

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/161

ZAKLJUČNO POROČILO O REZULTATIH RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

A. PODATKI O RAZISKOVALNEM PROJEKTU

1. Osnovni podatki o raziskovalnem projektu

Šifra projekta	J4-1019
Naslov projekta	Ekologija in produkcija mikotoksinov pri glivah rodu <i>Wallemia</i> , kontaminantah sladke in slane hrane
Vodja projekta	5935 Nina Gunde-Cimerman
Tip projekta	J Temeljni projekt
Obseg raziskovalnih ur	4.650
Cenovni razred	C
Trajanje projekta	02.2008 - 01.2011
Nosilna raziskovalna organizacija	481 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta
Raziskovalne organizacije - soizvajalke	381 Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta 401 Kmetijski inštitut Slovenije
Družbeno-ekonomski cilj	13. Splošni napredek znanja - RiR financiran iz drugih virov (ne iz splošnih univerzitetnih fondov - SUF)

1.1. Družbeno-ekonomski cilj¹

Šifra	07.
Naziv	Zdravje

2. Sofinancerji²

1.	Naziv	
	Naslov	
2.	Naziv	
	Naslov	
3.	Naziv	
	Naslov	

B. REZULTATI IN DOSEŽKI RAZISKOVALNEGA PROJEKTA

3. Poročilo o realizaciji programa raziskovalnega projekta³

Kserofilni glivni rod *Wallemia* je do leta 2007, ko smo opisali tri vrste, obsegal eno samo vrsto, *W. sebi*, ki je bila znana predvsem kot kontaminant hrane, konzervirane z visokimi koncentracijami soli in sladkorja. Rod *Wallemia* torej obsega tri vrste: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga*. Slednja je najbolj ekstremofilen evkariont od vseh, ki lahko prenesejo visoko slanost. Pred prijavo projekta smo odkrili, da vse tri vrste sintetizirajo toksin z izjemno močno hemolitično aktivnostjo in da njegovo sintezo stimulirajo visoke koncentracije soli. V okviru projekta smo se osredotočili na: 1. Določitev ekofiziologije vseh treh vrst rodu *Wallemia*, 2. Preučevanje prilagoditev gliv rodu *Wallemia* na znižano vodno aktivnost na ravni fiziologije in morfologije, 3. Izolacijo, karakterizacijo in določanje bioloških aktivnosti neznanega metabolita, ki ga sintetizirajo vrste rodu *Wallemia*.

Ad 1. Ekofiziologija. V okviru projekta smo odvzeli in testirali preko 300 ekoloških vzorcev, pridobljenih v solinskih bazenih, v grenčici, skladiščeni slanici, čebelnjakih, iz rastlin, notranjih prostorov, hrane, gob in iz tujih mikrobioloških zbirk. V celoti smo pridobili 100 sevov, ki smo jih na podlagi morfoloških karakteristik, rasti na gojiščih z znižano vodno aktivnostjo in analize nukleotidnih zaporedij regij notranjih distančnikov 1 in 2 vključno s 5,8S rDNA, identificirali do vrste. Novo pridobljene seve smo trajno vključili v Gensko banko EX, v okviru infrastrukturnega centra Mycosmo.

Glede na izolacijo iz naravnih habitatov in filogenetsko analizo smo pridobili nova spoznanja o taksonomiji in ekologiji znotraj rodu *Wallemia*. (i) Ugotovili smo, da vrsta *Wallemia muriae* naseljuje izjemno slana okolja, kot je voda v solinah, površina halofitskih rastlin, pelod različnih rastlin, sladka hrana in tudi notranjost bivalnih prostorov (izolirana iz zraka in s sten). Ta vrsta je halofilna in ubikvitarna, saj smo izolate pridobili iz Evrope, Afrike, Azije in srednje Amerike. (ii) Vrsto *Wallemia sebi* smo izolirali predvsem iz rastlinskih substratov (koruza, pšenica, seno), izjemno slanega okolja solin in slanih jezer in le redko iz tal. Je halotolerantna in ubikvitarna, saj posamezni izolati izhajajo iz Evrope, Afrike, Azije in severne Amerike. V nasprotju z doslej znanimi podatki smo ugotovili, da vrsta *W. sebi* ne naseljuje hrane. (iii) Obligatno halofilna in specializirana vrsta *W. ichthyophaga* naseljuje le izjemno slano okolje solin, sušene in soljene mesne izdelke, našli pa smo jo tudi na kristalih soli in v grenčici bogati z $MgCl_2$. Do sedaj smo jo izolirali le v Sloveniji in v Afriki (1 izolat), vendar je najverjetneje tudi ta vrsta ubikvitarna, vendar redkejša.

Glede na filogenetsko analizo regije ITS rDNA skupno 100-tih izolatov, tretjine izolatov nismo mogli umestiti v doslej opisane vrste; zato smo jih poimenovali *Wallemia* sp. in *Wallemia* aff. *sebi*. (iv) *Wallemia* sp. je najverjetneje nova vrsta, ki jo trenutno predstavljata dva halotolerantna izolata iz bršljana in ječmena v Sloveniji. Na osnovi molekularnogenetskih podatkov se zelo razlikujeta od vseh opisanih vrst. Še najbolj sta sorodna vrsti *W. ichthyophaga* in zato verjetno predstavljata vezni člen med le-to in ostalimi vrstami znotraj rodu *Wallemia*. (v) *Wallemia* aff. *sebi* pa najverjetneje predstavlja kompleks vrst. Vsi izolati znotraj tega kompleksa so halotolerantni, tretjina se pojavlja na slani/sladki hrani, ostali pa izhajajo iz solinske vode po svetu (Sredozemlje, ne v Sloveniji, srednja Amerika), cvetja (Kuba), posamezni izolati pa tudi iz zraka zunaj ali v notranjih prostorih. Za določitev filogenetske pozicije potencialnih novih vrst znotraj tega kompleksa bomo v prihodnje izvedli sekveniranje dodatnega filogenetskega markerja - gena *rpb2*, ki kodira drugo največjo podenoto RNA polimeraze II. Skupna morfološka značilnost rodu *Wallemia* je poseben tip konidiogeneze v obliki nespolnih konidijev v četvorkah, ki apikalno razpadajo na posamezne enote. Ker so si morfološko vrste med seboj izjemno podobne, smo iskali dodatne fenotipske lastnosti, na podlagi katerih bi jih lahko ločevali. Izvedli smo asimilacijske teste različnih virov ogljika in dušika, tako v slanih kot tudi neslanih pogojih, in vpeljali ločevanje vrst na osnovi rasti oz. potreb po različni koncentraciji NaCl, in tudi drugih soleh, kot sta $MgCl_2$ in $MgSO_2$, kar predstavlja novo spoznanje in tudi možen selekcijski dejavnik pri izolaciji vrst rodu *Wallemia*. V bodočnosti bomo testirali nova izolacijska gojišča z kombinacijo različnih soli (NaCl, $MgCl_2$, $MgSO_2$) v 1M koncentraciji, predvsem za selektivno izolacijo izjemno redke vrste *W. ichthyophaga*, saj trenutno na svetu obstaja le 6 znanih izolatov. Izolati rodu

Wallemia, izolirani iz hrane, so se proti pričakovanjem izkazali za zelo redke. Največkrat smo jih uspešno izolirali s čokolade - *W. muriae* in kompleks vrst *W. aff. sebi*, občasno pa še iz sušenih in soljenih mesnin - *W. ichthyophaga*. Prisotnost gliv rodu *Wallemia* smo potrdili tudi na soli (*W. muriae*, *W. ichthyophaga*) in sladkorju (*W. muriae*). S tem smo potrdili možnost kontaminacije hrane s soljenjem ali dodajanjem večjih količin sladkorja, soline pa določili za najbolj verjeten naraven habitat za vse vrste znotraj rodu *Wallemia*.

Ad 2. Prilagoditve na nizko vodno aktivnost:

Celična stena in morfologija. V okviru projekta smo pri glivah rodu *Wallemia* preučevali morfološke prilagoditve na nivoju celic ter ultrastrukture celične stene, pri rasti na gojišču z ekstremno nizko vodno aktivnost na račun ekstremno visokih koncentracij soli ali sladkorjev (glukoza in med). Morfologija kolonij vseh treh vrst se je razlikovala glede na tip in koncentracijo topljenca v gojišču. Na osnovi ugotovljenih razlik v morfologiji med vrsto *W. ichthyophaga* na eni strani ter *W. muriae* in *W. sebi* na drugi strani, smo potrdili, da je vrsta *W. ichthyophaga* filogenetsko oddaljena od vrst *W. muriae* in *W. sebi*. Poleg tega smo potrdili halofilno naravo vrste *W. ichthyophaga*, ki hitreje raste pri visokih koncentracijah NaCl ter pridela več biomase kot pri visokih koncentracijah sladkorjev. Vrsta *W. ichthyophaga* raste v obliki večceličnih meristematskih skupkov, ki se statistično značilno povečajo v gojišču predvsem z visoko koncentracijo NaCl ter v manjši meri tudi v gojišču z glukozo oz. medom. Vrsti *W. muriae* in *W. sebi* rasteta v obliki hif, prepletenih v goste micelijske skupke, ki se povečajo le v gojišču z visoko slanostjo. Ultrastrukturne značilnosti celične stene in celičnih skupkov smo preučili z različnimi tehnikami elektronske mikroskopije. S presevno elektronsko mikroskopijo smo ugotovili, da je celična stena pri vseh treh vrstah dvoslojna in jo sestavlja notranji debelejši in elektronsko redek sloj in zunanji elektronsko gost tanjši sloj. Debelina celične stene vrste *W. ichthyophaga* se v gojišču z visoko koncentracijo soli značilno poveča. V sladkih gojiščih je debelina celične stene za polovico tanjša kot v slanih gojiščih in njena debelina se ne spreminja. Celična stena *W. muriae* in *W. sebi* se v gojišču z visoko slanostjo neznatno odebeli, v sladkih gojiščih pa ostane nespremenjena oz. se celo zmanjša. Z vrstično elektronsko mikroskopijo in mikroskopijo s fokusiranim ionskim snopom smo zaznali, da celice, celične skupke in hife gliv rodu *Wallemia* v slanem in sladkem gojišču prekrivajo zunajcelične polimerne snovi. Te preprečujejo izsuševanje celic določenih ekstremofilnih gliv in imajo verjetno tudi zaščitno vlogo pri suboptimalnih slanostih. Rezultati teh raziskav potrjujejo predvidevanja o pomembni vlogi celične stene, ki z odebelitvijo ohranja celično integriteto in posledično zagotavlja preživetje v okoljih z visokimi koncentracijami soli. Poleg tega pa preživetje v razmerah z nizko vodno aktivnostjo omogoča, ali vsaj olajša, tudi rast v meristematskih skupkih.

Ioni in kompatibilni topljenci. S pomočjo tekočinske kromatografije visoke zmogljivosti (HPLC) ter jedrske magnetne resonance (NMR) smo ugotovili, da se glive rodu *Wallemia* na slana okolja prilagodijo s kopičenjem kompatibilnih topljencev, predvsem glicerola ter v manjši meri še arabitola in manitola. Natančnejše analize spreminjanja vsebnosti in vrste kompatibilnih topljencev še potekajo s sodelovanjem z Univerzo v Bonnu v Nemčiji. Poleg tega smo na Univerzi v Cordobi v Španiji z atomsko absorpcijsko spektroskopijo (AAS) izmerili nizke znotrajcelične koncentracije kationov, K^+ in Na^+ , tako pri različnih slanostih kot tudi po hiperosmotskem šoku. Tako kot je bilo že ugotovljeno za številne glive s halotolerantno naravo, tudi halofilni glivni predstavniki rodu *Wallemia* uporabljajo strategijo intracelularnega kopičenja glicerola ter izločanja Na^+ iz celic.

Membrana. Pri proučevanju vpliva visokih slanosti na lipidno sestavo in fluidnost plazemskih membran smo glivo *W. ichthyophaga* nagojili v definiranem gojišču YNB z različnimi koncentracijami soli, na saharoznem gradientu iz biomase izolirali plazemske membrane, in jim izmerili fluidnost s pomočjo elektronske paramagnetne resonančne spektroskopije (EPR) pri različnih temperaturah. Kot spinski označevalec smo uporabili z nitroksidno skupino označeni metilni ester palmitinske kisline. Za določitev lipidne sestave plazemskih membran smo izolirali celokupne lipide iz membran. Po metanolni hidrolizi dela lipidnih ekstraktov smo izolirali nevtralne lipide (sterole) s pomočjo n-heksana in jih pretvorili v trimetilsililetre (TMS etre). Preostalo metanolno fazo smo nakisali, izolirali maščobne kisline z n-heksanom in jih metilirali. Za identifikacijo fosfolipidov smo celokupne lipidne ekstrakte analizirali in ločili s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC), kjer smo kot referenco uporabili primerne fosfolipidne homologe.

Posamezne fosfolipidne skupine smo kvantificirali z določanjem njihove celokupne vsebnosti fosfata. TMS etre sterolov in metilirane maščobne kisline smo analizirali s pomočjo plinske kromatografije, sklopljene z masno spektrometrijo (GC-MS). Relativne koncentracije sterolov in maščobnih kislin smo izračunali s pomočjo znane količine internega standarda. Sterole in maščobne kisline smo identificirali na podlagi interpretacij masnih spektrov in podatkov o njihovih retencijskih časih.

V primerjavi z dvema glivama, ki ju v okviru drugih študij preučujemo kot modelna organizma, halotolerantno črno kvasovko *Aureobasidium pullulans* in ekstremno halotolerantno črno kvasovko *Hortaea werneckii* ima halofilna *W. ichthyophaga* dosti bolj rigidne membrane. Fluidnost plazmaleme vzdržuje na določeni ravni pri slanostih od 15 do 25% NaCl (m/v), medtem ko se pri slanosti, nižji od 10% NaCl, ki predstavlja tudi mejo uspevanja te obligatno halofilne glive, fluidnost membrane drastično poveča, kar vodi do hiperfluidizacije oz. dezintegracije lipidnega dvosloja in smrti celic. Pri določitvi lipidne sestave plazemskih membran *W. ichthyophaga* pri koncentraciji 15 in 20% NaCl smo ugotovili, da med steroli prevladuje ergosterol, med fosfolipidi pa fosfatidilholin in fosfatidiletanolamin, v katerih so večinoma zaestrene nasičene in (enkrat ali dvakrat) nenasičene maščobne kisline s 16 ali 18 C atomi. Podrobnejša analiza sterolov in maščobnih kislin ob vplivu NaCl še poteka in bo končana v letošnjem letu.

Identifikacija nekaterih ključnih genov, odzivnih na znižano vodno aktivnost. Sprva smo iskali diferencialno izražene gene pri različnih koncentracijah soli s supresijsko subtrakcijsko hibridizacijo z zrcalno orientiranim izborom (MOS-SSH), ki smo jo kasneje zaradi tehničnih težav opustili. Kljub temu smo z MOS-SSH kot enega od diferencialno izraženih genov pri različnih koncentracijah soli določili gen za encim glicerol-3-fosfat dehidrogenazo (*WiGPD1*), ki je glavni encim pri sintezi poglavitnega kompatibilnega topljenca glicerola. Izražanje gena *WiGPD1* v odvisnosti od različnih koncentracij NaCl v gojišču smo preučili z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času. Gen *WiGPD1* smo pomnožili in ga v vektorju za kloniranje prenesli v mutante *Saccharomyces cerevisiae*. S funkcionalno komplementacijo ustreznih mutant *S. cerevisiae*, ki imajo okvarjen en ali obe različici gena za GPD, smo preverili funkcijo gena *WiGPD1*. Heterologna ekspresija *WiGPD1* je mutanti *S. cerevisiae* povrnila toleranco na slane pogoje. Pripravili smo tudi cDNA knjižnico iz *W. ichthyophaga*, vzgojene pri visoki slanosti. Knjižnico, pripravljeno v vektorju Gateway, smo z rekombinacijo prenesli v nov prenosljivi plazmid, primeren za propagacijo tako v *E. coli*, kot tudi v *S. cerevisiae*. Knjižnico v novem vektorju smo vnesli v *E. coli*, jo namnožili, ponovno izolirali in prenesli v *S. cerevisiae* ter s tem pripravili ekspresijsko knjižnico. Presejanje knjižnice za morebitne transformante s povečano toleranco na nizko vodno aktivnost/povišano koncentracijo soli je trenutno v teku.

Ad 3. Izolacija in karakterizacija neznanega metabolita.

Naše preliminarno delo je pokazalo, da glive rodu *Wallemia* producirajo še neopisan aktivni metabolit s hemolitično aktivnostjo. V okviru projekta smo s postopkom ekstrakcije in ločitve s tankoplastno kromatografijo ugotovili, da je metabolit prisoten v organskih ekstraktih biomase vseh treh vrst, ne glede na tip in koncentracijo topljenca v gojišču. Pridobili smo organske ekstrakte iz biomase vseh treh vrst in določili njihovo hemolitično, protimikrobno, hemaglutinacijsko in nevrotoksično aktivnost. Ekstrakti biomase so izkazovali predvsem hemolitično aktivnost in šibko protimikrobno aktivnost, zato smo testirali sposobnost vezave na lipidne vezikle in velikost por, ki jih membransko aktivna snov tvori v membranah eritrocitov. Za nadaljnje študije smo zaradi hitrejše rasti in bolj izražene hemolitične aktivnosti pri višjih slanostih izbrali *W. sebi*, ki smo jo gojili v gojišču YNB s 5% in 20% NaCl. Ekstrahirani metabolit se je vezal na nevtralne fosfolipidne vezikle s holinsko glavo in tvoril pore velikosti med 0,69 in 1,1 nm. Naredili smo stabilnostne študije vpliva temperature, pH ter ionske jakosti na hemolitično aktivnost etanolnega ekstrakta oz. v njem ekstrahiranih metabolitov. Študije vezave so obsegale uporabo različnih lipidnih veziklov, ki se med seboj razlikujejo po lipidni sestavi in imajo posledično različen naboj in fluidnost. Za kvantifikacijo, izolacijo in karakterizacijo metabolita, ki je odgovoren za hemolizo eritrocitov, smo uporabili GC oz. GC-MS. Rezultati so pokazali, da izpostavitve ekstrakta *W. sebi* temperaturi 100°C znatno zmanjša hemolitično aktivnost, medtem ko alkalno okolje in višanje ionske jakosti pufra povzroči hitrejši potek hemolize, kar je lahko posledica nestabilnosti samih eritrocitov in/ali pri teh pogojih večje občutljivosti na delovanje metabolita. Do inhibicije hemolize je

prišlo v primeru veziklov, ki so vsebovali fosfatidilholin in/ali sfingomielin. Hemolitično aktiven metabolit v ekstraktu se najverjetneje veže na pozitivno nabito holinsko glavo, kar prepreči njegovo vezavo na eritrocitne membrane. Urejenost membranskih lipidov (npr. primerjava veziklov z in brez holesterola) pri vezavi metabolita na membrano ni igrala vloge. S pomočjo spektrofotometra smo spremljali sproščanje kalceina iz lipidnih veziklov po stiku z metabolitom. Izkazalo se je, da je za permeabilizacijo potrebna večja fluidnost membrane, saj so vezikli, ki vsebujejo holesterol, bolj občutljivi na hemolitično aktiven ekstrakt. Zaključili smo, da je za vezavo hemolitično aktivnega metabolita pomembna prisotnost pozitivnega naboja, za permeabilizacijo membrane pa njena fluidnost. Do hemolize eritrocitov torej ne pride zaradi tvorbe por in posledičnim iztokom citosola iz eritrocitov, temveč zaradi raztapljanja membrane eritrocitov (t.i. učinek detergenta), saj hemolize nismo mogli preprečiti z uporabo ozmoprotektantov različnih velikosti. GC-MS analiza ekstrakta glive *W. sebi*, gojene na 20% NaCl, je pokazala, da se v hemolitično aktivni frakciji, pridobljeni po ločitvi s tankoplastno kromatografijo, nahaja zmes nenasičenih maščobnih kislin in sterolov. Pri višji slanosti naraste količina nenasičenih maščobnih kislin, ki delujejo premosorazmerno hemolitično, glede na stopnjo nenasičenosti, celo do 26-krat. Maščobne kisline očitno delujejo na eritrocitne celične membrane kot detergenti, oz. tvorijo mešane micele z eritrocitnimi membranskimi fosfolipidi in na ta način "raztopijo" membrano.

4. Ocena stopnje realizacije zastavljenih raziskovalnih ciljev⁴

Cilje, zastavljene za celotno trajanje projekta, smo dosegli. Preučili smo naravno ekologijo in ekofiziologijo vseh treh vrst rodu *Wallemia*. Ugotovili smo, v katerih habitatih uspeva posamezna vrsta, in prišli do presenetljive ugotovitve, da *W. ichthyophaga* naseljuje grenčico, bogato z $MgCl_2$, ki je doslej veljala za »sterilno« okolje. Odkrili smo tudi nov kompleks vrst *W. aff. sebi*, ki naseljujejo skoraj izključno hrano in ki ga bomo v nadaljevanju opisali, ter novo vrsto *Wallemia* sp., ki predstavlja vezni člen med filogenetsko oddaljeno vrsto *W. ichthyophaga* in bolj tesno sorodnima vrstama *W. muriae* in *W. sebi*. V pripravi je članek na temo ekofiziologija in filogenija rodu *Wallemia*, članek na temo evlucijskih prilagoditev pa je bil lani objavljen. Drug del raziskav je obsegal prilagoditve na visoko slanost pri modelnem organizmu, obligatno halofilni vrsti *W. ichthyophaga*. Preučevali smo prilagoditve na nivoju membrane, celične stene, ionov in kompatibilnih topljencev. Prilagoditve na visoko slanost na nivoju ultrastrukture celične stene smo že objavili, članek, ki opisuje prilagoditve na izjemno sladko okolje, pa je bil poslan v objavo. Trenutno sta v pripravi članka z opisom prilagoditev na nivoju ionov in kompatibilnih topljencev ter sestave in fluidnosti membrane. V okviru projekta smo poskušali identificirati nekaj ključnih genov, odzivnih na znižano vodno aktivnost s supresijsko subtraksijsko hibridizacijo z zrcalno orientiranim izborom (MOS-SSH). Kot enega najpomembnejših diferencialno izraženih genov pri različnih koncentracijah soli smo določili gen za encim glicerol-3-fosfat dehidrogenazo (*WiGPD1*), ki je glavni encim pri sintezi poglavitnega kompatibilnega topljenca glicerola. Izražanje gena *WiGPD1* v odvisnosti od različnih koncentracij NaCl v gojišču smo preučili z verižno reakcijo s polimerazo v realnem času, ga pomnožili in klonirali v mutante *Saccharomyces cerevisiae*. S funkcionalno komplementacijo mutant *S. cerevisiae* z okvarjenima genoma za GPD smo preverili njegovo funkcijo. Članek na to temo je bil poslan v objavo. Pripravili smo tudi cDNA knjižnico iz *W. ichthyophaga*, vzgojene pri visoki slanosti. Tretji del programa, ki obsega karakterizacijo hemolitičnega metabolita, je razkril, da le-ta ni valeminol, kot je bilo eno od predvidevanj, temveč mešanica sterolov in nenasičenih maščobnih kislin, ki delujejo kot detergenti na membrano eritrocitov. Hemolitična aktivnost je v premosorazmerni odvisnosti od nenasičenosti maščobnih kislin, ki se znatno poveča pri višjih slanostih. Rezultate smo že objavili v enem članku, drugi na to temo pa je trenutno v pripravi.

5. Utemeljitev morebitnih sprememb programa raziskovalnega projekta oziroma sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine⁵

Ni bilo bistvenih sprememb programa.

6. Najpomembnejši znanstveni rezultati projektne skupine⁶

Znanstveni rezultat			
1.	Naslov	SLO	HMG-CoA reduktazo uravnava slanost okolja, njeno delovanje pa je potrebno za halotoleranco pri halofilnih glivah
		ANG	HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi
	Opis	SLO	HMG-CoA reduktaza je ključni encim, ki sodeluje pri metabolizmu sterolov in s tem tudi pri uravnavanju sestave plazemske membrane in njene fluidnosti. Pri proučevanih modelnih halofilnih glivah in sicer ekstremno halotolerantni črni kvasovki <i>Hortaea werneckii</i> in halofilni glivi <i>Wallemia ichthyophaga</i> je delovanje tega encima uravnava tudi s stopnjo slanosti okolja, v katerem živijo te glive.
		ANG	HMG-CoA reductase is a key enzyme in the sterol metabolism and also in the regulation of the membrane composition and fluidity. Its activity is regulated by environmental salinity and is essential for the halotolerance in the studied extremely halotolerant black yeast <i>Hortaea werneckii</i> and halophilic <i>Wallemia ichthyophaga</i> .
	Objavljeno v		HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi. Avtorji: VAUPOTIČ, Tomaž, VERANIČ, Peter, PETROVIČ, Uroš, GUNDE-CIMERMAN, Nina, PLEMENITAŠ, Ana. Stud. Mycol., 2008, letn. 61, str. 61-66.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		25205977
2.	Naslov	SLO	Gunde-Cimerman Nina, Ramos Jose, Plemenitaš Ana. 2009. Halotolerantne in halofilne glive.
		ANG	Halotolerant and halophilic fungi.
	Opis	SLO	Halotolerantne in halofilne glive predstavljajo primernejše modelne organizme za preučevanje prilagoditev na slane pogoje kot mezofilna, na sol občutljiva pivska kvasovka <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . V članku so predstavljene tri glive, ki jih predlagamo kot modelne organizme: ekstremno halotolerantna črna kvasovka <i>Hortaea werneckii</i> , halotolerantna morska kvasovka <i>Debaryomyces hansenii</i> in pa halofilna gliva <i>Wallemia ichthyophaga</i> . Razlogi za predlog so ekologija in že preučenih fiziološki in molekularni mehanizmi adaptacij omenjenih gliv.
		ANG	Halotolerant and halophilic fungi represent a much better model organisms for the study of adaptations to hypersaline conditions than mesophilic, salt-sensitive <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . In the article we present 3 fungi, that we propose as new model organisms: extremely halotolerant black yeast <i>Hortaea werneckii</i> , halotolerant marine yeast <i>Debaryomyces hansenii</i> and halophilic fungus <i>Wallemia ichthyophaga</i> . The suggestion is based on their ecology and physiological and molecular mechanisms of adaptation already investigated.
	Objavljeno v		Gunde-Cimerman Nina, Ramos Jose, Plemenitaš Ana. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. Mycological Research 113(11): 1231-1241.
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		26049241
3.	Naslov	SLO	Odgovor na povišano slanost pri halofilnih glivah rodu <i>Wallemia</i> na morfološkem nivoju.
		ANG	Morphological response of the halophilic fungal genus <i>Wallemia</i> to high salinity.
	Opis	SLO	Glive halofilnega rodu <i>Wallemia</i> se na povišano slanost v gojišču odzivajo s spremembami na nivoju morfologije celice ter debeline in ultrastrukture celične stene. Pri manj prilagojenih vrstah (<i>W. sebi</i> in <i>W. muriae</i>) pri vseh slanostih morfologija ostane filamentozna, ultrastruktura in debelina celične stene se le delno spremenita, dočim se pri obligatno halofilni vrsti (<i>W. ichthyophaga</i>) pri najvišjih slanosti morfologija spremeni v meristematsko, celična stena postane večplastna in . se statistično signifikantno odebeli.
			Fungi of the halophilic genus <i>Wallemia</i> respond to increased salinity in the medium with changes on cell morphology level, as well as on the cell wall ultrastructure and thickness level. In less adapted species (<i>W. sebi</i> and <i>W.</i>

		ANG	muriae) colony morphology remained filamentous and ultrastructure and thickness of cell wall only partially changed at all tested salinities, while the obligately halophilic W. ichthyophaga at highest salinities changed morphology into meristematic cell clumps, cell wall became multilayered and statistically significantly thicker.
	Objavljeno v		Kralj Kunčič, Marjetka, Kogej, Tina, Drobne, Damjana, Gunde-Cimerman, Nina. 2010, Applied and Environmental Microbiology 76 (1):329-337.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		6174073
4.	Naslov	SLO	Nizka vodna aktivnost inducira produkcijo bioaktivnih metabolitov pri halofilnih in halotolerantnih glivah.
		ANG	Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi.
	Opis	SLO	V okviru študije smo testirali glive osamljene iz solin po svetu in iz arktičnih ledenikov na produkcijo metabolitov s hemolitično in protibakterijsko aktivnostjo. Ker so te glive v okolju izpostavljene nizki vodni aktivnosti na račun povišanih koncentracij soli, sladkorja ali nizkih temperatur, smo jih gojili pri standardnih in skrajnih pogojih. Izbrane halofilne vrste, med katerimi zlasti izstopa rod Wallemia, so pokazale pri rasti na povišani slanosti bistveno večjo hemolitično in tudi antibakterijsko aktivnost kot ostale, manj halofilne vrste.
		ANG	The aim of the present study was to investigate indigenous fungal communities isolated from hypersaline waters of solar salterns and subglacial ice, for the production of bioactive compounds under both standard growth conditions and at high NaCl and sugar concentrations and low growth temperatures. The results indicate that selected halotolerant and halophilic species, particularly the halophilic genus Wallemia, showed at increased salt concentrations a much higher hemolytic and antibacterial activity, than less halophilic species.
	Objavljeno v		Sepčič, Kristina, Zalar, Polona, Gunde-Cimerman, Nina. Marine Drugs, 2011, 9 (1): 43-58.
	Tipologija		1.01 Izvirni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		2320719
5.	Naslov	SLO	Ekstremotoleranca pri glivah: evolucija na robu preživetja.
		ANG	Extremotolerance in fungi : evolution on the edge.
	Opis	SLO	Nedavne raziskave so odkrile raznovrstnost gliv, ki naseljujejo stresna okolja, neprimerna za večino evkariontskih organizmov. Po pregledu teh študij smo predlagali nekaj mehanizmov, ki najverjetneje omogočajo evlucijske prilagoditve evkariontskim mikroorganizmom na življenje v ledu in pri visokih koncentracijah soli, ker obstaja med njima presenetljivo velika podobnost zaradi značilno nizke vodne aktivnosti. Predlagali smo evlucijske korake od generalističnih do specialsitičnih vrst, kot j npr. rod Wallemia, ki lahko vodijo tudi do pojavljanja novih glivnih patogenov.
		ANG	Recent studies have revealed the diversity of fungi that can occur in stressful environments that are hostile to most eukaryotes. We reviewed these studies with the purpose of proposing some mechanisms that would allow for the evolutionary adaptation of eukaryotic microbial life under extreme conditions. We propose steps of evolution of generalist species towards the development of specialists, such as the genus Wallemia, which might even explain the emergence of novel fungal pathogens.
	Objavljeno v		Gostinčar, Cene, Grube, Martin, De Hoog, Sybren, Zalar, Polona, Gunde-Cimerman, Nina. FEMS Microbiology Ecology, 2010, 71: 2-11.
	Tipologija		1.02 Pregledni znanstveni članek
	COBISS.SI-ID		2166607

7. Najpomembnejši družbeno-ekonomsko relevantni rezultati projektne skupine⁶

	Družbeno-ekonomsko relevantni rezultat		
1.	Naslov	SLO	Doktorat dr. Cene Gostinčar
		ANG	Ph.D. thesis dr. Cene Gostinčar

	Opis	SLO	V letu 2009 je uspešno zaključil svoje doktorsko usposabljanje GOSTINČAR, Cene (mentorstvo Gunde-Cimerman) z uspešno bibliografijo 6 znanstvenih člankov. Njegovo sodelovanje poteka na tem projektu še naprej. Doktorska disertacija: Populacijske in fiziološke strategije preživetja mikrogliv v ekstremnih okoljih : doktorska disertacija = Population and physiological survival strategies of microfungi in extreme environments : doctoral dissertation. Ljubljana: [C. Gostinčar], 2009. XI, 163 f., ilustr., pril.
		ANG	In 2009 GOSTINČAR, Cene (supervisor Gunde-Cimerman) has successfully defended his Ph.D. thesis with a successful bibliography of 6 scientific articles. He is still actively involved in the ongoing research of this project. Doctoral dissertation: Population and physiological survival strategies of microfungi in extreme environments, Ljubljana: [C. Gostinčar], 2009. XI, 163 f., ilustr.
	Šifra	D.09 Mentorstvo doktorandom	
	Objavljeno v	Doktorska disertacija Cene Gostinčar: Populacijske in fiziološke strategije preživetja mikrogliv v ekstremnih okoljih : doktorska disertacija = Population and physiological survival strategies of microfungi in extreme environments : doctoral dissertation. Ljubljana: [C. Gostinčar], 2009. XI, 163 f., ilustr., pril.	
	Tipologija	2.08 Doktorska disertacija	
	COBISS.SI-ID	2126159	
2.	Naslov	SLO	Življenje na robu: (bio)aktivno preživetje osmofilnega rodu Wallemia (Basidiomycota)
		ANG	Life at the limits: (bio)active survival of the osmophilic genus Wallemia (Basidiomycota)
	Opis	SLO	Glive rodu Wallemia predstavljajo posebnost v kraljestvu gliv, saj kontaminirajo hrano, konzervirano z visokimi koncentracijami soli ali sladkorja ter naseljujejo naravne ekološke niše, za katere je značilna izrazito nizka vsebnost biološko dostopne vode. To jim omogočajo različne prilagoditve na nivoju strukture celice in molekularnih mehanizmov. V predavanju je bil prvič celovito prikazan pregled dosedanjih raziskav, ki so bile izvedene v okviru raziskovalne skupine.
		ANG	Fungi of the genus Wallemia represent a curiosity in the fungal kingdom since they contaminate food, preserved with high concentration of salt or sugar. They also inhabit natural ecological niches with extremely low amounts of biologically available water. Their survival is based on special adaptations in the cell structure and on molecular mechanisms. This lecture was the first combined presentation of the research, conducted by our research group.
	Šifra	B.04 Vabljen predavanje	
	Objavljeno v	Life at the limits: (bio)active survival of the osmophilic genus Wallemia (Basidiomycota). Avtorji: GUNDE-CIMERMAN, Nina, ZALAR, Polona, DROBNE, Damjana, SEPCIĆ, Kristina. BARLIČ-MAGANJA, Darja (ur.), RASPOR, Peter (ur.). 4. kongres Slovenskega Mikrobiološkega Društva z mednarodno udeležbo, Portorož, November 2008. zbornik povzetkov. 2008, str. 29.	
	Tipologija	1.12 Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci	
	COBISS.SI-ID	25099481	
3.	Naslov	SLO	Slanoljubne glive in njihov biotehnoški potencial. GUNDE-CIMERMAN, Nina, PLEMENITAŠ, Ana.
		ANG	Salt loving fungi and their biotechnological potential. GUNDE-CIMERMAN, Nina, PLEMENITAŠ, Ana.
	Opis	SLO	Halofilne glive, ki naseljujejo izjemno slana okolja, so na življenje v takšnih okoljih prilagojene na ravni celične strukture in procesov. Preučevanje molekularnih mehanizmov pri modelnih halofilnih organizmih kot so Hortaea werneckii in Wallemia ichthyophaga ter odkritje ključnih genov/proteinov, ki pri adaptaciji sodelujejo, nam odpira pot za izboljšanje tolerance na sol pri biotehnoško pomembnih glivah in transgenih rastlinah.
		ANG	Halophilic fungi that inhabit extremely saline environments are well-adapted to life in these environments on the level of their cell structure and processes. Studies of molecular mechanisms in the model halophilic organisms such as Hortaea werneckii in Wallemia ichthyophaga and discovery of the key enzymes/proteins involved in osmoadaptation pave the way to the improvement of the osmotolerance of biotechnologically

		important fungi and transgenic plants.
	Šifra	B.05 Gostujoči profesor na inštitutu/univerzi
	Objavljeno v	Vabila razposlana po univerzi. [predavanje na Instituut voor Plantkunde en Microbiologie, Haverlee, 18. april 2008]
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanje)
	COBISS.SI-ID	1869903
4.	Naslov	SLO Ozmoofilni rod Wallemia – aktivni prebivalci morskih solarnih solin.
		ANG Osmophilic fungal genus Wallemia - active inhabitants of marine solar salterns.
	Opis	SLO Najbolj halofilni rod gliv Wallemia, ki naseljuje izjemno slana okolja, je na življenje v tem okolju prilagojen na ravni ekologije, morfologije, fiziologije, celične strukture in molekularnih mehanizmov. Preučevanje teh organizmov in odkritje ključnih genov/proteinov, ki pri adaptaciji sodelujejo, nam odpira pot za izboljšanje tolerance na sol pri transgenih, biotehnološko pomembnih kvasovkah in rastlinah.
		ANG The most halophilic fungal genus Wallemia, that inhabits hypersaline environments, is adapted to life at hypersaline conditions on the level of ecology, morphology, physiology, cell structure and molecular mechanisms. Investigation of these organisms and discovery of key genes/proteins, involved in adaptation, opens the possibility for improvement of salt tolerance in biotechnologically important transgenic yeasts and plants.
	Šifra	B.04 Vabljeni predavanje
	Objavljeno v	GUNDE-CIMERMAN, Nina, ZALAR, Polona, DROBNE, Damjana, SEPCIC, Kristina. Osmophilic fungal genus Wallemia - active inhabitants of marine solar salterns. TURK, Valentina (ur.), TURK, Samo (ur.). SAME 11 - The 11th Symposium on Aquatic Microbial Ecology, August 30 - September 04 2009, Piran, Slovenia. Abstract book. Piran: National Institute of Biology, Marine Biology Station, 2009, str. 39.
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanje)
	COBISS.SI-ID	26227417
5.	Naslov	SLO Glive v ekstremnih okoljih ali ekstremofilne glive?
		ANG Fungi in extreme environments or extremophilic fungi?
	Opis	SLO Vabljeni predavanje na svetovnem kongresu za halofilne mikroorganizme 2010. Na osnovi opisane biodiverzitete ekstremofilnih gliv, ki naseljujejo skrajno slana okolja, smo predlagali nekaj mehanizmov, ki omogočajo evolucijske prilagoditve pri teh skrajnih pogojih. Predlagali smo tri nove evkariontske modelne organizme za raziskave na molekularnem nivoju, ki med drugim obsegajo specialistično vrsto Wallemia ichthyophaga.
		ANG Invited lecture at the world congress Halophiles 2010. Our investigations have revealed the diversity of fungi which populate hypersaline environments. We were able to suggest some common adaptive mechanisms and three new eukaryotic model organisms for investigations on the molecular level, which also include the specialist species Wallemia ichthyophaga.
	Šifra	B.04 Vabljeni predavanje
	Objavljeno v	Gunde-Cimerman, Nina, Gostinčar, Cene, Kralj Kunčič, Marjetka, Zajc, Janja, Zalar, Polona, Plemenitaš, Ana. Fungi in extreme environments or extremophilic fungi? V: Halophiles 2010 : life in saline environments. Beijing: [s.n.], 2010, 20.
	Tipologija	1.06 Objavljeni znanstveni prispevek na konferenci (vabljeni predavanje)
	COBISS.SI-ID	27464409

8. Drugi pomembni rezultati projektne skupine⁸

Sodelavci pri projektu sodelujejo v uredništvu mednarodnih revij iz področja mikrobiologije oz. mikrobiologije ekstremnih okolij. N. Gunde – Cimerman sodeluje v uredniškem odboru mednarodne revije FEMS Microbiology Letters, kjer pokriva področje ekstremofilnih gliv in medicinsko pomembnih gob, A. Plemenitaš pa sodeluje v uredniškem odboru mednarodne revije Saline systems, kjer pokriva področje molekularnih adaptacij pri halofilnih glivah.

Tako N. Gunde – Cimerman kot A. Plemenitaš sta bili plenarni predvataljici na svetovnem kongresu Halophiles 2010 (junij 2010 v Pekingu), kjer sta predstavili tudi delo, ki je potekalo v okviru raziskovalnega projekta.

Vodenje Infrastrukturnega centra Mycosmo v okviru MRIC UL 2009-2014

Gunde-Cimerman Nina je vodja infrastrukturnega centra MYCOSMO, ki vključuje gensko banko ekstremofilnih gliv (Ex), edino tovrstno gensko banko na svetu. Ex je poleg MZKI edina slovenska zbirka, ki je vključena v Evropsko združenje za mikrobiološke zbirke ECCO in v Svetovno združenje za mikrobiološke zbirke WFCC. Genska banka aktivno sodeluje s sorodnimi tujimi institucijami, zlasti z Zbirko biotehnološko pomembnih gliv na Inštitutu za biotehnologijo Danske tehnične univerze DTU v Lyngbyju (prof. J. Frisvad) in z zbirko gliv CBS na Nizozemskem (prof. G. S. de Hoog).

http://www.uni-lj.si/files/ULJ/userfiles/ulj/razis_razv_projekti/MRIC/Infrastrukturni%20centri.pdf

Center odličnosti CipKe Bip.

9. Pomen raziskovalnih rezultatov projektne skupine⁹

9.1. Pomen za razvoj znanosti¹⁰

SLO

Glivni rod *Wallemia* je do leta 2005 obsegal eno samo vrsto, *W. sebi*, ki je bila znana kot kontaminant hrane, konzervirane z visokimi koncentracijami soli ali sladkorja, in kot povzročitelj pljučnega alergičnega obolenja, znanega kot bolezen kmetov. L. 2005 smo opisali tri vrste: *W. sebi*, *W. muriae* in *W. ichthyophaga* ter razrešili filogenetsko pozicijo rodu, kar je omogočilo v okviru projekta preučevanje naravne ekologije posamezne vrste in povezavo s kontaminacijo hrane. Za znanost posebej pomembno je odkritje, da sevi doslej izjemno redke vrste *W. ichthyophaga* naseljujejo vodo, bogato z $MgCl_2$, ki je do zdaj veljala za »sterilno« okolje. Sevi so ekstremno kaofilni, saj rastejo celo na gojiščih z 2.3 M $MgCl_2$. Pred tem odkritjem so bile znane le posamezne vrste bakterij, sposobne rasti na 1.5 M $MgCl_2$. Ugotovili smo tudi, da hrane ne okužujejo tri že znane vrste rodu *Wallemia*, temveč še neopisan kompleks vrst *W. aff. sebi*. Našli smo tudi novo vrsto *Wallemia sp.*, ki filogenetsko predstavlja vezni člen med *W. ichthyophaga* in bolj sorodnima vrstama *W. sebi* in *W. muriae*. Preliminarno smo ugotovili, da vse tri vrste rodu *Wallemia* sintetizirajo neznan hemolitičen metabolit, katerega koncentracija se spreminja v odvisnosti od vodne aktivnosti okolja in je velikega pomena za zdravje ljudi oz. za živilsko predelovalno industrijo. Za znanost novo je dejstvo, da imajo povečano hemolitično aktivnost pri visoki slanosti tudi druge halofilne in halotolerantne vrste gliv, izolirane iz solin. Pri vrsti *W. sebi* je bila za hemolitično aktivnost odgovorna mešanica sterolov in dolgoverižnih maščobnih kislin, ki se kot detergenti vrinejo v membrane eritrocitov in jih tako hemolizirajo. Vrsta *W. ichthyophaga* je najbolj halofilni evkariontski organizem opisan doslej, saj ne raste, če v gojišču ni dodane vsaj 10% NaCl, in zato predstavlja pomemben nov modelni organizem za raziskave adaptacij na življenje v izjemno slanem okolju. *W. ichthyophaga* se prilagaja na nivoju morfologije z rastjo v obliki meristematskih skupkov, na nivoju celične stene z izjemno odebelitvijo in večplastnostjo, na nivoju membran pa s spreminjanjem sestave in fluidnosti. Pri visokih slanostih celice *W. ichthyophaga* vzdržujejo nizko vsebnost intracelularnih ionov, razlike v turgorskih pritiskih pa uravnavajo s sintezo kompatibilnih topljencev, predvsem glicerola. Identificirali smo tudi določene diferencialno izražene gene, zlasti gen za encim glicerol-3-fosfat dehidrogenazo, ki s heterolognim vnosom v pivsko kvasovko bistveno poveča njeno toleranco na sol. Preučevanje ekstremofilnih adaptacij je botrovalo vključitvi v center odličnosti CipKeBip, v okviru katerega poteka kot pomemben del dejavnosti proučevanje proteinov ekstremofilnih gliv. Sodelavci projekta z BF in MF (oboje UL) smo pričeli aktivnosti, ki bodo vodile do določitve genomskega in transkriptomskega zaporedja *W. ichthyophaga*. To je eden od treh genomskih projektov, vodenih v naši skupini. Projekti predstavljajo prvo sekveniranje genoma katerekoli ekstremno halotolerantne ali halofilne glive v svetovnem merilu in hkrati prve projekte sekveniranja evkariontskih genomov, ki jih vodijo raziskovalci iz Slovenije. Projekt določevanja genomskega in transkriptomskega (pri treh različnih koncentracijah soli) zaporedja *W. ichthyophaga* poteka v sodelovanju s kitajskim inštitutom BGI. Zbrani podatki bodo s pomočjo primerjalne genomike pomagali pri razumevanju izjemne tolerance na sol pri *W. ichthyophaga*. Končni namen teh raziskav je pridobitev transgenih kvasovk in rastlin, prilagojenih na ozmotske (slanostne) strese. Halotolerantne kvasovke so namreč pomembne pri različnih industrijskih procesih, pri katerih so prisotne povišane koncentracije soli (npr. fermentacije v živilski

industriji, produkcija bioetanola iz odpadnih surovin), halotolerantne rastline pa predstavljajo potencialno rešitev problema naraščajočega globalnega zasoljevanja kmetijskih površin.

ANG

Until 2005, the fungal genus *Walleimia* contained only one species, *W. sebi*, known as a contaminant of food preserved with high concentrations of salt or sugar and as the causative agent of allergic farmers' lung disease. In 2005, we described three species: *W. sebi*, *W. muriae* and *W. ichthyophaga* and resolved the phylogenetic position of the genus *Walleimia*, which enabled unraveling of the natural ecology of individual species and their relation to food. Particularly important for science is the discovery that *W. ichthyophaga* populates waters rich with $MgCl_2$, so far considered as »sterile«. Strains are extremely chaophilic, since they can grow even on media with 2.3 M $MgCl_2$. Before this discovery only a few species of bacteria were known as being able to grow on 1.5 M $MgCl_2$. We have also discovered that the three known species are not food-borne. It appears that food is contaminated by a so far undescribed complex of species *W. aff. sebi*. Additionally, a new species *Walleimia sp.* was found, which represents the phylogenetically missing link between *W. ichthyophaga* and the more related species *W. sebi* and *W. muriae*.

Our preliminary results showed that all three species of the genus *Walleimia* synthesize an unknown haemolytic metabolite, more pronounced at low water activity, of great importance for human health and food-processing industry. Also other tested halophilic and halotolerant species of fungi, isolated from salterns, show haemolytic activity at increased salt concentrations. In *W. sebi*, the haemolytic activity was due to a mixture of sterols and long chain fatty acids that acted as detergents on membranes of erythrocytes.

W. ichthyophaga is so far the most halophilic eukaryotic microorganism known to date, since it does not grow without at least 10% of NaCl in the medium. It represents an important new model organism for investigations of adaptations to life at high salinity. *W. ichthyophaga* adapts on the level of cell morphology by growing as meristematic clumps, on the level of cell wall with extreme thickening and multi-layered structure, on the level of membranes by changing its composition and fluidity. At high salinities, the cells of *W. ichthyophaga* maintain low intracellular ion content and they counteract differences in osmotic pressure by the synthesis of compatible solutes, particularly glycerol. We have identified some differentially expressed genes, such as the enzyme glycerol-3-phosphate dehydrogenase. When we heterologously introduced it into brewers' yeast, we significantly increased its tolerance to salt. Research of extremophilic adaptations in fungi contributed to the involvement into a new Center of excellence CipKeBip. One of its main activities is the investigation of proteins of extremophilic fungi. Collaborators of the project have started activities, which will lead to the determination of genomic and transcriptomic sequences of *W. ichthyophaga*. This represents one of the three genome projects lead by our group. The three projects represent the first sequencing of genome of any extremely halotolerant or halophilic fungus on a global scale and at the same time the first projects of sequencing of an eukaryotic genome lead by Slovenian scientists. The determination of genomic and transcriptomic sequences (at three different salt concentrations) of *W. ichthyophaga* is conducted with the Chinese institute BGI. Collected data, with the help of comparative genomics, will help in our understanding of the extreme tolerance to salt in *W. ichthyophaga*. The final intention is to acquire transgenic yeasts and plants, adapted to osmotic (saline) stress. Halotolerant yeasts are important in different industrial processes, which are characterized by elevated concentrations of salt, such as fermentations in food industry, production of bioethanol from waste materials, while halotolerant plants represent the potential solution to global salinization of agricultural soil.

9.2. Pomen za razvoj Slovenije¹¹

SLO

V prihodnjih letih bo najverjetneje prišlo do klimatskih sprememb, ki bodo vodile k povišanim temperaturam, suši, posledičnemu namakanju in zasoljevanju prsti. Kmetijske površine različnih področij sveta, ki se nahajajo v toplejšem podnebnem pasu, so vsak dan bolj zasoljene (npr. Indija, Kitajska), s spremembo klime pa lahko pričakujemo zasoljevanje tudi v zmernih podnebnih pasovih, vključno s Slovenijo. Raziskave prilagoditev halofilnih gliv so pomembne za razvoj tolerance na povečano slanost in sušo industrijsko pomembnih kvasovk in rastlin, prinesle bodo tudi pomembne nove informacije in znanje. Pomen tega področja je razviden tudi iz podpisa skupnega projekta med Slovenijo in Kitajsko (BGI inštitut), v okviru katerega bo poteklo prvo sekveniranje genoma katerekoli halofilne glive v svetovnem merilu in hkrati prvi projekt sekveniranja evkariontskih genomov, ki ga vodijo raziskovalci iz Slovenije. Zbrani podatki bodo s pomočjo primerjalne genomike pomagali pri razumevanju izjemne tolerance na sol pri *W. ichthyophaga*. Pomen raziskav ekstremofilnih gliv za razvoj Slovenije je bil dodatno potrjen z vključitvijo v novo ustanovljeni Center odličnosti za integrirane pristope v kemiji in biologiji proteinov CipKeBIP, kjer je ena od treh glavnih usmeritev preučevanje proteinov

ekstremofilnih mikroorganizmov, in z organizacijo dveh mednarodnih srečanj: Black yeast conference pod okriljem ISHAM maja 2010 v Ljubljani in 4th Polar and Alpine Microbiology Conference septembra 2011 v Ljubljani. Aktualnost raziskav ekstremofilnih gliv izpričuje tudi dejstvo, da so bili rezultati projekta predstavljeni na različnih mednarodnih forumih in konferencah, v obliki vabljenih plenarnih predavanj (5), vabljenih predavanj (5) in postrov (2), ki so vsi promovirali dosežke slovenske znanosti.

Sevi gliv (60), ki so bili izolirani tekom raziskave, so bili vključeni v gensko banko ekstremofilnih gliv (EX) v okviru Infrastrukturnega centra Mycosmo. Z vključitvijo v gensko banko so sevi iz težko dostopnih ekoloških niš gensko banko pomembno obogatili in postali na razpolago tako domači kot tuji znanstveni srenji in industriji. Pomemben dosežek predstavljajo novi izolati doslej izjemno redke vrste *W. ichthyophaga* in odkritje novih vrst znotraj rodu *Wallemia*. Ker so glive rodu *Wallemia* mikotoksične kontaminante hrane, konzervirane z visokimi koncentracijami soli in sladkorja, je ugotovitev, da hrano okužujejo doslej neopisane vrste, še zlasti pomembna. Sevi teh novih vrst so zaenkrat shranjeni izključno v slovenski genski banki EX. Preliminarna ugotovitev, da tri opisane vrste rodu *Wallemia* sintetizirajo hemolitičen metabolit, je pomembna za slovensko in mednarodno živilsko industrijo, ki se srečuje z omenjenimi kontaminacijami. Prisotnost tega metabolita je bila tekom projekta ugotovljena tudi pri drugih halofilnih in halotolerantnih glivah, ki prav tako okužujejo hrano in izgleda predstavlja prilagoditev gliv na rast pri slanih pogojih.

V okviru projekta so se izobraževali mladi raziskovalci, sodelovali pa so tudi diplomanti. Iz tematike projekta sta bila v lanskem letu zaključena dva doktorata (dr. Cene Gostinčar in dr. Marjetka Kralj Kunčič) ter štiri diplome. Trenutno še poteka delo na eni doktorski disertaciji, ki bo zaključena v letu 2011. Sodelavci projekta so znanje prenesli tudi študentom pri predavanjih različnih predmetov na Univerzi v Ljubljani, saj je več sodelavcev projekta habilitiranih in sodeluje pri pedagoških procesih različnih študijskih smeri.

ANG

In the future years, most probably climatic changes will occur that will lead to increased temperatures, drought, consequential irrigation and soil salinisation. Agricultural land in different parts of the world located in warmer climatic zones, such as China and India, are being increasingly salinized. With climatic change, we can expect salinisation of land also in more temperate zones, such as in Slovenia. Investigations of adaptations of halophilic fungi are thus important for the development of tolerance to salt and drought of industrially important yeasts and plants and for the acquirement of new information and knowledge. The importance of this field was proved by signing a common project between Slovenia and China (BGI institute). Within its framework, the first sequencing ever of a genome of a halophilic fungus will be performed on the global basis. This will also be the first project of sequencing of an eukaryotic genome that will be conducted by Slovenian scientists. The assembled data analyzed with the aid of comparative genomics will help us to understand the exceptional tolerance to salt of *W. ichthyophaga*. The importance of research of extremophilic fungi for the development of Slovenia has been additionally confirmed also by joining the newly established Center of Excellence for integrated approaches in chemistry and biology of proteins CipKeBIP. One of the main areas of research within the Center is the investigation of proteins from extremophilic microorganisms. Another evidence of actuality are the organization of two international conferences: Black yeast conference under the auspices of ISHAM in May 2010 in Ljubljana, Slovenia and the 4th Polar and Alpine Microbiology Conference in September 2011 in Ljubljana, Slovenia. The importance of research of extremophilic fungi is also evident by presentation of results of the project at different international forums and conferences, as plenary lectures (5), invited lectures (5) and posters (2), which all promoted achievements of Slovenian scientists. Strains of fungi that were isolated during the research project (60) have been included in the gene bank of Extremophilic fungi (EX), within the Infrastructural Centre Mycosmo. With the inclusion of the strains originating from habitats that are difficult to access into the gene bank, the gene bank was importantly enriched, and strains became available to the scientific and industrial community. An important achievement represent isolates of the so far extremely rare species *W. ichthyophaga* and the discovery of new species within the genus *Wallemia*. Strains of these new species are so far preserved exclusively in the Slovene gene bank EX. Since fungi of the genus *Wallemia* are mycotoxic contaminants of food preserved with high concentrations of salt and sugar, the finding that food-borne species are still undescribed is particularly important. The finding that fungi of the genus *Wallemia* are able to synthesize a haemolytic metabolite (s) is important for Slovenian and for international food industry. The synthesis of this metabolite has been discovered during the project also in other halophilic and halotolerant food-borne fungi. It appears that it represents an adaptation of fungi to hypersaline conditions. Several young researchers and undergraduate students were involved in the project. Two doctoral theses (dr. Cene Gostinčar and dr. Marjetka Kralj Kunčič) and 4 diploma theses have been successfully completed. Another Ph.D. thesis will be completed this year. Since several collaborators of the project are habilitated at the University of Ljubljana, they were able to

transfer their knowledge to undergraduate and graduate students also during lectures and practical courses.

10. Samo za aplikativne projekte!

Označite, katerega od navedenih ciljev ste si zastavili pri aplikativnem projektu, katere konkretne rezultate ste dosegli in v kakšni meri so doseženi rezultati uporabljeni

Cilj		
F.01	Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.02	Pridobitev novih znanstvenih spoznanj	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.03	Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.04	Dvig tehnološke ravni	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.05	Sposobnost za začetek novega tehnološkega razvoja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.06	Razvoj novega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.07	Izboljšanje obstoječega izdelka	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.08	Razvoj in izdelava prototipa	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.09	Razvoj novega tehnološkega procesa oz. tehnologije	

	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.10	Izboljšanje obstoječega tehnološkega procesa oz. tehnologije	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.11	Razvoj nove storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.12	Izboljšanje obstoječe storitve	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.13	Razvoj novih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.14	Izboljšanje obstoječih proizvodnih metod in instrumentov oz. proizvodnih procesov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.15	Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.16	Izboljšanje obstoječega informacijskega sistema/podatkovnih baz	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.17	Prenos obstoječih tehnologij, znanj, metod in postopkov v prakso	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.18	Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE

	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.19	Znanje, ki vodi k ustanovitvi novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.20	Ustanovitev novega podjetja ("spin off")	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.21	Razvoj novih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.22	Izboljšanje obstoječih zdravstvenih/diagnostičnih metod/postopkov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.23	Razvoj novih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.24	Izboljšanje obstoječih sistemskih, normativnih, programskih in metodoloških rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.25	Razvoj novih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.26	Izboljšanje obstoječih organizacijskih in upravljavskih rešitev	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.27	Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

F.28	Priprava/organizacija razstave	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.29	Prispevek k razvoju nacionalne kulturne identitete	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.30	Strokovna ocena stanja	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.31	Razvoj standardov	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.32	Mednarodni patent	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.33	Patent v Sloveniji	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.34	Svetovalna dejavnost	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	
F.35	Drugo	
	Zastavljen cilj	☐ DA ☐ NE
	Rezultat	
	Uporaba rezultatov	

Komentar

11. Samo za aplikativne projekte!

Označite potencialne vplive oziroma učinke vaših rezultatov na navedena področja

	Vpliv	Ni vpliva	Majhen vpliv	Srednji vpliv	Velik vpliv	
G.01	Razvoj visoko-šolskega izobraževanja					
G.01.01.	Razvoj dodiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.02.	Razvoj podiplomskega izobraževanja	☐	☐	☐	☐	
G.01.03.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.02	Gospodarski razvoj					
G.02.01	Razširitev ponudbe novih izdelkov/storitev na trgu	☐	☐	☐	☐	
G.02.02.	Širitev obstoječih trgov	☐	☐	☐	☐	
G.02.03.	Znižanje stroškov proizvodnje	☐	☐	☐	☐	
G.02.04.	Zmanjšanje porabe materialov in energije	☐	☐	☐	☐	
G.02.05.	Razširitev področja dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.02.06.	Večja konkurenčna sposobnost	☐	☐	☐	☐	
G.02.07.	Večji delež izvoza	☐	☐	☐	☐	
G.02.08.	Povečanje dobička	☐	☐	☐	☐	
G.02.09.	Nova delovna mesta	☐	☐	☐	☐	
G.02.10.	Dvig izobrazbene strukture zaposlenih	☐	☐	☐	☐	
G.02.11.	Nov investicijski zagon	☐	☐	☐	☐	
G.02.12.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.03	Tehnološki razvoj					
G.03.01.	Tehnološka razširitev/posodobitev dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.02.	Tehnološko prestrukturiranje dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.03.03.	Uvajanje novih tehnologij	☐	☐	☐	☐	
G.03.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.04	Družbeni razvoj					
G.04.01	Dvig kvalitete življenja	☐	☐	☐	☐	
G.04.02.	Izboljšanje vodenja in upravljanja	☐	☐	☐	☐	
G.04.03.	Izboljšanje delovanja administracije in javne uprave	☐	☐	☐	☐	
G.04.04.	Razvoj socialnih dejavnosti	☐	☐	☐	☐	
G.04.05.	Razvoj civilne družbe	☐	☐	☐	☐	
G.04.06.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.05.	Ohranjanje in razvoj nacionalne naravne in kulturne dediščine in identitete	☐	☐	☐	☐	
G.06.	Varovanje okolja in trajnostni razvoj	☐	☐	☐	☐	
G.07	Razvoj družbene infrastrukture					
G.07.01.	Informacijsko-komunikacijska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.02.	Prometna infrastruktura	☐	☐	☐	☐	

G.07.03.	Energetska infrastruktura	☐	☐	☐	☐	
G.07.04.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	
G.08.	Varovanje zdravja in razvoj zdravstvenega varstva	☐	☐	☐	☐	
G.09.	Drugo:	☐	☐	☐	☐	

Komentar

--

12. Pomen raziskovanja za sofinancerje, navedene v 2. točki [12](#)

1.	Sofinancer		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	Komentar		
Ocena			
2.	Sofinancer		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
	5.		
	Komentar		
Ocena			

3.	Sofinancer		
	Vrednost sofinanciranja za celotno obdobje trajanja projekta je znašala:		EUR
	Odstotek od utemeljenih stroškov projekta:		%
	Najpomembnejši rezultati raziskovanja za sofinancerja		Šifra
	1.		
	2.		
	3.		
	4.		
5.			
Komentar			
Ocena			

C. IZJAVE

Podpisani izjavljam/o, da:

- so vsi podatki, ki jih navajamo v poročilu, resnični in točni
- se strinjamo z obdelavo podatkov v skladu z zakonodajo o varstvu osebnih podatkov za potrebe ocenjevanja, za objavo 6., 7. in 8. točke na spletni strani <http://sicris.izum.si/> ter obdelavo teh podatkov za evidence ARRS
- so vsi podatki v obrazcu v elektronski obliki identični podatkom v obrazcu v pisni obliki
- so z vsebino zaključnega poročila seznanjeni in se strinjajo vsi soizvajalci projekta

Podpisi:

Nina Gunde-Cimerman	in	
podpis vodje raziskovalnega projekta		zastopnik oz. pooblaščen oseba RO

Kraj in datum:

Ljubljana

21.4.2011

Oznaka poročila: ARRS-RPROJ-ZP-2011-1/161

¹ Zaradi spremembe klasifikacije družbeno ekonomskih ciljev je potrebno v poročilu opredeliti družbeno ekonomski cilj po novi klasifikaciji. [Nazaj](#)

² Samo za aplikativne projekte. [Nazaj](#)

³ Napišite kratko vsebinsko poročilo, kjer boste predstavili raziskovalno hipotezo in opis raziskovanja. Navedite ključne ugotovitve, znanstvena spoznanja ter rezultate in učinke raziskovalnega projekta. Največ 18.000 znakov vključno s presledki (približno tri strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁴ Realizacija raziskovalne hipoteze. Največ 3.000 znakov vključno s presledki (približno pol strani, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁵ V primeru bistvenih odstopanj in sprememb od predvidenega programa raziskovalnega projekta, kot je bil zapisan v predlogu raziskovalnega projekta oziroma v primeru sprememb, povečanja ali zmanjšanja sestave projektne skupine v zadnjem letu izvajanja projekta (obrazložitev). V primeru, da sprememb ni bilo, to navedite. Največ 6.000 znakov vključno s presledki (približno ena stran, velikosti pisave 11). [Nazaj](#)

⁶ Navedite največ pet najpomembnejših znanstvenih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov v slovenskem in angleškem jeziku (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki) v slovenskem in angleškem jeziku, navedite, kje je objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>.

PRIMER (v slovenskem jeziku):

Naslov: Regulacija delovanja beta-2 integrinskih receptorjev s katepsinom X;

Opis: Cisteinske proteaze imajo pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka. Zadnje študije kažejo njihovo povezanost s procesi celičnega signaliziranja in imunskega odziva. V tem znanstvenem članku smo prvi dokazali... (največ 600 znakov vključno s presledki)

Objavljeno v: OBERMAJER, N., PREMŽL, A., ZAVAŠNIK-BERGANT, T., TURK, B., KOS, J.. Carboxypeptidase cathepsin X mediates $\beta 2$ - integrin dependent adhesion of differentiated U-937 cells. Exp. Cell Res., 2006, 312, 2515-2527, JCR IF (2005): 4.148

Tipologija: 1.01 - Izvirni znanstveni članek

COBISS.SI-ID: 1920113 [Nazaj](#)

⁷ Navedite največ pet najpomembnejših družbeno-ekonomsko relevantnih rezultatov projektne skupine, ki so nastali v času trajanja projekta v okviru raziskovalnega projekta, ki je predmet poročanja. Za vsak rezultat navedite naslov (največ 150 znakov vključno s presledki), rezultat opišite (največ 600 znakov vključno s presledki), izberite ustrezen rezultat, ki je v Šifrantu raziskovalnih rezultatov in učinkov (Glej: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-razisk-rezult.asp>), navedite, kje je rezultat objavljen (največ 500 znakov vključno s presledki), izberite ustrezno šifro tipa objave po Tipologiji dokumentov/del za vodenje bibliografij v sistemu COBISS ter napišite ustrezno COBISS.SI-ID številko bibliografske enote.

Navedeni rezultati bodo objavljeni na spletni strani <http://sicris.izum.si/>. [Nazaj](#)

⁸ Navedite rezultate raziskovalnega projekta v primeru, da katerega od rezultatov ni mogoče navesti v točkah 6 in 7 (npr. ker se ga v sistemu COBISS ne vodi). Največ 2.000 znakov vključno s presledki. [Nazaj](#)

⁹ Pomen raziskovalnih rezultatov za razvoj znanosti in za razvoj Slovenije bo objavljen na spletni strani: <http://sicris.izum.si/> za posamezen projekt, ki je predmet poročanja. [Nazaj](#)

¹⁰ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹¹ Največ 4.000 znakov vključno s presledki [Nazaj](#)

¹² Rubrike izpolnite/prepišite skladno z obrazcem "Izjava sofinancerja" (<http://www.arrs.gov.si/sl/progproj/rproj/gradivo/>), ki ga mora izpolniti sofinancer. Podpisan obrazec "Izjava sofinancerja" pridobi in hrani nosilna raziskovalna organizacija – izvajalka projekta. [Nazaj](#)

Obrazec: ARRS-RPROJ-ZP/2011-1 v1.01

FA-7B-61-EB-9F-2A-33-64-60-6C-A1-AB-BE-DF-C3-4A-14-F6-47-78