitor iz krompirja
H	ekstrakt (Inštitut Jožef Stefan)	papainski inhibitor iz meglenke

**PRILOGA D:** Optična gostota (OD) ekstraktov gliv pri 595 nm.



Primerjava krivulj ekstraktov gliv od oznake 31 do 45 (Priloga C) s krivuljami rasti *E. amylovora* – pozitivno (PK) in kontrolo s streptomycin sulfatom (NKs=Ks) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. Standardni odkloni pri ekstraktih gliv so minimalni, zato iz grafa niso razvidni.



Primerjava krivulj ekstraktov gliv od oznake 46 do H (Priloga C) s krivuljami rasti *E. amylovora* – pozitivno (PK) in kontrolo s streptomycin sulfatom (NKs=Ks) v tekočem gojišču KB (28°C, 400 obr./min). Točke predstavljajo povprečne vrednosti meritev optične gostote pri 595 nm. Napaka predstavlja en standardni odklon. Standardni odkloni pri ekstraktih gliv so minimalni, zato iz grafa niso razvidni.



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Mateja ŽELKO

**PROUČEVANJE PROTIBAKTERIJSKEGA UČINKA  
EKSTRAKTOV GLIV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010