

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tina TELBAN STOILJKOVIĆ

**INSEKTICIDNI POTENCIAL VODNIH  
EKSTRAKTOV GOB, NABRANIH V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2022

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tina TELBAN STOILJKOVIĆ

**INSEKTICIDNI POTENCIJAL VODNIH EKSTRAKTOV GOB,  
NABRANIH V SLOVENIJI**

MAGISTRSKO DELO  
Magistrski študij - 2. stopnja

**INSECTICIDAL POTENTIAL OF AQUEOUS EXTRACTS OF  
MUSHROOMS HARVESTED IN SLOVENIA**

M. SC. THESIS  
Master Study Programmes

Ljubljana, 2022

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Molekulska in funkcionalna biologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Delo je bilo opravljeno na Katedri za biokemijo (Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta) in na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorja magistrskega dela imenovala doc. dr. Mateja Skočaja, za somentorja doc. dr. Miha Pavšiča in za recenzentko prof. dr. Kristino Sepčić.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Marjana REGVAR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matej SKOČAJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Miha PAVŠIČ

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Tina Telban Stoiljković

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2

DK UDK 582.28(043.2)

KG glice, gobe, proteini, membrane, metaboliti, citotoksičnost, insekticidnost

AV TELBAN STOILJKOVIĆ, Tina

SA SKOČAJ, Matej (mentor), PAVŠIČ, Miha (somentor), SEPČIĆ, Kristina (recenzent)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij Molekulske in funkcionalne biologije

LI 2022

IN INSEKTICIDNI POTENCIJAL VODNIH EKSTRAKTOV GOB, NABRANIH V SLOVENIJI

TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)

OP IX, 61 str., 13 pregl., 14 sl., 143 vir

IJ sl

JI sl/en

AI Glice so zelo raznolika in razširjena skupina organizmov, prisotna skoraj v vseh ekoloških nišah. Igrajo pomembno vlogo pri delovanju ekosistemov, zanimive pa so tudi zaradi širokega nabora biotehnološko pomembnih encimov ter drugih snovi. Nekatere od teh snovi imajo potencialno insekticidno aktivnost in bi zato lahko bile uporabne za razvoj inovativnih biopesticidov. V magistrski nalogi smo med surovimi ekstrakti gob iskali take, ki delujejo citotoksično na celično linijo Sf9. Med temi ekstrakti smo nato določili take, katerih citolitična aktivnost bi lahko bila posledica citolitičnih proteinov, katerih receptor je membranski lipid. S citotoksičnim testom MTT smo prvi dokazali insekticidni potencial 18 gob, kar do sedaj še ni bilo opisano v literaturi. Podatke citotoksičnosti, ki smo jih pridobili smo nato primerjali s predhodno narejenimi analizami hemolitične aktivnosti in vezave proteinskih komponent istih gobijih ekstraktov na celokupne lipide iz celič Sf9. Iz vseh teh rezultatov lahko zaključimo, da gobe *Megacollybia platyphylla*, *Bjerkandera adusta* in *Amanita excelsa* zelo verjetno vsebujejo insekticidne proteine, katerih aktivnost je posledica njihove vezave na specifični lipidni receptor v membranah celič Sf9 ter tvorbe pore v teh membranah. Presenetljivo smo tudi dokazali, da je večina gob z insekticidnim potencialom nemikoriznih, zato predlagamo, da se je pri iskanju tovrstnih molekul bolje osredotočiti na saprofitske in parazitske glice oz gobe.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2

DC UDC 582.28(043.2)

CX fungi, mushrooms, proteins, membranes, metabolites, cytotoxicity, insecticidal activity

AU TELBAN STOILJKOVIĆ, Tina

AA SKOČAJ, Matej (supervisor), PAVŠIČ, Miha (co-advisor), SEPČIĆ, Kristina (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Molecular and Functional Biology

PY 2022

TI INSECTICIDAL POTENTIAL OF AQUEOUS EXTRACTS OF MUSHROOMS, HARVESTED IN SLOVENIA

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO IX, 61 p., 13 tab., 14 fig., 143 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Fungi are an extremely diverse and widespread group of organisms, present in almost all ecological niches. They play an important role in the functioning of ecosystems and are also interesting because of the wide range of natural metabolites they produce. Many of these metabolites have potential insecticidal activity and could therefore be useful for the development of innovative biopesticides. We searched for crude mushroom extracts that exert a cytotoxic effect on the Sf9 cell line. Specifically, we were interested in those extracts that could potentially harbour cytolytic proteins recognizing a membrane lipid receptor, and consequently leading to pore formation and cell death. Using the MTT cytotoxic test, we determined the insecticidal activity of various raw and heat-treated mushroom extracts against the insect cell line Sf9 and were the first to demonstrate the insecticidal potential of 18 mushroom species. We compared our results with previously obtained data on hemolytic activity and Sf9 total membrane lipid sedimentation assay. Among the cytotoxic mushrooms, *Megacollybia platyphylla*, *Bjerkandera adusta* and *Amanita excelsa* proved to have the highest potential for the development of lipid-binding biopesticides. We have also demonstrated that the majority of insecticidal molecules are most probably produced by non-mycorrhizal fungi; therefore we propose that further research on new bioinsecticides should be focused on saprophytic and parasitic fungi.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.2 MIKROSKOPSKE ENTOMOPATOGENE GLIVE .....	6
2.3 MAKROSKOPSKE ENTOMOPATOGENE GLIVE .....	7
2.4 KOMERCIALNO POMEMBNI PRIMARNI IN SEKUNDARNI METABOLITI GLIV .....	7
2.5 INSEKTICIDNI SEKUNDARNI METABOLITI GLIV .....	8
2.6 INSEKTICIDNI GLIVNI PROTEINI .....	12
2.7 POROTVORNI PROTEINI GLIV .....	12
2.7.1 Enokomponentni citolizini .....	12
2.7.2 Dvokomponentni citolizini .....	13
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1 MATERIAL .....	16
3.1.1 Popis gob, ki smo jih v raziskavi testirali .....	16
3.1.2 Kemikalije .....	21
3.1.3 Raztopine za ekstrakcijo proteinov .....	22
3.1.4 Raztopine za preverjanje koncentracije celokupnih proteinov .....	23
3.1.5 Raztopine za test citotoksičnosti MTT .....	23
3.1.6 Uporabljene celice .....	23
3.1.7 Laboratorijska oprema in aparature .....	24
3.2 METODE .....	26
3.2.1 Predpriprava gob .....	26
3.2.2 Priprava vodnih ekstraktov gob .....	26
3.2.3 Določanje koncentracije proteinov z uporabo komercialnega kompleta Pierce <sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit .....	26
3.2.4 Priprava kuhanih ekstraktov gob .....	27
3.2.5 Test citotoksičnosti MTT .....	27
<b>4 REZULTATI .....</b>	<b>29</b>

4.1 CITOTOKSIČNA AKTIVNOST GOBJIH EKSTRAKTOV PROTI ŽUŽELČJI CELIČNI LINIJI Sf9 .....	29
<b>4.1.1 Kuhani vodni ekstrakti gob.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1.2 Surovi vodni ekstrakti gob .....</b>	<b>31</b>
4.2 PRIMERJAVA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI GOBJIH EKSTRAKTOV PROTI ŽUŽELČJI CELIČNI LINIJI Sf9 Z REZULTATI HEMOLIZE .....	34
<b>4.3.1 Surovi vodni ekstrakti gob .....</b>	<b>35</b>
4.4 PRIMERJAVA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI SUROVIH VODNIH GOBJIH EKSTRAKTOV Z ŽIVLJENJSKIM STILOM GOBE.....	38
4.5 PREGLED PREDHODNO IN NOVOODKRITE INSEKTICIDNE AKTIVNOSTI TESTIRANIH VRST GOB .....	41
<b>5 RAZPRAVA .....</b>	<b>44</b>
<b>6 SKLEPI .....</b>	<b>50</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>51</b>
<b>8 VIRI.....</b>	<b>53</b>
<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shema klasifikacije gliv.	4
<b>Slika 2:</b> Prikaz okužbe insekta z glivo iz rodu <i>Metarhizium</i> .	6
<b>Slika 3:</b> Kemijske strukture nakterih sekundarnih metabolitov gliv.	10
<b>Slika 4:</b> Kemijski strukturi sekundarnih metabolitov.	12
<b>Slika 5:</b> Prikaz gliv, ki proizvajajo enokomponentne citolizine.	13
<b>Slika 6:</b> Prikaz gliv, ki proizvajajo dvokomponentne citolizine.	14
<b>Slika 7:</b> Shematski prikaz tvorbe pore.	14
<b>Slika 8:</b> Karta Slovenije z označenimi lokacijami nabranih vrst bazidiomicet.	21
<b>Slika 9:</b> Prikaz spremembe barve na mikrotitrski plošči po dodatku MTT reagenta zaradi nastanka vijolično obarvanega formazana.	28
<b>Slika 10:</b> Prikaz deleža kuhanih gob, ki delujejo citotoksično proti žuželčji celični liniji Sf9.	30
<b>Slika 11:</b> Prikaz deleža surovih gob, ki delujejo citotoksično proti žuželčji celični liniji Sf9.	34
<b>Slika 12:</b> Prikaz deleža gob, katerih surovi ekstrakti delujejo citotoksično in hkrati tudi hemolitično.	35
<b>Slika 13:</b> Prikaz deleža gob, katerih surovi ekstrakti delujejo citotoksično in se hkrati vežejo na MLV, pripravljene iz celic Sf9.	38
<b>Slika 14:</b> Prikaz življenjskega stila gob, ki delujejo citotoksično proti žuželčji celični liniji Sf9.	40

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Latinsko in slovensko ime gobe, datum nabiranja in lokacija nabiranja ...	16
<b>Preglednica 2:</b> Seznam uporabljenih kemikalij in njihovih proizvajalcev. ....	21
<b>Preglednica 3:</b> Seznam uporabljenih raztopin za ekstrakcijo proteinov.....	22
<b>Preglednica 4:</b> Seznam uporabljenih raztopin za preverjanje koncentracije proteinov. ....	23
<b>Preglednica 5:</b> Seznam uporabljenih raztopin za MTT test.....	23
<b>Preglednica 6:</b> Seznam uporabljenih celic .....	23
<b>Preglednica 7:</b> Seznam uporabljene laboratorijske opreme .....	24
<b>Preglednica 8:</b> Prikaz preživelosti celic Sf9 po tretiraju s kuhanimi ekstrakti gob. ....	30
<b>Preglednica 9:</b> Prikaz 0 – 50 % preživelosti celic Sf9 po tretiraju s surovimi ekstrakti gob. ....	31
<b>Preglednica 10:</b> Prikaz 50 – 100 % preživelosti celic Sf9 po tretiraju s surovimi ekstrakti gob. ....	33
<b>Preglednica 11:</b> Prikaz povezave med citotoksičnostjo surovih ekstraktov gob in med njihovo vezavo na MLV iz celic Sf9.....	36
<b>Preglednica 12:</b> Latinsko ime gobe, slovensko ime gobe in življenjski stil gobe. ....	39
<b>Preglednica 13:</b> Latinsko ime gobe, slovensko ime gobe, insekticidna aktivnost in referenca. ....	41

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BSA - goveji serumski albumin (ang. *bovine serum albumin*)

CPE - ceramid fosfoetanolamin (ang. *ceramide phosphoethanolamine*)

DMSO – dimetilsulfoksid

EryA - erilizin A

EryB - erilizin B

HCl - klorovodikova kislina

kDa – kilodalton

KP Tršh – krajinski park Tivoli, Rožnik in Šišenski hrib

MACPF - domena kompleksa, ki napade membrano/performin (ang. *membrane attack complex/porin*)

MES pufer - 2-(N-morfolino)etansulfonska kislina

MLV - multilamelarni vezikli

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid

NaOH - natrijev hidroksid

obr./min - obrati na minuto

OlyA - ostreolizin A

OlyA6 - ostreolizin A6

PBS - fosfatni pufer z NaCl (ang. *phosphate buffered saline*)

Ply - pleurotolizin

PlyA - pleurotolizin A

PlyA2 - pleurotolizin A2

PlyB - pleurotolizin B

Tris - tris 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propan-1,3-diol

## 1 UVOD

Glive so izjemno raznolika skupina organizmov, ki je prisotna v skoraj vseh ekoloških nišah (Gunatilaka & Wijeratne, 2012; Hibbett et al., 2007; Stajich et al., 2010). Najbolj raziskani debli gliv sta zaprtotrosnice (*Ascomycota*) in prostotrosnice (*Basidiomycota*), ki igrajo pomembno vlogo pri delovanju ekosistemov, zanimive pa so tudi zaradi širokega nabora sekundarnih metabolitov in biotehnološko pomembnih encimov (E. Bielli et al., 2004; Lata et al., 2019; Ma et al., 2013; Yadav, Kumar, et al., 2017).

Glive in njihovi metaboliti ter produkti, ki imajo širok nabor aktivnosti, postajajo vse bolj pomembni v smislu razvoja sredstev za biokontrolo škodljivcev, ki povzročajo velike izgube kmetijskih pridelkov in posledično ekonomsko škodo (Jakka et al., 2016; Panevska et al., 2021; Vega et al., 2012). Tradicionalno se za zatiranje škodljivcev uporablajo kemijski pesticidi, ki pa niso problematični le zaradi škode, ki jo povzročijo v okolju, temveč tudi zaradi vpliva, ki ga imajo na netarčne organizme, med njimi tudi na človeka (Castañeda-Ramírez et al., 2022). S tem namenom se iščejo novi pristopi za zatiranje škodljivcev, ki temeljijo na uporabi bakterij, gliv in njihovih produktov, in za katere se pričakuje, da bi imeli v primerjavi s kemičnimi insekticidi manjši vpliv na okolje in netarčne organizme (Jakka et al., 2016; Panevska et al., 2021; Purwar & Sachan, 2006). Nekatere vrste gliv in njihovi produkti se že uporabljajo kot insekticidi, veliko pa je še neraziskanih (Kusari et al., 2012; Sánchez-Fernández et al., 2013).

Glive imajo sposobnost proizvodnje velikega nabora encimov, ki jih potrebujejo za rast in razvoj (Turner, 1971; Walker & White, 2005). Med njimi je najbolj zanimiv širok nabor zunajceličnih encimov, ki jim omogočajo kolonizacijo in razgradnjo velikega števila substratov. Biotehnološko so ti encimi zanimivi, saj jih lahko uporabimo tudi za sintezo medicinsko in industrijsko zanimivih metabolitov, hkrati pa so potencialno uporabni v prehranski, usnjarski in tekstilni industriji, pa tudi pri biopretvorbah in v bioremediaciji (McKelvey & Murphy, 2017; Nigam, 2013; Nisa et al., 2015). Hkrati so pomembni tudi sekundarni metaboliti gliv, ki jih proizvajajo kot dejavnike obrambe v smislu preživetja. Komercialno pomembni so predvsem antibiotiki, alkaloidi in statini (Istvan & Deisenhofer, 2001; Macheleidt et al., 2016).

Mnogi sekundarni metaboliti gliv imajo insekticidno delovanje. Ena prvih spojin z dokazanim insekticidnim delovanjem je bila ibotenska kislina, ki jo proizvajajo nekatere bazidiomicete iz rodu *Amanita*, in naj bi bila toksična za muhe (Wieland, 1968). Zanimivi so tudi sekundarni metaboliti destruksini askomicete *Metarrhizium anisopliae*, ki povzročajo tetanično paralizo insekrov (Pedras et al., 2002; Quiot et al., 1985). Dokazano je bilo tudi insekticidno delovanje buvericina in bazianolida, ki sta sekundarna metabolita askomicete *Beauveria bassiana* (Xu et al., 2008). Z vidika vsebnosti insekticidnih sekundarnih metabolitov je zelo pomemben tudi rod *Aspergillus*, iz katerega je bilo izoliranih približno

100 spojin z insekticidnim delovanjem (Gloer, 1995). Še en pomemben rod gliv je *Penicillium*, iz katerega so izolirali insekticidni metabolit penitrem A, ki je bil patentiran kot širokospektralna insekticidna molekula (González et al., 2003). Eden najbolj zanimivih metabolitov gliv iz rodov *Aspergillus* in *Penicillium* pa je piripiropen A, katerega semisintetični derivat afidopiropen je bil pred kratkim registriran kot insekticid Inscalis (Koradin et al., 2021; Omura et al., 1993).

Poleg opisanih insekticidnih sekundarnih metabolitov, je bilo odkritih tudi nekaj glivnih proteinov z insekticidnim potencialom (Wang et al., 2002). Gre za porotvorne proteine, ki se vežejo na membrano in oblikujejo citolitične porotvorne komplekse. Za glice je znano, da proizvajajo eno ali dvokomponentne porotvorne citolizine (Shibata et al., 2010). Med enokomponentnimi citolizini sta poznana flamutoksin iz bazidiomicete zimska panjevka (*Flammulina velutipes*) in hemolitični protein iz bazidiomicete nizka rdečelistka (*Rhodophyllus rhodopolius*) (Bernheimer & Oppenheim, 1987; Lin et al., 1975; Narai et al., 2004; Suzuki et al., 1990; Tomita et al., 1998; Watanabe et al., 1999). Med dvokomponentne citolizine pa prištevamo hemolizin iz bazidiomicete žvepleni lepoluknjičar (*Laetiporus sulphureus*), ki deluje kot lektin (Tateno & Goldstein, 2003). Poleg tega pa je bilo ugotovljeno, da bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) in kraljevi ostrigar (*Pleurotus eryngii*) proizvajata dvokomponentne citolizine, kjer A komponenta (egerolizin) prepoznavata specifični lipidni receptor, komponenta B pa omogoča tvorbo pore v tarčnih membranah. Večina egerolizinov iz rodu *Pleurotus* se z veliko afiniteto veže na membrane, ki vsebujejo ceramid fosfoetanolamin (CPE), ki je glavni sfingolipid v celičnih membranah nevretenčarjev (Bhat et al., 2015; Kishimoto et al., 2016). Zaradi tega ti proteini predstavljajo potencialno orožje za zatiranje škodljivcev, ki v svojih celičnih membranah vsebujejo CPE (Panewska et al., 2019). Preučevanje gliv iz naravnih okolij zaradi naraščajoče potrebe po snoveh, ki bi omogočile biološko kontrolo, remediacijo okolja ali bi bile uporabne v industrijskih procesih je tako izjemnega pomena (Blackwell, 2011).

## 1.1 NAMEN DELA

V magistrski nalogi smo želeli preveriti citotoksično aktivnost kuhanih in surovih vodnih ekstraktov slovenskih gob na modelu žuželčje celične linije Sf9 in na ta način opredeliti njihov insekticidni potencial.

## 1.2 DELOVNI HIPOTEZI

Hipoteza 1: Surovi vodni ekstrakti gob bodo izkazovali citotoksično aktivnost proti žuželčji celični liniji Sf9.

Hipoteza 2: Citotoksično aktivnost proti žuželčji celični liniji Sf9 bodo izkazovali predvsem surovi nekuhani gobji ekstrakti.

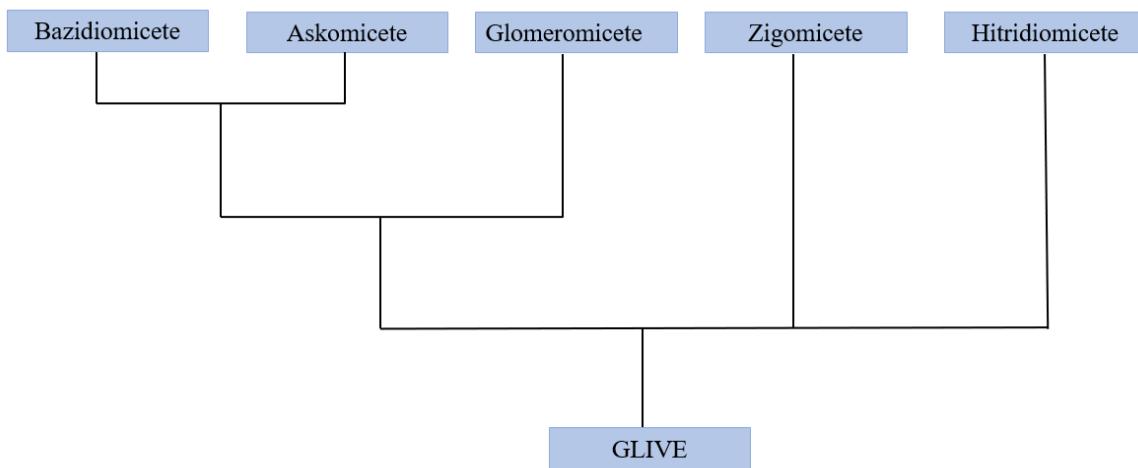
## 2 PREGLED OBJAV

Glive so morfološko ter ekološko izjemno raznolika skupina organizmov. Mednje uvrščamo enocelične kvasovke in večcelične višje glive (Gunatilaka & Wijeratne, 2012). Glive so evkariontski heterotrofni organizmi, katerih skupna značilnost je prisotnost hitina v celični steni (Gherbawy & Voigt, 2010). Prisotne so v skoraj vseh ekoloških nišah in predstavljajo drugo največje kraljestvo za bakterijami (Hibbett et al., 2007; Stajich et al., 2010). Najdemo jih v zemlji, kislih vročih vrelcih, radioaktivnih odpadkih, vodi, globoko v zemeljski skorji, pa tudi v organski snovi in živih tkivih večine organizmov, kot so tudi rastline in živali (Gunatilaka & Wijeratne, 2012; Lata et al., 2019; Rana et al., 2016; Saxena et al., 2016; Suman et al., 2016). Ocenjuje se, da na svetu obstaja 1,5 milijonov vrst gliv, od tega pa jih je le 10 % poznanih znanstveni skupnosti (Hibbett et al., 2007; Stajich et al., 2010).

Kraljestvo gliv razdelimo na štiri debla – *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* in *Basidiomycota* (Ma et al., 2013) (**Slika 1**). Glive, ki pripadajo deblu *Chytridiomycota* lahko delujejo kot paraziti. Njihova reprodukcija poteka preko proizvodnje zoospor. Glive iz debla *Zygomycota* so večinoma kopenski organizmi, ki pridobivajo hranila iz zemlje ali razpadajočega rastlinskega ali živalskega materiala (Plett & Martin, 2011).

*Ascomycota* (zaprtotrosnice) so najbolj raziskano deblo gliv, saj predstavljajo več kot 60 % vseh opisanih vrst (Ma et al., 2013). Nekatere izmed njih so industrijsko pomembne zaradi širokega nabora sekundarnih metabolitov (*Aspergillus*, *Fusarium* in *Trichoderma*) (Lata et al., 2019; Yadav, Kumar, et al., 2017), druge pa so patogene za živali, rastline in ljudi (*Candida albicans*, *Nematospora* in *Cryptococcus neoformans*) (Ma et al., 2013). Zaprtotrosnice proizvajajo spolne spore (askospore) v zaprtih vrečastih razmnoževalnih strukturah, imenovanih aski in nespolne spore (konidije) na prostih hifah ali nespolnih trosiščih (E. Bielli et al., 2004).

*Basidiomycota* (prostotrosnice) imajo pomembno vlogo pri delovanju ekosistemov. Zunanji, vidni del prostotrosnic ima različna poimenovanja – goba, trošnjak ali plodišče. Gre za razmnoževalni del glive, ki tvori plodno telo, na katerem nastanejo spore (trosi). Celotni organizem, ki vključuje gobo in podgobje (micelij) pa imenujemo gliva. Prostotrosnice se spolno razmnožujejo s proizvajanjem reproduktivnih spor (bazidiospor) na površini bazidijev. Večino gliv, ki tvorijo plodišče (gobo), uvrščamo med bazidiomicete (E. Bielli et al., 2004).

**Slika 1:** Shema klasifikacije gliv.

Bazidiomicete lahko glede na način prehranjevanja razdelimo na simbiotske, saprofitske in parazitske glive. Simbiotske glive najdemo v sožitju z drugimi organizmi, s katerimi si gliva izmenjujejo hranilne snovi, zaradi česar oba simbiotska organizma bolje uspevata. Gliva, ki ima mutualistični odnos z drevesom, omogoča drevesu dotok mineralnih snovi kot sta fosfor in dušik, v zameno pa prejme sladkorje in druge snovi, pridobljene s fotosintezo rastline, ki jih sama ne more proizvajati (Schmidt-Dannert, 2016). Za saprofitske predstavnike je značilno, da se prehranjujejo z absorpcijo in razgrajevanjem organske snovi kot so les, iztrebki in listje, in na tak način v ekosistemih pomagajo pri kroženju snovi (Gunatilaka & Wijeratne, 2012; Schmidt-Dannert, 2016; Schueffler & Anke, 2014). Hranila pridobivajo z absorpcijo skozi hife, preko izločanja različnih hidrolitičnih in oksidativnih encimov (Blackwell, 2011). Parazitske glive lahko okužijo rastline, živali in druge glive (Schmidt-Dannert, 2016).

Od odkritja penicilina, antibiotika, ki izvira iz askomicete *Penicillium notatum* naprej, se raziskovalci ukvarjajo z iskanjem naravnih bioaktivnih produktov gliv, ki imajo potencialno biotehnološko in medicinsko vrednost. Glice so namreč velik, a precej neraziskan vir farmacevtsko pomembnih produktov, med katerimi imajo številni protirakavo, antioksidativno, hepatoprotективno, antibakterijsko in antidiabetično vlogo. Poleg tega imajo iz prehranskega vidika visoko vsebnost proteinov, vlaknin in vitaminov (Cheung, 2010).

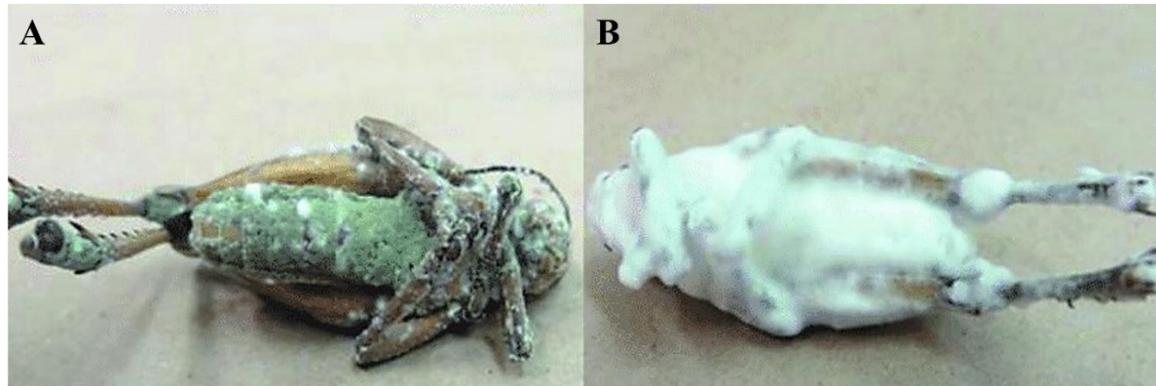
## 2.1 UPORABA GLIV IN NJIHOVIH PRODUKTOV KOT INSEKTICIDNIH SREDSTEV

Škodljivca kot sta koruzni hrošč (*Diabrotica virgifera virgifera*) in koloradski hrošč (*Leptinotarsa decemlineata*) povzročata velike izgube kmetijskih pridelkov in ekonomsko škodo (Jakka et al., 2016; Panevska et al., 2021). Tradicionalno se za zatiranje teh in podobnih škodljivcev uporablajo kemijski pesticidi, ki pa so problematični zaradi škode, ki

jo povzročijo v okolju, hkrati pa lahko vplivajo tudi na zdravje ljudi (Castañeda-Ramírez et al., 2022).

Pesticidi povečujejo učinkovitost kmetijske proizvodnje in sodelujejo pri povečanju donosa in kakovosti pridelka, obenem pa neselektivna, pretirana in napačna uporaba teh sredstev predstavlja grožnjo za netarčne organizme kot so ljudje, živali in rastline (Qian et al., 2018; Stanley et al., 2016). Te toksične snovi se lahko kopijo v zemlji, vodi, zraku, rastlinah, hrani in v krmi. Ostanki pesticidov vstopajo v rastline in živalske proizvode ter se na ta način kopijo v ljudeh in živalih v sklopu prehranjevalnih verig (Hashimi et al., 2020). Uporaba pesticidov lahko pospeši razvoj številnih kroničnih bolezni, ki prizadenejo posameznika, še posebej če gre za kronično izpostavljenost (Igbedioh, 1991). Njihovi negativni učinki na človeško telo se kažejo predvsem na koži, gastrointestinalnem traktu, centralnem živčnem, respiratornem in reproduktivnem sistemu (Nicolopoulou-Stamati et al., 2016). Neželen učinek pesticidov je tudi ta, da povzročijo neravnovesje ekosistemov in onesnažujejo okolje (Igbedioh, 1991). Pesticidi pogosto vsebujejo toksične kemijske elemente ali spojine (ali njihove derivate) kot so klor, arzen, formaldehid in amonijak. Poleg tega zatiranje škodljivcev s kemičnimi pesticidi postaja izziv, saj organizmi razvijajo odpornost na takšne vrste insekticidov. V zadnjih letih se trend zaščite rastlin in pridelka zato usmerja k zatiranju škodljivcev s pomočjo bakterij in gliv ali njihovimi produkti (Purwar & Sachan, 2006). Novi pristopi zatiranja kmetijskih škodljivcev z uporabo bioinsekticidov imajo v primerjavi s kemičnimi insekticidi manjši škodljivi vpliv na okolje in na netarčne organizme (Jakka et al., 2016; Panewska et al., 2021).

Glivni entomopatogeni so glice z insekticidno aktivnostjo (Castañeda-Ramírez et al., 2022), ki so postale pomembna sredstva za biokontrolo škodljivcev, predvsem v kmetijstvu (Vega et al., 2012). Gre za specifične vrste gliv, ki v naravi napadajo insekte in v nekaterih primerih povzročijo popoln propad populacije škodljivcev, kot take pa so primerne za uporabo kot biopesticidi (Ortiz-Urquiza et al., 2015). Ena izmed prednosti uporabe gliv za zatiranje škodljivcev je, da jih lahko množično proizvajamo *in vitro* in shranimo za daljše časovno obdobje, poleg tega pa se lahko njihove spore nanesejo s konvencionalno pršilno opremo. Glice so v primerjavi s kemičnimi insekticidi precej manj toksične za sesalce in imajo zanemarljivo malo škodljivega vpliva na okolje (Thomas & Read, 2007). Nekatere vrste gliv, ki se uporablja kot insekticidi so *Beauveria* spp., *Metarhizium* spp., *Trichoderma*, *Isaria* spp., *Lecanicillium* spp. in *Purpureocillium* spp. *Beauveria bassiana* je entomopatogena gliva, ki zelo uspešno deluje na pekanovega mokarja, koloradskega hrošča in hrošča kudzu, pa tudi na druge škodljivce. Askomiceta *Metarhizium* spp. pa se po drugi strani pogosto uporablja na poljih za zaščito pridelka pred ličinkami hroščev, koruznimi črvi in drugimi žuželkami (Vega, 2018). Na **Sliki 2** je predstavljen prikaz okužbe insekta z glivo iz rodu *Metarhizium*.



Slika 2: Prikaz okužbe insekta z glivo iz rodu *Metarhizium* (Bustilloz Rodríguez et al., 2016).

## 2.2 MIKROSKOPSKE ENTOMOPATOGENE GLIVE

Nekatere mikroskopske entomopatogene glive so že dobro preučene in komercialno uporabljeni, veliko pa je še neraziskanih. Večinoma gre za endofitske glive, to so mikroorganizmi ki preživijo večino svojega življenskega cikla tako da kolonizirajo tkiva gostiteljske rastline, ne povzročajo pa škode gostitelju. Te glive lahko branijo gostitelja pred rastlinojedimi žuželkami, saj so nekatere študije pokazale da imajo insekticidno aktivnost (Kusari et al., 2012; Sánchez-Fernández et al., 2013). Mehanizem insekticidnega delovanja mikroskopskih entomopatogenih gliv je sestavljen iz več korakov: adhezije, penetracije kutikule insekta, kar olajša invazijo hemocela in degeneracijo tkiv, sledi smrt gostitelja zaradi mehanskih poškodb in toksinov. Sledi saprofitska rast in sporulacija invazivne glive (Hyde et al., 2019; Khan et al., 2012).

Askomiceta *Metarhizium anisopliae* je mikroskopska gliva, ki deluje proti več kot 300 vrstam škodljivih insektov iz več kot 50 različnih družin. Sorodna vrsta, *M. rileyi*, lahko napade več kot 32 vrst insektov redov hroščev (Coleoptera), metuljev (Lepidoptera) in kobilic (Orthoptera). Najpogosteje inficira red metuljev *Spodoptera*, kot je *Spodoptera frugiperda*, ki povzroča škodo na koruzi. Trenutno se uporablajo številni komercialni mikrobeni insekticidi, ki temeljijo na vrstah iz rodu *Metarhizium* in so na voljo v ZDA, Avstraliji, Franciji, Braziliji, Indiji in drugod po svetu. Druga najbolj preučevana entomopatogena gliva je askomiceta *Beauveria* spp., ki napada več kot 200 vrst insektov (Monzón, 2002). Ta rod vključuje več različnih vrst, kot so *B. bassiana*, *B. brongniartii*, *B. amorphia* in *B. velata*. Še en primer entomopatogene mikroskopske glive je askomiceta *Isaria fumosorosea*, ki je toksična za več kot osem vrst insektov (González-Castillo et al., 2012).

Endofitska gliva *Neotyphodium coenophialum* kaže aktivnost proti stenici *Oncopeltus fasciatus*, kar naj bi bila posledica alkaloidov, ki jih gliva proizvaja (Yates et al., 1989). Druge študije so pokazale tudi učinek alkaloidov na organizem *Popillia japonica* in

*Spodoptera* spp. (Patterson et al., 1991; Riedell et al., 1991). Bazidiomiceta *Piriformospora indica* je sposobna kolonizirati korenine rastlin in hkrati povečati rast rastline (Verma et al., 1998), v nekaterih primerih pa vzpodbuja tudi proizvodnjo semen in rast pri vrsti *Arabidopsis* (Camehl et al., 2010). *Piriformospora indica* lahko kot biokontrolno sredstvo v rastlini sproži produkcijo obrambnih signalnih molekule poti patogenom (Stein et al., 2008). Red Entomophthorales so biotrofne glice, kar pomeni, da od gostitelja pridobivajo hranila, a mu hkrati ne povzročajo nobene škode (Sharma & Sharma, 2021). Hkrati so bile preučevane tudi številne glice iz reda Entomophthorales, med drugimi tudi *Conidiobolus apiculatus*, *Conidiobolus coronatus*, *Entomophthora planchonian* in *Erynia neoaphidis*. Za glico *Zoophthora radicans* pa je bilo dokazano, da napada enakokrilce (Homoptera), dvokrilce (Diptera) in metulje (Lepidoptera) (Remaudière & Latgé, 1985).

## 2.3 MAKROSKOPSKE ENTOMOPATOGENE GLIVE

Eden prvih odkritih rodov makroskopskih gliv z insekticidno aktivnostjo je bil rod bazidiomicet *Lycoperdon*, za katerega so pokazali, da s pomočjo svojih spor paralizira čebele (Cordier, 1876). To odkritje je bilo v nadaljevanju povod za začetek več študij, ki so preučevale insekticidno delovanje gliv. Med letom 1876 in 2021 je bilo preučenih več kot 150 gliv z insekticidno aktivnostjo. Od teh jih je več kot 90 izkazovalo insekticidni potencial proti organizmom kot so *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera littoralis*, vrste iz rodu *Tribolium*, *Diatraea magnifactella* in *Sitophilus zeamais* (Castañeda-Ramírez et al., 2022). Pomembno je omeniti, da glice nimajo nujno enake ali primerljive insekticidne aktivnosti čeprav pripadajo istemu rodu (Mier et al., 1996). V dosedanjih študijah, ki so preučevale insekticidno aktivnost makroskopskih gliv, so najpogosteje poročali o rodovih *Boletus*, *Tricholoma*, *Hygrophoropsis*, *Cortinarius*, *Amanita*, *Pleurotus*, *Lepista* in *Clitocybe* (Castañeda-Ramírez et al., 2022).

## 2.4 KOMERCIALNO POMEMBNI PRIMARNI IN SEKUNDARNI METABOLITI GLIV

Edinstvena lastnost gliv je njihova sposobnost proizvodnje presenetljivo velikega nabora (zunajceličnih) encimov, kar jim omogoča kolonizacijo in razgradnjo velikega števila substratov. Po drugi strani pa nam biološka aktivnost teh encimov daje potencial za sintezo zelo pestrega nabora medicinsko in industrijsko zanimivih metabolitov (McKelvey & Murphy, 2017; Nisa et al., 2015). V zadnjih letih se povečuje raziskovanje primarnih in sekundarnih metabolitov gliv, saj se povečuje potreba po spojinah z biološko aktivnostjo, ki imajo potencial za uporabo v farmaciji in kmetijstvu (Gunatilaka & Wijeratne, 2012; Sexton & Howlett, 2006).

Gliva iz okolja privzame hranila, ki jih nato uporabi kot vir energije, ali za proizvodnjo primarnih metabolitov: proteinov, lipidov, ogljikovih hidratov in nukleinskih kislin; ki jih

nato potrebuje za rast in proizvodnjo biomase (Turner, 1971; Walker & White, 2005). Primarni metaboliti se tvorijo med aktivno rastjo glive, ki se nato v biomaso glive vgradijo v sklopu primarnih metabolnih poti. Primeri komercialno pomembnih snovi iz gliv sta na primer intermediata primarnega metabolizma, citronska in glukonska kislina, ki se ju tipično pridobiva iz askomicete *Aspergillus niger*, sekundarna metabolita vitamin B2 (riboflavin) iz askomicete *Eremothecium ashbyii* in polisaharid pululan iz *Aureobasidium pullulans* ter encimi renin iz *Rhizomucor pusillus*, lipaze iz askomicete *Penicillium roquefortii*, proteaze iz askomicete *Aspergillus oryzae* in celulaze iz askomicete *Trichoderma viride* (Pujari & Chandra, 2000; Roukas, 2000; Viniegra-González et al., 2003).

Encimi so najbolj raziskani in uporabljeni primarni metaboliti gliv, saj so pomembni v panogah za predelavo substratov in surovin. Glivni encimi so uporabni v prehranski, usnjarski in tekstilni industriji, pa tudi pri biopretvorbah in bioremediaciji (Nigam, 2013). Najpomembnejši komercialno uporabljeni encimi iz gliv so proteaze, amilaze, celulaze, ksilanaze, lipaze in fitaze (Yadav, Kumar, et al., 2017; Yadav et al., 2016; Yadav, Verma, et al., 2017). Najpogosteje se izolirajo iz rodov *Aspergillus*, *Rhizopus* in *Penicillium* (McKelvey & Murphy, 2011).

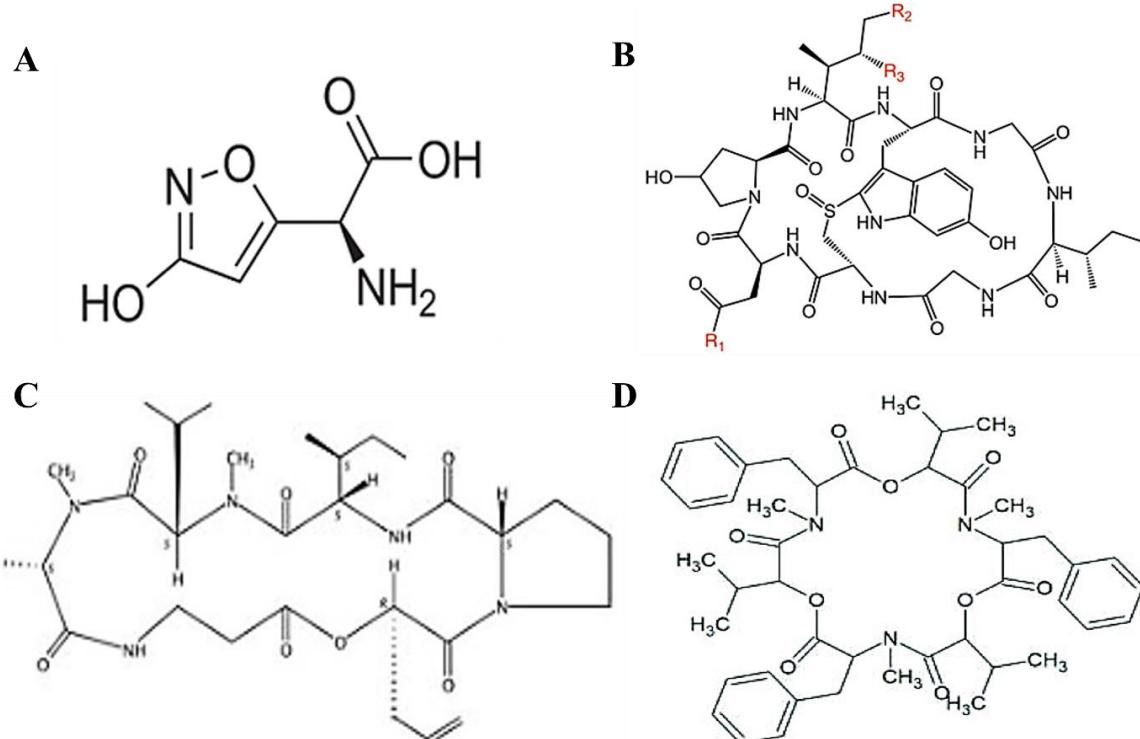
Čeprav sekundarni metaboliti niso nujno potrebni za samo rast glive jih mnoge vrste proizvajajo. Številni med njimi, kot so na primer antibiotiki in mikotoksini, imajo protiglivno in antibakterijsko aktivnost in za glivo predstavljajo kompetitivno prednost ter delujejo kot obrambni mehanizem v smislu preživetja. Večina gliv ima razvite mehanizme za obrambo pred škodljivimi snovmi, ki jih same proizvajajo. V večini primerov gliva proizvede te metabolite po fazi aktivne rasti, takrat pa je micelij že sposoben detoksificirati snovi ali preprečiti vstop antibiotikov preko celične stene s spremembjo permeabilnosti plazemske membrane. Komercialno pomembni sekundarni produkti gliv so predvsem antibiotiki (penicilin iz askomicete *Penicillium chrysogenum*, cefalosporin iz askomicete *Cephalosporium acremonium*, griseofulvin iz askomicete *Penicillium griseofulvum*) in alkaloidi (askomicete *Claviceps* spp.) (Macheleidt et al., 2016). Pomembni sekundarni metaboliti gliv so tudi statini, ki znižujejo serumske ravni holesterola preko inhibicije encimov, ki so udeleženi v biosintezi holesterola (Istvan & Deisenhofer, 2001) (mevastatin iz askomicete *Penicillium citrinum*, lovastatin iz askomicete *Aspergillus terreus*) (Manzoni & Rollini, 2002).

## 2.5 INSEKTICIDNI SEKUNDARNI METABOLITI GLIV

Ena izmed prvih glivnih spojin, za katero so dokazali, da deluje insekticidno, je bila ibotenska kislina, ki jo proizvajata tudi bazidiomiceti *Amanita muscaria* in *Amanita pantherina* in naj bi bila toksična za muhe (Wieland, 1968). Tudi druge spojine z insekticidnim potencialom so bile izolirane iz rodu *Amanita*, kot so recimo amatoksi. Za amatoksi je značilno, da ireverzibilno inhibirajo RNA polimerazo in so posledično

toksični za vse evkariontske organizme, z izjemo nekaterih mikofagnih insektov (Jaenike et al., 1983). Askomiceta *Metarrhizium anisopliae* je po drugi strani vir sekundarnih metabolitov destruksinov, katerih delovanje proti insektom se preučuje že od leta 1985 (Quiot et al., 1985). Destruksi povzročijo tetanično paralizo, ki vodi v smrt insekta (Pedras et al., 2002).

Še ena izmed nevrološko aktivnih spojin je 2-amino-3-(1,2-dikarboksietiltio) oz. propanoična kislina, ki je antagonist glutamatnega receptorja NMDA (ang. *N-methyl-D-aspartate receptor*) in ki jo lahko izoliramo iz bazidomicete *Amanita pantherina* (Fushiya et al., 1993). Iz askomicete *Beauveria bassiana* sta bila izolirana buvericin in bazianolid, izvedena pa je bila tudi študija, kjer so preučili njuno delovanje proti različnim insektom. V raziskavi so uporabili divji sev *B. bassiana*, ki proizvaja tako buvericin kot bazianolid, hkrati pa so pripravili dve mutanti glice in sicer je ena proizvajala le bazianolid, druga pa nobeno izmed omenjenih snovi. Nato so preverjali delovanje teh treh sevov *in vitro* proti različnim stopnjam razvojnih stadijev insektov *Spodoptera exigua*, *Galleria mellonella* in *Helicoverpa zea*. Največji odstotek smrtnosti pri vseh žuželkah je pričakovano povzročil divji tip *B. bassiana*. Študija je tako potrdila pomembno vlogo buvericina in bazianolida v askomiceti *B. bassiana*, saj se je ob odsotnosti katerekoli od dveh snovi odstotek smrtnosti zmanjšal proti vsem trem testiranim insektom (Xu et al., 2008). Leta 2017 pa je bila potrjena prisotnost ergosterola v bazidomiceti *Pleurotus salmoneostamineus*, ki je pokazal insekticidno aktivnost proti parazitu *Trypanosoma cruzi*. Mehanizem delovanja ergosterola vključuje povečanje permeabilnosti membran, pa tudi depolarizacijo mitohondrijskega membranskega potenciala, kar vodi v smrt insekta (Alexandre et al., 2017). Na **Sliki 3** je predstavljen prikaz kemijskih struktur nekaterih insekticidnih sekundarnih metabolitov gliv.



**Slika 3:** Kemijske strukture nakterih sekundarnih metabolitov gliv: A – ibotenska kislina (Voynova et al., 2020), B – amatoksin (Bever et al., 2019), C – destruksin A (Wang et al., 2020), D – buvericin (Krizova et al., 2021).

Še en primer sekundarnega metabolita z insekticidnim delovanjem je oosporein, derivat 1,4-dibenzokinona, ki ga najdemo v nekaterih vrstah iz rodu *Beauveria*. Omenjen toksin je eden glavnih metabolitov *B. brongniartii*, ki je bil odkrit v okuženih insektih (Basyouni et al., 1968; Strasser et al., 2000). Sevi *B. bassiana*, ki proizvajajo oosporein, so zelo patogeni (Eyal et al., 1993), saj ta snov deluje citotoksično in antimikrobično. Med infekcijo z *B. bassiana* oosporein zavira imunost insektov, inhibira signalno pot posredovano z profenol oksidazo in izražanje genov, odgovornih za sintezo protiglavnih peptidov (Alurappa et al., 2014; Fan et al., 2017; Feng et al., 2015; Nagaoka et al., 2004).

Med sekundarnimi metaboliti askomicete *Cordyceps sensu lato* so insekticidno delovanje pokazali kordicepin, fomalakton in buvericin, ki jih sicer proizvajajo vrste *Cordyceps militaris*, *C. cicadae* in *Ophiocordyceps communis* (Prathumpai & Kocharin, 2016; Wang et al., 2014).

Kordicepin je eden glavnih metabolitov glive *Cordyceps militaris* (Tuli et al., 2013), ki deluje citotoksično saj povzroči terminacijo sinteze nukleinskih kislin (Holliday & Cleaver, 2008). Kordicepin je pokazal aktivnost predvsem proti larvam moljev *Plutella xylostella*, ki so pognile po petih dneh prehranjevanja z listi, ki so jih tretirali s toksinom v koncentraciji 0,3–0,5 mg/mL (Kim et al., 2002). Infekcija larv moljev *Galleria mellonella* s kordiocepinom

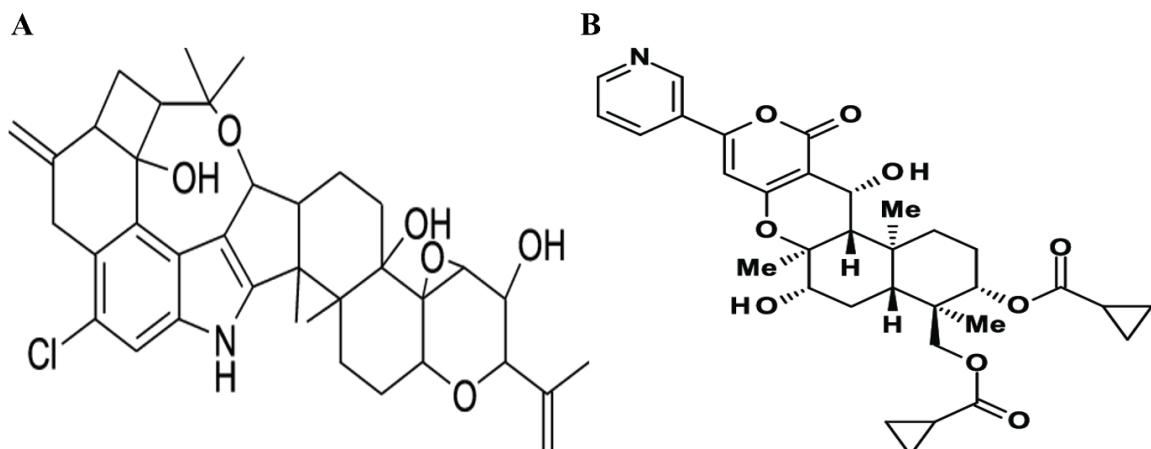
vodi v inhibicijo imunskega odziva žuželke oziroma izražanja zaščitnih genov, kar prispeva k razvoju bolezni in smrti žuželke (Tyurin in sod., 2019; Woolley in sod., 2020).

Fomalakton je bil izoliran iz entomopatogene askomicete *Hirsutella thompsonii* in je deloval toksično proti muhi *Rhagoletis pomonella* (Krasnoff & Gupta, 1994). Hkrati je izkazoval tudi antifungicidno delovanje proti vodni plesni *Phytophthora infestans*, ki povzroča bolezen krompirjeva plesen (Kim et al., 2001).

Iz rodu *Aspergillus* spp. je bilo izoliranih približno 100 spojin z insekticidno aktivnostjo (Gloer, 1995). Številne med njimi so bile patentirane kot potencialne insekticidne molekule: aspernomin (Staub et al., 1992), sulpinin, sekopenitrem B, aflatrem B (Laakso et al., 1992), leporin A (Dowd et al., 1994) in cikloehinulin (Deguzman et al., 1994). *Aspergillus sclerotiiicarbonarius* vsebuje številne snovi, ki delujejo insekticidno proti larvam vinske mušice *Drosophila melanogaster* (Frisvad et al., 2014; Petersen et al., 2015). Asperparalini pa so tetramični kislinski derivati, ki jih proizvaja *A. japonicus* in povzročajo paralizo v sviloprejki *Bombyx mori* (Hayashi et al., 2000). Asperparalin A v 100 nM koncentraciji selektivno blokira na nikotin občutljive acetilholinske receptorje tega insekta (Hirata et al., 2011).

Iz rodu *Penicillium* so izolirali insekticidne metabolite kot so penitremi A-B ter njihove analoge. Penitrem A je bil patentiran kot širokospektralna insekticidna molekula (González et al., 2003).

Med najbolj zanimivimi metaboliti iz gliv rodu *Aspergillus* in *Penicillium* je bilo odkritje piripiropena A iz skupine meroterpenoidov, ki so ga sprva izolirali iz *A. flavus* (Omura et al., 1993). Kasneje so ga identificirali tudi v *P. coprobium* in *P. griseofulvum*. Semisintetični derivat piripiropena A, afidopiropen je bil pred kratkim registriran kot insekticid Inscalis. Afidopiropen deluje tako, da blokira aktivnost specifičnih ionskih kanalčkov hordotonálnih organov žuželk, s čimer se vpleta v njihovo koordinacijo in prehranjevanje (Koradin et al., 2021). Na **Sliki 4** je predstavljen prikaz kemijskih struktur sekundarnih metabolitov penitrema A in afidopiropena.



**Slika 4:** Kemijski strukturi sekundarnih metabolitov A – penitrem A (Naude et al., 2003) in B – afidopiopen (Jeschke, 2020).

## 2.6 INSEKTICIDNI GLIVNI PROTEINI

V glivah je bilo identificiranih tudi nekaj proteinov z insekticidnimi potencialom. Leta 2002 je bila izvedena študija o insekticidni aktivnosti različnih gliv, v kateri so identificirali hemolizine, lektine in serpine. Poleg tega so s testom citotoksičnosti pokazali insekticidno aktivnost teh gliv, saj so povzročile 40 – 100 % smrtnost pri vrstah *Spodoptera littoralis* in *Drosophila melanogaster* (Wang et al., 2002).

## 2.7 POROTVORNI PROTEINI GLIV

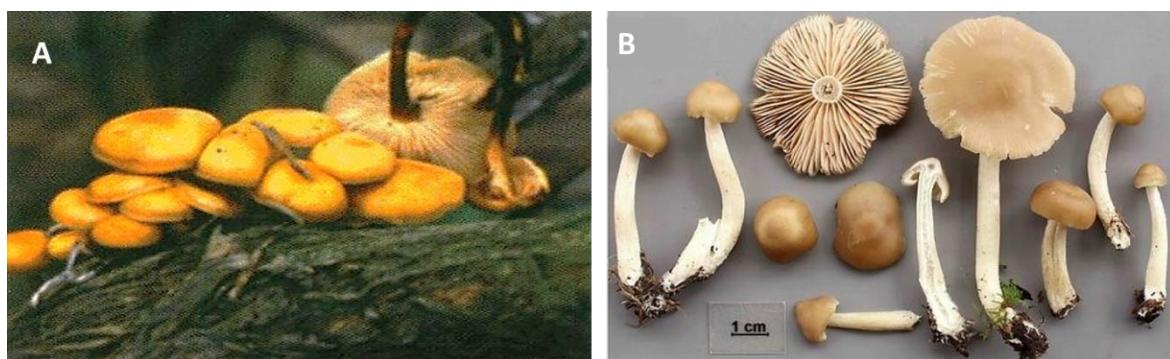
Porotvorni proteini so velika skupina proteinov, ki jih najdemo v vseh domenah življenja (Butala et al., 2017). Gre za proteine, ki so v vodni raztopini v monomerni ali oligomerni oblikih, ob prisotnosti membrane pa se nanjo vežejo in oblikujejo citolitične porotvorne komplekse (Shibata et al., 2010). Bakterijski in živalski porotvorni proteini so dobro poznani in večinoma vpleteni v mehanizme obrambe ali napada, zelo malo pa je znanega o njihovi vlogi in razširjenosti pri glivah (Butala et al., 2017). Le te proizvajajo eno ali dvokomponentne porotvorne proteine. Pri enokomponentnih porotvornih proteinih je za nastanek transmembranske pore potreben le en protein, pri dvokomponentih pa morata biti prisotni dve proteinski komponenti (Shibata et al., 2010).

### 2.7.1 Enokomponentni citolizini

Primer enokomponentnega citolizina je flamutoksin, ki je kardiotoksični in citolitični polipeptid velikosti 31 kDa iz užitne bazidiomicete zimske panjevke (*Flammulina velutipes*), ki povzroči odpiranje tesnih stikov (Bernheimer & Oppenheim, 1987; Lin et al., 1975; Narai et al., 2004; Tomita et al., 1998; Watanabe et al., 1999). Deluje kot hemolitični protein in tvori membranske pore s premerom 4 – 5 nm, ki delujejo kot selektivni napetostno odvisni

kationski kanali. Na ta način pride do iztoka kalijevih ionov iz eritrocitov, kar vodi v nabrekanje celic in hemolizo (Tadjibaeva et al., 2000; Tomita et al., 1998).

Med enokomponentne citolizine gob prištevamo tudi hemolitični protein, ki je bil izoliran iz strupene bazidiomicete nizka rdečelistka (*Rhodophyllus rhodopolius*), ki pri miših povzroča diarejo in smrt. Poleg tega je protein povzročil hemolizo človeških, mišjih, piščančjih, podganjih in konjskih eritrocitov, ne pa tudi ovčjih in kravjih (Suzuki et al., 1990). Na **Sliki 5** je predstavljen prikaz gliv, ki proizvajajo enokomponentne citolizine.



**Slika 5:** Prikaz gliv, ki proizvajajo enokomponentne citolizine. A – *Flammulina velutipes* (Petersen & Hughes, 1999), B – *Rhodophyllus rhodopolius* (Brandrud in sod., 2018).

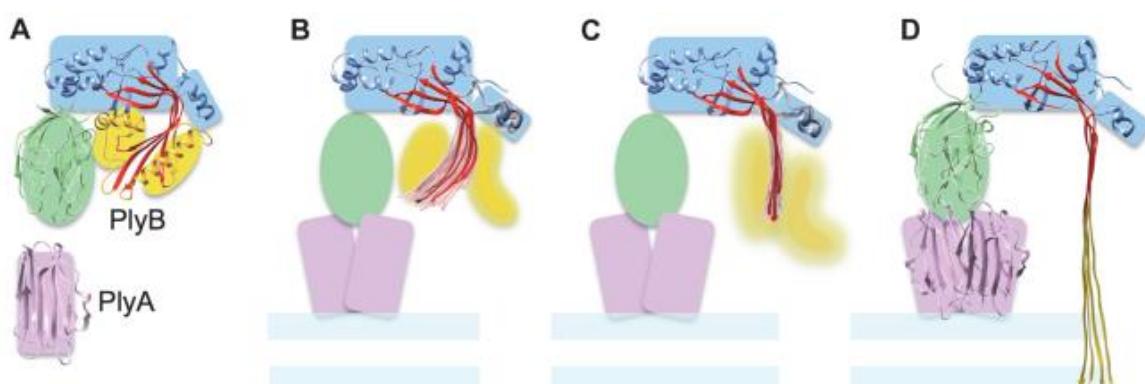
## 2.7.2 Dvokomponentni citolizini

Primer dvokomponentnega citolizina je hemolizin iz parazitske bazidiomicete žvepleni lepoluknjičar (*Laetiporus sulphureus*), ki deluje kot lektin (Tateno & Goldstein, 2003). Ta hemolizin je strukturno podoben  $\alpha$ -toksinu iz bakterije *Clostridium septicum* in toksinu MTX2 iz *Bacillus sphaericus*, ki je toksičen za komarje (Mancheno in sod., 2004). Ta protein vsebuje dve domeni, ki imata različni funkciji. N-terminalna domena prepozna sladkorne komponente na površini celic, medtem ko je C-terminalna domena potrebna za oligomerizacijo. C-terminalna domena je strukturno zelo podobna aerolizinu iz bakterije *Aeromonas hydrophila* (Mancheño in sod., 2005), poleg tega pa odstranitev te domene popolnoma inaktivira hemolitično aktivnost proteina (Mancheño in sod., 2010). Protein povzroči hemolizo preko mehanizma, ki vključuje tvorbo ionsko prepustnih membranskih por s funkcionalnim premerom, manjšim od 3,8 nm (Tateno & Goldstein, 2003). Po oblikovanju pore pride do lize eritrocitov (Mancheño in sod., 2005). Na **Sliki 6** je predstavljen prikaz gliv, ki proizvajajo dvokomponentne citolizine.



**Slika 6:** Prikaz gliv, ki proizvajajo dvokomponentne citolizine. A – *Laetiporus sulphureus* (Patočka, 2019), B – *Pleurotus ostreatus* (Vlasenko & Vlasenko, 2018), C – *Pleurotus eryngii* (Ro in sod., 2007).

Leta 2019 je bilo ugotovljeno, da glivni rod *Pleurotus* proizvaja proteine z insekticidnim delovanjem (Panevska in sod., 2019). Ti proteini so dvokomponentni citolizini, kjer je komponenta A egerolizin, ki prepozna specifični lipidni receptor, komponenta B pa protein z domeno MACPF (ang. *membrane attack complex/perforin*), ki omogoča tvorbo pore v membrani (**Slika 7**). Bukov ostrigar (*P. ostreatus*) proizvaja egerolizine ostreolizin A (OlyA), ostreolizin A6 (OlyA6) in pleurotolizin A (PlyA) ter protein pleurotolizin B (PlyB), ki je protein z domeno MACPF. Kraljevi ostrigar (*Pleurotus eryngii*) kodira za egerolizina pleurotolizin A2 (PlyA2) in erilizin A (EryA) in protein erilizin B (EryB), ki je protein z domeno MACPF (Krašavec & Skočaj, 2022). Molekularni mehanizem delovanja teh citolitičnih dvokomponentnih kompleksov je tak, da se komponenta A (egerolizin) močno veže na ustrezni lipidni receptor v membranah celic žuželk, ob prisotnosti komponente B pa se tvori multimerna dvokomponentna transmembranska pora. Taki kompleksi kažejo močno insekticidno aktivnost proti ličinkam in odraslim organizmom koruznega in koloradskega hrošča (Panevska in sod., 2021).



**Slika 7:** Shematski prikaz tvorbe pore. A – Monomerni oblici proteinov PlyA in PlyB, B – Interakcija PlyA z membrano, tvorba dimera, vezava PlyB, C – Sprememba konformacije PlyB, D – tvorba pore (Lukoyanova in sod., 2015)

Egerolizini se sicer pojavljajo predvsem v glivah in bakterijah (Butala in sod., 2017). Prva odkrita in izolirana egerolizina sta bila Asp-hemolizin iz plesni *Aspergillus fumigatus* (Yokota in sod., 1977) in pleurotolizin (Ply) iz bazidiomicete *Pleurotus ostreatus* (Bernheimer & Avigad, 1979). Skupna značilnost večine egerolizinov iz rodu *Pleurotus* je, da prepoznajo in se vežejo na lipidne domene s sestavo sfingomielin/holessterol, ali še 1000-krat močneje na membrane, ki vsebujejo holessterol in ceramid fosfoetanolamin (CPE) (Bhat in sod., 2015; Kishimoto in sod., 2016). CPE je glavni sfingolipid v celičnih membranah nevretenčarjev in analog sfingomielina, ki prevladuje pri vretenčarjih (Bhat in sod., 2015). Zato egerolizini s svojo specifično interakcijo s CPE in oblikovanjem transmembranske pore v kombinaciji s komponento B predstavljajo odlično orožje za zatiranje škodljivcev, ki vsebujejo CPE v svojih celičnih membranah (Panewska in sod., 2019).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

##### 3.1.1 Popis gob, ki smo jih v raziskavi testirali

Uporabljene gobe so bile liofilizirane in shranjene na Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani. Popis uporabljenih gob, njihova latinska imena, datum in lokacija nabiranja so prikazani v **Preglednici 1.** Lokacije nabranih vrst bazidiomicet so označene na karti Slovenije na **Sliki 8.** V raziskavi smo pripravili ekstrakte 138 gob, ki so pripadali 114 različnim vrstam gob.

**Preglednica 1:** Latinsko in slovensko ime gobe, datum nabiranja in lokacija nabiranja. \*\*, kupljeni v trgovini. Opomba: Cerkniško jezero – Otok; Johe – Krajinski park Drava; KP Trš – Krajinski Park Tivoli, Rožnik in Šišenski hrib

Latinsko ime gobe	Slovensko ime gobe	Datum nabiranja	Lokacija
<i>Hygrocybe conica</i>	Koničasta vlažnica	26.10.2019	Idrija
<i>Tricholoma stiparophyllum</i>	Brezina kolobarnica	26.10.2019	Idrija
<i>Cuphophyllus pratensis</i>	Travniška tratnica	26.10.2019	Idrija
<i>Hygrocybe coccinea</i>	Škrlatna vlažnica	26.10.2019	Idrija
<i>Hygrocybe ovina</i>	Ovčja vlažnica	26.10.2019	Idrija
<i>Russula queletii</i>	Queletova golobica	26.10.2019	Idrija
<i>Hydnnum repandum</i>	Rumeni ježek	26.10.2019	Idrija
<i>Hygrocybe citrinovirens</i>	Zelenkasta vlažnica	26.10.2019	Idrija
<i>Cuphophyllus fornicatus</i>	Oblokasta tratnica	26.10.2019	Idrija
<i>Lepista nuda</i>	Vijoličasta kolesnica	26.10.2019	Idrija
<i>Lactarius torminosus</i>	Kosmata mlečnica	26.10.2019	Idrija
<i>Gliophorus laetus</i>	Spolzki vlažnik	26.10.2019	Idrija
<i>Fomitopsis betulina</i>	Brezova kresilača	26.10.2019	Idrija
<i>Porpolomopsis calyptriformis</i>	Rožnata vlažnica	9.11.2019	Cerkniško jezero
<i>Auricularia mesenterica</i>	Brestova uhljevka	7.12.2019	Idrija
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	Rdečeča zvitocevka	7.12.2019	Johe
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	7.12.2019	Johe
<i>Flammulína velútipes</i>	Zimska panjevka	7.12.2019	Johe
<i>Phlebia tremellosa</i>	Drhtava žilnica	7.12.2019	Johe
<i>Volvopluteus gloiocephalus</i>	Velika nožničarka	7.12.2019	Johe
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bukov ostrigar	7.12.2019	Johe

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Latinsko in slovensko ime gobe, datum nabiranja in lokacija nabiranja. \*\*, kupljeno v trgovini. Opomba: Cerkniško jezero – Otok; Johe – Krajinski park Drava; KP Trš – Krajinski Park Tivoli, Rožnik in Šišenski hrib

<i>Auricularia auricula-judae</i>	Bezgova uhljevka	7.12.2019	Johe
<i>Trametes suaveolens</i>	Vrbova ploskocevka	7.12.2019	Johe
<i>Schizophyllum commune</i>	Navadna cepilistka	7.12.2019	Johe
<i>Fomes fomentarius</i>	Bukova kresilka	7.12.2019	Johe
<i>Trametes versicolor</i>	Pisana ploskocevka	7.12.2019	Johe
<i>Phylloporia ribis</i>	Ribezova plutačevka	19.02.2020	KP Trš
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	19.02.2020	KP Trš
<i>Trametes gibbosa</i>	Grbasta ploskocevka	19.02.2020	KP Trš
<i>Gloeoporus taxicola</i>	Obrobljena pokrivača	19.02.2020	KP Trš
<i>Inonotus obliquus</i>	Brezin luknjičar - Čaga	neznano	**
<i>Phragmotrichum chailletii</i>	Storževa pregradnica	19.02.2020	KP Trš
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka	neznano	neznano
<i>Amanita eliae</i>	Elijeva mušnica	neznano	neznano
<i>Neofavolus alveolaris</i>	Satjasti luknjičar	neznano	neznano
<i>Boletus reticulatus</i>	Poletni goban	neznano	neznano
<i>Stropharia eximia</i>	Orjaška strniščnica	neznano	neznano
<i>Lentinula edodes</i>	Užitni nazobčanec - Šitake	neznano	**
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Bezgova uhljevka	neznano	neznano
<i>Laetiporus sulphureus</i>	Žvepleni lepoluknjičar	21.5.202	Rožnik
<i>Polyporus ciliatus</i>	Ščetinasti luknjičar	neznano	neznano
<i>Lactarius volemus</i>	Sočna mlečnica	21.05.2020	Rožnik
<i>Mitrula paludosa</i>	Močvirkska kapica	21.05.2020	Rožnik
<i>Gymnopus dryophilus</i>	Vitki korenovec	neznano	neznano
<i>Cantharellus friesii</i>	Žametna lisička	neznano	neznano
<i>Russula virescens</i>	Zelenkasta golobica	14.08.2020	Janče
<i>Amanita rubescens</i>	Rdečkasta mušnica	14.08.2020	Janče
<i>Russula nigricans</i>	Črneča golobica	14.08.2020	Janče
<i>Amanita excelsa</i>	Podaljšana mušnica	14.08.2020	Janče
<i>Daedalea quercina</i>	Hrastova labirintnica	14.08.2020	Janče
<i>Fomes fomentarius</i>	Bukova kresilka	14.08.2020	Janče
<i>Hemitrichia serpula</i>	Mrežasta zlatovka	14.08.2020	Janče
<i>Lactarius vellereus</i>	Polstena mlečnica	14.08.2020	Janče

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Latinsko in slovensko ime gobe, datum nabiranja in lokacija nabiranja. \*\*, kupljeno v trgovini. Opomba: Cerkniško jezero – Otok; Johe – Krajinski park Drava; KP Trš – Krajinski Park Tivoli, Rožnik in Šišenski hrib

<i>Cantharellus cibarius</i>	Navadna lisička	14.08.2020	Janče
<i>Chlorociboria aeruginascens</i>	Zelenkasti zelenivec	14.08.2020	Janče
<i>Strobilomyces strobilaceus</i>	Črni kuštravec	14.08.2020	Janče
<i>Tapinella atrotomentosa</i>	Žamentni podvihanec	14.08.2020	Janče
<i>Scleroderma citrinum</i>	Navadna trdokožnica	14.08.2020	Janče
<i>Russula amoenolens</i>	Vonjava golobica	14.08.2020	Janče
<i>Gloephylum odoratum</i>	Dišeča tramovka	14.08.2020	Janče
<i>Tylopilus felleus</i>	Žolčasti grenivec	14.08.2020	Janče
<i>Hypholoma fasciculare</i>	Navadna žveplenjača	14.08.2020	Janče
<i>Cyathus striatus</i>	Črtkani košek	14.08.2020	Janče
<i>Suillus luridiformis</i>	Žametasti goban	14.08.2020	Janče
<i>Trametes versicolor</i>	Pisana ploskocevka	14.08.2020	Janče
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	14.08.2020	Janče
<i>Trametes gibbosa</i>	Grbasta ploskocevka	14.08.2020	Janče
<i>Fomitopsis betulina</i>	Brezova kresilača	14.08.2020	Janče
<i>Cantharellus amethysteus</i>	Luskata lisička	17.06.2020	Koseški Boršt
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar	27.07.2020	Hotična
<i>Russula cyanoxantha</i>	Modrikasta golobica	neznano	neznano
<i>Tuber aestivum</i>	Poletna gomoljika	neznano	neznano
<i>Russula illota</i>	Blatna golobica	22.08.2020	Zminec
<i>Scleroderma citrinum</i>	Navadna trdokožnica	22.08.2020	Zminec
<i>Gymnopus confluens</i>	Šopasti korenovec	22.08.2020	Zminec
<i>Russula albonigra</i>	Črnorjava golobica	22.08.2020	Zminec
<i>Sparassis crispa</i>	Borov glivec	2.09.2021	KP Trš
<i>Fomitopsis betulina</i>	Brezova kresilača	2.09.2021	KP Trš
<i>Phallus impudicus</i>	Smrdljivi mavrahovec	5.09.2021	KP Trš
<i>Scleroderma citrinum</i>	Navadna trdokožnica	2.09.2021	KP Trš
<i>Scleroderma cepa</i>	Gladka trdokožnica	3.09.2021	KP Trš
<i>Trametes versicolor</i>	Pisana ploskocevka	2.9.2021	KP Trš
<i>Crepidotus crocophyllus</i>	Rjavoluskata postrančica	5.9.2021	KP Trš
<i>Lactarius sphagneti</i>	Šotna mlečnica	3.9.2021	KP Trš
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar	4.9.2021	KP Trš
<i>Neoboletus luridiformis</i>	Prašičji goban	4.9.2021	KP Trš

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Latinsko in slovensko ime gobe, datum nabiranja in lokacija nabiranja. \*\*,  
kupljeno v trgovini. Opomba: Cerkniško jezero – Otok; Johe – Krajinski park Drava; KP Trš – Krajinski Park Tivoli, Rožnik in Šišenski hrib

<i>Ganoderma adspersum</i>	Debela pološčenka	2.9.2021	KP Trš
<i>Craterellus lutescens</i>	Žolta tropenta	3.9.2021	KP Trš
<i>Xerula radicata</i>	Zaviti širokolistar	5.9.2021	KP Trš
<i>Scleroderma verrucosum</i>	Bradavičasta trdokožnica	5.9.2021	KP Trš
<i>Gloeophyllum abietinum</i>	Hojeva tramovka	2.9.2021	KP Trš
<i>Cantharellus amethysteus</i>	Luskata lisička	2.9.2021	KP Trš
<i>Cantharellus cibarius</i>	Navadna lisička	22.8.2021	Zminec
<i>Infundibulicybe gibba</i>	Rjavkasta livka	2.9.2021	KP Trš
<i>Gyrodon lividus</i>	Jelšev polgoban	3.9.2021	KP Trš
<i>Cortinarius bolaris</i>	Opečna koprenka	3.9.2021	KP Trš
<i>Pseudoboletus parasiticus</i>	Zajedalski pagoban	3.9.2021	KP Trš
<i>Pterula multifida</i>	Razvejana ščetinjača	3.9.2021	KP Trš
<i>Ceriporiopsis gilvescens</i>	Rjaveča samičarka	3.9.2021	KP Trš
<i>Cantharellus amethysteus</i>	Luskata lisička	4.9.2021	KP Trš
<i>Pluteus cervinus</i>	Jelenova ščitovka	4.9.2021	KP Trš
<i>Ganoderma appланatum</i>	Sploščena pološčenka	22.08.2021	Zminec
<i>Gloeophyllum odoratum</i>	Dišeča tramovka	2.09.2021	KP Trš
<i>Fistulina hepatica</i>	Jetrasta cevača	4.09.2021	KP Trš
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Navadna ledenka	4.09.2021	KP Trš
<i>Amanita rubescens</i>	Rdečkasta mušnica	22.8.2021	Zminec
<i>Auriporia aurulenta</i>	Vonjava zlatoluknjičarka	3.9.2021	KP Trš
<i>Ganoderma resinaceum</i>	Smolena pološčenka	2.9.2021	KP Trš
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar	4.9.2021	KP Trš
<i>Trichaptum biforme</i>	Papirasta apnenka	2.9.2021	KP Trš
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar	2.9.2021	KP Trš
<i>Cantharellus amethysteus</i>	Luskata lisička	22.8.2021	Zminec
<i>Amylostereum areolatum</i>	Smrekov slojevec	4.9.2021	KP Trš
<i>Daedaleopsis confragosa</i>	Rdečeča zvitocevka	3.9.2021	KP Trš
<i>Xylaria longipes</i>	Dolgobetna lesenjača	2.9.2021	KP Trš
<i>Amanita excelsa</i>	Podaljšana mušnica	2.9.2021	KP Trš
<i>Gomphidius roseus</i>	Rožnati slinar	3.9.2021	KP Trš
<i>Lactarius quietus</i>	Hrastova mlečnica	2.9.2021	KP Trš
<i>Panaeolus semiovatus</i>	Obročkani govnar	2.9.2021	KP Trš
<i>Asterophora lycoperdoides</i>	Navadna zajedalka	5.9.2021	KP Trš
<i>Heterobasidion parviporum</i>	Smrekov trhnobnež	4.9.2021	KP Trš

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 1: Latinsko in slovensko ime gobe, datum nabiranja in lokacija nabiranja. \*\*,  
kupljeno v trgovini. Opomba: Cerkniško jezero – Otok; Johe – Krajinski park Drava; KP Tršč – Krajinski Park Tivoli, Rožnik in Šišenski hrib

<i>Pluteus roseipes</i>	Rožnobetna ščitovka	4.9.2021	KP Tršč
<i>Bjerkandera adusta</i>	Osmojena bjerkandera	2.9.2021	KP Tršč
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka	22.8.2021	Zminec
<i>Lenzites betulina</i>	Brezova lenzovka	2.9.2021	KP Tršč
<i>Cyathus olla</i>	Gladki košek	3.9.2021	KP Tršč
<i>Lacrymaria lacrymabunda</i>	Kosmati črnivec	3.9.2021	KP Tršč
<i>Gloeophyllum sepiarium</i>	Sivorjava tramovka	3.9.2021	KP Tršč
<i>Pluteus cervinus</i>	Jelenova ščitovka	2.9.2021	KP Tršč
<i>Lactarius volemus</i>	Sočna mlečnica	22.8.2021	Zminec
<i>Lycoperdon perlatum</i>	Betičasta prašnica	2.9.2021	KP Tršč
<i>Calocera viscosa</i>	Lepljivi rožiček	22.8.2021	Zminec
<i>Elaphomyces granulatus</i>	Zrnata košutnica	2.9.2021	KP Tršč
<i>Asterophora lycoperdoides</i>	Navadna zajedalka	22.8.2021	Zminec
<i>Asterophora parasitica</i>	Zastrta zajedalka	5.9.2021	KP Tršč
<i>Hygrocybe cantharellus</i>	Lijasta vlažnica	3.9.2021	KP Tršč
<i>Lycoperdon molle</i>	Rjava prašnica	4.9.2021	KP Tršč
<i>Mycena pura</i>	Redkvičasta čeladica	22.8.2021	Zminec



**Slika 8:** Karta Slovenije z označenimi lokacijami nabranih vrst bazidiomicet (privzeto in prilagojeno po <https://www.drustvo-dugs.si/zemljevidi/>, 2022).

### 3.1.2 Kemikalije

**Preglednica 2:** Seznam uporabljenih kemikalij in njihovih proizvajalcev.

DMSO (dimetil sulfoksid)

Merck, ZDA

Fosfatni pufer (PBS)

Merck, ZDA

Gojitveni medij Insect XPRESS protein-free  
z L-glutamin

Lonza, ZDA

Goveji serumski albumin (ang. *bovine serum albumine*, BSA)

Thermo Fisher Scientific, ZDA

HCl

Merck, ZDA

Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit

Thermo Fisher Scientific, ZDA

MES pufer

Sigma, ZDA

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 2: Seznam uporabljenih kemikalij in njihovih proizvajalcev.

---

MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)	Thermo Fisher Scientific, ZDA
-----	--	-------------------------------

---

NaOH	Merck, ZDA
------	------------

---

Tris	Duchefa Biochemie, Nizozemska
------	-------------------------------

---

### 3.1.3 Raztopine za ekstrakcijo proteinov

**Preglednica 3:** Seznam uporabljenih raztopin za ekstrakcijo proteinov.

Ime kemikalije	Koncentracija/opomba
Tris	/
milliQ voda	/
HCl	Za uravnavanje pH
NaOH	Za uravnavanje pH
Pripravljena raztopina je imela pH 8	

---

Pripravili smo 50 mM Tris pufer, pH 8. Najprej smo zatehtali določeno maso Tris-a, ki smo jo nato raztopili v 200 mL vode miliQ. Raztopino smo raztopili ter z ustreznim dodatkom kisline (HCl) ali baze (NaOH) na pH metru pripravili raztopino s pH vrednostjo 8.

### 3.1.4 Raztopine za preverjanje koncentracije celokupnih proteinov

**Preglednica 4:** Seznam uporabljenih raztopin za preverjanje koncentracije proteinov.

Ime kemikalije	Koncentracija/opomba
MES pufer	pH = 6
Goveji serumski albumin (ang. <i>bovine serum albumine</i> , BSA)	2 mg/mL
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	/

### 3.1.5 Raztopine za test citotoksičnosti MTT

**Preglednica 5:** Seznam uporabljenih raztopin za MTT test

Ime kemikalije	Koncentracija/sestava
Gojitveni medij Insect XPRESS protein-free z L-glutamin	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O 20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 140 mM NaCl pH 7,4
Fosfatni pufer (PBS)	
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid9)	0,5 mg/mL
DMSO (dimetil sulfoksid)	1,101 g/mL

### 3.1.6 Uporabljene celice

**Preglednica 6:** Seznam uporabljenih celic

Sf9, Thermo Fisher Scientific, ZDA

klonski izolat celic Sf21 molja  
*Spodoptera frugiperda*

### 3.1.7 Laboratorijska oprema in aparature

**Preglednica 7:** Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Aspirator	Grant-bio, Velika Britanija
Centrifuga 5810 R	Eppendorf, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih plošč	Agilent, ZDA
Čitalec mikrotitrskih plošč	Tecan, Švica
Pipeta HandyStep	Brand, Nemčija
Hladilnik – 4 °C	Gorenje, Slovenija
Hladilnik – 20 °C	Gorenje, Slovenija
IKA Vorteks 2	Merck, ZDA
Inkubator	New Brunswick Scientific, ZDA
Ledomat	Brema, Italija
Magnetno mešalo	Thermo Fisher Scientific, ZDA
Mikrotitrkska plošča	Brand, Nemčija
Homogenizator	Waring Commercial, ZDA
Namizna centrifuga 5418 R	Eppendorf, Nemčija
pH-meter	Mettler Toledo, Nemčija

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 7: Seznam uporabljeni laboratorijske opreme

Pipete	Eppendorf, Nemčija
Stresalnik ThermoMixer C	Eppendorf, Nemčija
Tehtnica MS4002TS	Mettler Toledo, Nemčija
Temperaturna komora	Hybaid, Velika Britanija
Termostatski stresalnik Thermo Shaker	Grant-bio, Velika Britanija
Ultrazvočni čistilnik	Iskra, Slovenija

---

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Predpriprava gob

Vse gobe, ki smo jih nabrali v naravi smo najprej skrbno popisali, Luka Šparl pa jim je določil slovensko in latinsko ime. Nato smo jim dodali identifikacijsko številko. V nadaljevanju smo vse gobe prenesli na Oddelek za biologijo, Biotehniške fakultete, kjer smo jih zrezali na manjše koščke in jih ali takoj liofilizirali ali do nadaljnega shranili pri – 80 °C in nato liofilizirali.

### 3.2.2 Priprava vodnih ekstraktov gob

Ekstrakte gob smo pripravili z uporabo multipraktika, kamor smo dodali 0,2 – 0,3 g narezanih in liofiliziranih gob. Nato smo 0,1 g liofilizirane in homogenizirane gobje biomase shranili v predhodno označene 2 mL mikrocentrifugirke. Homogeniziranim liofiliziranim gobam smo nato dodali 1 ali 1,5 mL pufra Tris, pH 8. Količina dodanega pufra je bila odvisna od higroskopnosti vzorca. Opazili smo, da predvsem »lesne gobe« absorbirajo veliko več pufra kot travniške gobe z betom in klobukom. Vse vzorce smo nato sonicirali v ledeni kopeli in sicer 4-krat po 10 sek z 10 sek pavzami z uporabo ultrazvočne aparature. V nadaljevanju je sledilo stresanje na stresalniku in sicer za 30 min pri 8 °C pri 1500 obr./min in ponovna sonikacija pod istimi pogoji kot prej. Po drugi sonikaciji smo vse vzorce centrifugirali in sicer za 20 min pri 4 °C na 14.000 obr./min. Po centrifugiranju smo supernatant odpipetirali v mikrocentrifugirke, ki smo jih označili z identifikacijsko številko ter jih shranili v zamrzovalniku pri – 20 °C.

Po tem postopku smo pripravili vse vodne ekstrakte gob, ki so bile nabранe po 1. 9. 2021. Predhodni ekstrakti so bili pripravljeni na podoben način in sicer so/bodo protokoli povzeti v magistrski nalogi Lane Žura (v pripravi) in dveh poročilih o individualnem raziskovalnem projektu dodiplomskih študentov Biotehnologije Drejca Flajnika in Matije Hrovatina.

### 3.2.3 Določanje koncentracije proteinov z uporabo komercialnega kompleta Pierce<sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit

Za določanje koncentracije proteinov smo najprej pripravili 2-kratne redčitve BSA v 50 mM pufru MES, pH 6. Ustrezne redčitve smo pripravili tako, da smo zamešali pufer MES ter raztopino BSA v takih razmerjih, da smo nato dobili končne koncentracije BSA: 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 in 1,6 mg/mL. Pripravili smo tudi delovno raztopino reagenta BCA in sicer tako, da smo zmešali reagent A (puferski sistem) in reagent B (raztopina bakrovega sulfata) v razmerju 50:1.

Na vsako mikrotitrsko ploščo smo nanesli nato  $10 \mu\text{L}$  vsakega vzorca gobe v dveh ponovitvah in  $10 \mu\text{L}$  standarda v dveh ponovitvah. Nato smo vsakemu vzorcu in standardu dodali  $190 \mu\text{L}$  pripravljene delovne raztopine reagenta BCA. Zatem smo mikrotitrsko ploščo 30 min inkubirali v temperaturni komori pri  $37^\circ\text{C}$ . Po končani inkubaciji smo spektrofotometrično preverili absorbancijo vzorcev pri  $562 \text{ nm}$ . Komercialni komplet BCA namreč temelji na sposobnosti proteinov, da reducirajo  $\text{Cu}^{2+}$  v  $\text{Cu}^{1+}$  (biuretska reakcija), posledica česar je vijolična barva raztopine zaradi prisotnosti bikinhoninske kisline (He, 2011). Za konec je sledila obdelava podatkov pridobljenih iz standardnih raztopin BCA s programskim paketom Office, Excel, s čimer smo dobili umeritveno krivuljo, iz katere smo nato izračunali koncentracije proteinov v vzorcu vsake gobe.

### 3.2.4 Priprava kuhanih ekstraktov gob

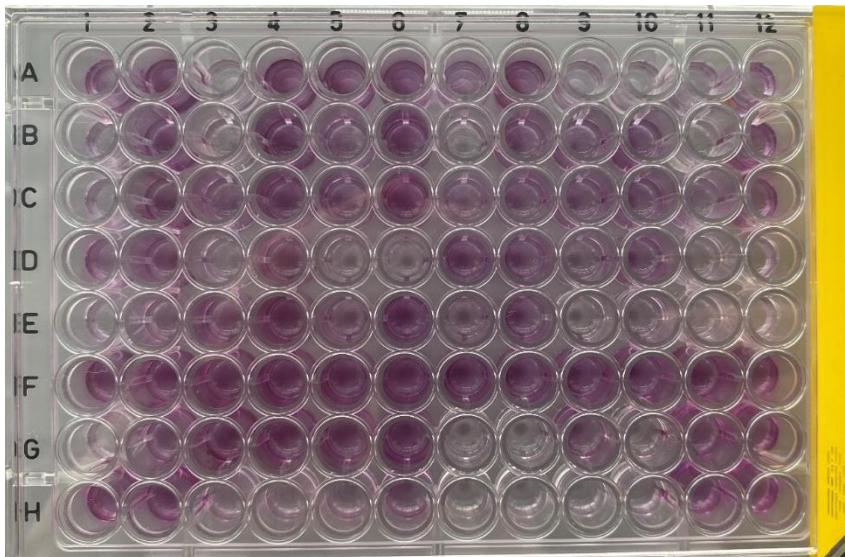
Kuhane vzorce vodnih ekstraktov gob smo pripravili tako, da smo najprej odpipetirali  $100 \mu\text{L}$  vsakega vzorca v mikrocentrifugirko, nato pa smo jih kuhalili pri  $95^\circ\text{C}$  10 min v tesno zaprtih mikrocentrifugirkah. Potem smo jih shranili v zmrzovalnik pri  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.2.5 Test citotoksičnosti MTT

S pripravljenimi surovimi ali kuhanimi vodnimi ekstrakti iz gob smo delo nadaljevali na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani. Končno število kuhanih in surovih ekstraktov gob je bilo 138, skupno torej 276 vzorcev. Poskus smo izvedli v dveh delih in sicer smo v ločenih poskusih preverjali toksičnost kuhanih in surovih gobjih ekstraktov. Ker je bila naloga del širše raziskave (objava v pripravi), ki poteka že dlje časa in ker smo nove vzorce potrebovali tudi za druge analize, smo vsak vzorec (kuhan in surov) odpipetirali 2-krat po  $100 \mu\text{L}$ . Eno serijo tako pripravljenih vzorcev smo nato skuhalili (denaturirali) kot je opisano zgoraj ter nato vse vzorce zamrznili pri  $-20^\circ\text{C}$ .

Žuželčje celice Sf9 smo gojili v sterilnih mikrotitrskih ploščah z 96 jamicami pri 100 % relativni zračni vlažnosti. V vsako jamico smo nasadili po  $100 \mu\text{L}$  celic, ki so bile pri gostoti  $2,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  in jim dodali  $100 \mu\text{L}$  svežega rastnega medija INSECT-XPRESS™. Celice smo nato gojili 48 h v celičnem inkubatorju pri temperaturi  $27^\circ\text{C}$ . Po koncu inkubacije smo jim odstranili rastni medij z uporabo aspiratorja in jim dodali prej pripravljene vodne ekstrakte gob. Te smo pripravili tako, da smo zamešali  $11 \mu\text{L}$  posameznega gobjega (kuhanega ali surovega) ekstrakta in  $99 \mu\text{L}$  gojitvenega medija ter tako pridobili  $110 \mu\text{L}$  posameznega vodnega ekstrakta. Iz tako pripravljenih ekstraktov smo nato odpipetirali  $100 \mu\text{L}$  na ploščo s celicami in pustili učinkovati 60 min. Kot pozitivno kontrolo smo na vsaki mikrotitrski plošči uporabili surova vodna ekstrakta bukovega (*Pleurotus ostreatus*) in poletnega ostrigarja (*P. pulmonarius*), kot negativno kontrolo pa pufer Tris, pH 8. Po 60 min inkubacije smo vodne ekstrakte gob aspirirali in dodali  $100 \mu\text{L}$  raztopine MTT, ki je bila pripravljena v pufru PBS. Snov MTT je v vodi topno rumeno barvilo, ki ga žive celice reducirajo s

pomočjo mitohondrijskih dehidrogenaz (Slater in sod., 1963). Produkt te reakcije je v vodi netopen vijolično obarvan formazan, ki pa postane topen v nadaljevanju ob dodatku DMSO (**Slika 9**). Količina formazana je direktno proporcionalna številu živih celic, zato se test MTT uporablja za določanje preživelosti celic (Morgan, 1998; Mosmann, 1983).



**Slika 9:** Prikaz spremembe barve na mikrotitrski plošči po dodatku MTT reagenta zaradi nastanka vijolično obarvanega formazana.

Po 3 h inkubacije smo z uporabo aspiratorja odstranili MTT in celicam dodali 100 µL DMSO, ki raztopi netopni formazan. Po 30 min inkubacije smo preverili absorbanco pri valovni dolžini 570/630 nm na čitalcu mikrotitrskih plošč. Za vse ekstrakte, ki so pokazali citotoksično delovanje smo poskus še dvakrat ponovili, pri čemer smo preverjali toksičnost izključno tistih vzorcev, ki so pokazali aktivnost. Hkrati smo testirali tudi citotoksični potencial 10-krat redčenih vzorcev. Poskus, opisan v točki 3.2.5 smo na enak način izvedli za kuhanje in surove ekstrakte gliv.

## 4 REZULTATI

V raziskavi smo testirali 114 različnih slovenskih gob. Ker so bile nekatere med njimi nabrane večkrat, je bilo celokupno število ekstraktov 138 (podvojene gobe smo upoštevali kot interne kontrole). V raziskavi testiranja insekticidnega potenciala proti žuželčji celični liniji Sf9 smo tako testirali 138 surovih in 138 kuhanih vodnih ekstraktov slovenskih gob (**Poglavlje 4.1**). Na tak način smo že zeleli preveriti, kateri izmed testiranih ekstraktov so citolitični zaradi delovanja proteinov, saj le-te s kuhanjem večinoma denaturiramo. Ker smo med testiranimi ekstrakti iskali take, ki so specifično toksični za žuželke, smo v nadaljevanju rezultate toksičnosti na celični liniji Sf9 primerjali z rezultati predhodno narejenega hemolitičnega testa na govejih eritrocitih (**Poglavlje 4.2**). Ker nas je v raziskavi predvsem zanimalo, ali je citolitičnost ekstraktov posledica vezave proteinskih komponent na lipidni receptor, smo pridobljene rezultate primerjali z že predhodno pridobljenimi rezultati vezave celokupnih proteinov iz ekstraktov na umetne lipidne vezikle, ki so bili pripravljeni iz žuželče celične linije Sf9 (**Poglavlje 4.3**).

### 4.1 CITOTOKSIČNA AKTIVNOST GOBJIH EKSTRAKTOV PROTI ŽUŽELČJI CELIČNI LINIJI Sf9

#### 4.1.1 Kuhani vodni ekstrakti gob

Od 114 testiranih gob je citotoksično aktivnost pri njihovih neredčenih kuhanih ekstraktih pokazalo 5 različnih gob, kar predstavlja 4 % vseh testiranih gob (**Slika 10**). Za te smo nato pripravili tudi 10-kratne redčitve. Pridobljene rezultate smo predstavili v **Preglednici 8**.

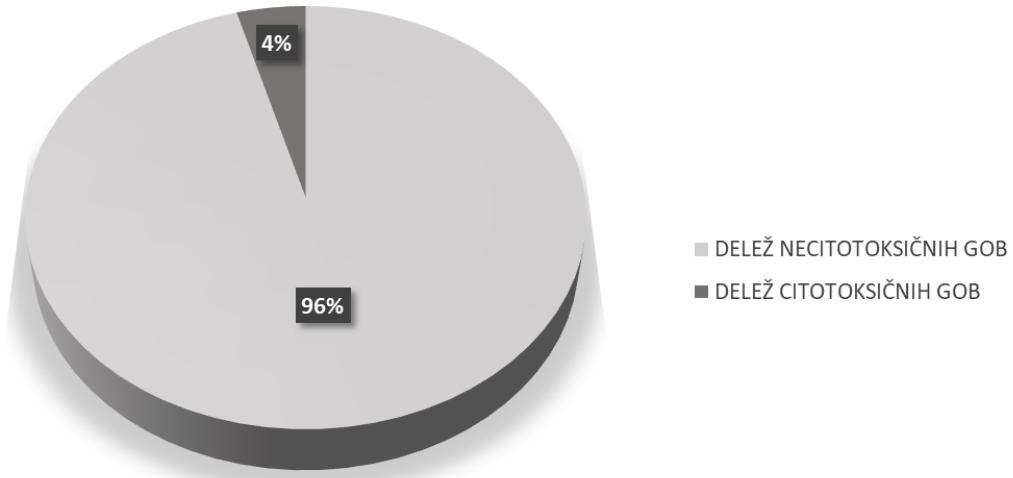
Največjo citotoksično aktivnost med kuhanimi vodnimi ekstrakti je glede na preživelost celic Sf9 pokazal ekstrakt gobe *Calocera viscosa*, ki je zmanjšal preživelost celic na 17,8 %. Podobno citotoksično aktivnost je pokazal tudi kuhan vodni ekstrakt *Fomitopsis betulina*. Omenjena goba je bila v sklopu raziskave nabранa 2-krat in oba vzorca sta kljub 2-kratni razliki v koncentraciji proteinov pokazala podoben citotoksični učinek. V enem primeru je preživelost celic padla na 18,4 % (koncentracija celokupnih proteinov je bila 0,3 µg/µL), v drugem pa na 19,6 % (koncentracija celokupnih proteinov je bila 0,1 µg/µL). Podobno citotoksično aktivnost je pokazal tudi kuhan vodni ekstrakt *Hypholoma fasciculare*, ki pa je imel mnogo višjo koncentracijo celokupnih proteinov. Kuhan ekstrakt gobe *Schizophyllum commune*, ki je zmanjšal preživelost celic na 72 % in gobe *Lactarius sphagneti*, ki je zmanjšala preživelost celic na 86,3 % sta se izkazala za manj toksična kot prej omenjeni ekstrakti gob. V obeh primerih je ob uporabi 10-kratnega redčenega ekstrakta preživelo več kot 90 % celic Sf9.

**Preglednica 8:** Prikaz preživelosti celic Sf9 po tretiraju s kuhanimi ekstrakti gob.

V preglednici so gobe razporejene glede na preživelost celic Sf9. N, neredčen kuhan ekstrakt gobe; 10×, 10-krat redčen kuhan ekstrakt gobe; \*\*, premalo vzorca. Preživelost celic je v primeru neredčenih vzorcev podana kot povprečje meritev treh neodvisnih poskusov.

Latinsko ime gobe	Slovensko ime gobe	Redčitev	% preživelosti	Koncentracija proteinov [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	Hemoliza
<i>Calocera viscosa</i>	Lepljivi rožiček	N	<b>17,8 ± 1,83</b>	3,2	NE
		10×	23,8		
<i>Fomitopsis betulina</i>	Brezova kresilača	N	<b>18,4 ± 1,74</b>	0,3	NE
		10×	95		
<i>Hypholoma fasciculare</i>	Navadna žveplenjača	N	<b>18,6 ± 1,00</b>	1,6	NE
		10×	65,7		
<i>Fomitopsis betulina</i>	Brezova kresilača	N	<b>19,6 ± 1,21</b>	0,1	NE
		**			
<i>Schizophyllum commune</i>	Navadna cepilistka	N	<b>72 ± 13,51</b>	0,7	NE
		10×	98,1		
<i>Lactarius sphagneti</i>	Šotna mlečnica	N	<b>86,3 ± 1,65</b>	2,7	NE
		10×	92,4		

**Delež gob, katerih kuhami vodni ekstrakti so toksični za celično linijo Sf9**



**Slika 10:** Prikaz deleža kuhanih gob, ki delujejo citotoksično proti žuželčji celični liniji Sf9.

#### 4.1.2 Surovi vodni ekstrakti gob

Od 138 testiranih neredčenih surovih ekstraktov gob je citotoksično aktivnost proti žuželčji celični liniji pokazalo 28 vzorcev, ki so pripadali 23 različnim gobam (20 % vseh testiranih gob) (**Slika 11**). Od teh 23 različnih gob so bili 3 ekstrakti taki, ki so pokazali aktivnost tudi ob predhodnem kuhanju, kar pomeni da bi citotoksičnost zaradi prisotnosti proteinov lahko pripisali 20 različnim gobam. Rezultate smo razdelili na dva dela, v **Preglednici 9** so predstavljene gobe, ki so znižale preživelost celic Sf9 na manj kot 50 %, v **Preglednici 10** pa gobe, ki so znižale preživelost celic Sf9 za manj kot 50 %.

V prvi skupini je največjo citotoksično aktivnost glede na preživelost celic Sf9 pokazala goba *Calocera viscosa*, katere neredčeni vodni ekstrakt je zmanjšal preživelost celic na 13,9 %. Omenjena goba se je sicer izkazala kot najbolj toksična tudi med kuhanimi ekstrakti gob. Manj kot 25 % preživelost so povzročili tudi neredčeni vodni ekstrakti gob *Hypholoma fasciculare*, *Panaeolus semiovatus*, *Fomitopsis betulina*, *Megacollybia platyphylla* (nabранa 2-krat), *Polyporus ciliatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Lenzites betulina*, *Pleurotus pulmonarius* (nabранa 2-krat) in *Neofavolus alveolaris*. Neredčeni ekstrakti gliv *Pleurotus pulmonarius*, *Megacollybia platyphylla* (druga ponovitev), *Amanita eliae*, *Fistulina hepatica*, *Berkandera adusta*, *Amanita excelsa*, *Pluteus cervinus* in *Trametes hirsuta* pa so zmanjšali preživelost celic za 75 % do 50 %.

**Preglednica 9:** Prikaz 0 – 50 % preživelosti celic Sf9 po tretiranju s surovimi ekstrakti gob.

V preglednici so gobe razporejene glede na preživelost celic Sf9. N, neredčen ekstrakt gobe; 10×, 10-krat redčen ekstrakt gobe. Preživelost celic je podana kot povprečje meritev treh neodvisnih poskusov; \* označuje citolitičnost kuhanega ekstrakta gobe.

Latinsko ime gobe	Slovensko ime gobe	Redčitev	% preživelosti	Koncentracija proteinov [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	Hemoliza
<i>Calocera viscosa</i> *	Lepljivi rožiček	N	<b>13,9 ± 1,46</b>	3,2	NE
		10×	32,4 ± 7,19		
<i>Hypholoma fasciculare</i> *	Navadna žveplenjača	N	<b>16,2 ± 1,57</b>	1,6	DA
		10×	53,1 ± 12,44		
<i>Panaeolus semiovatus</i>	Obročkani govnar	N	<b>18,1 ± 1,32</b>	6,0	NE
		10×	17,2 ± 1,56		
<i>Fomitopsis betulina</i> *	Brezova kresilača	N	<b>18,2 ± 2,35</b>	0,1	NE
		10×	84,4 ± 5,04		
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka	N	<b>23,2 ± 1,54</b>	7,5	NE
		10×	20,6 ± 0,78		
<i>Polyporus ciliatus</i>	Ščetinasti luknjičar	N	<b>23,4 ± 2,34</b>	0,7	DA
		10×	100,6 ± 3,41		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 9: Prikaz 0 – 50 % preživelosti celic Sf9 po tretiranju s surovimi ekstrakti gob

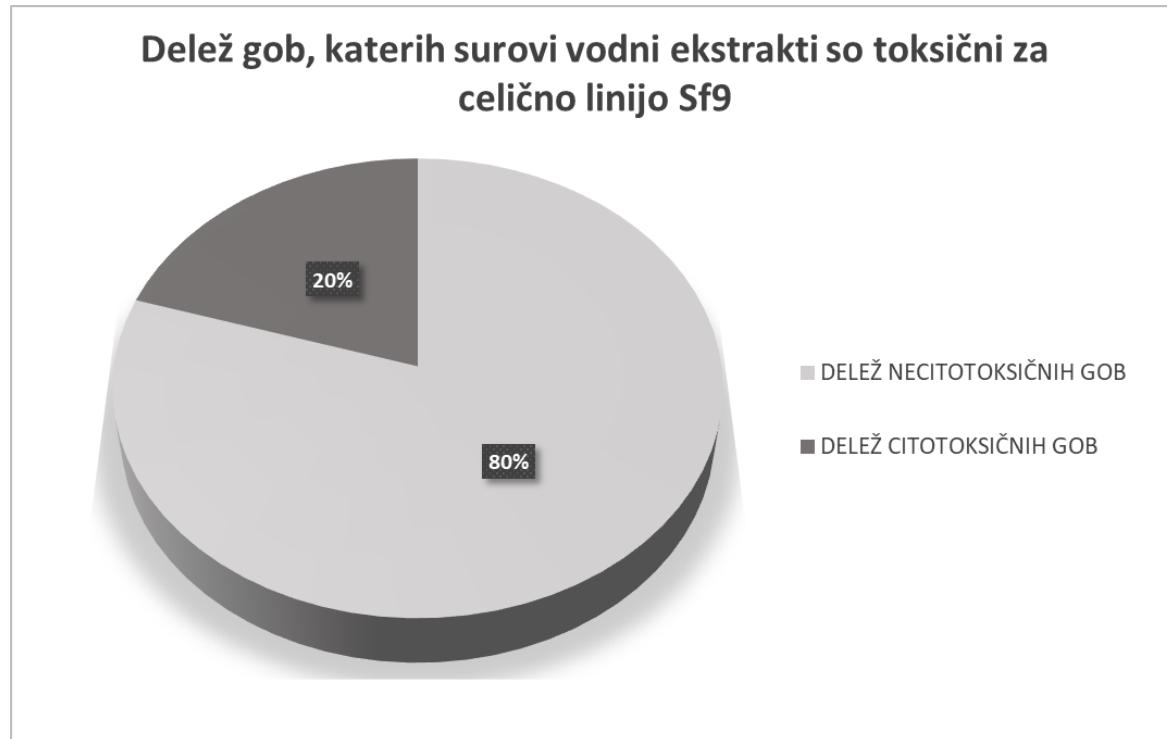
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bukov ostrigar	N	<b>23,6 ± 3,07</b>	2,8	DA
		10×	93,4 ± 18,32		
<i>Lenzites betulina</i>	Brezova lenzovka	N	<b>23,7 ± 3,22</b>	5,8	NE
		10×	50,2 ± 19,89		
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar	N	<b>24,2 ± 1,13</b>	4,4	DA
		10×	75,9 ± 10,75		
<i>Neofavolus alveolaris</i>	Satjasti luknjičar	N	<b>24,9 ± 3,11</b>	1,1	DA
		10×	88,4 ± 13,10		
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar	N	<b>25,2 ± 4,76</b>	4,1	DA
		10×	88,5 ± 6,79		
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka	N	<b>26,4 ± 2,76</b>	4,1	NE
		10×	22,9 ± 4,80		
<i>Amanita eliae</i>	Elijeva mušnica	N	<b>30,5 ± 3,57</b>	5,0	DA
		10×	45,8 ± 5,52		
<i>Fistulina hepatica</i>	Jetrasta cevača	N	<b>36,8 ± 6,61</b>	37,0	NE
		10×	53,4 ± 4,88		
<i>Bjerkandera adusta</i>	Osmojena bjerkandera	N	<b>39,5 ± 3,23</b>	8,1	NE
		10×	68,4 ± 6,84		
<i>Amanita excelsa</i>	Podaljšana mušnica	N	<b>40 ± 10,41</b>	4,5	NE
		10×	93,5 ± 1,93		
<i>Pluteus cervinus</i>	Jelenova ščitovka	N	<b>42,1 ± 10,78</b>	2,9	DA
		10×	90,1 ± 2,51		
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	N	<b>49,1 ± 5,32</b>	2,4	NE
		10×	98,3 ± 1,87		

V **Preglednici 10** so povzete gobe, katerih surovi vodni ekstrakti znižajo preživelost celic Sf9 za manj kot 50 %. V tej skupini je pokazal največjo toksičnost glede na preživelost celic Sf9 ekstrakt gobe *Cerrena unicolor*, ki je zmanjšal preživelost celic Sf9 na 50,7 %. Podobno citotoksično aktivnost je pokazal tudi ekstrakt gobe *Pseudohydnum gelatinosum* s koncentracijo proteinov 0,9 µg/µL, ki je zmanjšal preživelost celic Sf9 na 51,9 %. Podobno so delovali tudi neredčeni ekstrakti gob *Crepidotus crocophyllus*, *Lacrymaria lacrymabunda*, *Fomitopsis betulina*, *Amanita rubescens*, *Trametes hirsuta* in *Pluteus roseipes*, ki so znižali preživelost celic Sf9 med 50 in 70 %. Najmanj citotoksično je deloval neredčeni ekstrakt gobe *Auricularia auricula-judae*, ki je znižal preživelost celic na 85,5 %.

**Preglednica 10:** Prikaz 50 – 100 % preživelosti celic Sf9 po tretiranju s surovimi ekstrakti gob.

V preglednici so gobe razporejene glede na preživelost celic Sf9. N, neredčen ekstrakt gobe; 10× – 10-krat redčen ekstrakt gobe. Preživelost celic je podana kot povprečje meritev treh neodvisnih poskusov; \* označuje citolitičnost kuhanega ekstrakta gobe.

Latinsko ime gobe	Slovensko ime gobe	Redčitev	% preživelosti	Koncentracija proteinov [ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	Hemoliza
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar	N	<b>50,7 ± 4,06</b>	3,3	NE
		10×	77,2 ± 18,17		
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar	N	<b>51,6 ± 5,18</b>	1,6	NE
		10×	102,8 ± 2,90		
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Navadna ledenka	N	<b>51,9 ± 5,64</b>	0,9	NE
		10×	86,7 ± 14,24		
<i>Crepidotus crocophyllus</i>	Rjavoluskata postrančica	N	<b>52,5 ± 3,13</b>	3,6	DA
		10×	89,8 ± 1,81		
<i>Lacrymaria lacrymabunda</i>	Kosmati črnivec	N	<b>55,4 ± 6,63</b>	10,3	NE
		10×	92,5 ± 10,75		
<i>Fomitopsis betulina*</i>	Brezova kresilača	N	<b>55,8 ± 6,51</b>	0,3	NE
		10×	102,4 ± 1,45		
<i>Amanita rubescens</i>	Rdečkasta mušnica	N	<b>59,9 ± 28,80</b>	3,8	DA
		10×	88,5 ± 15,21		
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	N	<b>60,4 ± 12,91</b>	1,6	NE
		10×	91,8 ± 0,62		
<i>Pluteus roseipes</i>	Rožnobetna ščitovka	N	<b>68,4 ± 9,65</b>	7,9	DA
		10×	76,6 ± 16,07		
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Bezgova uhljevka	N	<b>85,5 ± 21,82</b>	1	NE
		10×	109 ± 4,01		



**Slika 11:** Prikaz deleža surovih gob, ki delujejo citotoksično proti žuželčji celični liniji Sf9.

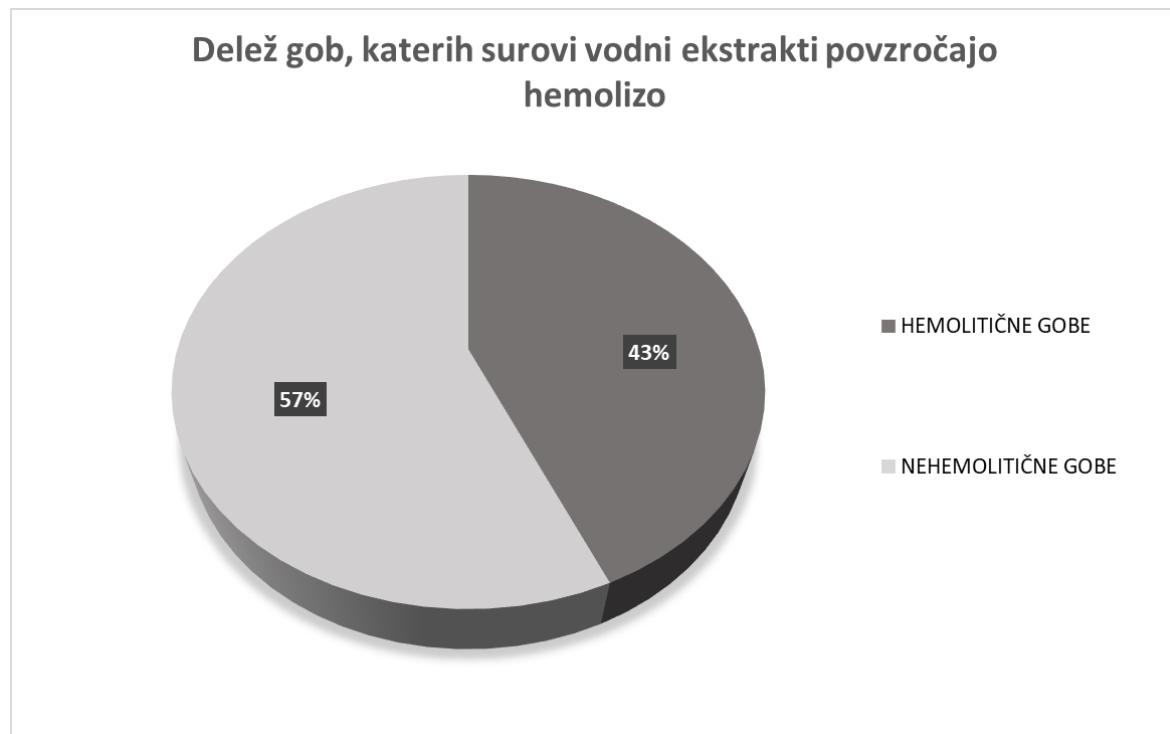
#### 4.2 PRIMERJAVA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI GOBJIH EKSTRAKTOV PROTI ŽUŽELČJI CELIČNI LINIJI Sf9 Z REZULTATI HEMOLIZE

V predhodni raziskavi je bilo za iste ekstrakte preverjeno tudi ali so hemolitični za goveje eritrocite. Za preverjanje hemolitične aktivnosti je bilo v vsako jamico dodan tak volumen ekstrakta, da je bilo celokupno število proteinov v poskus 1 µg/µL.

Kuhani ekstrakti gob *Fomitopsis betulina*, *Calocera viscosa*, *Hypholoma fasciculare*, *Schizophyllum commune* in *Lactarius sphagneti*, za katere smo pokazali toksičnost za žuželčjo celično linijo Sf9 niso povzročili hemolize govejih eritrocitov.

Med 28 surovimi ekstrakti, ki so pokazali citotoksično delovanje in ki so pripadali 23 različnim gobam, je bilo 10 (43 %) vrst gob takih, ki so bile hkrati tudi hemolitične za goveje eritrocite (**Slika 12**). Gre za gobe *Hypholoma fasciculare*, *Polyporus ciliatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Neofavolus alveolaris*, *Amanita eliae*, *Pluteus cervinus*, *Crepidotus crocophyllus*, *Amanita rubescens* in *Pluteus roseipes*. Preostalih 13 gob (57 %) je izkazalo citolitično delovanje izključno na žuželčjo celično linijo Sf9, ne pa tudi na goveje eritrocite. Gre se za gobe: *Calocera viscosa*, *Panaeolus semiovatus*, *Fomitopsis betulina*, *Megacollybia platyphylla*, *Lenzites betulina*, *Fistulina hepatica*, *Bjerkandera adusta*,

*Amanita excelsa, Trametes hirsuta, Cerrena unicolor, Pseudohydnum gelatinosum Lacrymaria lacrymabunda in Auricularia auricula-judae.*



**Slika 12:** Prikaz deleža gob, katerih surovi ekstrakti delujejo citotoksično in hkrati tudi hemolitično.

#### 4.3 PRIMERJAVA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI SUROVIH VODNIH GOBJIH EKSTRAKTOV PROTI ŽUŽELČJI CELIČNI LINIJI Sf9 Z REZULTATI VEZAVE EKSTRAKTOV NA MULTILAMELARNE VEZIKLE, PRIPRAVLJENE IZ CELIC Sf9

##### 4.3.1 Surovi vodni ekstrakti gob

Med 28 surovimi vodnimi ekstrakti gob, ki so pokazali citotoksično delovanje in ki so pripadali 23 različnim gobam je bilo 17 (74 %) takih, ki se hkrati tudi vežejo na multilamelarne vezikle (MLV), pripravljene iz celic Sf9 (**Slika 13, Preglednica 11**). Gre za gobe *Calocera viscosa*, *Hypholoma fasciculare*, *Fomitopsis betulina*, *Megacollybia platyphylla*, *Polyporus ciliatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Neofavolus alveolaris*, *Bjerkandera adusta*, *Amanita excelsa*, *Pluteus cervinus*, *Pseudohydnum gelatinosum*, *Crepidotus crocophyllus*, *Lacrymaria lacrymabunda*, *Amanita rubescens*, *Pluteus roseipes* in *Auricularia auricula-judae*. Preostalih 6 (26 %) gob, ki delujejo citotoksično, se ne veže na MLV, pripravljene iz celic Sf9.

**Preglednica 11:** Prikaz povezave med citotoksičnostjo surovih ekstraktov gob in med njihovo vezavo na MLV iz celic Sf9.

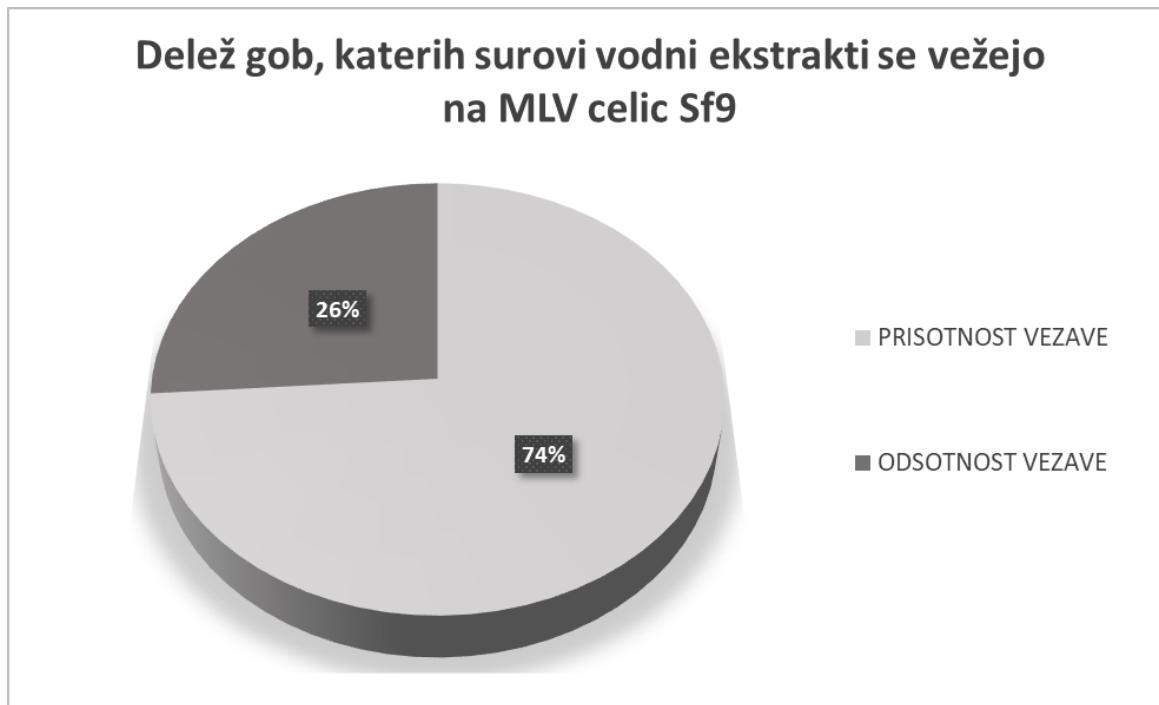
V preglednici so gobe razporejene po naraščajoči citotoksičnosti glede na preživelost Sf9. \* označuje citolitičnost kuhanega ekstrakta gobe. \*\* velikost proteinov je določena s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti Na-dodecil sulfata (test sedimentacije z MLV Sf9).

Latinsko ime gobe	Slovensko ime gobe	Vezava na MLV Sf9	Velikost proteinov [kDa]**
<i>Calocera viscosa</i> *	Lepljivi rožiček	DA	17
<i>Hypoloma fasciculare</i> *	Navadna žveplenjača	DA	40, 65
<i>Panaeolus semiovatus</i>	Obročkani govnar	NE	/
<i>Fomitopsis betulina</i> *	Brezova kresilača	DA	37, 45, 100
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka	DA	12, 15, 17, 22, 30, 39
<i>Polyporus ciliatus</i>	Ščetinasti luknjičar	DA	18
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bukov ostrigar	DA	15
<i>Lenzites betulina</i>	Brezova lenzovka	NE	/
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar	DA	10, 12, 16
<i>Neofavolus alveolaris</i>	Satjasti luknjičar	DA	50, 60, 70
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar	DA	30
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka	DA	43
<i>Amanita eliae</i>	Elijeva mušnica	NE	/
<i>Fistulina hepatica</i>	Jetrasta cevača	NE	/
<i>Bjerkandera adusta</i>	Osmojena bjerkandera	DA	65, 75
<i>Amanita excelsa</i>	Podaljšana mušnica	DA	12
<i>Pluteus cervinus</i>	Jelenova ščitovka	DA	30, 65

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 11: Prikaz povezave med citotoksičnostjo surovih ekstraktov gob in med njihovo vezavo na MLV iz celic Sf9.

<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	NE	/
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar	NE	/
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar	NE	/
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Navadna ledenka	DA	35, 38, 40
<i>Crepidotus crocophyllus</i>	Rjavoluskata postrančica	DA	11, 12, 13, 18, 25, 27, 38, 39
<i>Lacrymaria lacrymabunda</i>	Kosmati črnivec	DA	13, 50, 100
<i>Fomitopsis betulina</i> *	Brezova kresilača	DA	37, 45, 100
<i>Amanita rubescens</i>	Rdečkasta mušnica	DA	14
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	NE	/
<i>Pluteus roseipes</i>	Rožnobetna ščitovka	DA	60
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Bezgova uhljevka	DA	23



**Slika 13:** Prikaz deleža gob, katerih surovi ekstrakti delujejo citotoksično in se hkrati vežejo na MLV, pripravljene iz celic Sf9.

#### 4.4 PRIMERJAVA CITOTOKSIČNE AKTIVNOSTI SUROVIH VODNIH GOBJIH EKSTRAKTOV Z ŽIVLJENJSKIM STILOM GOBE

Med 25 različnimi gobami, ki so pokazale citotoksično aktivnost (surovi ali kuhanji ekstrakti), so 4 mikorizne (16 %) in 21 nemikoriznih (84 %). Od tega je 15 saprofitskih (60 %), 1 parazitska (4 %) in 5 saprofitskih in hkrati parazitskih (20 %) (**Slika 14**). Med saprofitske gobe uvrščamo *Calocera viscosa*, *Fomitopsis betulina*, *Hypholoma fasciculare*, *Panaeolus semiovatus*, *Megacollybia platyphylla*, *Polyporus ciliatus*, *Lenzites betulina*, *Neofavolus alveolaris*, *Pluteus cervinus*, *Cerrena unicolor*, *Pseudohydnum gelatinosum*, *Crepidotus crocophyllus*, *Lacrymaria lacrymabunda*, *Pluteus roseipes* in *Auricularia auricula-judae*. Parazitska goba je *Fistulina hepatica*, mikorizne pa so *Lactarius sphagneti*, *Amanita eliae*, *Amanita excels* in *Amanita rubescens*. Saprofitske in hkrati parazitske so *Schizophyllum commune*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius*, *Berkandera adusta*, in *Trametes hirsuta* (**Preglednica 12**).

**Preglednica 12:** Latinsko ime gobe, slovensko ime gobe in življenjski stil gobe.

Latinsko ime gobe	Slovensko ime gobe	Življenjski stil
<i>Calocera viscosa</i>	Lepljivi rožiček	Saprofit
<i>Fomitopsis betulina</i>	Brezova kresilača	Saprofit
<i>Hypholoma fasciculare</i>	Navadna žveplenjača	Saprofit
<i>Schizophyllum commune</i>	Navadna cepilstka	Saprofit, parazit
<i>Lactarius sphagneti</i>	Šotna mlečnica	Mikoriza
<i>Panaeolus semiovatus</i>	Obročkani govnar	Saprofit
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka	Saprofit
<i>Polyporus ciliatus</i>	Ščetinasti luknjičar	Saprofit
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bukov ostrigar	Saprofit, parazit
<i>Lenzites betulina</i>	Brezova lenzovka	Saprofit
<i>Neofavolus alveolaris</i>	Satjasti luknjičar	Saprofit
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar	Saprofit, parazit
<i>Amanita eliae</i>	Elijeva mušnica	Mikoriza
<i>Fistulina hepatica</i>	Jetrasta cevača	Parazit
<i>Bjerkandera adusta</i>	Osmojena bjerkandera	Saprofit, parazit
<i>Amanita excelsa</i>	Podaljšana mušnica	Mikoriza
<i>Pluteus cervinus</i>	Jelenova ščitovka	Saprofit

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice: 12: Latinsko ime gobe, slovensko ime gobe in življenjski stil gobe.

<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka	Saprofit, parazit
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar	Saprofit
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Navadna ledenka	Saprofit
<i>Crepidotus crocophyllus</i>	Rjavoluskata postrančica	Saprofit
<i>Lacrymaria lacrymabunda</i>	Kosmati črnivec	Saprofit
<i>Amanita rubescens</i>	Rdečkasta mušnica	Mikoriza
<i>Pluteus roseipes</i>	Rožnobetna ščitovka	Saprofit
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Bezgova uhljevka	Saprofit



**Slika 14:** Prikaz življenjskega stila gob, ki delujejo citotoksično proti žuželčji celični liniji Sf9.

#### 4.5 PREGLED PREDHODNO IN NOVOODKRITE INSEKTICIDNE AKTIVNOSTI TESTIRANIH VRST GOB

S pregledom literature smo želeli ugotoviti, katere testirane gobe z insekticidno aktivnostjo smo na novo odkrili, katere pa že imajo potrjeno insekticidno aktivnost. Rezultati so prikazani v **Preglednici 13**. Od 25 različnih gob, ki so pokazale citotoksično delovanje, je bilo 7 že opisanih v literaturi, 18 pa je novoodkritih. Predhodno opisane so *Schizophyllum commune*, *Megacollybia platyphylla*, *Pleurotus ostreatus*, *Lenzites betulina*, *Pleurotus pulmonarius*, *Pseudohydnum gelatinosum* in *Amanita rubescens*. Gobe z novoodkrito insekticidno aktivnostjo so *Calocera viscosa*, *Fomitopsis betulina*, *Hypholoma fasciculare*, *Lactarius sphagneti*, *Panaeolus semiovatus*, *Polyporus ciliatus*, *Neofavolus alveolaris*, *Amanita eliae*, *Fistulina hepatica*, *Bjerkandera adusta*, *Amanita excelsa*, *Pluteus cervinus*, *Trametes hirsuta*, *Cerrena unicolor*, *Crepidotus crocophyllus*, *Lacrymaria lacrymabunda*, *Pluteus roseipes* in *Auricularia auricula-judae*.

**Preglednica 13:** Latinsko ime gobe, slovensko ime gobe, insekticidna aktivnost in referenca. Zelena barva označuje glive, katerih insekticidno aktivnost smo na novo odkrili. Rumena barva označuje glive, katerih insekticidna aktivnost je bila že predhodno opisana v literaturi (pripadajoča referenca).

Latinsko ime gobe	Slovensko ime gobe	Insekticidna aktivnost	Referenca
<i>Calocera viscosa</i>	Lepljivi rožiček		
<i>Fomitopsis betulina</i>	Brezova kresilača		
<i>Hypholoma fasciculare</i>	Navadna žveplenjača		
<i>Schizophyllum commune</i>	Navadna cepilstka		(Kaur in sod., 2018; Wang in sod., 2022)
<i>Lactarius sphagneti</i>	Šotna mlečnica		
<i>Panaeolus semiovatus</i>	Obročkani govnar		
<i>Megacollybia platyphylla</i>	Širokolistna velekorenovka		(Mier in sod., 1996)
<i>Polyporus ciliatus</i>	Ščetinasti luknjičar		

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 13: Latinsko ime gobe, slovensko ime gobe, insekticidna aktivnost in referenca.

<i>Pleurotus ostreatus</i>	Bukov ostrigar		(Panewska in sod., 2019; Rahman in sod., 2011)
<i>Lenzites betulina</i>	Brezova lenzovka		(Mier in sod., 1996)
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	Poletni ostrigar		(Popošek in sod., v pripravi)
<i>Neofavolus alveolaris</i>	Satjasti luknjičar		
<i>Amanita eliae</i>	Elijeva mušnica		
<i>Fistulina hepatica</i>	Jetrasta cevača		
<i>Bjerkandera adusta</i>	Osmojena bjerkandera		
<i>Amanita excelsa</i>	Podaljšana mušnica		
<i>Pluteus cervinus</i>	Jelenova ščitovka		
<i>Trametes hirsuta</i>	Kosmata ploskocevka		
<i>Cerrena unicolor</i>	Pepelasti zvitoluknjičar		
<i>Pseudohydnum gelatinosum</i>	Navadna ledenka		(Mier in sod., 1996)

se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 13: Latinsko ime gobe, slovensko ime gobe, insekticidna aktivnost in referenca

<i>Crepidotus crocophyllus</i>	Rjavoluskata postrančica		
<i>Lacrymaria lacrymabunda</i>	Kosmati črnivec		
<i>Amanita rubescens</i>	Rdečkasta mušnica		(Mier in sod., 1996)
<i>Pluteus roseipes</i>	Rožnobetna ščitovka		
<i>Auricularia auricula-judae</i>	Bezgova uhljevka		

## 5 RAZPRAVA

Glive so izjemno raznolika skupina organizmov. Čeprav se ocenjuje, da na svetu obstaja 1,5 milijonov gliv in da so prisotne v skoraj vseh ekoloških nišah, pa je le okoli 10 % gliv poznanih znanstveni skupnosti (Gunatilaka & Wijeratne, 2012; Hibbett in sod., 2007; Stajich in sod., 2010). Glive imajo v naravi pomembno vlogo kot simbionti, paraziti in saprofiti, poleg tega pa predstavljajo precej neraziskan in neizkoriščen vir naravnih produktov, ki jih proizvajajo v različne namene (Cheung, 2010; Schmidt-Dannert, 2016). Številni med njimi imajo širok nabor aktivnosti in so uporabni v prehranski, usnjarski, tekstilni, farmacevtski industriji in kmetijstvu (Gunatilaka & Wijeratne, 2012; Nigam, 2013; Sexton & Howlett, 2006). Glive in glivni metaboliti postajajo vse bolj pomembni z vidika razvoja insekticidnih sredstev za nadzor škodljivcev, ki povzročajo velike izgube v kmetijstvu in ekonomsko škodo (Jakka in sod., 2016; Panevska in sod., 2021; Vega in sod., 2012). Najpogosteje se za zatiranje škodljivcev, ki povzročajo škodo na pridelkih, uporabljo kemijski pesticidi, ki so problematični iz več razlogov. Poleg tega, da onesnažujejo okolje in se akumulirajo v zemlji, vodi in zraku, so nevarni tudi za netarčne organizme, kot so živali, rastline in ljudje (Castañeda-Ramírez in sod., 2022; Hashimi in sod., 2020; Qian in sod., 2018; Stanley in sod., 2016). Uporaba pesticidov močno doprinese k razvoju številnih kroničnih bolezni, ki pestijo sodobno družbo (Igbedioh, 1991). Poleg tega škodljivci sčasoma razvijejo odpornost na insekticide, zato se v zadnjih letih išče nove pristope zatiranja, ki bi imeli manjši škodljivi vpliv na netarčne organizme (Jakka in sod., 2016; Panevska in sod., 2021; Purwar & Sachan, 2006).

Glive zaradi svojih metabolitov in dejstva, da imajo zelo malo škodljivega vpliva na okolje, predstavljajo zelo velik potencial za razvoj sredstev za biokontrolo škodljivcev v kmetijstvu (Thomas & Read, 2007; Vega in sod., 2012). Določene glive z insekticidno aktivnostjo so že dodobra raziskane in uporabljene komercialno, veliko pa je še nepreučenih (Kusari in sod., 2012; Sánchez-Fernández in sod., 2013). Glive proizvajajo številne metabolite, ki delujejo insekticidno, kot so ibotenska kislina, amatoksini, destruksini, oosporein in piripiropen A, katerega semisintetični derivat afidopiropen je bil leta 2021 registriran kot insekticid Inscalil (Basyouni in sod., 1968; Jaenike in sod., 1983; Koradin in sod., 2021; Omura in sod., 1993; Quiot in sod., 1985; Strasser in sod., 2000; Wieland, 1968). Zanimivi so tudi glivni proteini z insekticidnim potencialom, ki ustvarjajo pore v membranah (Shibata in sod., 2010; Wang in sod., 2002). Glive lahko vsebujejo enokomponentne citolizine, ki delujejo citolitično (Bernheimer & Oppenheim, 1987; Lin in sod., 1975; Narai in sod., 2004; Suzuki in sod., 1990; Tomita in sod., 1998; Watanabe in sod., 1999). Leta 2019 pa je bilo ugotovljeno, da glivni rod *Pleurotus* proizvaja dvokomponentne citolitične proteine z insekticidnim potencialom (Panevska in sod., 2019). Ker se ti porotvorni proteinski kompleksi močno vežejo na CPE, ki je glavni sfingolipid membran nevretenčarjev in posledično oblikujejo transmembranske pore, predstavljajo potencialno orožje za zatiranje

tistih škodljivcev, ki vsebujejo v svojih membranah sfingolipid CPE (Bhat in sod., 2015; Kishimoto in sod., 2016; Panevska in sod., 2019). Zaradi naraščajoče potrebe po snoveh, ki bi bile uporabne v farmaciji, industrijskih procesih ali pri nadzoru škodljivcev, ostaja preučevanje gliv ključnega pomena (Blackwell, 2011).

Namen magistrske naloge je bil opredeliti gobe, ki so specifično toksične za insektne celice Sf9 in katerih citolitični proteini, bi bili potencialno uporabni za razvoj inovativnih biopesticidov in s tem za zaščito rastlin v kmetijstvu. V nalogi smo testirali 138 vodnih ekstraktov gob, ki so pripadali 114 različnih gobam. Pripravljenim kuhanim in surovim ekstraktom smo opredelili citotoksično aktivnost na modelu žuželčje celične linije Sf9. V raziskavi nas je zanimal predvsem insekticidni potencial surovih ekstraktov, in sicer zato, ker obstaja velika verjetnost, da je insekticidna aktivnost takih ekstraktov posledica prisotnosti citolitičnih proteinov. Specifično nas je predvsem zanimalo, ali bi lahko citolitični potencial teh ekstraktov prispisali interakciji z membranskimi lipidnimi receptorji, kot je že bilo pokazano za proteinske porotvorne komplekse iz bukovega ostrigarja (Panevska in sod., 2019). Da bi potrdili, kateri izmed ekstraktov so citolitični zaradi delovanja proteinov, smo vse vzorce tudi skuhali in na ta način proteine denaturirali.

V magistrski nalogi smo skupno za 25 različnih gob dokazali, da delujejo insekticidno proti žuželčji celični liniji Sf9. Od tega je bilo za 7 (28 %) gob že predhodno v literaturi dokazano, da delujejo insekticidno, za 18 gob (72 %) pa smo prvi dokazali insekticidni potencial (**Preglednica 13, Slika 15**). Gobe, ki smo jim prvi določili insekticidni potencial so: *Calocera viscosa*, *Fomitopsis betulina*, *Hypholoma fasciculare*, *Lactarius sphagneti*, *Panaeolus semiovatus*, *Polyporus ciliatus*, *Neofavolus alveolaris*, *Amanita eliae*, *Fistulina hepatica*, *Bjerkandera adusta*, *Amanita excelsa*, *Pluteus cervinus*, *Trametes hirsuta*, *Cerrena unicolor*, *Crepidotus crocophyllus*, *Lacrymaria lacrymabunda*, *Pluteus roseipes* in *Auricularia auricula-judae*. Te glive so raziskovalno zanimive in predstavljajo neodkrit vir snovi, ki bi jih potencialno lahko uporabili za razvoj biopesticidov.

Med 114 testiranimi kuhanimi gobami je citotoksično aktivnost proti celični liniji Sf9 pokazalo 5 različnih gob (4 % vseh testiranih gob) (**Slika 10**). Ker ob kuhanju proteini večinoma denaturirajo, predvidevamo, da je citotoksični učinek teh gob posledica molekul, ki niso proteini. Glede na delež preživelosti celic Sf9 po tretiranju s kuhanimi ekstrakti je največjo citotoksično aktivnost pokazal kuhan vodni ekstrakt gobe *Calocera viscosa*, ki je neredčen zmanjšal preživelost celic Sf9 na 17,8 % (koncentracija proteinov je bila 3,2 µg/µL). Aktivnost 10-krat redčenega ekstrakta je bila podobna, saj je bila preživelost celic 23,8 %. Visoko aktivnost je pokazal tudi ekstrakt gobe *Fomitopsis betulina*, ki je bila v sklopu magistrske naloge nabранa 2-krat, oba vzorca pa sta pokazala podoben citotoksični učinek. V prvem primeru je preživelost celic padla na 18,4 % (koncentracija proteinov je bila 0,3 µg/µL), v drugem pa na 19,6 % (koncentracija proteinov je bila 0,1 µg/µL). Ob 10-kratnem redčenju se je preživelost celic v prvem primeru zvišala na 95 %. Pri drugem

primeru je vzorca zmanjkalo, zato 10-kratne redčitve nismo pripravili. Visoko citotoksično aktivnost je pokazal tudi kuhan vodni ekstrakt gobe *Hypholoma fasciculare*, ki je neredčen znižal preživelost celic na 18,6 % ob koncentraciji proteinov 1,6 µg/µL. Aktivnost 10-krat redčenega ekstrakta je bila precej nižja, saj se je preživelost celic zvišala na 65,7 % (**Preglednica 8**).

Med 25 različnimi ekstrakti gob, ki so izkazovali insekticidni potencial, so bile tudi trije taki, ki so bili toksični za celice Sf9 v kuhan ali v surovi obliki. Gre se za gobe *Calocera viscosa*, *Hypholoma fasciculare* in *Fomitopsis betulina*. Pri surovem neredčenem vodnem ekstraktu *Calocera viscosa* je preživelost celic Sf9 znašala 13,9 % (**Preglednica 9**), pri kuhanem pa 17,8 % (**Preglednica 8**). Podobno je surovi neredčeni ekstrakt *Hypholoma fasciculare* zmanjšal preživelost celic na 16,2 % (**Preglednica 9**), po kuhanju pa se je preživelost celic znašala 18,6 % (**Preglednica 8**). Beattie in sod. so leta 2011 v svoji raziskavi s testom MTT dokazali, da etanolni ekstrakt *Hypholoma fasciculare* deluje citotoksično proti rakavim celicam debelega črevesja. Poleg tega so bili iz te gobe izolirani številni terpenoidi s citotoksično in antibiotično aktivnostjo (Sterner, 1995). Surov neredčen ekstrakt *Fomitopsis betulina*, je zmanjšal preživelost celic na 18,2 % (**Preglednica 9**) po kuhanju ekstrakta pa je bila preživelost celic zelo podobna in sicer 18,4 % (**Preglednica 8**). *Fomitopsis betulina* se že dolgo uporablja v ljudski medicini zaradi svojih antimikrobnih lastnosti, ki pospešujejo celjenje ran (Poder, 2005). Vodni ekstrakti in triterpeni, izolirani iz plodnega telesa te gobe, imajo imunomodulatorne in protirakave učinke (Shamtsyan in sod., 2004). V študiji leta 2018 so preučili citotoksičnost te gobe proti rakavim celičnim linijam in pokazali, da imajo ekstrakti micelija *Fomitopsis betulina* visoko citotoksično aktivnost predvsem proti rakavim celicam prostate (Sułkowska-Ziaja in sod., 2018). Rezultati citotoksičnosti kuhanih ali surovih ekstraktov vseh treh omenjenih gob so podobni. Predvidevamo, da je insekticidna aktivnost teh gob posledica neproteinskih snovi.

Med 114 testiranimi surovimi ekstrakti različnih gob je citotoksično aktivnost proti žuželčji celični liniji pokazalo 23 različnih ekstraktov gob (20 % vseh testiranih gob). Kot že omenjeno zgoraj, so bile med njimi tudi 3 vrste gob, ki so citotoksičnost izkazovale ob predhodnem kuhanju vodnega ekstrakta (*Calocera viscosa*, *Hypholoma fasciculare* in *Fomitopsis betulina*). Predvidevamo, da njihova citotoksična aktivnost ni posledica proteinov temveč drugih aktivnih snovi, zato za nas posledično niso bili tako zanimivi. V nadaljevanju smo se osredotočili na preostalih 20 gob, ki so delovale citotoksično le ob uporabi njihovih surovih ekstraktov. Absolutno citotoksičnost gob med seboj težko primerjamo, ker so imeli vzorci različne koncentracije proteinov, zato je primerjava lahko le relativna. V sklopu raziskave smo namreč žeeli predvsem določiti oz poiskati tiste gobe, ki izkazujejo citotoksično aktivnost. V nadaljevanju se bodo gobe, ki so izkazovale citotoksično aktivnost nabrale še enkrat, kjer se bo nato še enkrat ovrednotili njihovo absolutno citotoksično aktivnost. Kljub vsemu lahko s precejšnjo gotovostjo trdimo, da večina izmed teh 20 ekstraktov vsebuje kot citotoksične dejavnike proteine, saj ob kuhanju

izgubijo citotoksično aktivnost. Kot pozitivno kontrolo smo v vsakem poskusu uporabili vodna ekstrakta gob *Pleurotus ostreatus* in *Pleurotus pulmonarius*. Za ti dve gobi so v raziskavi Panevska in sod., 2019 ter Popošek in sod. (v pripravi) dokazali, da vsebujejo egerolizine, ki skupaj s proteinskim partnerjem tvorijo transmembranske pore v umetnih lipidnih veziklih, ki vsebujejo CPE in inducirajo selektivno toksičnost v žuželčji celični liniji Sf9.

Med najbolj citotoksičnimi surovimi vodnimi ekstrakti je bil sicer ekstrakt gobe *Calocera viscosa*. Neredčen vodni ekstrakt je zmanjšal preživelost celic na 13,9 %. Kljub visoki citotoksičnosti pa je zelo verjetno, da je le-ta posledica molekul, ki niso proteini, saj je bila podobna citotoksičnost pokazana tudi za kuhan vodni ekstrakt te gobe. Visoko aktivnost je pokazal tudi vodni ekstrakt gobe *Panaeolus semiovatus*, ki je neredčen zmanjšal preživelost celic na 18,1 %, 10-krat redčen pa na 17,2 % (celokupna koncentracija proteinov je bila 6,0 µg/µL). Za razliko od prej omenjene gobe, ta ekstrakt ni bil toksičen ob predhodnem kuhanju, zaradi česar sklepamo, da je citotoksična aktivnost te gobe posledica delovanja proteinov. Citotoksična aktivnost obeh omenjenih gob do sedaj še ni bila opisana v literaturi. Zelo visoko citotoksično aktivnost je pokazal tudi vodni ekstrakt gobe *Megacollybia platyphylla*, ki je bila v sklopu raziskave nabранa dvakrat, oba ekstrakta pa sta pokazala zelo podoben učinek na celice Sf9. V prvem primeru je neredčen ekstrakt zmanjšal preživelost celic na 23,2 %, 10-krat redčen pa na 20,6 % (celokupna koncentracija proteinov je bila 7,5 µg/µL). V drugem primeru pa je neredčen ekstrakt zmanjšal preživelost celic na 26,4 %, 10-krat redčen pa na 22,9 % (celokupna koncentracija proteinov je bila 4,1 µg/µL) (**Preglednica 9**). Tudi v tem primeru kuhan ekstrakt ni izkazoval citotoksičnosti zato tudi v tem primeru sklepamo, da je citolitična aktivnost te gobe posledica prisotnosti proteinov. Leta 1996 je bil že dokazan insekticidni potencial *Megacollybia platyphylla*, ki deluje toksično proti žuželkam *Drosophila melanogaster* in *Spodoptera littoralis* (Mier in sod., 1996). Podobno so dokazali tudi Besl in sodelavci leta 1987 (Besl in sod., 1987). Menimo, da naštete gobe kažejo velik insekticidni potencial, ki bi ga bilo potrebno v prihodnosti še raziskati. Iz stališča morebitno prisotnih porotvornih proteinov sta še posebej zanimivi *Panaeolus semiovatus* in *Megacollybia platyphylla*, ki izkazujeta toksičnost le v primeru nekuhanih ekstraktov.

Magistrska naloga je bila sicer del širše raziskave, v kateri je bilo predhodno za iste gobje ekstrakte preverjeno tudi ali so hemolitični za goveje eritrocite. Hemoliza predstavlja razpad ali motnjo integrите celične membrane eritrocitov, kar povzroči sproščanje hemoglobina (Sowemimo-Coker, 2002). Med 20 različnimi gobami, ki so pokazale citotoksičnost proti žuželčji celični liniji Sf9 je bilo 9 različnih gobjih ekstraktov takih, ki hkrati povzročajo tudi hemolizo eritrocitov. V okviru naše raziskave so bili za nas zanimivi predvsem tisti ekstrakti, ki izkazujejo citolitično delovanje izključno na žuželčjo linijo Sf9, in hkrati ne povzročajo hemolize eritrocitov in posledično niso toksični za sesalce. Kot taki bi bili primerni za razvoj inovativnih biopesticidov. Takih je bilo 11 različnih gob. Med takimi ekstrakti gob so

pokazali najvišjo citotoksično aktivnost tisti iz gob *Panaeolus semiovatus*, *Megacollybia platyphylla*, *Lenzites betulina*, *Fistulina hepatica*, *Bjerkandera adusta*, *Amanita excelsa* in *Trametes hirsuta* (**Preglednica 9**). Teh 7 gob je posledično najbolj zanimivih in obetavnih za nadaljnje raziskovanje.

V nadaljevanju smo rezultate citotoksičnosti surovih vodnih ekstraktov primerjali z rezultati vezave istih ekstraktov na MLV-je, pripravljene iz celic Sf9. Med 20 različnimi surovimi ekstrakti gob, ki so pokazali citotoksično delovanje, je bilo 14 različnih gob, ki se vežejo tudi na MLV-je, pripravljene iz celokupnega lipidnega ekstrakta celic Sf9. Z veliko verjetnostjo lahko trdimo, da se v teh gobah nahajajo proteini, ki se vežejo na lipidni receptor in povzročijo pore v membranah ter propad celic. Med njimi so za nadaljnje raziskovanje najbolj zanimive *Megacollybia platyphylla*, *Bjerkandera adusta* in *Amanita excelsa*, ker hkrati tudi ne povzročajo hemolize in so torej toksične le za Sf9, ne pa tudi za eritrocite (**Preglednica 11**). Najbolj citotoksično med njimi deluje *Megacollybia platyphylla*, ki zaradi tega obeta največ na področju razvoja potencialnih biopesticidov.

Proučili smo tudi življenske stile gob, ki so pokazale citotoksičnost bodisi surove ali kuhané (skupno 25 gob). Zanimivo je, da je večji delež gob (84 %), ki smo jim dokazali citotoksičnost nemikoriznih (60 % saprofitskih, 4 % parazitskih in 20 % saprofitskih in hkrati parazitskih). Le 4 gobe oz. 16 % citotoksičnih gob pa je mikoriznih (**Slika 14**). Za saprofite je značilno, da izločajo različne hidrolitične in oksidativne encime, s katerimi razgrajujejo organske snovi in jih absorbirajo preko hif (Blackwell, 2011). Paraziti okužijo rastline, živali in celo druge glive in iz njih črpajo hrnilne snovi. Mikorizne gobe pa najdemo v sožitju z drugimi organizmi, s katerimi si izmenjujejo hrnilne snovi, zaradi česar oba simbiotska organizma bolje uspevata (Schmidt-Dannert, 2016). Entomopatogene gobe delujejo kot patogeni insektov in so se verjetno razvile iz gob, ki delujejo kot patogeni rastlin preko adaptacij zunajceličnih hidrolitičnih encimov, s katerimi si goba olajša hidrolizo kutikule insektov (St Leger & Bidochka, 1996). Nekateri izmed osnovnih mehanizmov patogeneze gob so zato lahko podobni pri rastlinah in pri insektih. Ker je večina insektov rastlinojedih, pa pogosto prihaja do interakcij med gobami in insekti (St Leger in sod., 1997).

Večji delež gob (60 %), ki smo jim dokazali citotoksičnost proti žuželčji celični liniji Sf9 je saprofitskih (**Slika 14**). Ker te gobe očitno vsebujejo snovi, ki delujejo citotoksično proti žuželkam, predvidevamo, da gre za mehanizem obrambe, s katerim se goba zaščiti pred objedanjem in hkrati zaščiti ekološko nišo. Ker saprofiti razgrajujejo odmrli organski material, bi šlo lahko tudi za mehanizem, s katerim si goba zagotovi kompetitivno prednost pred insekti, s katerimi morda tekmuje za enako hrano v isti ekološki niši. Glede na to, da so entomopatogene glive vrsta parazitskih gliv, je zanimivo, da je le 4 % testiranih citotoksičnih gob parazitskih, pri katerih citotoksične snovi verjetno olajšajo kolonizacijo tkiv insektov. 16 % citotoksičnih gob je mikoriznih. Pri teh gre verjetno tako kot pri saprofitih za obrambo pred objedanjem.

Zaključimo lahko, da smo v okviru magistrske nalogi pokazali, da je večina gob, ki imajo insekticidni potencial ne-mikoriznih. Najverjetnejše so se te molekule razvile kot mehanizem, s katerim gobe zaščitijo ekološko nišo in hkrati služijo kot dejavnik obrambe pred insekti, ter omogočajo, da gliva dobi dodaten vir hrani. Glice predstavljajo precej neizkoriščen vir metabolitov, med katerimi so mnogi zelo zanimivi v smislu insekticidnega delovanja in razvoja biopesticidov. Ker pa na svetu obstaja vsaj 1.5 milijonov vrst glic, se poraja vprašanje, v katerih izmed njih iskatи potencialno uporabne metabolite. V okviru magistrske naloge smo pokazali, da so vir insekticidnih molekul predvsem nemikorizne glice, kar pomeni, da se je v iskanju tovrstnih molekul bolje osredotočiti na saprofitske in parazitske glice. Potreba po uporabnih metabolitih iz glic je velika, zato je ključnega pomena, da se zmanjša nabor tistih, ki jih je vredno raziskovati v prihodnosti. Na ta način bo iskanje bolj učinkovito, glice, ki predstavljajo zakladnico uporabnih snovi pa bolje izkoriscene. V okviru magistrske naloge smo precej zmanjšali nabor možnosti in omejili iskanje insekticidnih snovi na nemikorizne glice.

Ugotovili smo tudi, da so gobe *Megacollybia platyphylla*, *Bjerkandera adusta* in *Amanita excelsa* iz staliča razvoja bioinsekticidov, ki delujejo toksično preko prepozname lipidnega receptorja v membaran celic žuželk, najbolj zanimive za nadaljnje raziskovanje. Njihovi surovi vodni ekstrakti so toksični za celice Sf9, hkrati pa niso hemolitični in se obenem vežejo na MLV iz celic Sf9. Predvidevamo lahko, da te gobe potencialno izražajo podobne proteine kot bukov ostrigar (*Pleurotus ostreatus*) in poletni ostrigar (*Pleurotus pulmonarius*). Ti citotoksični proteini delujejo tako, da se vežejo na membranske lipide in povzročijo nastanek por v membranah. Iz stališča razvoja inovativnih biopesticidov in gensko spremenjenih rastlin, ki bi izražale specifične citotoksične proteine, katerih receptor bi bil lipid, so omenjene gobe najbolj obetavne. Pri iskanju insekticidnih proteinov se je namreč bolje osredotočiti na take, ki se vežejo na lipidni receptor, saj se ta z molekularno evolucijo mnogo počasneje spreminja kot proteinski receptor in posledično obstaja manjsa možnost, da bodo žuželke na takšen bioinsekticid razvile rezistenco.

Gobe, ki smo jim dokazali citotoksično aktivnost, je potrebno v prihodnosti še dodobra raziskati, saj predstavljajo vir snovi, ki bi jih potencialno lahko uporabili za razvoj biopesticidov. S tem bi naredili korak proti zmanjšanju uporabe kemičnih sredstev, ki predstavljajo velik problem z vidika onesnaževanja narave. Narava in glice predstavljajo neizkoriščen vir snovi, uporabnih ne le v farmaciji in industriji, temveč tudi v kmetijstvu za zaščito rastlin. Zato ostaja raziskovanje in popisovanje glic ključnega pomena pri varovanju okolja in iskanju novih inovativnih rešitev za zaščito narave.

## 6 SKLEPI

- S testom MTT smo med 114 različnimi ekstrakti gob uspešno dokazali citotoksičnost testiranih ekstraktov proti žuželčji celični liniji Sf9 pri 5 različnih kuhanih ter pri 23 različnih surovih ekstraktih gob. Ekstrakti 3 različnih gob delujejo citotoksično tako kuhan kot surovi;
- Med 23 različnimi citotoksičnimi surovimi ekstrakti gob smo potrdili, da je 13 različnih ekstraktov takih, ki so nehemolitični za goveje eritrocite;
- Med 23 citotoksičnimi surovimi ekstrakti gob smo potrdili, da je 17 različnih ekstraktov takih, ki se hkrati tudi vežejo na multilamelarne vezikle, pripravljene iz celic Sf9;
- Ugotovili smo, da največji potencial za razvoj biopesticidov na osnovi prepozname specifičnega lipidnega insektnega receptorja kažejo gobe *Megacollybia platyphylla*, *Bjerkandera adusta* in *Amanita excelsa*;
- Dokazali smo, da je 84 % citotoksično aktivnih gob nemikoriznih (parazitskih ali saprofitskih);
- Prvi smo dokazali insekticidni potencial 18 gob, ki še ni bil opisan v literaturi.

## 7 POVZETEK

Glive so v naravi nepogrešljive, saj s svojimi številnimi interakcijami z ostalimi organizmi povezujejo ekosistem v celoto. Za nas so zanimive iz prehranskega vidika, saj imajo visoko vsebnost proteinov, vlaknin in vitaminov, po drugi strani pa predstavljajo pogosto spregledan in neizkoriščen vir uporabnih naravnih produktov. Primarne metabolite glive proizvajajo za rast in proizvodnjo biomase. Med najbolj raziskanimi primarnimi metaboliti gliv so predvsem encimi, ki jih glive potrebujejo za razgradnjo različnih substratov, za nas pa so različne proteaze, amilaze in celulaze uporabne v industrijah kot so prehranska, usnjarska in tekstilna. Sekundarne metabolite glive pogosto proizvajajo kot mehanizem obrambe, saj imajo številni antibakterijsko, antioksidantno, antibiotično in protiglivno delovanje. Komercialno pomembni in uporabljeni sekundarni produkti gliv so predvsem antibiotiki (penicilin, cefalosporin, griseofulvin) in statini, ki znižujejo serumske ravni holesterola. Določene glive proizvajajo sekundarne metabolite, ki delujejo insekticidno in predstavljajo potencial za uporabo v kmetijstvu za zaščito rastlin. Različni škodljivci povzročajo velike izgube pridelka in posledično ekonomsko škodo, zatiranje s kemičnimi pesticidi pa postaja izziv, saj organizmi razvijajo odpornost na takšne vrste insekticidov. Poleg tega kemijski pesticidi povzročijo neravnovesje ekosistemov in onesnažujejo okolje, zato se raziskujejo novi načini zatiranja škodljivcev, kot je uporaba bakterij, gliv ali njihovih produktov. Ti imajo manjši škodljivi vpliv na okolje in na netarčne organizme. Nekatere izmed glivnih spojin, za katere so dokazali, da delujejo insekticidno, so ibotenska kislina, amatoksini, destruksini, beauvericin, basianolid in številni drugi. Zelo zanimivi so tudi insekticidni proteini, ki jih proizvajajo glive in lahko delujejo kot hemolizini, lektini, serpini ali citolizini. Glice proizvajajo eno in dvokomponentne citolizine, ki ob prisotnosti membrane oblikujejo citolitične porotvorne komplekse in povzročijo naluknjanje membrane. Še posebej zanimivi so citolitični kompleksi na osnovi egerolizinov iz glivnega rodu *Pleurotus*, za katere je bilo leta 2019 dokazano, da imajo insekticidno delovanje. Omenjeni proteini se ob prisotnosti proteinskega partnerja vežejo na ustrezni lipidni receptor v membranah celic žuželk in tvorijo poro. Zaradi teh lastnosti predstavljajo egerolizini potencialno orožje za zatiranje škodljivcev.

Zaradi naraščajoče potrebe po snoveh, ki bi bile uporabne kot bioinsekticidi, smo v sklopu magistrske naloge testirali insekticidni potencial 114 slovenskih gob na žuželčji celični liniji Sf9. Uporabili smo surove ali predhodno skuhane vodne ekstrakte, s čimer smo žeeli preveriti, kateri izmed testiranih ekstraktov so citotoksični zaradi delovanja proteinov. Ugotovili smo, da je med 114 različnimi vrstami gob citotoksično delovanje pokazalo 5 kuhanih vodnih ekstraktov. Za omenjene ekstrakte predvidevamo, da vsebujejo insekticidne molekule, ki niso proteini. Ugotovili smo tudi, da je med 114 testiranimi surovimi ekstrakti gob citotoksično aktivnost pokazalo 23 ekstraktov, za katere lahko trdimo, da vsebujejo proteine, ki delujejo citotoksično proti celicam Sf9. Med testiranimi ekstrakti smo potrdili 3,

ki so izkazali citotoksično aktivnost tako surovi kot skuhani. Za te ekstrakte predvidevamo, da vsebujejo neproteinske molekule, ki delujejo toksično proti celicam Sf9.

V raziskavi so nas zanimali predvsem ekstrakti, ki so specifično toksični za žuželke, zato smo v nadaljevanju rezultate toksičnosti na celični liniji Sf9 primerjali z rezultati predhodno narejene hemolize na govejih eritrocitih. Ugotovili smo, da je med 23 surovimi ekstrakti, ki delujejo citotoksično, 13 ekstraktov takih, ki ne povzročajo hemolize eritrocitov in niso toksični za sesalce. Kot taki bi bili primerni za nadaljnje raziskovanje in razvoj specifičnih biopesticidov.

Ker nas je v raziskavi predvsem zanimalo, ali je citotoksičnost ekstraktov posledica vezave proteinov na lipidni receptor, smo pridobljene rezultate primerjali z rezultati vezave celokupnih proteinov iz ekstraktov na multilamelarne vezikle, pripravljene iz celic Sf9. Ugotovili smo, da je med 23 surovimi citotoksičnimi ekstrakti gob 17 takih, ki se vežejo tudi na multilamelarne vezikle, pripravljene iz celic Sf9. Zato lahko z veliko verjetnostjo trdimo, da to gobe, v katerih se nahajajo proteini, ki se vežejo na lipidni receptor, povzročijo pore v membrani in tako sprožijo lizo celic.

Ker nas je zanimalo, kaj imajo citotoksične gobe skupnega, smo primerjali njihove življenjske stile. Ugotovili smo, da je večji delež gob, ki smo jim dokazali citotoksičnost nemikoriznih (saprofitskih in parazitskih), manjši delež pa mikoriznih. Verjetno je insekticidno delovanje gob posledica obrambnega mehanizma, s katerim se zaščitijo pred objedanjem žuželk, hkrati pa te gobe najverjetneje na tak način zaščitijo svojo ekološko nišo. Dokazali smo, da se je pri iskanju insekticidnih snovi v gobah bolje osredotočiti na nemikorizne gobe. Ob pregledu literature smo ugotovili, da je bilo od 25 gob, ki smo jim surovim ali kuhanim dokazali citotoksično delovanje, za 7 gob predhodno že dokazano, da delujejo insekticidno. Za 18 gob pa smo prvi dokazali insekticidni potencial. Zaključimo lahko, da smo v sklopu magistrske naloge odkrili nove gobe z insekticidnim potencialom, ki so zanimive za nadaljnje raziskovanje in najverjetneje vsebujejo snovi, ki bi jih lahko uporabili za razvoj inovativnih biopesticidov. Med temi 25 gobami pa smo odkrili tudi take, ki hkrati hkrati niso hemolitične in se obenem vežejo na multilamelarne vezikle, pripravljene iz celic Sf9, kar pomeni, da bi lahko bil njihov mehanizem toksičnosti podoben insekticidnim citolitičnim kompleksom na osnovi egerolizinov.

## 8 VIRI

- Alexandre T.R., Lima M.L., Galuppo M.K., Mesquita J.T., Nascimento M.A. do, Santos A.L. dos, Sartorelli P., Pimenta D.C., Tempone A.G. 2017. Ergosterol isolated from the basidiomycete *Pleurotus salmoneostramineus* affects *Trypanosoma cruzi* plasma membrane and mitochondria. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23:30, doi:10.1186/s40409-017-0120-0: 10 str.
- Alurappa R., Bojegowda M.R.M., Kumar V., Mallesh N.K., Chowdappa S. 2014. Characterisation and bioactivity of oosporein produced by endophytic fungus *Cochliobolus kusanoi* isolated from *Nerium oleander* L. *Natural product research*, 28, 23: 2217–2220
- Basyouni S.H. El, Brewer D., Vining L.C. 1968. Pigments of the genus Beauveria. *Canadian journal of Botany*, 46, 4: 441–448
- Bernheimer A.W., Avigad L.S. 1979. A cytolytic protein from the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 585, 3: 451–461
- Bernheimer A.W., Oppenheim J.D. 1987. Some properties of flammutoxin from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Toxicon*, 25, 11: 1145–1152
- Besl H., Krump C., Schefcsik M. 1987. Wirkung von Pilzfruchtkörpern auf Drosophila-Maden. *Zeitschrift für Mykologie*, Band 53, 2: 273-282
- Bever C., Hnasko R., Cheng L., Stanker L. 2019. A Rapid Extraction Method Combined with a Monoclonal Antibody-Based Immunoassay for the Detection of Amatoxins. *Toxins*, 11 (12), 724, doi: 2072-6651/11/12/724: 11 str.
- Bhat H.B., Ishitsuka R., Inaba T., Murate M., Abe M., Makino A., Kohyama-Koganeya A., Nagao K., Kurahashi A., Kishimoto T. 2015. Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *The FASEB Journal*, 29, 9: 3920–3934
- Blackwell M. 2011. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, 98, 3: 426–438
- Brandrud T.E., Bendiksen E., Jordal J.B., Weholt Ø., Eidissen S.E., Lorås J.A., Dima B., Noordeloos M.E. 2018. Entoloma species of the rhodopolioid clade (subgenus Entoloma; Tricholomatinae, Basidiomycota) in Norway. *Agarica*, 38: 21-46, doi: <http://hdl.handle.net/11250/2503903>: 27 str.
- Bustillos Rodríguez J., Ríos C., Valdés-Licano R., Berlanga D., Ornelas-Paz J., Acosta C., Ruiz-Cisneros M., Salas-Marina M., Cambero-Campos J. 2016. Laboratory Assessment of *Metarrhizium* spp. and *Beauveria* spp. Isolates to Control *Brachystola magna* in Northern México. *Southwestern Entomologist*, 41: 643–656
- Butala M., Novak M., Kraševec N., Skočaj M., Veranič P., Maček P., Sepčić K. 2017. Aegerolysins: Lipid-binding proteins with versatile functions. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 72: 142–151
- Camehl I., Sherameti I., Venus Y., Bethke G., Varma A., Lee J., Oelmüller R. 2010. Ethylene signalling and ethylene-targeted transcription factors are required to balance beneficial and nonbeneficial traits in the symbiosis between the endophytic fungus *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 185, 4: 1062–1073

- Castañeda-Ramírez G., Aguilar-Marcelino L., López-Guillen G. 2022. Macroscopic and microscopic fungi with insecticidal activity. Chilean journal of agricultural research, 82, 2: 348–357
- Cheung P.C.K. 2010. The nutritional and health benefits of mushrooms. Nutrition Bulletin, 35, 4: 292–299
- Cordier F.S. 1876. Les champignons: histoire, description, culture, usages des espèces comestibles, vénéneuses, suspectes, employées dans les arts. l'industrie-l'économie domestique-la médecine. J. Rothschild P. J. (ur.). Paris: 438 str.
- Deguzman F.S., Dowd P.F., Gloer J.B., Wicklow D.T. 1994. N-methylepiamauromine, epiamauromine and cycloechinulin antiinsectan metabolites. United States Patent and Trademark Office, 07/843, 567: 10 str.
- Dowd P.F., Wicklow D.T., Gloer J.B., Tepaske M.R. 1994. Leporin A, an antiinsectan fungal metabolite. United States Patent and Trademark Office, 07/950,346: 11 str.
- E. Bielli, Samide M., Maggiora L., Vrhovec B. 2004. Gobe na Slovenskem. Ljubljana, Mladinska knjiga: 15 str.
- Eyal J., Fischbein K.L., Walter J.F. 1993. Novel toxin producing fungal pathogen and uses. European Patent, 0570089A1: 18 str.
- Fan Y., Liu X., Keyhani N.O., Tang G., Pei Y., Zhang W., Tong S. 2017. Regulatory cascade and biological activity of Beauveria bassiana oosporein that limits bacterial growth after host death. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114, 9: E1578–E1586
- Feng P., Shang Y., Cen K., Wang C. 2015. Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112, 36: 11365–11370
- Frisvad J.C., Petersen L.M., Lyhne E.K., Larsen T.O. 2014. Formation of sclerotia and production of indoloterpenes by *Aspergillus niger* and other species in section Nigri. PLoS One, 9, 4: e94857, doi: 10.1371/journal.pone.0094857: 11 str.
- Fushiya S., GU Q.-Q., Ishikawa K., Funayama S., Nozoe S. 1993. (2R),(1'R) and (2R),(1'S)-2-Amino-3-(1, 2-dicarboxyethylthio) propanoic Acids from *Amanita pantherina*. Antagonists of N-Methyl-D-aspartic Acid (NMDA) Receptors. Chemical and pharmaceutical bulletin, 41, 3: 484–486
- Gherbawy Y., Voigt K. 2010. Molecular identification of fungi. Berlin: Springer: 511 str.
- Gloer J.B. 1995. Antiinsectan natural products from fungal sclerotia. Accounts of Chemical Research, 28, 8: 343–350
- González-Castillo M., Aguilar C.N., Rodríguez-Herrera R. 2012. Control de insectos-plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. Revista científica de la Universidad Autónoma de Coahuila, 4, 8: 42–55
- González M.C., Lull C., Moya P., Ayala I., Primo J., Primo Yufera E. 2003. Insecticidal activity of penitrem, including penitrem G, a new member of the family isolated from *Penicillium crustosum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 8: 2156–2160
- Gunatilaka A.A.L., Wijeratne E.M.K. 2012. Natural Products From Bacteria and Fungi. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), UK, Eolss Publishers Co.: 27 str.
- Hashimi M.H., Hashimi R., Ryan Q. 2020. Toxic Effects of Pesticides on Humans, Plants, Animals, Pollinators and Beneficial Organisms. Asian Plant Research Journal, August: 37–47
- Hayashi H., Nishimoto Y., Akiyama K., Nozaki H. 2000. New paralytic alkaloids, asperparalines A, B and C, from *Aspergillus japonicus* JV-23. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 64, 1: 111–115

- He F. 2011. <http://www.bio-protocol.org/e44> Vol 1, Iss 5, Mar 05, 2011, 1: 1–2
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk M. P., Lucking R., Lumbsch T., Lutzoni F., Matheny B., McLaughlin D., Powell M., Redhead S., Schoch C., Spatafora J., ..., Zhang N. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111, 5: 509–547. doi: 10.1016/j.mycres.2007.03.004, 39 str.
- Hirata K., Kataoka S., Furutani S., Hayashi H., Matsuda K. 2011. A fungal metabolite asperparaline a strongly and selectively blocks insect nicotinic acetylcholine receptors: the first report on the mode of action. *PLoS One*, 6, 4: e18354, doi: 10.1371/journal.pone.0018354: 8 str.
- Holliday J., Cleaver M.P. 2008. Medicinal value of the caterpillar fungi species of the genus *Cordyceps* (Fr.) Link (Ascomycetes). A review. *International journal of medicinal mushrooms*, 10, 3, doi: 10.1615/IntJMedMushr.v10.i3.30: 17. str.
- Hyde K.D., Xu J., Rapior S., Jeewon R., Lumyong S., Niego A.G.T., Abeywickrama P.D., Aluthmuhandiram J.V.S., Brahamanage R.S., Brooks S. 2019. The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97, 1: 1–136
- Igbedioh S.O. 1991. Effects of agricultural pesticides on humans, animals, and higher plants in developing countries. *Archives of Environmental Health*, 46, 4: 218–224
- Istvan E.S., Deisenhofer J. 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science*, 292, 5519: 1160–1164
- Jaenike J., Grimaldi D.A., Sluder A.E., Greenleaf A.L. 1983.  $\alpha$ -Amanitin tolerance in mycophagous *Drosophila*. *Science*, 221, 4606: 165–167
- Jakka S.R.K., Shrestha R.B., Gassmann A.J. 2016. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins by western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *Scientific Reports*, 6, 1: 27860, doi: 10.1038/srep27860: 9 str.
- Jeschke P. 2020. Status and Outlook for Acaricide and Insecticide Discovery. *Pest management science*, 77, doi: <https://doi.org/10.1002/ps.6084>: 13 str.
- Kaur M., Chadha P., Kaur S., Kaur A., Kaur Rajvir, Yadav A.K., Kaur Ramandeep. 2018. *Schizophyllum commune* induced genotoxic and cytotoxic effects in *Spodoptera litura*. *Scientific Reports*, 8, 1: 4693, doi: 10.1038/s41598-018-22919-0: 12 str.
- Khan S., Guo L., Maimaiti Y., Mijit M., Qiu D. 2012. Entomopathogenic fungi as microbial biocontrol agent. *Molecular Plant Breeding*, 3, 7, doi: 10.5376/mpb.2012.03.0007: 17 str.
- Kim J., Choi G.J., Park J., Kim H.T., Cho K.Y. 2001. Activity against plant pathogenic fungi of phomalactone isolated from *Nigrospora sphaerica*. *Pest Management Science: Formerly Pesticide Science*, 57, 6: 554–559
- Kim J., Yeon S., Kim H., Ahn Y. 2002. Larvicidal activity against *Plutella xylostella* of cordycepin from the fruiting body of *Cordyceps militaris*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 58, 7: 713–717
- Kishimoto T., Ishitsuka R., Kobayashi T. 2016. Detectors for evaluating the cellular landscape of sphingomyelin- and cholesterol-rich membrane domains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861, 8, Part B: 812–829
- Koradin C., Schröder H., Oyama K., Ōmura S. 2021. Chemistry and biology connected: The development of Inscalis. *Recent Highlights in the Discovery and Optimization of Crop Protection Products* Elsevier: 231–239

- Kraševec N., Skočaj M. 2022. Towards Understanding the Function of Aegerolysins. *Toxins*, 14, 9: 629, doi: 10.3390/toxins14090629: 36 str.
- Krasnoff S.B., Gupta S. 1994. Identification of the antibiotic phomalactone from the entomopathogenic fungus *Hirsutella thompsonii* var. *synnematospora*. *Journal of Chemical Ecology*, 20, 2: 293–302
- Krizova L., Dadakova K., Dvořáčková M., Kasparovsky T. 2021. Feedborne Mycotoxins Beauvericin and Enniatins and Livestock Animals. *Toxins*, 13: 32, doi: 10.3390/toxins13010032: 14 str.
- Kusari S., Hertweck C., Spitteler M. 2012. Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites. *Chemistry & biology*, 19, 7: 792–798
- Laakso J.A., TePaske M.R., Dowd P.F., Gloer J.B., Wicklow D.T. 1992, July 14. Sulpinine, secopenitrem B and aflatrem B antiinsectan metabolites. Google Patents
- Lata R.K., Divjot K., Nath Y.A. 2019. Endophytic Microbiomes: Biodiversity, Ecological Significance and Biotechnological Applications. *Research Journal of Biotechnology*, 14, 10: 142–162
- Lin J.-Y., Wu H.-L., Shi G.-Y. 1975. Toxicity of the cardiotoxic protein, flammutoxin, isolated from the edible mushroom *Flammulina velutipes*. *Toxicon*, 13, 5: 323–332
- Lukyanova N., Kondos S.C., Farabella I., Law R.H.P., Reboul C.F., Caradoc-Davies T.T., Spicer B.A., Kleifeld O., Traore D.A.K., Ekkel S.M. 2015. Conformational changes during pore formation by the perforin-related protein pleurotolysin. *PLoS biology*, 13, 2: e1002049, doi: 10.1371/journal.pbio.1002049: 15 str.
- Ma L.-J., Geiser D.M., Proctor R.H., Rooney A.P., O'Donnell K., Trail F., Gardiner D.M., Manners J.M., Kazan K. 2013. Fusarium pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67: 399–416
- Macheleidt J., Mattern D.J., Fischer J., Netzker T., Weber J., Schroeck V., Valiante V., Brakhage A.A. 2016. Regulation and Role of Fungal Secondary Metabolites. *Annual Review of Genetics*, 50, 1: 371–392
- Mancheno J. e M., Tateno H., Goldstein I.J., Hermoso J.A. 2004. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a novel haemolytic lectin from the mushroom *Laetiporus sulphureus*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60, 6: 1139–1141
- Mancheño J.M., Tateno H., Goldstein I.J., Martínez-Ripoll M., Hermoso J.A. 2005. Structural analysis of the *Laetiporus sulphureus* hemolytic pore-forming lectin in complex with sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 17: 17251–17259
- Mancheño J.M., Tateno H., Sher D., Goldstein I.J. 2010. *Laetiporus sulphureus* lectin and aerolysin protein family. *Proteins Membrane Binding and Pore Formation*, 67–80
- Manzoni M., Rollini M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied microbiology and biotechnology*, 58, 5: 555–564
- McKelvey S.M., Murphy R.A. 2011. Biotechnological use of fungal enzymes. *Biology and Applications*, 179, doi: 10.1002/9781119374312.ch8: 25 str.
- McKelvey S.M., Murphy R.A. 2017. Biotechnological Use of Fungal Enzymes. *Fungi: biology and applications*: 201-225
- Mier N., Canete S., Klaebe A., Chavant L., Fournier D. 1996. Insecticidal properties of mushroom and toadstool carpophores. *Phytochemistry*, 41, 5: 1293–1299
- Monzón A. 2002. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 63: 95 - 103

- Morgan D.M.L. 1998. Tetrazolium (MTT) assay for cellular viability and activity. Polyamine protocols Springer: 179–184
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 1–2: 55–63
- Nagaoka T., Nakata K., Kouno K. 2004. Antifungal activity of oosporein from an antagonistic fungus against *Phytophthora infestans*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 59, 3–4: 302–304
- Narai A., Watanabe H., Iwanaga T., Tomita T., Shimizu M. 2004. Effect of a pore-forming protein derived from *Flammulina velutipes* on the Caco-2 intestinal epithelial cell monolayer. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 68, 11: 2230–2238
- Naude T.W., O'Brien O.M., Rundberget T., McGregor A.D.G., Roux C., Flåøyen A. 2003. Tremorgenic neuromycotoxicosis in 2 dogs ascribed to the ingestion of penitrem A and possibly roquefortine in rice contaminated with *Penicillium crustosum*. *Journal of the South African Veterinary Association*, 73: 211–215
- Nicolopoulou-Stamati P., Maipas S., Kotampasi C., Stamatis P., Hens L. 2016. Chemical pesticides and human health: the urgent need for a new concept in agriculture. *Frontiers in public health*, 4: 148, doi: 10.3389/fpubh.2016.00148: 8 str.
- Nigam P.S. 2013. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnological applications. *Biomolecules*, 3, 3: 597–611
- Nisa H., Kamili A.N., Nawchoo I.A., Shafi S., Shameem N., Bandh S.A. 2015. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. *Microbial Pathogenesis*, 82: 50–59
- Omura S., Tomoda H., Kim Y.K., Nishida H. 1993. Pyripyropenes, highly potent inhibitors of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of antibiotics*, 46, 7: 1168–1169
- Ortiz-Urquiza A., Luo Z., Keyhani N.O. 2015. Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 3: 1057–1068
- Panevska A., Hodnik V., Skočaj M., Novak M., Modic Š., Pavlic I., Podržaj S., Zarić M., Resnik N., Maček P. 2019. Pore-forming protein complexes from *Pleurotus* mushrooms kill western corn rootworm and Colorado potato beetle through targeting membrane ceramide phosphoethanolamine. *Scientific reports*, 9, 1: 1–14
- Panevska A., Skočaj M., Modic Š., Razinger J., Sepčić K. 2021. Aegerolysins from the fungal genus *Pleurotus*—Bioinsecticidal proteins with multiple potential applications. *Journal of invertebrate pathology*, 186: 107474, doi: 10.1016/j.jip.2020.107474: 10 str.
- Patocka J. 2019. Will the sulphur polypore (*laetiporus sulphureus*) become a new functional food? *Global Journal of Medical and Clinical Case Reports*, 6, 1: 6–9
- Patterson C.G., Potter D.A., Fannin F.F. 1991. Feeding detergency of alkaloids from endophyte-infected grasses to Japanese beetle grubs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 61, 3: 285–289
- Pedras M.S.C., Zaharia L.I., Ward D.E. 2002. The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59, 6: 579–596
- Petersen L.M., Frisvad J.C., Knudsen P.B., Rohlf M., Gotfredsen C.H., Larsen T.O. 2015. Induced sclerotium formation exposes new bioactive metabolites from *Aspergillus scleroticarbonarius*. *The Journal of Antibiotics*, 68, 10: 603–608
- Petersen R.H., Hughes K.W. 1999. Species and speciation in mushrooms: development of a species concept poses difficulties. *Bioscience*, 49, 6: 440–452

- Plett J.M., Martin F. 2011. Blurred boundaries: lifestyle lessons from ectomycorrhizal fungal genomes. *Trends in Genetics*, 27, 1: 14–22
- Poder R. 2005. The Ice man's fungi: facts and mysteries. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7, 3, doi: 10.1615/IntJMedMushrooms.v7.i3.190: 3 str.
- Prathumpai W., Kocharin K. 2016. Phomalactone optimization and production of entomopathogenic fungi by *Ophiocordyceps communis* BCC 1842 and BCC 2763. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46, 1: 44–48
- Pujari V., Chandra T.S. 2000. Statistical optimization of medium components for enhanced riboflavin production by a UV-mutant of *Eremothecium ashbyii*. *Process Biochemistry*, 36, 1: 31–37
- Purwar J.P., Sachan G.C. 2006. Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiological research*, 161, 1: 38–42
- Qian J., Shi C., Wang S., Song Y., Fan B., Wu X. 2018. Cloud-based system for rational use of pesticide to guarantee the source safety of traceable vegetables. *Food Control*, 87: 192–202
- Quiot J.-M., Vey A., Vago C. 1985. Effects of mycotoxins on invertebrate cells in vitro. *Advances in cell culture* Elsevier: 199–212
- Rahman M.F., Karim M.R., Alam M.J., Islam M.F., Habib M.R., Uddin M.B., Hossain M.T. 2011. Insecticidal effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) against *Tribolium castaneum* (Herbst). *NPAIJ*, 7, 4: 187–190
- Rana K.L., Kour D., Yadav A.N., Kumar V., Dhaliwal H.S. 2016. Biotechnological applications of endophytic microbes associated with barley (*Hordeum vulgare* L.) growing in Indian Himalayan regions. Proceeding of 86th annual session of NASI & symposium on “science, technology and entrepreneurship for human welfare in the Himalayan Region”: 80 str.
- Remaudière G., Latgé J.P. 1985. Importancia de los hongos patógenos de insectos (especialmente Aphididae y Cercopidae) en México y perspectivas de uso. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 11, 2: 217–225
- Riedell W.E., Kieckhefer R.E., Petroski R.J., Powell R.G. 1991. Naturally-occurring and synthetic loline alkaloid derivatives: insect feeding behavior modification and toxicity. *Journal of Entomological Science*, 26, 1: 122–129
- Ro H.-S., Kim S.S., San Ryu J., Jeon C.-O., Lee T.S., Lee H.-S. 2007. Comparative studies on the diversity of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*: ITS sequence analysis, RAPD fingerprinting, and physiological characteristics. *Mycological research*, 111, 6: 710–715
- Roukas T. 2000. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25, 6: 298–304
- Sánchez-Fernández R.E., Sánchez-Ortiz B.L., Sandoval-Espinosa Y.K.M., Ulloa-Benítez Á., Armendáriz-Guillén B., García-Méndez M.C., Macías-Rubalcava M.L. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16, 2: 132–146

- Saxena A., Yadav A.N., Rajawat M., Kaushik R., Kumar R., Kumar M., Prasanna R., Shukla L. 2016. Microbial Diversity of Extreme Regions: An Unseen Heritage and Wealth. Indian Journal of Plant Genetic Resources, 29, 3: 246, doi: 10.5958/0976-1926.2016.00036.X, 4 str.
- Schmidt-Dannert C. 2016. Biocatalytic portfolio of Basidiomycota. Current opinion in chemical biology, 31: 40–49
- Schueffler A., Anke T. 2014. Fungal natural products in research and development. Natural product reports, 31, 10: 1425–1448
- Sexton A.C., Howlett B.J. 2006. Parallels in Fungal Pathogenesis on Plant and Animal Hosts. Eukaryotic Cell, 5, 12: 1941–1949
- Shamtsyan M., Konusova V., Maksimova Y., Goloshchey A., Panchenko A., Simbircev A., Petrishchev N., Denisova N. 2004. Immunomodulating and anti-tumor action of extracts of several mushrooms. Journal of Biotechnology, 113, 1–3: 77–83
- Sharma R., Sharma P. 2021. Fungal entomopathogens: a systematic review. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31, 1: 1–13
- Shibata T., Kudou M., Hoshi Y., Kudo A., Nanashima N., Miyairi K. 2010. Isolation and characterization of a novel two-component hemolysin, erylysin A and B, from an edible mushroom, Pleurotus eryngii. Toxicon, 56, 8: 1436–1442
- Slater T.F., Sawyer B., Straeuli U. 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase systems. iii. points of coupling of four different tetrazolium salts. Biochimica et biophysica acta, 77: 383–393, doi: 10.1016/0006-3002(63)90513-4: 10 str.
- Sowemimo-Coker S.O. 2002. Red blood cell hemolysis during processing. Transfusion Medicine Reviews, 16, 1: 46–60
- St Leger R.J., Bidochka M.J. 1996. Insect-fungal interactions. New directions in invertebrate immunology, 443–479
- St Leger R.J., Joshi L., Roberts D.W. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. Microbiology, 143, 6: 1983–1992
- Stajich J.E., Wilke S.K., Ahrén D., Au C.H., Birren B.W., Borodovsky M., et al. 2010. Insights into evolution of multicellular fungi from the assembled chromosomes of the mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*). Proceedings of the National Academy of Sciences, 107, 26: 11889–11894
- Stanley Johnson, Preetha G., Stanley J. 2016. Pesticide toxicity to non-target organisms. Berlin, Springer: 531 str.
- Staub G.M., Gloer J.B., Wicklow D.T., Dowd P.F. 1992. Aspernomine: a cytotoxic antiinsectan metabolite with a novel ring system from the sclerotia of *Aspergillus nomius*. Journal of the American Chemical Society, 114, 3: 1015–1017
- Stein E., Molitor A., Kogel K.-H., Waller F. 2008. Systemic resistance in *Arabidopsis* conferred by the mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* requires jasmonic acid signaling and the cytoplasmic function of NPR1. Plant and cell physiology, 49, 11: 1747–1751
- Sterner O. 1995. Toxic terpenoids from higher fungi and their possible role in chemical defence systems. Cryptogamie. Mycologie, 16, 1: 47–57
- Strasser H., Abendstein D., Stuppner H. 2000. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein. Mycological Research, 104, 10: 1227–1233

- Sułkowska-Ziaja K., Szewczyk A., Galanty A., Gdula-Argasińska J., Muszyńska B. 2018. Chemical composition and biological activity of extracts from fruiting bodies and mycelial cultures of *Fomitopsis betulina*. *Molecular Biology Reports*, 45, 6: 2535–2544
- Suman A., Yadav A.N., Verma D.P. 2016. Endophytic Microbes in Crops: Diversity and Beneficial Impact for Sustainable Agriculture: 117–143
- Suzuki K., Une T., Yamazaki M., Takeda T. 1990. Purification and some properties of a hemolysin from the poisonous mushroom *Rhodophyllus rhodopolius*. *Toxicon*, 28, 9: 1019–1028
- Tadjibaeva G., Sabirov R., Tomita T. 2000. Flammutoxin, a cytolysin from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, forms two different types of voltage-gated channels in lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1467, 2: 431–443
- Tateno H., Goldstein I.J. 2003. Molecular cloning, expression, and characterization of novel hemolytic lectins from the mushroom *Laetiporus sulphureus*, which show homology to bacterial toxins. *Journal of biological chemistry*, 278, 42: 40455–40463
- Thomas M.B., Read A.F. 2007. Fungal bioinsecticide with a sting. *Nature Biotechnology*, 25, 12: 1367–1368
- Tomita T., Ishikawa D., Noguchi T., Katayama E., Hashimoto Y. 1998. Assembly of flammutoxin, a cytolytic protein from the edible mushroom *Flammulina velutipes*, into a pore-forming ring-shaped oligomer on the target cell. *Biochemical Journal*, 333, 1: 129–137, doi: 10.1042/bj3330129: 9 str.
- Tuli H.S., Sharma A.K., Sandhu S.S., Kashyap D. 2013. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential. *Life sciences*, 93, 23: 863–869
- Turner W.B. 1971. Fungal metabolites. London, Academic Press: 446 str.
- Tyurin M. V., Orlova T.I., Tomilova O.G., Saveleva E.I., Kryukov V.Y., Berestetskiy A. 2019. Production of *Cordyceps militaris* metabolites in infected wax moth *Galleria mellonella* L. larvae. *Euroasian Entomological Journal*, 17:373–377
- Vega F.E. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. *Mycologia*, 110, 1: 4–30
- Vega F.E., Meyling N. V., Luangsa-ard J.J., Blackwell M. 2012. Fungal entomopathogens. *Insect pathology*, 171–220
- Verma S., Varma A., Rexer K.-H., Hassel A., Kost G., Sarbhoy A., Bisen P., Bütehorn B., Franken P. 1998. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, 90, 5: 896–903
- Viniegra-González G., Favela-Torres E., Aguilar C.N., de Jesus Rómero-Gomez S., Díaz-Godínez G., Augur C. 2003. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13, 2: 157–167
- Vlasenko V., Vlasenko A. 2018. Antiviral activity of fungi of the Novosibirsk Region: *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius*. *BIO Web of Conferences EDP Sciences*: 44, doi: 10.1051/bioconf/20181100044: 4 str.
- Voynova M., Shkondrov A., Kondeva-burdina M., Krasteva I. 2020. Toxicological and pharmacological profile of *Amanita muscaria* (L.) Lam. – a new rising opportunity for biomedicine. *Farmacia*, 67,4: 317–323, doi: 10.3897/pharmacria.67.e56112: 7 str.
- Walker G.M., White N.A. 2005. Introduction to Fungal Physiology. *Fungi: Biology and Applications*, 1–34

- Wang C., Yang X., Sun J., Wang T., Cui H., Yang Y., Ding Z. 2022. New Metabolites, Antifeedant, Insecticidal Activities, and Reciprocal Relationship Between Insect and Fungus from Endophyte *Schizophyllum commune*. *Chemistry & Biodiversity*, 19, 6: e202200130, doi: doi.org/10.1002/cbdv.202200130, 8 str.
- Wang J., Weng Q., Yin F., Hu Q. 2020. Interactions of Destruxin A with Silkworms' Arginine tRNA Synthetase and Lamin-C Proteins. *Toxins*, 12: 137, doi: 10.3390/toxins12020137, 10 str.
- Wang J., Zhang D.-M., Jia J.-F., Peng Q.-L., Tian H.-Y., Wang L., Ye W.-C. 2014. Cyclodepsipeptides from the ascocarps and insect-body portions of fungus *Cordyceps cicadae*. *Fitoterapia*, 97: 23–27
- Wang M., Trigueros V., Paquereau L., Chavant L., Fournier D. 2002. Proteins as Active Compounds Involved in Insecticidal Activity of Mushroom Fruitbodies. *Journal of Economic Entomology*, 95, 3: 603–607
- Watanabe H., Narai A., Shimizu M. 1999. Purification and cDNA cloning of a protein derived from *Flammulina velutipes* that increases the permeability of the intestinal Caco-2 cell monolayer. *European journal of biochemistry*, 262, 3: 850–857
- Wieland T. 1968. Poisonous Principles of Mushrooms of the Genus *Amanita*: Four-carbon amines acting on the central nervous system and cell-destroying cyclic peptides are produced. *Science*, 159, 3818: 946–952
- Woolley V.C., Teakle G.R., Prince G., de Moor C.H., Chandler D. 2020. Cordycepin, a metabolite of *Cordyceps militaris*, reduces immune-related gene expression in insects. *Journal of invertebrate pathology*, 177: 107480, doi: 10.1016/j.jip.2020.107480: 11 str.
- Xu Y., Orozco R., Wijeratne E.M.K., Gunatilaka A.A.L., Stock S.P., Molnár I. 2008. Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chemistry & biology*, 15, 9: 898–907
- Yadav A.N., Kumar R., Kumar S., Kumar V., Sugitha T.C.K., Singh B., Chauhan V.S., Dhaliwal H.S., Saxena A.K. 2017. Beneficial microbiomes: biodiversity and potential biotechnological applications for sustainable agriculture and human health. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 5, 6: 4–7
- Yadav A.N., Sachan S.G., Verma P., Kaushik R., Saxena A.K. 2016. Cold active hydrolytic enzymes production by psychrotrophic Bacilli isolated from three sub-glacial lakes of NW Indian Himalayas. *Journal of Basic Microbiology*, 56, 3: 294–307
- Yadav A.N., Verma P., Sachan S.G., Saxena A.K. 2017. Biodiversity and biotechnological applications of psychrotrophic microbes isolated from Indian Himalayan regions. *EC Microbiol Eco*, 1: 48–54
- Yates S.G., Fenster J.C., Bartelt R.J. 1989. Assay of tall fescue seed extracts, fractions, and alkaloids using the large milkweed bug. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37, 2: 354–357
- Yokota K., Shimada H., Kamaguchi A., Sakaguchi O. 1977. Studies on the Toxin of *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology and Immunology*, 21, 1: 11–22

## ZAHVALA

Največja zahvala gre mentorju doc. dr. Mateju Skočaju za neverjetno odzivnost, potrpežljivost in vse vzpodbudne besede. Hvala za vse nasvete, ki si mi jih dal in hvala ker si me vedno poslušal, ko je šlo kaj narobe, in se veselil z mano, ko je šlo dobro. Vesela sem, da si bil moj mentor.

Hvala somentorju doc. dr. Mihu Pavšiču za pomoč pri delu v laboratoriju ter uporabne nasvete pri pisanju. Hvala recenzentki prof. dr. Kristini Sepčič za natančen pregled magistrske naloge in vse uporabne nasvete in popravke. Hvala tudi za vso vzpodbudo, odzivnost in pozitivo.

Hvala doc. dr. Sabini Berne za vso pomoč pri delu v laboratoriju ter za mnogo koristnih nasvetov in napotkov.

Hvala Lari za vso pomoč pri laboratorijskem delu in ker si odgovarjala na vsa moja vprašanja z veseljem in potrpežljivostjo. Zaradi tebe je bilo delo v laboratoriju zabavno. Hvala da sem se lahko vedno obrnila nate.

Hvala Luku Šparlu, ki je nabral vse uporabljenе gobe in jih poimenoval. Hvala tudi za vse nasvete in koristne informacije pri pisanju naloge.

Hvala dr. Anastasiji Panevski za domiselne nasvete in predloge!

Hvala moji družini – mami Daši, očiju Željku, bratu Žigu, mami Ireni, atu Jožetu, babi Darinki in dediju Živojinu, ki so navajali zame ob vsakem izpitu, kolokviju in izzivu in od katerih sem vedno čutila neomajno podporo. Hvala, da sem se lahko naslonila na vas, vam potožila ob težkih trenutkih in praznovala z vami vsak uspeh. Hvala, da ste mi omogočili študij, hvala za vsa skuhana kosila, sms-e vzpodbude, držanje pesti zame in da nikoli niste podvomili vame.

Hvala najboljšim prijateljicam Sari, Urški, Niki in Hani, od katerih sem tekom študija vedno brez izjeme dobila pomoč in oporo, kadarkoli sem zanjo prosila (pa tudi kadar nisem). Hvala vam za brezpogojno prijateljstvo, neštetokrat ste me dvignile ko sem bila slabo in nihče ni bolj navijal zame, ko mi je šlo dobro.

Velika zahvala gre mojemu fantu Luku za vse, kar je naredil zame med procesom ustvarjanja magistrske naloge. Hvala ti ne samo za vso pomoč pri oblikovanju naloge, za vse debate, predloge in nasvete, ampak tudi za dobro voljo, potrpežljivost in pozitivo. Iz srca ti hvala, da si bil brez izjeme v vsakem trenutku pripravljen pomagati in da si me vedno postavil na prvo mesto. Brez tebe resnično ne bi bilo nič.