

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA

ZNAČILNOSTI VRSTE *OPHIOCORDYCEPS*
UNILATERALIS IN NJEN VPLIV NA GOSTITELJA

ALENKA BABIČ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Značilnosti vrste *Ophiocordyceps unilateralis* in njen vpliv na
gostitelja**

(Characteristics of the species *Ophiocordyceps unilateralis* and its impact on
the host)

Ime in priimek: Alenka Babič

Študijski program: Biodiverziteta

Mentor: doc. dr. Vladimir Ivović

Somentor: dr. Katja Kalan

Koper, september 2021

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Alenka BABIČ

Naslov zaključne naloge: Značilnosti vrste *Ophiocordyceps unilateralis* in njen vpliv na gostitelja

Kraj: Koper

Leto: 2021

Število listov: 44

Število slik: 11

Število tabel: 2

Število referenc: 39

Mentor: doc. dr. Vladimir Ivović

Somentor: dr. Katja Kalan

Ključne besede: Hypocreales, *Ophiocordyceps unilateralis*, *Camponotini*, patogena zombi gliva, manipulacija vedenja, tropski gozd.

Izvleček:

V zaključni nalogi je predstavljena gliva *Ophiocordyceps unilateralis* (Tul. & C. Tul.) Petch 1931, njena morfologija, življenjski krog, razširjenost in habitat, vpliv na gostitelja ter medicinski pomen.

Ophiocordyceps unilateralis (Hypocreales, Ascomycetes) je entomopatogena gliva, specializirana za mravlje iz plemena *Camponotini* (Formicinae: Formicidae). Parazitizem tako imenovane zombi glive predstavlja enega izmed najzanimivejših odnosov med mikrobi in živalmi. Gliva ima pantropsko razširjenost, pojavlja se predvsem v tropskih gozdovih, z nekaj nahajališči v zmerno toplih ekosistemih. Gliva v telo gostitelja prodre skozi kutikulo in prične manipulirati z njegovim vedenjem. Mravlja med manipulacijo zapusti svojo kolonijo ter se povzpne na del vegetacije, kjer vladajo optimalni pogoji za glivo; mravlja zagrizi v glavno žilo lista in nato umre. Iz baze njene glave požene stroma, na kateri se razvije reproduktivni organ glive – peritecij. V njemu dozori spore, ki se sprostijo v okolico. Med pasivnim premikanjem po zraku pristanejo na novi mravlji, ki bo nadaljevala življenjski krog glive. Cilj manipulacije je povečanje uspešnosti nadaljnje reprodukcije in rasti gliv.

Cilja zaključne naloge sta pregled značilnosti in taksonomije vrste, ter njen vpliv na svojega gostitelja.

Key words documentation

Name and SURNAME: Alenka BABIČ

Title of the final project paper: Characteristics of the species *Ophiocordyceps unilateralis* and its impact on the host

Place: Koper

Year: 2021

Number of pages: 44

Number of figures: 11

Number of tables: 2

Number of references: 39

Mentor: Assist. Prof. Vladimir Ivović, PhD

Co-Mentor: Assist. Katja Kalan, PhD

Keywords: Hypocreales, *Ophiocordyceps unilateralis*, *Camponitini*, pathogenic zombie fungus, behavior manipulation, tropical forest.

Abstract:

The final work focuses on the fungus *Ophiocordyceps unilateralis* (Tul. & C. Tul.) Petch 1931, its morphology, life cycle, distribution and habitat, impact on the host and medical significance.

Ophiocordyceps unilateralis (Hypocreales, Ascomycetes) is an entomopathogenic fungi specific to ants from the tribe *Camponitini* (Formicinae: Formicidae). The parasitism of so-called zombie fungus represents one of the most interesting relationships between microbes and animals. It has a pantropic distribution, it can be found mainly in tropical forests, with few localities in moderate ecosystems. The fungus enters the host's body by penetrating its cuticle and begins to manipulate its behaviors. During the manipulation, the ant leaves its colony and ascends to the part of the vegetation where the optimal conditions for the fungus are present; afterwards it bites into the main vein of the leaf and dies. From the head base a stroma starts to grow, on which later develops the reproductive organ of the fungus - perithecia. After the spores in the perithecium mature, the cap opens and they are released into the atmosphere. While they passively move through the air, they land on new ants, which will continue the life cycle of the fungus. The fungus manipulates host's behaviour in order to increase its own fitness.

The two main objectives of the final work are to review the characteristics of the species along with its taxonomy, and to learn how it affects its host.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorju dr. Vladimirju Ivoviću za vso strokovno pomoč pri izdelavi zaključne naloge, potrpežljivost in hitro odzivnost. Iskreno se zahvaljujem tudi somentorici dr. Katji Kalan za napotke in pomoč.

Nazadnje pa gre posebna zahvala družini, fantu in prijateljem, ki so mi med študijem vedno stali ob strani, me podpirali in spodbujali.

Najlepša hvala vsem!

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
2	SPLOŠNE ZNAČILNOSTI GLIV	3
3	ZGODOVINA RAZISKOVANJA PARAZITA	9
4	TAKSONOMIJA.....	11
	4.1 <i>Ophiocordyceps unilateralis</i> sensu lato.....	11
	4.1.1 Značilnosti vrst znotraj <i>O. unilateralis</i> kompleksa	13
5	MORFOLOGIJA	16
6	ŽIVLJENJSKI KROG	19
7	RAZŠIRJENOST IN HABITAT	24
8	VPLIV NA GOSTITELJA	25
9	MEDICINSKI POMEN.....	29
10	ZAKLJUČEK	31
11	LITERATURA IN VIRI.....	32

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Znanstvena klasifikacija vrste <i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	11
Preglednica 2: Primerjava morfoloških značilnosti, gostitelja in distribucije med vrstami znotraj <i>Ophiocordyceps unilateralis</i> kompleksa	14

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba glive.....	3
Slika 2: Življenjski cikel s spolnim razmnoževanjem debla Ascomycota.....	7
Slika 3: Ilustracija vrste <i>Ophiocordyceps unilateralis</i> v publikaciji “Selecta fungorum carpologia”.....	10
Slika 4: Izraščanje vrste <i>Ophiocordyceps albacongiuae</i> iz hrbtni strani glave.....	16
Slika 5: Vrsta <i>Oecophylla smaragdina</i>	17
Slika 6: Različne oblike rodu <i>Hirsutella</i>	18
Slika 7: Posamezne faze v življenjskem ciklu <i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	21
Slika 8: Življenjski krog <i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	22
Slika 9: Geografska razširjenost <i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	24
Slika 10: Prečni prerez mravljine glave okužene z <i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	27
Slika 11: Kemijska struktura šestih derivatov rdečega naftokinona, ki se pojavljajo pri <i>Ophiocordyceps unilateralis</i>	29

SEZNAM KRATIC

ATP = adenzin trifosfat

CATs (*Conidial anastomosis tubes*) = konidialne cevi za anastomozo

DNK = deoksiribonukleinska kislina

1 UVOD

Kraljestvo gliv predstavlja eno izmed glavnih skupin evkariontskih mikrobov v kopenskih in vodnih ekosistemih. Do danes je bilo opisanih okoli 100.000 vrst gliv, kar naj bi predstavljajo le delček celotne biodiverzitete gliv, za katero se ocenjuje da naj bi bila med 1.5 do 5 milijonov vrst. Ena od posebnih značilnosti, ki jo srečamo pri glivah, je njihova sposobnost tvorjenja vezi z ostalimi skupinami organizmov. Ocenjuje se, da je 21% vseh opisanih vrst v povezavi z algami, 8% gliv pa tvori odnose z rastlinami kot mikoriza. Glive predstavljajo enega od ključnih sestavnih delov ekosistemov, saj le redko kateri organizmi v kopenskih ekosistemih obstajajo v odsotnosti gliv (Kepler 2016).

Vrsto *Ophiocordyceps unilateralis* uvrščamo v rod *Ophiocordyceps*. Glive iz navedenega rodu predstavljajo enega izmed najzanimivejših in impresivnih odnosov med parazitskimi glivami in žuželkami. Rod je nastal pred približno 100 milijoni let in obsega okoli 200 vrst parazitskih gliv (Araújo in Hughes 2016). Prvotno so bile vrste, ki danes pripadajo rodu *Ophiocordyceps*, dodeljene rodu *Cordyceps*, saj rod *Ophiocordyceps* zaradi pomanjkanja podatkov in raziskav še ni obstajal. Sung G.H. je s sod. v znanstvenem članku "Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi" leta 2007 dokazal, da se družina Clavicipitaceae deli na tri monofiletske družine: *Clavicipitaceae*, *Cordycipitaceae* in *Ophiocordycipitaceae*. Na podlagi novih ugotovitev so veliko število vrst premestili iz rodu *Cordyceps* v družino *Ophiocordycipitaceae* (Sung in sod. 2007).

Večina vrst iz rodu *Ophiocordyceps* ima temno obarvano stromo, predvsem tiste, pripadajoče rodu *Hirsutella*, obenem pa jo imajo nekatere vrste svetlo obarvano (rod *Hymenostilbe*). Stroma je lahko trda, žilasta, vlaknasta ali prožna. Nanje lahko naletimo na različnih lokacijah, kot so listne strelje, spodnje strani listov in stebela, na deblih dreves ali v prsti (Evans in sod. 2017). Položajev oz. razporeditev peritecijev (trosišč) je več, vse od površinskih do poševnih. Askospore so običajno valjaste oblike, lahko pa so tudi segmentirane, ki po izpustu ostanejo cele ali se razdelijo v manjše dele. Anamorfne vrste, ki se pojavljajo v rodu *Ophiocordyceps* so iz rodov *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paraisaria* in *Syngliocladium* (Evans in sod. 2017).

Vrste iz roda *Ophiocordyceps* najdemo v številnih žuželkah in so pretežno entomopatogene. Redovi žuželk, ki jih te glive napadajo, so: Coleoptera (hrošči), Diptera (dvokrilci), Hemiptera (polkrlci), Hymenoptera (kožekrilci), Isoptera (termiti), Lepidoptera (metulji), Neuroptera (pravi mrežekrilci), in Odonata (kačji pastirji). Okužijo jih lahko v različnih fazah življenjskega cikla, od ličink vse do odraslih osebkov (Evans in sod. 2017).

Rod *Ophiocordyceps* srečamo na večini kontinentov, vendar je bila najvišja stopnja raznolikosti zabeležena v tropskih in subtropskih klimatih (Luangsa-ard in sod. 2018).

Eden izmed najbolj fascinantnih pojavov, ki jih srečamo pri entomopatogenih glivah so t.i. zombi mravlje oz. manipulacija njihovega vedenja, ki ga povzroča vrsta *Ophiocordyceps unilateralis* (Tul.) Petch 1931 (Hughes in sod. 2011). Vrsto sta prva opisala brata Tulasne v svoji publikaciji »Selecta Fungorum Carpologia« leta 1865, in jo poimenovala *Torrubia unilateralis*. Vrsta manipulira z vedenjem mravelj tako, da mravlje zapustijo svojo kolonijo ter poiščejo optimalno mikroklimo, v kateri se lahko gliva razvija in razmnožuje. Nato mravlja zagrizi v žilo lista in umre. Po smrti na hrbtni strani mravljinine glave zraste plodišče, ki bo askospore spustilo v ozračje oz. bodo le-te padle na tla gozda, kjer se bodo okužile nove mravlje (Araújo in Hughes 2016).

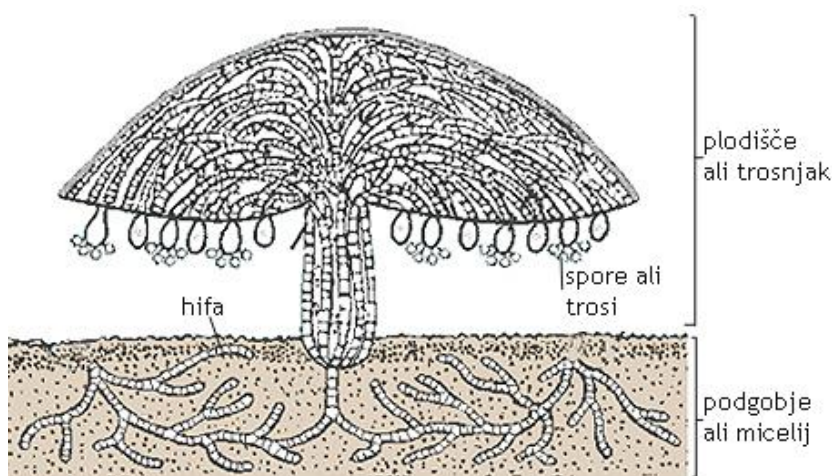
Zaključna naloga je preglednega tipa. Cilj zaključne naloge je opis vrste *Ophiocordyceps unilateralis*, ter njenega vpliva na gostitelja, na podlagi dosedanjih raziskav razvidnih iz znanstvene literature. Literaturo sem iskala v knjižnici in elektronskih zbornikih znanstvenih gradiv. V zaključni nalogi sem zajela značilnosti same vrste *Ophiocordyceps unilateralis* (zgodovina raziskovanja, taksonomija itd.), njeno morfologijo in življenjski krog, razširjenost in habitat, njen vpliv na gostitelja ter medicinski pomen.

2 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI GLIV

Glive so se razvile kot posebna skupina enoceličnih evkariontov v Predkambriju, najstarejši fosili gliv štejejo 400 milijonov let. Kraljestvo gliv vključuje sedem debel: Basidiomycota, Ascomycota, Glomeromycota, Blastocladiomycota, Chytridiomycota, Microsporidia in Neocallimastigomycota (Watkinson in sod. 2008).

Glive so heterotrofni organizmi, kar pomeni da niso zmožni sami proizvajati hrane, zato za svojo rast uporabljajo energijo, ki je shranjena bodisi v rastlinski ali živalski biomasi (Watkinson in sod. 2008). Med heterotrofne organizme gliv ne uvrščamo le na podlagi energetske preskrbe in presnove ogljika, vendar tudi glede prehranjevanja z dušikovimi spojinami in ostalimi hranili. Kot gradnik celične stene prevladuje aminopolisaharid hitin, vseeno pa lahko pri določenih skupinah srečamo polisaharide: celuloza, manan in glukoz in beljakovine (Batič in sod. 2009). Prehranjujejo se predvsem z absorpcijo hranil. Živijo lahko saprofitsko, parazitsko ali simbiotsko. Saprofiti ali gniloživke so glive, ki razkrajajo in se hranijo z ostanki odmrlih organizmov. Hrano pridobivajo z razkrojem snovi, bogatih z ogljikom in dušikom, ki jih nato absorbirajo. Parazitske glive zajedajo na ostalih organizmih in se prehranjujejo s hranili njihovih celic. Simbiotske glive pa živijo v sožitju z drugimi organizmi in ne povzročajo škode svojemu gostitelju. Primer je sožitje z višjimi rastlinami v t.i. mikorizi, pri kateri pride do izmenjave vode in anorganskih snovi (zlasti fosfata, kalija, natrija in kalcija) med hifami gliv in koreninami dreves, obenem pa glive rastline varujejo pred zajedavci in povečujejo imunost dreves proti strupenim snovem, predvsem težkim kovinam (Watkinson in sod. 2008).

Glive imajo obliko steljke, zgrajene iz protoplastov, rizoidnega, brstilnega ali hifnega micelija oz. podgobja (vegetativno telo), ter reprodukcijskih struktur: trosov ali spor in trosnjakov (Batič in sod. 2009).



Slika 1: Zgradba glive (Godec in sod. 2015).

Glede na organizacijski nivo jih ločimo na enocelične, sifonalne ali cenocitske in nitaste ali cenoblastične (Batič in sod. 2009).

Razmnožujejo se zelo raznovrstno in sicer:

- Nespolno (vegetativno): lahko z brstenjem ali razraščanjem s t.i. rizomorfi, ki predstavljajo vrvičaste splete hif, dolge tudi več metrov; ali z raznimi vrstami trosov. Spore delimo glede na njihov nastanek, jedrne faze in vrsti kateri pripadajo. Spore, ki nastajajo v sporangijih, imenujemo endospore, tiste ki nastajajo na sporangijih pa ekospore. Nespolno se razmnožujejo zlasti s tvorbo konidijev ali konidiospor, ki nastajajo v procesu mitoze in so predvsem enocelične eksospore (Money, 2016).
- Spolno: s somatogamijo, pri kateri se gradniki primarnega micelija - enojedrne hife, združijo in tvorijo dvojedrne hife. Proces je značilen za prostotrošnice ali *Basidiomycota*. Poleg somatogamije je lahko prisotna tudi gametangiogamija, kjer se združujejo gametangiji. Pri glivah se za poimenovanje ženskih gametangijev namesto izraza arhegonij uporablja oogon pri odprtotrošnicah ali askogon pri zaprtotrošnicah, moški anteridij pa spermatogonij ali spermogon (Batič in sod. 2009).

Pri mnogih predstavnikih se pojavlja menjava generacij, metageneza, pri kateri prihaja do menjave med nespolno (anamorf) in spolno (teleomorf) generacijo ali obliko. Skupaj tvorita obliko holomorf. Nadalje lahko osebke, pripadajoče spolni generaciji, delimo še glede na regulacijo spolnega razmnoževanja, in sicer na homotalične in heterotalične vrste. Dejavnik ločevanja je genetska kompatibilnost med osebki – homotalične vrste so zmožne križanja med dvema miceliji, ki so nastali iz identičnih hif, mejospor, itd., torej micelija, ki predstavljata dva klona. Križanje pri heterotaličnih glivah pa je omejeno z genetsko inkompatibilnostjo, kjer uspešnost reprodukcije določa en ali več parov alelov. Da bo reprodukcija uspešna, je nujno, da sta micelija oz. hife nastala iz mejospor, ki se genetsko razlikujejo med seboj, saj se v nasprotnem primeru jedra z enako genetsko zasnovno odbijajo in zlitje gametangijev, steljke oz. hif ni mogoče (Batič in sod. 2009).

Entomopatogene glive so organizmi, ki so skozi evolucijo razvili sposobnost izkoriščanja žuželk za samoohranitev. Pri različnih vrstah entomopatogenih gliv srečamo veliko raznolikosti med morfološkimi, filogenetskimi in ekološkimi lastnostmi. Entomopatogene glive so razporejene v pet od sedmih debel gliv: *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota*, *Blastocladiomycota* in *Microsporidia* (Araújo in Hughes 2016).

Znotraj debel veljajo *Oomycota*, *Microsporidia*, *Chytridiomycota*, "Zygomycetes", *Basidiomycota* in *Ascomycota* za glavne skupine entomopatogenih gliv (Araújo in Hughes 2016). Mednje uvrščamo tudi deblo *Oomycota* ali vodno plesen, ki sicer velja za algo in

spada v kraljestvo Stramenophila, vendar je ekološko in morfološko izjemno podobna glivam (Araújo in Hughes 2016).

Entomopatogene glive in vodna plesen veljajo za parazite, ki kot svojega gostitelja okužijo velik razpon vrst žuželk, od vodnih ličink do odraslih žuželk. Pojavljajo se v habitatih vse od visokih krošenj dreves v tropskih gozdovih do puščav. Njihovi gostitelji so razporejeni v 20 od 31 redov žuželk. Pojavljajo se v vseh razvojnih fazah: jajčecih, ličinkah, bubah, nimfah in odraslih. S tako raznolikostjo gostiteljev in niš, ki jih zasedajo, so skozi evolucijo razvile neverjetno raznolikost v morfologiji in sami biodiverziteti vrst, ki še dan danes ostaja po večini neodkrita (Araújo in Hughes 2016).

Za entomopatogene glive je značilno, da večina vrst prehaja skozi hitinski eksoskelet žuželk. Po vstopu v žuželče telo slive nekaterih skupin, kot na primer *Metarhizium* and *Beauveria* iz redu Hypocreales (deblo Ascomycota) v žuželkinem telesu rastejo in se razvijajo v kvasovkam podobnih oblikah hif, ki se razmnožujejo z brstenjem. Nekatere vrste, ki jih srečamo znotraj debela Entomophthoromycota, producirajo protoplaste (celice brez celičnih sten). Vrste znotraj debela Oomycota, Chytridiomycota in rodu *Entomophthora* napadajo listne uši, in so znane po tem da v telesu žuželke zrastejo v obliki hifnih filamentov (Araújo in Hughes 2016).

Večina vrst entomopatogenih gliv svojega gostitelja ubije pred začetkom produkcije spor oz. v tako imenovani hemibiotrofni fazi, v kateri prebivajo znotraj tkiv gostitelja in uporabljajo njegova hranila, brez da bi gostitelja ubili. Vse vrste znotraj debela Oomycota svojega gostitelja ubijejo pred prenosom svojih spor. Nekaj vrst gliv je tudi biotrofnih - sem uvrščamo predvsem vrste iz debela Entomophthoromycota, ki svoje spore producirajo na truplih svojih gostiteljev (Araújo in Hughes 2016).

Vse vrste entomopatogenih gliv in vodne plesni se prenašajo s pomočjo spor. Ločimo dva tipa spor: spolne in nespolne spore. Spolne spore glive aktivno sproščajo v okolje. Chytridiomycota in Oomycota za svoje razmnoževanje uporabljajo zoospore, ki so gibljive in se premikajo oz. plavajo s pomočjo bička, pritrjenega na njeno telo. Pri ostalih skupinah pa so spolne spore poimenovane na podlagi pripadanja skupini, torej »Zygomycetes« ima (zigo)spore, Basidiomycota ima (bazidio)spore, Ascomycota ima (asko)spore in tako dalje. Pri vsaki izmed vrst spor so prisotne unikatne lastnosti. Na drugi strani pa imamo nespolne spore ali konidije (ime se uporablja za vse taksone), ki se pogosto pasivno prenašajo. V namene klasifikacije in sistematike gliv je bila morfologija spor in njihova kaljivost ena izmed ključnih lastnosti za razvrščanje in medsebojno razlikovanje različnih skupin gliv (Araújo in Hughes 2016).

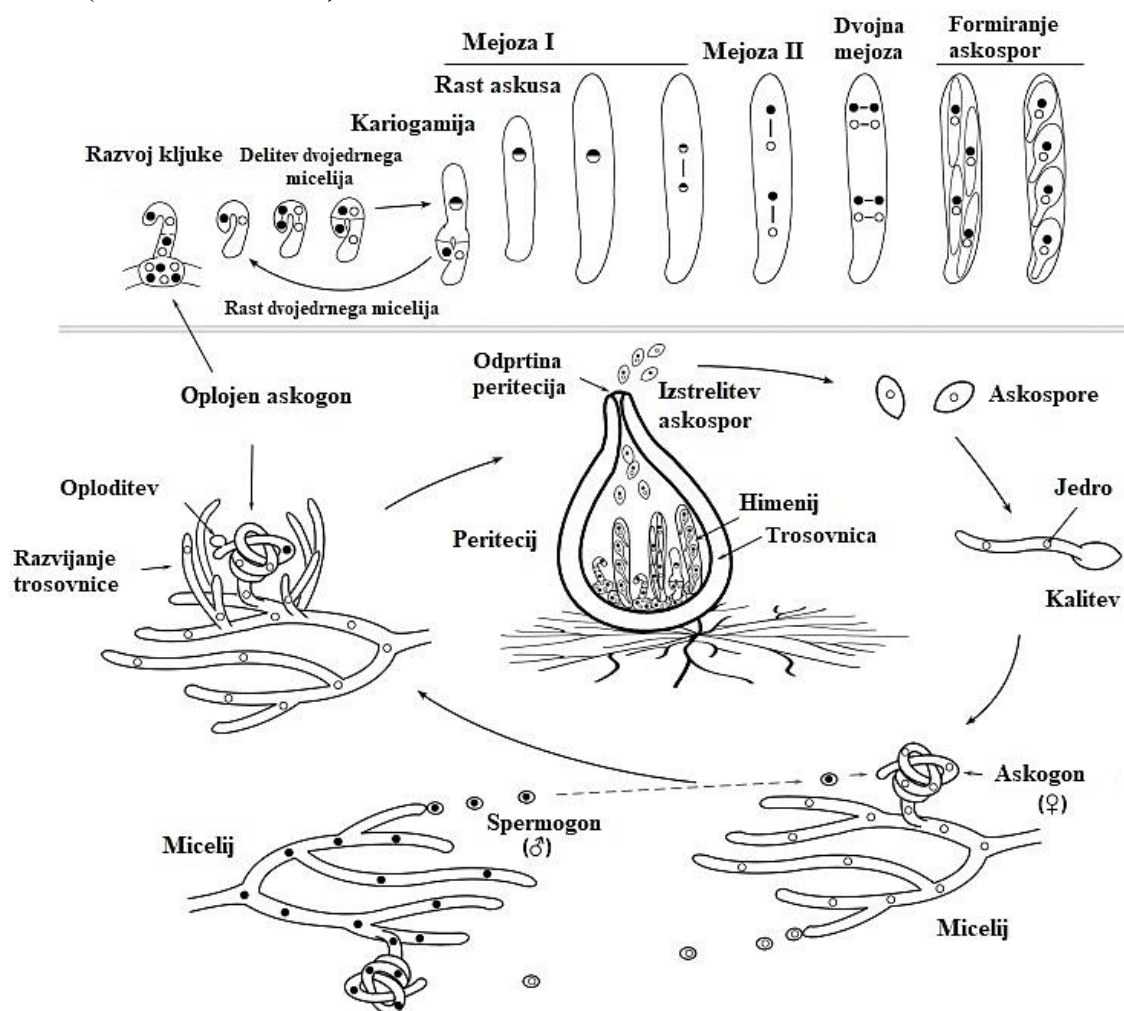
Deblo Ascomycota (askomicete) ali zaprtotrošnice velja za eno največjih skupin v sklopu kraljestva gliv, z okoli 64,000 opisanimi vrstami. V sklopu debela srečamo visok delež ekološke raznolikosti; zasledimo lahko razkrojevalce, rastlinske, živalske in človeške

patogene, prav tako pa so znani po zmožnosti tvorbe simbiotskih odnosov (npr. lišaji) (Araújo in Hughes 2016).

Večina vrst je nitastih (nitaste oblike) in proizvajajo septirane (večcelične) hife. Veliko vrst je znanih le kot nespolne glive, t.i. anamorf, ki na nespolnih trosiščih proizvajajo nespolne spore ali konidije. Pokončno hifo, na kateri nastajajo konidiji in omogočajo lažje razširjanje, imenujemo konidiofor. Spolni organ, ki ga tvorijo zaprtotrošnice imenujemo askokarp. Askokarp obsega apotecij, ki je odprto trosišče in je navadno čašaste ali diskaste oblike z aski in parafizami, ter peritecij, prav tako trosišče, ki je lahko okrogel, vrečast ali podolgovat in ima na zgornjem delu odprtino. Obsega tudi kleistotecij, to je trosišče, komaj vidno s prostim očesom. Njegovi trosi se sprostijo, ko se stena pretrga. Askokarp vsebuje aske ali askuse. Ask je reproduktivni organ oz. vrečasta celica, ki se pojavlja v okrogli do podolgovati ali cilindrični vrečasti strukturi oz. mešičku. V mešičku nastajajo trosi – askospore. Po procesu mejoze v asku običajno nastane osem askospor. Septe oz. pregrade med hifami zaprtotrošnic imajo za razliko od ostalih debel eno samo poro na sredini pregrade. Pri poddeblu *Pezizomycotina*, ki predstavlja 90% debla *Ascomycota*, so prisotni mobilni organeli oz. mikrotelesa t.i. Woronijeva telesa. Njihova funkcija je odstranjevanje poškodovanih delov hif, tako da iz obeh strani zamašijo pore na septah in tako preostali koloniji omogočajo nadaljnjo rast. Woronijeva telesa so velika od 100 nm do 1 μ m in predstavljajo obliko peroksisoma (Watkinson in sod. 2008).

Življenjski cikel zaprtotrošnic se prične s kaljenjem spor oz. trosov. Izid kalitve spor je primarni micelij (vegetativno telo glive), ki je haploiden in je lahko moškega ali ženskega spola. Primarni micelij oz. hife t.i. monokariotične hife se množijo v in po substratu, dokler ne srečajo micelija iste vrste, vendar drugega spola. Hife nadalje prepleteno rastejo, celice pa ostanejo enojedrne, saj se za razliko od *Basidiomycota* ali prostotrošnic ne združijo ob stiku. Nato se ob nastopu ustreznih pogojev, ko je temperatura tal dovolj visoka in količina vode zadostna, začne oploditev. Na površini substrata se razvijejo trosnjaki, zgrajeni iz prepletenih primarnih (enojernih) micelijev. Primarno se pojavijo kot preplet hif, kasneje kot primordij (droben vlaknast izrastek). Naposled se razvije trosnjak. Himenij je trosovnica, kjer nastajajo spore – askospore. Pravimo mu tudi plodno tkivo na plodišču. V himeniju se krajne celice hif, moškega in ženskega spola, odebelijo in razvijejo se reprodukcijske strukture. Moške celice ustvarjajo strukturo spermatogonij oz. spermogon, ženske celice pa askogon. Pri obeh spolih se v delih, kjer so odebeljene, pričnejo zbirati haploidna jedra. Zatem se spermogon in askogon združita v ozkem kanalu t.i. trihogina. Nato se na vrhni strani ženskih celic pojavijo izbokline. Sledi plazmogamija, proces pri katerem se moška in ženska celica združita. Dvojedrne ali askogene hife, ki vsebujejo eno žensko in eno moško jedro začnejo rasti iz askogona. Nastopi naslednja faza življenjskega cikla, in sicer sporulacija, ki predstavlja proces nastajanja spor. Z združitvijo celic nastane dvojedrni micelij. Njegove krajne hife se začnejo ukrivljati v obliko ribiškega trnka. Med ukrivljanjem

se jedri delita in en par ostane v zgornjem delu. Ustvari se mešiček, ki se nato večja, v njem pa se razvijejo dvojedrni aski. Zatem se jedri v procesu kariogamije združita in nastane diploidno jedro. Sledi dvojna zaporedna mejoza; v asku so sedaj štiri jedra, po kasnejši mitotzi pa osem askospor s haploidnimi jedri. Kadar spore zapustijo aske, se cikel zaključi in ponovi (Batič in sod. 2009).



Slika 2: Življenjski cikel s spolnim razmnoževanjem debla Ascomycota (prirejeno po Peraza-Reyes in Berteaux-Lecellier 2013).

Zaprto trosnice se lahko razmnožujejo tudi vegetativno oz. nespolno. Tedaj hife, ki se pojavljajo na površini trosnjakov, pri septah razpadejo na več posamičnih celic ali konidijev in se s pomočjo živali ali vetra raztrosijo po okolju. Ob pristanku konidija na optimalen substrat se iz njega oblikuje nov micelij (Watkinson in sod. 2008)

Veliko vrst zaprtotrosnic ima v svojem življenjskem ciklusu dobro razvito parazitsko fazo, med katero okuži svojega gostitelja. Po smrti svojega gostitelja ostane v njegovem truplu, kjer se začne saprofitsko (hemibiotrofno) prehranjevati ter si s tem zagotovi nadaljnjo proizvodnjo in rast hif (Araújo in Hughes 2016).

Zaprto trosnice napadajo širok spekter gostiteljev. Deblo vključuje raznolike vrste patogenov na žuželke, od Pleosporales, Myriangiales, in Ascospaerales, ki imajo malo vrst, do

največje skupine entomopatogenov, red Hypocreales (Araújo in Hughes 2016). Slednji vključuje šest rodov: *Moelleriella* (25 vrst), *Ophiocordyceps* (19 vrst), *Torrubiella* (18 vrst), *Cordyceps* (17 vrst), *Samuelsia* (6 vrst) in *Regiocrella* (2 vrsti). Poleg naštetih rodov, k redu Hypocreales vključujemo še veliko anamorfnih vrst, ki producirajo le nespolne spore. Te spadajo v rodove: *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Hymenostilbe*, *Akanthomyces* in mnogo drugih. Anamorfne vrste veljajo za aseksualno fazo v sklopu Ascomycota (Araújo in Hughes 2016).

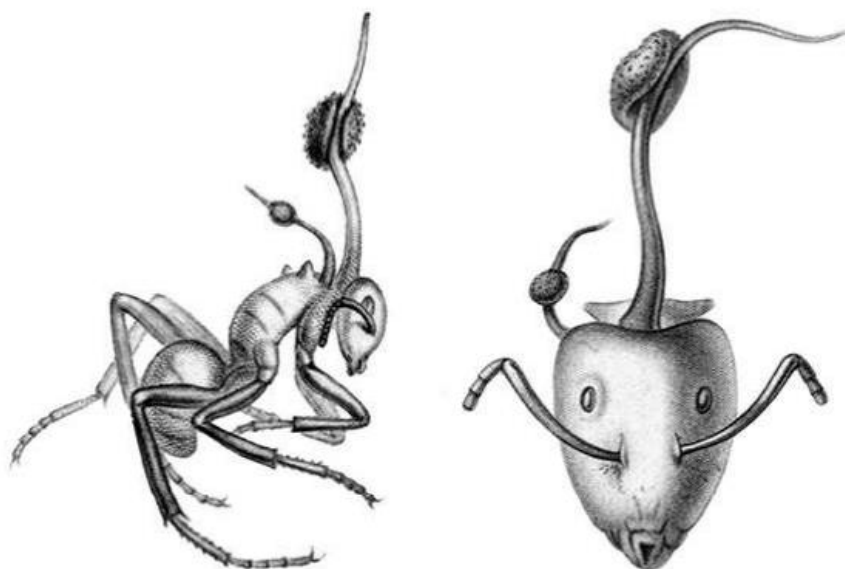
3 ZGODOVINA RAZISKOVANJA PARAZITA

Rod *Cordyceps* Fr. je leta 1818 ustanovil švedski mikolog in botanik Elias Magnus Fries. Ustanovil ga je z namenom, da bi vanj vključil vrste askomicetnih oz. patogenih gliv znotraj zaprtotrosovnic, ki napadajo skupine členonožcev. Pomemben razlikovalni znak za uvrstitev v rod so spolne strukture, ki v himeniju (trosovníku) proizvajajo spore ali askospore v ali na stromi - na palčki podobni strukturi, ki izrašča iz telesa gostitelja (Evans in sod. 2011a). Rod *Cordyceps* uvrščamo v družino *Clavicipitaceae*. Od preostalih rodov znotraj družine se loči po produkciji peritecijev na površini ali povsem obdanimi s tkivom glive, ter klavatni obliki strome. Klasifikacija rodu je temeljila predvsem na taksonomskih raziskavah, ki sta jih opravila Kobayasi leta 1941 in 1982 ter Mains leta 1985. Kobayasi je rod na podlagi razporeditve peritecijev in morfologije askov ter askospor razdelil na tri podrodove, in sicer: *Cordyceps*, *Ophiocordyceps*, in *Neocordyceps*. Mains je nato leta 1985 dodal še dva podroda - *Racemella* in *Cryptocordyceps*. Zadnji dodatek se je zgodil leta 1986, ko je Eriksson dodal podrod *Bolacordyceps* (Luangsa-ard in sod. 2018).

Z željo po preveritvi in morebitnih spremembah, so raziskovalci Artjariyasripong, Sung in Stensrud med letoma 2001 in 2005 izvedli več filogenetskih raziskav, pri katerih so ustreznost klasifikacije preverjali z uporabo ribosomske DNA. Raziskave so se zaradi pomanjkanja vzorcev dovoljšnjega števila taksonov in nezadostnih razlik v ribosomskem DNA izkazale za neuspešne (Sung in sod. 2007). Korak v pravo smer sta naredila Spatafora in Sung leta 2007, ko sta ugotovila, da tako družina *Clavicipitaceae*, kot rod *Cordyceps*, nista monofiletska. Na podlagi novih ugotovitev je Sung predlagal, da se družina *Clavicipitaceae* loči v tri monofiletske družine, in sicer *Clavicipitaceae*, *Cordycipitaceae* in *Ophiocordycipitaceae* (Sung in sod. 2007).

Rod *Ophiocordyceps* je prvič opisal britanski mikolog Tom Petch leta 1931, z namenom da bi vanj uvrstil vrste z debelostenskimi aski in askosporami klavatne oblike, ki ne fragmentirajo na manjše dele. Te so sprva spadale v rod *Cordyceps* (Evans in sod. 2018).

Vrsto *Ophiocordyceps unilateralis* je leta 1856 odkril britanski naravoslovec Alfred Russel Wallace. Prva sta jo opisala oz. poimenovala brata Tulasne leta 1865. Prvotno je bila opisana kot *Torrubia unilateralis* Tul.. Louis Tulasne je glivo opisal kot mesnato, polkroglo stromo, ki je enostransko nameščena na steljki. Podatkov o askih oz. askosporah ni priložil. Njegov brat Charles Tulasne pa je glivo ilustriral. Skupaj s podatki o glivi je bila ilustracija objavljena v lastni publikaciji "Selecta fungorum carpologia". Gostitelja, torej mravljo, sta opisala kot vrsto *Atta cephalotes*, kar se je kasneje izkazalo za napačno določitev (Araújo in sod. 2018).



Slika 3: Ilustracija vrste *O. unilateralis* v publikaciji “Selecta fungorum carpologia” (Tulasne in Tulasne 1861).

Leta 1883 je italijanski botanik in mikolog Pier Andrea Saccardo glivo uvrstil v rod *Cordyceps* in jo hkrati preimenoval v *Cordyceps unilateralis* (Tul.) Sacc.. Ob opisu novega rodu *Ophiocordyceps* leta 1931, je bila s strani mikologa Toma Petcha gliva ponovno premeščena in preimenovana v ime, ki velja še danes: *Ophiocordyceps unilateralis* (Tul.) Petch (Evans in sod. 2018).

Od prvega pojava glive *Ophiocordyceps unilateralis* v znanstvenih objavah je do danes preteklo 156 let. Kljub temu, da je vrstna diverziteta rodu *Ophiocordyceps* ocenjena na vsaj 850 vrst po celem svetu, je bilo zaradi pomanjkanja podatkov in raziskav, v vseh preteklih 156 letih, opisanih le borih 140 vrst (Kobmoo in sod. 2019).

4 TAKSONOMIJA

Vrsto *Ophiocordyceps unilateralis* uvrščamo v kraljestvo Fungi (glive), deblo Ascomycota (zaprtotrosnice), družino *Ophiocordycipitaceae* in rod *Ophiocordyceps* (Sung in sod. 2007). Podrobnejša znanstvena klasifikacija je prikazana v preglednici 1.

Preglednica 1: Znanstvena klasifikacija vrste *Ophiocordyceps unilateralis*

Domena	Eukaryota (evkarionti)
Kraljestvo	Fungi (glive)
Deblo	Ascomycota (zaprtotrosnice)
Razred	Sordariomycetes
Red	Hypocreales
Družina	<i>Ophiocordycipitaceae</i>
Rod	<i>Ophiocordyceps</i>
Vrsta	<i>Ophiocordyceps unilateralis</i>

4.1 *Ophiocordyceps unilateralis* sensu lato

Že od samega začetka raziskovanja so znanstveniki opazili variabilnost v morfologiji osebkov omenjene glive. Do razlik je prihajalo tako pri spolni (teleomorf) kot pri nespolni (anamorf) obliki. Veliko znanstvenikov je trdilo, da prihaja do razlik zaradi geografske izoliranosti oz. izoliranosti gostiteljev. Nekateri pa so namigovali, da je v resnici prisotnih več vrst (Evans in sod. 2018). Leta 1984 sta H. Evans in R. Samson v znanstvenem članku “*Cordyceps* species and their anamorphs pathogenic on ants (*Formicidae*) in tropical forest ecosystems II. The *Camponotus* (*Formicinae*) complex” želela znotraj vrste ločiti več ekotipov, s katerimi bi bilo razločevanje med posameznimi “oblikami” lažje. Vendar za ločitev niso imeli dovoljšnega števila podatkov glede specifičnosti za gostitelja in samega razpona variacij med osebki, ki se pojavljajo v zmernih, subtropskih in tropskih habitatih (Evans in Samson 1984). Kljub neuspehu so se skozi leta nabirali dokazi, da gre v resnici za kompleks vrst. V novejših znanstvenih člankih se je začelo uporabljati ime *Ophiocordyceps unilateralis* sensu lato, s čimer so nakazovali da se ime *Ophiocordyceps unilateralis* uporablja v širšem pomenu (Kobmoo in sod. 2019).

Z željo po odkritju taksonomske diverzitete vrste in razlagi variabilnosti med osebki, je Evans s sodelavci leta 2011 pričel z obsežnim nabiranjem svežih osebkov v Atlantskem gozdu v Braziliji in raziskovanjem le teh. Identificirali so štiri vrste mravelj iz rodu *Camponotus* na katerih so temeljito opazovali morfologijo askospor glive in njihovo kalitev. Rezultat je bilo odkritje štirih novih vrst iz kompleksa vrste *Ophiocordyceps unilateralis*. Poleg predstavitve novih vrst, so v znanstvenem članku “Hidden diversity behind the zombi-ant fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four new species described from Carpenter ants in

Minas Gerais, Brazil” predstavili hipotezo, ki trdi, da vsako vrsto mravelj iz plemena Camponotini lahko napadajo različne vrste znotraj kompleksa, in da v njem lahko obstaja na stotine vrst po vsem svetu (Evans in sod. 2011a). Hipoteza se je z leti izkazala kot pravilna, saj je bilo odkritih vedno več vrst. Leta 2011 je Kepler s sod. odkril novo vrsto na Japonskem (Kepler in sod. 2011). Med leti 2011 in 2015 sta Kobmoo in Luangsa-ard s sodelavci na Tajskem odkrila šest novih vrst (Luangsa-Ard in sod. 2011, Kobmoo in sod. 2012). Leta 2015 je Araújo s sod. odkril še tri nove v Braziliji (Araújo in sod. 2015). Z raziskovanjem so nadaljevali na štirih kontinentih in leta 2018 doživeli največje odkritje, pri katerem so odkrili petnajst novih vrst. Ugotovljeno je bilo, da klad *O. unilateralis* predstavlja monofiletsko skupino, ki obsega skupno 23 vrst in njegov podklad *O. kniphofioides*, ki obsega dve vrsti (Araújo in sod. 2018).

Seznam vrst iz *Ophiocordyceps unilateralis* kompleksa/klada:

1. *Ophiocordyceps albacongiuae* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
2. *Ophiocordyceps blakebarnesii* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
3. *Ophiocordyceps camponoti-atricipis* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
4. *Ophiocordyceps camponoti-balzani* H.C. Evans in D.P. Hughes
5. *Ophiocordyceps camponoti-bispinosi* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
6. *Ophiocordyceps camponoti-chartificis* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
7. *Ophiocordyceps camponoti-femorati* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
8. *Ophiocordyceps camponoti-floridani* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
9. *Ophiocordyceps camponoti-hippocrepididis* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
10. *Ophiocordyceps camponoti-leonardi* Kobmoo, Mongkolsamrit, Tasanathai, Thanakitpipattana in Luangsa-ard
11. *Ophiocordyceps camponoti-nidulantis* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
12. *Ophiocordyceps camponoti-renggeri* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
13. *Ophiocordyceps camponoti-rufipedis* H.C. Evans in D.P. Hughes
14. *Ophiocordyceps camponoti-saundersi* Kobmoo, Mongkolsamrit, Tasanathai, Thanakitpipattana in Luangsa-ard
15. *Ophiocordyceps camponoti-sexguttati* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
16. *Ophiocordyceps halabalaensis* Luangsa-ard, Ridkaew, Tasanathai in Hywel-Jones
17. *Ophiocordyceps kimflemingiae* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
18. *Ophiocordyceps naomipierceae* Araújo, R. Shivas, S. Abell, T. Marney, H.C. Evans in D.P. Hughes
19. *Ophiocordyceps ootakii* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
20. *Ophiocordyceps polyrhachis-furcata* Kobmoo, Mongkolsamrit, Tasanathai, Thanakitpipattana in Luangsa-ard
21. *Ophiocordyceps pulvinata* Kepler, Kaitsu in Spatafora
22. *Ophiocordyceps rami* Kobmoo, Mongkols., Tasan., Thanakitp. in Luangsa-ard

23. *Ophiocordyceps satoi* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes

Seznam vrst iz podklada *Ophiocordyceps kniphofioides*:

1. *Ophiocordyceps daceti* Araújo, H.C. Evans in D.P. Hughes
2. *Ophiocordyceps oecophyllae* Araújo, S. Abell, T. Marney, R. Shivas, H.C. Evans in D.P. Hughes

Danes se v znanstveni literaturi za poimenovanje vrste uporablja tako *Ophiocordyceps unilateralis* sensu lato kot tudi samo *Ophiocordyceps unilateralis*. V zaključni nalogi bom uporabljala ime *Ophiocordyceps unilateralis*.

4.1.1 Značilnosti vrst znotraj *O. unilateralis* kompleksa

V preglednici 2 so zapisane glavne značilnosti posameznih vrst znotraj kompleksa. Navedeni podatki so: gostitelj, položaj smrti, velikost askospor, oblika nespolne oblike oz. *Hirsutella* tip-A, tip-B in tip-C (razlage so zapisane v poglavju morfolologija) ter razširjenost.

Preglednica 2: Primerjava morfoloških značilnosti, gostitelja in distribucije med vrstami znotraj *Ophiocordyceps unilateralis* kompleksa (J. P. M. Araújo idr., 2018)

Zap. št.	Vrsta	Gostitelj	Položaj smrti	Velikost askospor (µm)	Hirsutella tip			Razširjenost
					A	B	C	
1.	<i>O. albacongiuae</i>	<i>Camponotus</i> sp.	Ugriznjena v epifite	80–100 × 5				Kolumbija
2.	<i>O. blakebarnesii</i>	<i>Camponotus</i> sp.	Ugr. v drevesno skorjo	140–160 × 4	x			ZDA (Misuri)
3.	<i>O. camponoti-atricipis</i>	<i>C. atriceps</i>	Ugr. v list	80–85 × 3	x			Amazonski pragozd
4.	<i>O. camponoti-balzani</i>	<i>C. balzani</i>	Ugr. v list	135–174 × 4–5	x	x		Atlantski gozd
5.	<i>O. camponoti-bispinosi</i>	<i>C. bispinosus</i>	Ugr. v tm	70–75 × 4,5	x			Amazonski pragozd
6.	<i>O. camponoti-charificis</i>	<i>C. charifex</i>	Ugr. v list	75–85 × 5	x			Amazonski pragozd
7.	<i>O. camponoti-femorati</i>	<i>C. femoratus</i>	Ugr. v list/tm	75–90 × 3	x			Amazonski pragozd
8.	<i>O. camponoti-floridani</i>	<i>C. floridanus</i>	Ugr. v list	75–90 × 4–5	x			ZDA (Florida)
9.	<i>O. camponoti-hippocrepidis</i>	<i>C. hippocrepis</i>	Ugr. v tm	75–85 × 4–5	x			Amazonski pragozd
10.	<i>O. camponoti-leonardi</i>	<i>C. leonardi</i>	Ugr. v list	110–125 × 2–3	x			Tajska
11.	<i>O. camponoti-nidulantis</i>	<i>C. niduland</i>	Ugr. v mlado drevo	90–105 (–115) × 3–4	x	x		Amazonski pragozd
12.	<i>O. camponoti-renggeri</i>	<i>C. renggeri</i>	Ugr. v list/mah	90–120 × 4		x		Amazonski pragozd

Zap. št.	Vrsta	Gostitelj	Položaj smrti	Velikost askospor (µm)	Hirsutella tip			Razširjenost
					A	B	C	
13.	<i>O. camponoti-rufipedis</i>	<i>C. rufipes</i>	Ugr. v list	80–95 × 2–3	x			Atlantski gozd
14.	<i>O. camponoti-saundersi</i>	<i>C. saundersi</i>	Ugr. v list	75–85 × 2–3	x			Tajska
15.	<i>O. camponoti-sexguttati</i>	<i>C. sexguttatus</i>	Ugr. v list	120–140 × 3	x			Atlantski gozd
16.	<i>O. halabalaensis</i>	<i>C. gigas</i>	Ugr. v list	60–75 × 3–5	x			Tajska
17.	<i>O. kinfflemingiae</i>	<i>C. castaneus</i>	Ugr. v vejo	80–90 × 5	x	x		ZDA (Južna Karolina)
18.	<i>O. naomipierceae</i>	<i>Polyrhachis cf. robsonii</i>	Ugr. v list	75–105 × 5–6	x		x	Avstralija
19.	<i>O. ootakii</i>	<i>Polyrhachis sp.</i>	Ugr. v list	85–100 × 3	x			Japonska
20.	<i>O. polyrhachis-furcata</i>	<i>P. furcata</i>	Ugr. v list	90–100 × 2–3	x			Tajska
21.	<i>O. pulvinata</i>	<i>C. obscuripes</i>	Ugr. v vejo	220–300 × 9–19				Japonska
22.	<i>O. rami</i>	<i>P. furcata</i>	Ugr. v vejo	200–215 × 2–3	x			Tajska
23.	<i>O. satoi</i>	<i>Polyrhachis sp.</i>	Ugr. v vejo	85–100 × 4	x			Japonska

5 MORFOLOGIJA

Vrste znotraj *O. unilateralis* kompleksa povezuje veliko makro morfoloških lastnosti, po katerih jih enostavno prepoznamo. Najlažje jih prepoznamo po razmnoževalni strukturi, ki zraste iz trupla mravlje. Ko je mrtva mravlja trdno pritrjena na list, ji iz hrbtne strani glave požene temno obarvana stroma. Kaže se v obliki palčke in predstavlja gost preplet hiv, na katerem se kasneje razvije trosišče oz. peritecij. Peritecij predstavlja spolni organ oz. obliko (teleomorf) in zraste tik pod vrhom strome na bočni strani. Je okroglo trosišče v katerem nastajajo aski - mešički v katerih se razvijajo velike (od 80 do 200 μm dolge), multiseptalne spolne spore t.i. askospore (Araújo in sod. 2018). Poleg glavnih značilnosti, ki vrste povezujejo med seboj, srečamo pri vsaki tudi unikatne mikro morfološke lastnosti. Ključna lastnost, po kateri ločujemo posamezne vrste je morfologija askospor, kjer upoštevamo velikost, obliko, septiranost in proces kalitve. Manj pomembna znaka sta položaj smrti (ugriznjenost v list, skorjo drevesa itd.) in morfologija nespolnih (anamorf) oblik (Araújo in sod. 2018).



Slika 4: Izraščanje vrste *Ophiocordyceps albacongiuae* iz hrbtne strani glave. Stroma je označena z rumeno puščico, peritecij z modro. Merilo: 0,2 mm (Araújo in sod. 2018).

Pri večini vrst znotraj *O. unilateralis* kompleksa se pojavlja tako spolna (teleomorf) kot nespolna (anamorf) oblika. Spolna se kaže v obliki askov in spolnih spor - askospor, nespolna pa kot nespolne spore oz. konidiji. Obliki se razlikujeta tako v morfologiji kot v funkciji (Ban in sod. 2015).

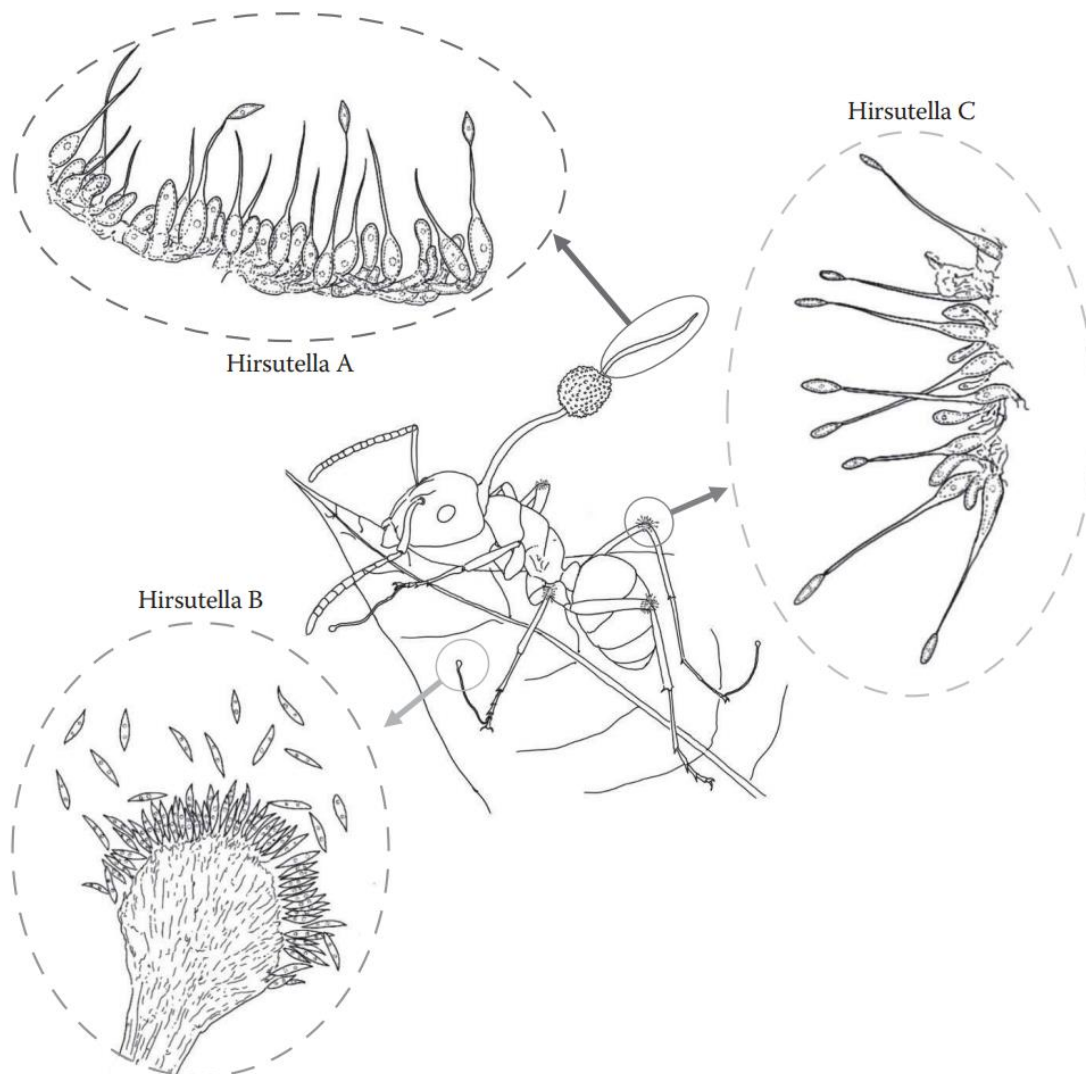


Slika 5: Vrsta *Oecophylla smaragdina*. Na sklepih vidni konidiji in fialidi. Merilo: 1 mm (Araújo in sod. 2018).

Rodovi oz. oblike nespolno razmnožujočih se gliv, ki se pojavljajo pri rodu *Ophiocordyceps* so *Sorospora*, *Syngliocladium*, *Paraisaria*, *Stilbella*, *Hymenostilbe* in *Hirsutella*. Najpogostejša je *Hirsutella*, sledi ji *Hymenostilbe*. Pri obliki *Hirsutella* so konidiogene celice imenovane fialide, ki nosijo konidije lahko bučkaste ali cilindrične oblike; konidiji so lahko eno ali dvocelični, elipsaste ali vretenaste oblike; na koncu fialid lahko tvorijo bazipetalne verižice, lahko pa so prekriti s sluzjo (Araújo in sod. 2018).

Tako anamorfne kot teleomorfne oblike so poimenovane po binarni nomenklaturi. Anamorfna oblika vrste *O. unilateralis* se imenuje *Hirsutella formicarum*. Znotraj rodu *Hirsutella* ločimo tri oblike: *Hirsutella* tip-A, tip-B in tip-C. Pri vrstah znotraj *O. unilateralis* se najpogosteje pojavlja tip-A, za katerega so značilni fialidi v obliki šila, ki imajo na konicah nameščene enojne konidije. *Hirsutella* tip-B, ki ga najdemo pri vrsti *O. camponoti-novogranadensis* se pojavlja na sklepih oz. nogah gostitelja. Predstavlja koremijsko (posebna oblika trosišča, pri kateri so hife združene v pokončen snop) s kroglasto konico oz. glavo. Zadnja oblika je tip-C, ki se pojavlja na sklepih anten in nog pri vrstah *O. camponoti-renggeri*, *O. camponoti-nidulantis*, *O. camponoti-balzani* itd. Producira jih sporodocij (majhna in kompaktna stroma v obliki rjavih blazin) (Araújo in sod. 2018) (Slika 5).

Vloga nespolne oblike še danes ni povsem jasna, vendar se zaradi sluzi, ki se na konidijih pogosto pojavlja, sklepa, da služijo kot kontaktne spore, ki se prilepijo na mravlje (Araújo in sod. 2018).



Slika 6: Različne oblike rodu *Hirsutella* (Dighton in White 2017) .

6 ŽIVLJENJSKI KROG

Razumevanje in poznavanje življenjskega kroga parazita in njegove ekologije je ključnega pomena za interpretiranje razvoja koevolucije med gostitelji in paraziti. Prav tako imajo paraziti zmožnost vpliva in kontroliranja dinamike populacij vretenčarjev (Mongkolsamrit in sod. 2012).

Pogosto se osebk, ki so žrtev manipulacije lastnega vedenja s strani parazita, v namene povečanja uspešnosti reprodukcije parazita, pojavljajo v drugačni ekološki niši kot ostali zdravi osebk oz. kolonija. Entomopatogene glive za svojo rast in uspevanje potrebujejo od 94 do 95% vlažnost in povprečno temperaturo od 20 do 30°C, saj lahko temperature, ki presegajo 30°C škodijo glivi. Spremembe vlažnosti imajo lahko tako pozitiven kot negativen vpliv na glivo. Milejša nihanja lahko povzročijo sprožitev sprostitve spor in tako nadaljujejo postopek reprodukcije, izrazitejša (drastična) pa spremenijo klimo v neugodno in tako omejijo rast oz. uspevanje glive (Andersen in sod. 2009).

Gostitelji vrste *Ophiocordyceps unilateralis* so mravlje iz plemena Camponotini, in sicer iz rodu *Camponotus* ali lesne mravlje ter vrste iz rodov, *Polyrhachis* in *Echinopla*. Življenjski prostor naštetih rodov mravelj so visoke krošnje v tropskih klimatih, kjer živijo v kolonijah. V krošnjah je za uspevanje glive klima poleg splošnega vročega in suhega ozračja neugodna zaradi pogostih sprememb (Evans in sod. 2011).

Izrazit dokaz, da glivi klimatske razmere krošenj ne ustrezajo, je postavitve okuženih osebkov oz. njihova premestitev na drugo mesto. V večini primerov so mrtvi osebk mravelj locirani na višini 25 cm od tal na severni ali severozahodni strani lista, kar nakazuje tudi na pomen sončnih žarkov. Redka trupla, ki se pojavljajo na tleh zaradi zunanjih dejavnikov hitro izginejo ali pa jih prekrije odpadlo listje oz. substrat. Posledično se rast glive občutno zmanjša ali v skrajnem primeru popolnoma zaustavi (Andersen in sod. 2009).

Do okužbe oz. stika s sporami največkrat pride v nočnem času, saj je relativno nizka oddaljenost gostitelja ključnega pomena zaradi hitrega upada učinkovitosti spor. Spore so lahko prisotne v substratu, odpadlemu listju, na deblih dreves itd. Ob stiku s sporami glive, se le-te prilepijo na mravljinu kutikulo, kjer pričnejo kaliti in prodirati v telo. Ko gliva uspešno prodre v notranjost organizma, se začne infekcija hitro širiti po celotnem telesu (Mongkolsamrit in sod. 2012).

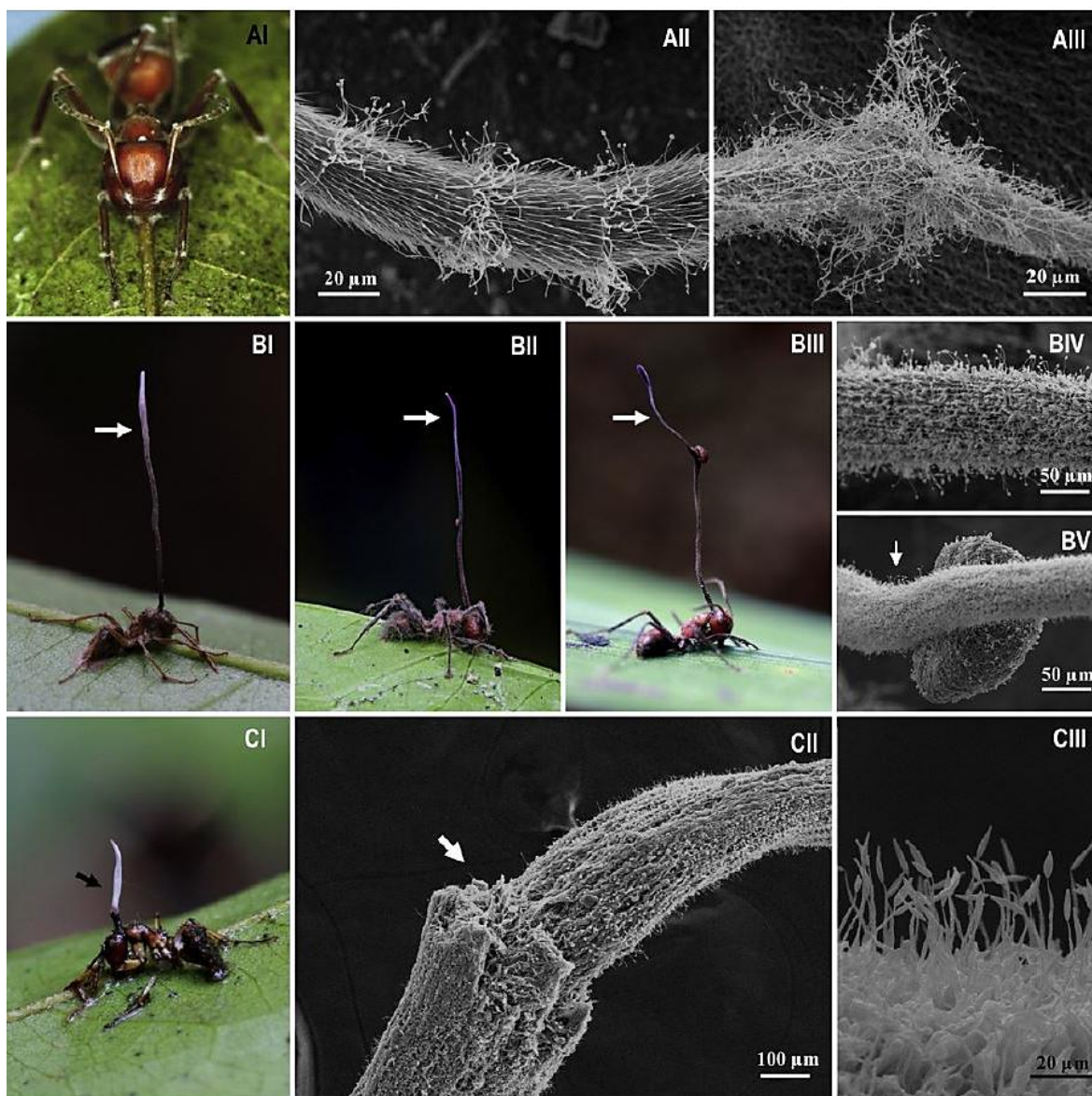
Za učinkovit začetek življenjskega kroga oz. razmnoževanja je bistvenega pomena smrt mravlje, saj lahko reproduktivni organi glive zrastejo šele po njeni smrti. Težava na katero »naleti« gliva, so preostale mravlje v koloniji, saj v kolikor ostale prepoznajo, da je ena izmed njih okužena, jo v najkrajšem možnem času iz kolonije odstranijo tako, da jo iz

drevesa odvržejo na tla gozda. Tako preprečijo širitev okužbe, gliva pa ne bi imela dovolj časa za razvoj reproduktivnih organov in samo reprodukcijo (Evans in sod. 2011).

Pogin mravlje predstavlja začetek ključnega dela življenjskega kroga glive. Gliva telo svojega gostitelja naseljuje in izkorišča skozi svoj celoten življenjski krog, zato je temelj za uspešno rast temeljita priprava trupla. Za čim daljše ohranjanje hranilnih snovi gliva povzroči, da se mravlja trdno pritrdi, tako da z mandibulami močno zagriže v glavno žilo lista na obojni strani, kjer je zaščitena pred močnim sevanjem sončnih žarkov. Gliva iz zunanosti kolonizira s hifami, ki v telo vstopijo skozi tanke intersegmentne membrane, brez da bi vmes kakorkoli vplivala ali poškodovala povrhnjico. S previdnim vstopom v telo zagotovi, da ostaneta eksoskelet in notranje strukture kutikule oz. povrhnjice (npr. tentorium) dobro ohranjeni. Z ohranitvijo organov in dodatno ojačitvijo strukture oz. povrhnjice z razrastjo hif po telesu gliva telo mravlje preoblikuje v nekakšen zaščitni "ovitek", ki bo njene strukture ščitil pred zunanjimi vplivi (Andersen in sod. 2009).

Od okužbe z glivo do ugriza, pri kateremu mravlja tudi umre, preteče le nekaj ur. V roku 24 ur po smrti se na površini mravlje začne razvijati anamorfna oblika – vrsta *Hirsutella formicarum*. Goste gmote belih hif se začnejo zaraščati na nesklerotiziranih delih kutikule, okoli sklepov njenih anten in nog. Rezultat je puhast videz mravlje. Hife poskrbijo za dodatno fiksacijo mravlje na list (Andersen *idr.*, 2009). Bele hife kasneje med procesom sproščanja nespolnih spor ali konidijev porjavijo in tako pridobijo karakteristično rjavo barvo, značilno za vrsto *O. unilateralis* (Mongkolsamrit *idr.*, 2012). Rjavo barvo hif povzročijo rdeči in vijola pigmenti, ki predstavljajo produkte iz različnih naftokinonov. Naftokinoni imajo antibiotične lastnosti, s katerimi se gliva zaščiti pred potencialnim vdorom mikrobov v telo mravlje (Andersen in sod. 2009).

Po 48 urah je v truplu prisotna visoka gostota glivičnega tkiva, njenih hif in kvasovkam podobnih celic. Mišice spodnje čeljustnice mravlje pričnejo kazati znake razpada, vendar so kljub temu še vedno razločne. Med drugim in sedmim dnevom po smrti iz baze mravljinine glave požene stroma bele do rahlo roza barve, velika približno 1 mm (Slika 7: AI). Na tej točki so mišične strukture mravelj še dobro razločne, tudi njena kutikula ne kaže znakov degradacije, saj sta eksoskelet in interna zgradba kutikule, ki skrbita za podporo glave, nedotaknjena (Andersen in sod. 2009). Po treh do štirih dneh od začetka rasti strome, le ta doseže dolžino 3 – 5 mm, celotna mravlja pa je trdno pričvrščena na list in preraščena z gostimi hifami (Mongkolsamrit in sod. 2012).



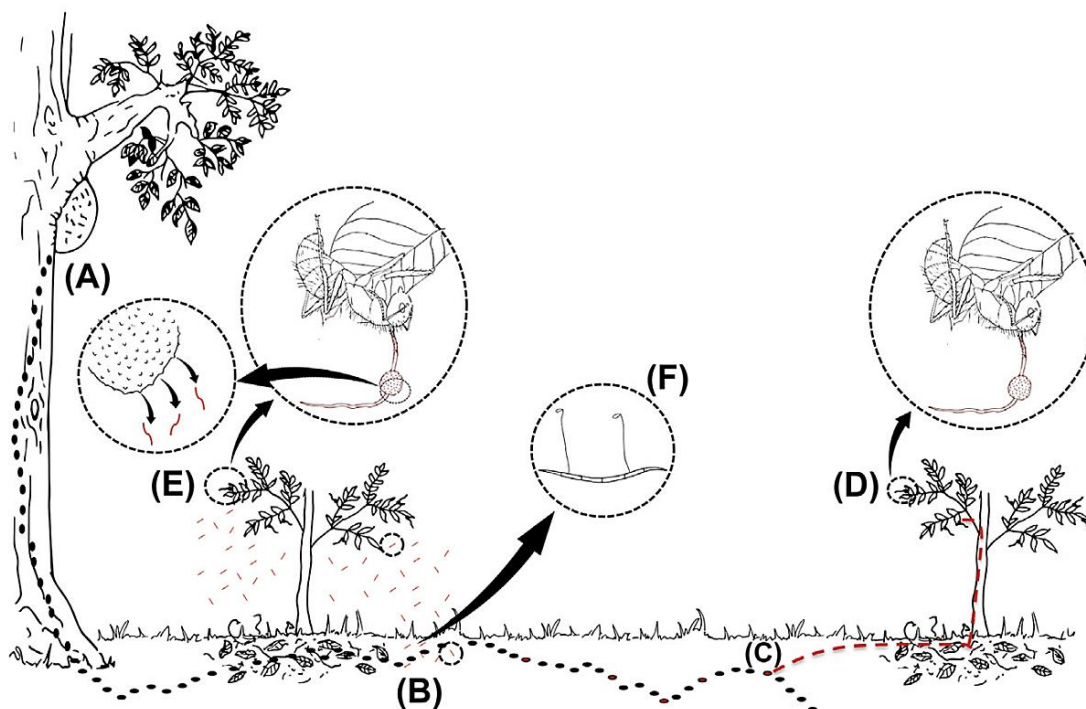
Slika 7: Posamezne faze v življenjskem ciklu *Ophiocordyceps unilateralis*. (AI) bela stroma velika približno 1 mm požene iz baze mravljinke glave. (AII in AIII) mikroskopska slika anamorfnih oblik (*Hirsutella formicarum*) na antenah in nogah mravlje. (BI) s puščico označena stroma. (BII in BIII) rast peritecij. (BIV in BV) mikroskopska slika anamorfnih oblik (*Hirsutella formicarum*) na stromi. (CI) na prelomu je zrastle nova stroma. (CII) mikroskopska slika preloma. (CIII) mikroskopska slika konidijev (Mongkolsamrit in sod. 2012).

Začetek spolne reprodukcije se lahko začne že po sedmih dneh od mravljinke smrti oz. ko stroma doseže dolžino 10 – 12 mm ali podvojeno povprečno velikost mravlje (Slika 7: BI). Anamorfni del glive se skoncentrira na zgornjem delu strome oz. od sredine proti vrhu. Po doseženi končni velikosti na stromi zraste okrogel peritecij (Slika 7: BIII), iz katerega bodo kasneje padle spore. Produkcija konidijev se kljub rasti peritecija nadaljuje in so lahko opazni na površini strome (Slika 7: CIII) (Mongkolsamrit in sod. 2012). Proti koncu življenjskega kroga se tkivo glive »pokrči« in skoncentrira v notranjosti glave. Hife, ki se pojavljajo sočasno s tkivom glive v votlini mravljinke glave, se na notranjost kutikule ne pritrdijo, vendar prosto rastejo. Po minulih dveh tednih od pogina se v mravljinem telesu

poleg splošnega tkiva glive, v zadku pojavi okrogla črna struktura, ki jo obdaja oranžno tkivo. To tkivo se v obliki cevi pojavlja po celotnem telesu, obdaja pa ga belo hifno tkivo, podobno tistemu, ki se pojavlja na zunanosti telesa. Vendar za razliko od tako belega hifnega tkiva in črne strukture, je oranžno tkivo po sestavi veliko bolj bogato z ogljikom, kar nakazuje, da ima specifično vlogo pri shranjevanju energije oz. ogljikovih hidratov in da se vloge različnih tipov tkiv med seboj razlikujejo (Andersen in sod. 2009).

Nespolni del, torej rast hif na zunanosti trupla in nespolno razmnoževanje steče veliko hitreje kot spolni del (stroma in peritecij), in sicer nespolni v nekaj dneh, spolni pa povprečno v enem do dveh tednih po nastopu smrti (Andersen in sod. 2009).

V primeru če se stroma zaradi okoljskih vplivov (veter, živali, nevihte itd.) prelomi in peritecij odpade, gliva ponovno razvije anamorfni del in zraste nov peritecij. Znotraj peritecija so prisotni aski, v katerih se neprestano producirajo askospore (Mongkolsamrit in sod. 2012).



Slika 8: Življenjski krog *Ophiocordyceps unilateralis*. (A) mravlja zapusti kolonijo in sestopi s krošnje. (B) v kontakt pride z askosporami in se okuži. (C in D) okoli 10 dni po okužbi, se mravlja povzpne na glivino željeno lokacijo in trdno zagriže v žilo lista. (E) iz peritecija se sprostijo askospore (F) po pretečenih 24 do 72 ur od sprostitve pričnejo spore kaliti (Araújo in Hughes 2016).

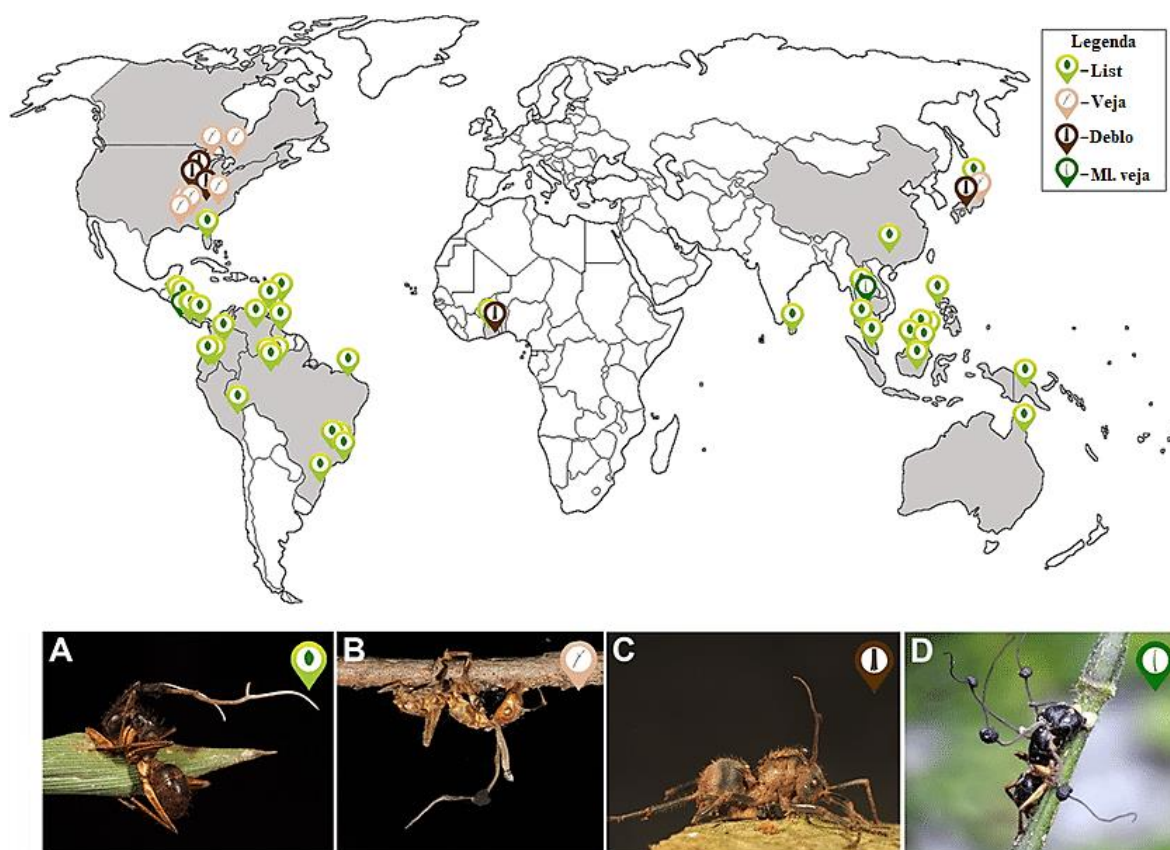
Življenjski krog *Ophiocordyceps unilateralis* obsega torej tri stopnje:

1. okužena mrtva mravlja, ki je z mandibulami pritrdi na spodnjo stran lista (oznaka DA – dead ant ali mrtva mravlja),
2. rast strome iz hrbtne strani glave (oznaka S – stroma) in
3. razvoj trosišča oz. peritecija iz že oblikovane strome (oznaka P – peritecij).

Življenjski krog (cikel DA – S – P) se lahko večkrat ponovi, vendar največ petkrat. V vsakem ciklu lahko stroma zraste do trikrat, peritecij pa lahko največ dvakrat. Večina osebkov gre običajno skozi enega ali dva cikla in razvije le po eno stromo in peritecij. Ugotovljeno je bilo, da osebkovi glive, ki okužijo mravlje iz rodu *Polyrhachis* v primerjavi z mravljami iz rodu *Camponotus*, večkrat ponovijo življenjski cikel. Trajanje posameznega stadija zelo variira, vendar je povprečna dolžina od enega do treh mesecev. Med rodovi mravelj prihaja do velikega odstopanja pri prvem ciklu, in sicer v stadijih DA in S, kjer gliva pri mravljah iz rodu *Polyrhachis* potrebuje veliko dlje za napredovanje v naslednji stadij. Povprečna življenjska doba vrste *Ophiocordyceps unilateralis* znaša 5.50 ± 3.30 mesecev. Med rodovi mravelj ni večjega odstopanja, prav tako na življenjsko dobo ne vpliva družina oz. vrsta rastline, na katero je pritrjena. Po pretečeni življenjski dobi mravlje iz listov pogosto odpadejo ali zginejo (Mongkolsamrit in sod. 2012).

7 RAZŠIRJENOST IN HABITAT

Vrsta *Ophiocordyceps unilateralis* ima pantropsko razširjenost. Pojavlja se v Severni, Srednji in Južni Ameriki, Afriki, Aziji in Oceaniji. Najdemo jo lahko v 26 državah, najpogosteje v tropskih gozdovih na Tajskem, Braziliji, Srednji Ameriki ter Afriki. Najsevernejša točka pojavljanja je na 47° geografske širine in sicer v Ontariu (Kanada), najjužnejša pa na 27° geografske širine v Sveti Katarini (Brazilija) (Loreto in sod. 2018). Redkeje jo lahko opazimo tudi v toploljubnih gozdovih (Združene države Amerike, Japonska in Kanada). Razširjenost in pojavljanje glive sta povezana z nahajališčem njenega gostitelja oz. mravlje (Hughes in sod. 2011). V tropskih gozdovih večina mravelj zagrizi v list oz. njegovo glavno žilo; v toploljubnih gozdovih pa tudi v deblo drevesa in veje (Loreto in sod. 2018).



Slika 9: Geografska razširjenost *Ophiocordyceps unilateralis*. (A) svetlo zelene puščice označujejo ugriz v list. (B) svetlo rjave puščice označujejo ugriz v vejo. (C) temno rjave puščice označujejo ugriz v deblo drevesa. (D) temno zelene puščice označujejo ugriz v mlado vejo (Loreto in sod. 2018).

8 VPLIV NA GOSTITELJA

Žuželke (Insecta), ki jih uvrščamo med členonožce (Arthropoda) predstavljajo vrstno najbolj bogato skupino evkariontov. Do danes je bilo opisanih že več kot 900.000 vrst. Sposobne so tvoriti izjemne odnose z glivami, med drugim poznamo:

- mutualistične endosimbionte, kjer glive pripomorejo k prehrani žuželk,
- glive kot vir hrane za nekatere skupine mravelj,
- komenzalizem,
- patogene glive, ki imajo močan vpliv na populacije svojega gostitelja itd.

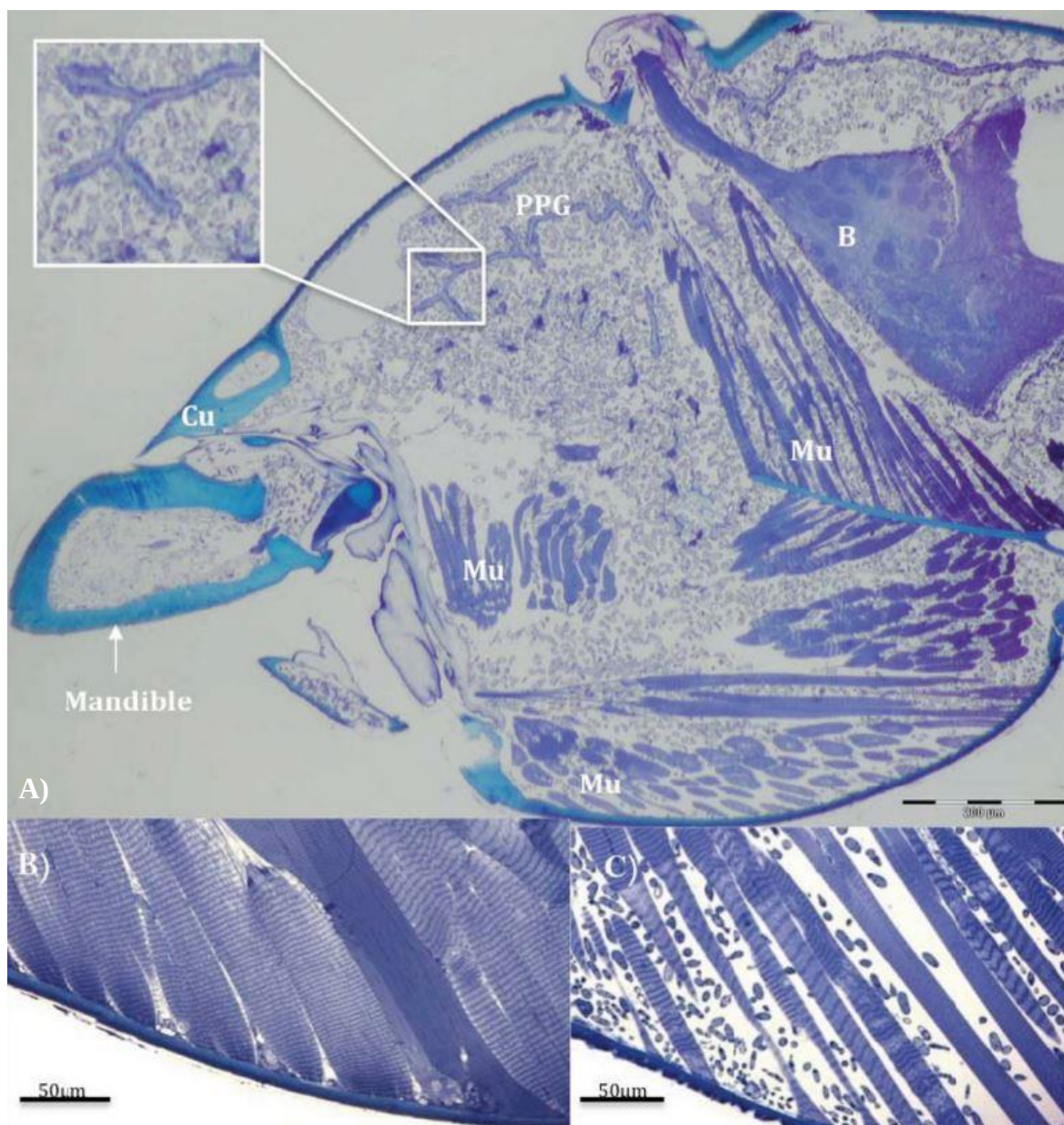
Vendar kljub temu, da poznamo številne vrste odnosov med glivami in žuželkami, ostaja njihovo sobivanje med najbolj neraziskanimi področji v biodiverziteti gliv (Araújo in Hughes 2016).

Gostitelji *Ophiocordyceps unilateralis* so mravlje iz rodu *Camponotus*, *Polyrhachis* in *Echinopla*. Mravlje iz vseh rodov živijo v kolonijah na krošnjah dreves, iz katerih le redko sestopijo. Ustvarjeno imajo celotno mrežo poti, ki se lahko znotraj krošenj raztezajo od 50 do 100 metrov dolžine (Pontoppidan in sod. 2009). Mravlje s krošenj redko sestopijo, vendar se ob sestopu premikajo le po že urejenih poteh z namenom iskanja hrane ali zaradi onemogočenega prehoda med krošnjami zaradi prekinitve poti. Na tleh se zadržujejo malo časa, med mestom kjer so sestopile do drevesa na katerega se povzpnejo, je povprečna razdalja od 3 do 5 metrov (Hughes in sod. 2011). Za razliko od zdravih osebkov, se okuženi sami izgubljeno premikajo po nizki vegetaciji, povečini do 50 cm od tal, le med 9.30 in 12.30 uro. Za razliko od zdravih mravelj, ki so aktivne čez cel dan, so okužene aktivne manj časa, saj jih zgodaj zjutraj in pozno popoldne (med 15.00 in 18.00 uro) ni mogoče opaziti (Hughes in sod. 2011).

Vedenje okužene mravlje, s katero gliva manipulira, se močno spremeni. Vpliv manipulacije se začne kazati v načinu hoje. Mravlja raztreseno in izgubljeno hodi, opazni so tudi krči, zaradi katerih vzbuja občutek vinjenosti. Rezultat krčev so pogosti padci z vegetacije na tla, vendar po vsakem padcu mravlja nadaljuje s hojo in se ponovno povzpne na nizko vegetacijo, podobno tisti iz katere je zdrsnila. Veliko znanstvenikov sklepa, da gliva namerno povzroča močno krčenje mišic in posledično padce, saj si tako zagotovi, da bo mravlja, ki prebiva na 20 metrih višine, padla na zaželenih 25 cm. Oboleli osebki večino časa hodijo, z le zelo redkimi postanki. Velik del poti prehodijo po listih, skupno prečkajo povprečno 99 listov. Pojav za mravlje ni normalen, saj si zdravi osebki ne ustvarjajo poti po listih vegetacije. Kljub temu, da okužene mravlje redko prekinejo s hojo, uspejo od kraja kjer so prišle v stik z askosporami glive, prehoditi relativno majhno dolžino. Povprečna dolžina poti, ki jo uspejo prehoditi od začetka okužbe, do točke kjer zagrižejo v vegetacijo, je 3 metre. Znameniti pojav vrste *O. unilateralis* je t.i. »death grip« ali smrtni oprijem. Okužene mravlje se povzpnejo na povprečno višino 25 cm od tal ter z mandibulami zagrižejo

v vegetacijo oz. v 98% primerih v glavno žilo lista. Ugriz se vedno zgodi okoli 12.00 ure, kar nakazuje, da je položaj sonca pokazatelj optimalnih pogojev (temperatura in vlažnost ozračja) za uspevanje glive. Ko je mravlja varno pritrjena na vegetacijo, iz le te redko odpade. Ugriz za mravljo ne pomeni takojšnje smrti, saj ostane živa še vsaj 6 ur. Čeprav je živa, pa se na okolico oz. mimoidoče živali ne odziva, opazi se lahko le občasno trzanje telesa, predvsem nog (Hughes in sod. 2011).

Prva se s celicami glive – hifami zapolni mravljinna glava. Kopičijo se predvsem okoli možganov, med mišičnimi vlakni in endokrinimi žlezami, pri čemer se znotraj omenjenih organov ne pojavljajo. Kasneje se razširijo še v prsni koš in zadek, opazne so tudi v nogah. Hife imajo sposobnost povezovanja med sabo s pomočjo kratkih (1 μm) septiranih cevi t.i. konidialne cevi za anastomozo ali CATs. Slednje se povežejo s sosednjimi hifami in tako omogočijo komunikacijo ter prenos nutrientov in ostalih snovi med dvema sporama. Povezavo ustvarijo tudi okoli mišičnih vlaken. Hife se lahko celične membrane celice le dotikajo, lahko pa jo predrejo in v celico vstopijo (Fredericksen in sod. 2017). Kljub temu, da je že pred smrtjo v mravljinah mišicah spletena gosta mreža celic, prične gliva destruktivno delovati šele po smrti, saj si le tako zagotovi, da bo njen gostitelj uspešno nadaljeval premikanje na željeno lokacijo in spotoma konzumiral hrano, ki vsebuje zanj potrebne nutriende. Nato s kontrakcijo mišic v čeljusti povzroči »death grip«. Po smrti pričnejo mišice atrofirati, kar se kaže v razmikih med posameznimi vlakni (Hughes in sod. 2011). Sarkomere v mišicah, ki mandibule oz. čeljust povezujejo z lobanjo, se znatno pokrčijo ali celo pretrgajo. Z-linije, ki dve sarkomeri povezujejo med seboj, se opazno napihnejo (Mangold in sod. 2019).



Slika 10: Prečni prerez mravljinke glave okužene z *Ophiocordyceps unilateralis*. (A) majhne sive kroglice so hife, ki so zapolnile glavo in mandibule. Opazni so tudi razmiki med mišičnimi vlakni. Mu = mišice, Cu = kutikula, PPG = faringealna žleza in B = možgani. (B) prečni prerez mišice zdrave mravlje. (C) prečni prerez mišice okužene mravlje. Prisotni so izraziti razmiki med mišičnimi vlakni in številne hife (Hughes in sod. 2011).

Gliva poleg intenzivne atrofije mišic povzroči še zmanjšanje količine sarkoplazemskega retikuluma in mitohondrijev. Mitohondriji so majhni celični organeli, ki s pomočjo kisika proizvajajo adenozin trifosfat ali ATP – energijo. Zmanjšanje njihove količine nakazuje na to, da gliva iz telesa gostitelja jemlje potrebno energijo za njeno delovanje (Fredericksen in sod. 2017). Po drugi strani pa centralni živčni sistem ostane nedotaknjen, saj je njegovo delovanje ključnega pomena za uspešno manipulacijo svojega gostitelja. Motorični nevroni ne kažejo znakov poškodb in ostanejo povezani med seboj (Mangold in sod. 2019).

Razširjeni fenotip, s pomočjo katerega gliva manipulira z osebkami mravelj, določa oz. vpliva na mesto kjer bo mravlja zagrizla. Posledično se okužene mravlje, ki so v vegetacijo že zagrizle, kopičijo na določenih območjih in ustvarjajo zanimiv pojav t.i. pokopališča. Pojavljanje pokopališč je zelo dinamično, med seboj so lahko oddaljena tudi po 20 do 30 metrov. Prav tako niha gostota samih trupel, na območjih kjer so mikro klimatske razmere slabše jih je manj prisotnih; kjer pa so razmere optimalne, lahko srečamo tudi do 26 mravelj/m². Trupla se redko pojavljajo izven pokopališč, kar dokazuje da gliva sama izbira željeno mesto ugriza (Pontoppidan in sod. 2009).

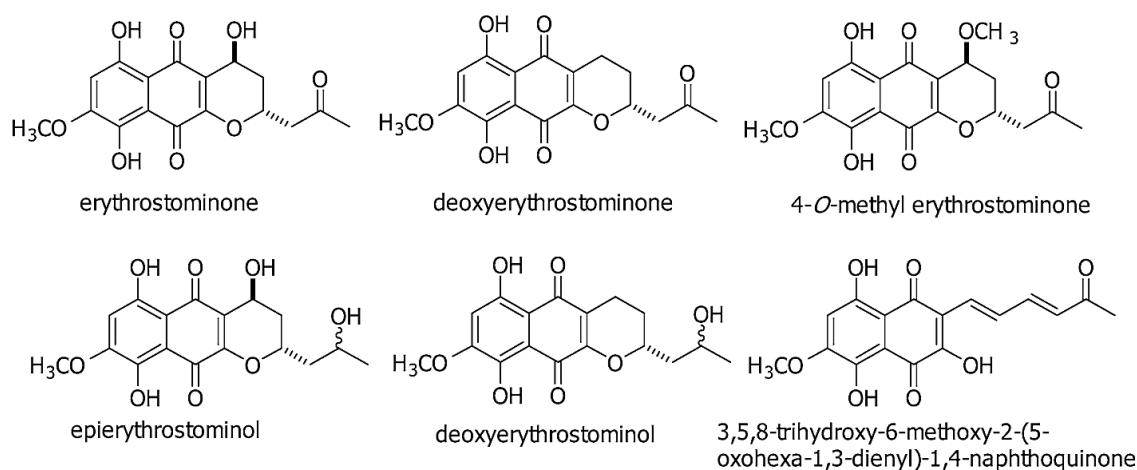
Ključni mehanizem, ki glivi omogoča preživetje in razmnoževanje je manipulacija gostiteljevega vedenja. Paraziti z manipulacijo uspešno spremenijo vedenje živali oz. svojega gostitelja, tako da le ta postane nosilec njihovih genov, bodisi na novega gostitelja ali nov habitat. V vseh primerih se pri gostitelju izkazuje vedenje, ki ji sicer ne bi izražal, saj bi jim le ta predstavljala nevarnost ali jim celo ogrožala življenje. Vedenju, ko parazit uporablja manipulacijo v namene razmnoževanja imenujemo »parasite-extended phenotype«. Sposobnost manipuliranja se je izoblikovala skozi evolucijo, saj je naravna selekcija genom parazita izoblikovala tako, da lahko upravlja s fenotipom svojega gostitelja (Hughes in sod. 2016).

Gliva *O. unilateralis* z manipulacijo prične, ko mravljinu telo napolni z nešteto hifami. Nato po uspešnem prevzemu nadzora nad mravljinim centralnim živčnim sistemom začne v možgane sproščati spojine sfingozin, hipoksantin in »guanidinobutyric« kisline (GBA), ki manipulacijo omogočijo (de Bekker in sod. 2014). Vendar kljub vsem raziskavam, nam točen proces manipulacije zaradi zapletenosti in obsežnosti samega pojava, še do danes v večji meri ostaja neznanka.

Gliva ob uspešni okužbi mravlje pridobi nad njenim telesom in življenjem celoten nadzor. Vselej pa mravlje niso prepuščene na milost in nemilost naključja okužbe glive, saj so pred napadi mikrobov razvile različne obrambne mehanizme. Razvile so socialno vedenje, s katerim se med seboj čistijo oz. negujejo in tako iz površine svojih teles odstranjujejo neželene mikroorganizme oz. v našem primeru glive. Drugi način zaščite, so žleze z notranjim izločanjem ali endokrine žleze. Vlogo imajo pri razmnoževanju, komunikaciji med osebki znotraj kolonije, ter seveda zaščiti pred patogeni in plenilci. Mravlje imajo razvitih veliko različnih endokrinih žlez, med njimi so najpomembnejše mandibularne, metapleurane, faringealne, Dufourove, pigidalne ter prsne žleze. Pred okužbo se zaščitijo tako, da snovi ki jih žleze izločajo na svojo kutikolo, z nogami »razmažejo« po celotni površini telesa. Izločene snovi onemogočajo kalitev askospor glive (Sakolrak in sod. 2018).

9 MEDICINSKI POMEN

Rod *Ophiocordyceps* v farmaciji velja za medicinsko pomembno skupino. Pri veliko vrstah znotraj rodu lahko srečamo sekundarne metabolite, ki blagodejno vplivajo na zdravje ljudi. Med njimi je tudi vrsta *Ophiocordyceps unilateralis*, ki proizvaja sekundarni metabolit naftokinon, in sicer šest različnih derivatov rdečega naftokinona: erythrostominone, deoxyerythrostominone, 4-O-methyl erythrostominone, epierythrostominol, deoxyerythrostominol in 3,5,8-trihidroxy-6-methoxy-2-(5-oxohexa-1,3-dienyl)-1,4-naftokinon (Kittakoop in sod. 1999). Naftokinoni se pojavljajo v nekaterih glivah, rastlinah ter bakterijah. Znani so po antibiotičnih, protivirusnih, protiglivičnih, protivnetnih, antimalaričnih in anti-rakotvornih učinkovinah (Amnuaykanjanasin in sod. 2011).



Slika 11: Kemijska struktura šestih derivatov rdečega naftokinona, ki se pojavljajo pri *Ophiocordyceps unilateralis* (Unagul in sod. 2005).

Poleg uporabe za medicinske namene v farmaciji, so pigmente rdečih naftokinonov, ki so jih izolirali iz vrste *O. unilateralis*, preučevali tudi za uporabo barvil v prehranski, kozmetični in farmacevtski industriji. Uporaba naravnih pigmentov v različnih panogah se je z leti povečala zaradi škodljivih učinkov, ki jih sintetična barvila in njihovi stranski produkti povzročajo v človeku in okolju. Glavna vira iz katerih lahko pridobivamo naravne pigmente sta rastline in mikroorganizmi. Poudarek na uporabi naravnih barvil se je z leti povečeval tudi zaradi same stabilnosti pigmentov (odporni so na spremembe v kislosti oz. bazičnosti okolja, v temperaturi ter izpostavljenosti soncu) in možnosti gojenja (Unagul in sod. 2005). Raziskovalci so v preteklosti uspešno poskusili povečati njihovo proizvodnjo, tako da so v laboratoriju optimizirali pogoje, pri katerih rastejo kulture (prezračevanje, začetni pH medija, temperatura ter izvor oz. dovod ogljika (C) in dušika (N)) (Khaokhajorn in sod. 2015). Kemijska zgradba rdečih naftokinonov vrste *O. unilateralis* je zelo podobna zgradbi pigmentoma šikonin in alkanin, ki se danes obširno uporabljata predvsem v farmaciji kot sredstva za celjenje ran in kot naravne protimikrobne snovi, ter kot barvila kozmetiko, tkanine in živila. Šikonin in alkanin sta prav tako sekundarna metabolita. Šikonin

se nahaja v koreninah rastline *Lithospermum erythrorhizon*, alkanin pa v koreninah rastline *Alkanna tinctoria*. Krvavo rdeča barva rdečih naftokinonov vrste *O. unilateralis* in nizka vsebnost citotoksičnih lastnosti kaže na potencialno vlogo za uporabo v raznolikih panogah (Unagul in sod. 2005).

Vrsta *O. unilateralis* poleg naftokinonov proizvaja tudi sekundarni metabolit poliketid. Poliketidi se uporabljajo v farmaciji in farmacevtski biotehnologiji. Uporablja se jih pri antibiotikih, protiglivičnih zdravilih in zdravilih za zdravljenje povišane vrednosti holesterola v krvi. Poleg navedenih uporab imajo še anti-rakotvorne in antioksidativne učinke (Amnuaykanjanasin in sod. 2009).

10 ZAKLJUČEK

Paraziti so z namenom povečanja lastnega fitnesa ali zmogljivosti in nadaljnjega prenosa, razvili sposobnost manipuliranja z vedenjem svojih gostiteljev. Glive (Fungi) so skozi evolucijo razvile vrsto strategij za manipuliranje z obnašanjem členonožcev (Arthropoda), ki so se izkazale za ene izmed najbolj zapletenih in impresivnih primerov vedenjske manipulacije. Med njimi lahko srečamo parazitsko glivo *Ophiocordyceps unilateralis* (Tul. & C. Tul.) Petch 1931 ali tako imenovano »zombi« glivo, ki predstavlja enega izmed najzanimivejših odnosov med mikrobi in živalmi.

Ophiocordyceps unilateralis iz debla Ascomycota (zaprtotrosnice) in redu Hypocreales, je entomopatogena gliva, ki parazitira na mravljah iz plemena *Camponotini* (Formicinae: Formicidae). Gliva se pojavlja po večini kontinentov v tropskih gozdovih, z nekaj nahajališči v zmerno toplih gozdovih. Svojega gostitelja okuži s sporami, ki priletijo na njegovo telo. Nato skozi kutikolo ali povrhnjico prodre v telo in se v njem začne razraščati s pomočjo hif. Po uspešnem prevzemu telesa in centralnega živčnega sistema je gostitelj naređ za manipulacijo. Mravlja pod vplivom glive zapusti svojo kolonijo v krošnji drevesa in se spusti do višine 25 ± 3 cm, kjer vladajo optimalni parametri temperature in vlažnosti za uspevanje glive. Nato s čeljustjo oz. mandibulami močno zagriže v glavno žilo lista in v roku šestih ur pogine. Po smrti ji iz baze glave požene stroma, bele do blede roza barve, dolga le nekaj milimetrov. Ob dosegu končne velikosti, se na njej razvije peritecij, ki predstavlja reproduktivni organ glive. Znotraj peritecija se nato razvijejo spore, ki se ob dozoritvi sprostijo v okolje. Med pasivnim premikanjem oz. letenjem po zraku pristanejo na novi mravlji, ki bo življenjski krog glive ponovila. Cilj manipuliranja z vedenjem gostitelja - v našem primeru mravlje, je povečanje uspešnosti nadaljnje reprodukcije in rasti glive.

11 LITERATURA IN VIRI

Amnuaykanjanasin A., Panchanawaporn S., Chutrakul C. in Tanticharoen M. 2011. Genes differentially expressed under naphthoquinone-producing conditions in the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps unilateralis*. *Canadian Journal of Microbiology* 57(8): 680–692.

Amnuaykanjanasin A., Phonghanpot S., Sengpanich N., Cheevadhanarak S. in Tanticharoen M. 2009. Insect-specific polyketide synthases (PKSs), potential PKS-nonribosomal peptide synthetase hybrids, and novel PKS clades in tropical fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 75(11): 3721–3732.

Andersen S. B., Gerritsma S., Yusah K. M., Mayntz D., Hywel-Jones N. L., Billen J., Hughes D. P. 2009. The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype. *American Naturalist* 174(3): 424–433.

Araújo J. P.M., Evans H. C., Kepler R. in Hughes D. P. 2018. Zombie-ant fungi across continents: 15 new species and new combinations within *Ophiocordyceps*. I. Myrmecophilous hirsutelloid species. *Studies in Mycology* 90: 119–160.

Araújo J. P.M. in Hughes D. P. 2016. Diversity of Entomopathogenic Fungi. Which Groups Conquered the Insect Body? *Advances in Genetics* 94: 1–39.

Araújo João P.M., Evans H. C., Geiser D. M., Mackay W. P. in Hughes D. P. 2015. Unravelling the diversity behind the *Ophiocordyceps unilateralis* (Ophiocordycipitaceae) complex: Three new species of zombie-ant fungi from the Brazilian Amazon. *Phytotaxa* 220(3): 224–238.

Ban S., Sakane T. in Nakagiri A. 2015. Three new species of *Ophiocordyceps* and overview of anamorph types in the genus and the family Ophiocordyceptaceae. *Mycological Progress* 14(1): 1–12.

Batič F., Wraber T. in Turk B. 2009. Pregled rastlinskega sistema s seznamom rastlin in navodili za pripravo študentskega herbarija: za študente gozdarstva in krajinske arhitekture (2., dopoln). Ljubljana: Biotehniška fakulteta v Ljubljani, Oddelek za agronomijo.

de Bekker C., Quevillon L. E., Smith P. B., Fleming K. R., Ghosh D., Patterson A. D. in Hughes D. P. 2014. Species-specific ant brain manipulation by a specialized fungal parasite. *BMC Evolutionary Biology* 14(1):166.

Evans H.C., Araújo J. P. M., Halfeld V. R. in Hughes D. P. 2017. Epitypification and re-description of the zombie-ant fungus, *Ophiocordyceps unilateralis* (Ophiocordycipitaceae). *Fungal Systematics and Evolution* 1(1): 13–22.

Evans H.C. in Samson R. A. 1984. Cordyceps species and their anamorphs pathogenic on ants (Formicidae) in tropical forest ecosystems II. The Camponotus (Formicinae) complex. *Transactions of the British Mycological Society* 82(1): 127–150.

Evans H. C., Elliot S. L. in Hughes D. P. 2011. Hidden diversity behind the zombie-ant fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four new species described from carpenter ants in Minas Gerais, Brazil. *PLoS ONE* 6(3): 1–9.

Evans H. C., Elliot S. L. in Hughes D. P. 2011. *Ophiocordyceps unilateralis*: A keystone species for unraveling ecosystem functioning and biodiversity of fungi in tropical forests?. *Communicative & Integrative Biology* 4(5): 598–602.

Fredericksen M. A., Zhang Y., Hazen M. L., Loreto R. G., Mangold C. A., Chen D. Z. in Hughes D. P. 2017. Three-dimensional visualization and a deep-learning model reveal complex fungal parasite networks in behaviorally manipulated ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(47): 12590–12595.

Geney-Gros, Tulasne C. in Tulasne L. R. 1861. *Selecta fungorum carpologia :ea documenta et icones potissimum exhibens ... /Junctis studiis ediderunt Ludovicus-Renatus Tulasne, et Carolus Tulasne. Parisiis : Imperatoris Jussu, In Imperiali Typographeo Excudebatur.*

Godec G., Grubelnik L., Glažar S., Jamešek S., Zmazek B. 2015. *Naravoslovje 7: i-učbenik za naravoslovje v 7. razredu osnovne šole.* www.eucbeniki.sio.si (datum dostopa: 3. 8. 2021)

Hughes D. P., Araújo J. P. M., Loreto R. G., Quevillon L., de Bekker C. in Evans H. C. 2016. From So Simple a Beginning. The Evolution of Behavioral Manipulation by Fungi. *Advances in Genetics* 94: 437–469.

Hughes D. P., Andersen S. B., Hywel-Jones N. L., Himaman W., Billen J. in Boomsma J. J. 2011. Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecology* 11(1): 13.

Hughes D. P., Wappler T. in Labandeira C. C. 2011. Ancient death-grip leaf scars reveal ant-fungal parasitism. *Biology Letters* 7(1): 67–70.

Dighton J., White J. 2017. The Fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem, Fourth Edition. CRC Press.

Isaka M., Kittakoop P., Kirtikara K., Hywel-Jones N. L. in Thebtaranonth Y. 2005. Bioactive substances from insect pathogenic fungi. *Accounts of Chemical Research* 38(10): 813–823.

Kepler R. 2016. Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. *Advances in genetics* 94.

Kepler R. M., Kaitsu Y., Tanaka E., Shimano S. in Spatafora J. W. 2011. *Ophiocordyceps pulvinata* sp. nov., a pathogen of ants with a reduced stroma. *Mycoscience* 52(1): 39–47.

Khaokhajorn P., Samipak S., Nithithanasilp S., Tanticharoen M. in Amnuaykanjanasin A. 2015. Production and secretion of naphthoquinones is mediated by the MFS transporter MFS1 in the entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps* sp. BCC1869. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 31(10): 1543–1554.

Kittakoop P., Punya J., Kongsaree P., Lertwerawat Y., Jintasirikul A., Tanticharoen M. in Thebtaranonth Y. 1999. Bioactive naphthoquinones from *Cordyceps unilateralis*. *Phytochemistry* 52(3): 453–457.

Kobmoo N., Mongkolsamrit S., Tasanathai K., Thanakitpipattana D. in Luangsa-Ard J. J. 2012. Molecular phylogenies reveal host-specific divergence of *Ophiocordyceps unilateralis* sensu lato following its host ants. *Molecular Ecology* 21(12): 3022–3031.

Kobmoo N., Mongkolsamrit S., Arnamnart N., Luangsa-ard J. J. in Giraud T. 2019. Population genomics revealed cryptic species within host-specific zombie-ant fungi (*Ophiocordyceps unilateralis*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 140: 106580.

Loreto R. G., Araújo J. P. M., Kepler R. M., Fleming K. R., Moreau C. S. in Hughes D. P. 2018. Evidence for convergent evolution of host parasitic manipulation in response to environmental conditions. *Evolution* 72(10): 2144–2155.

Luangsa-Ard J. J., Ridkaew R., Tasanathai K., Thanakitpipattana D. in Hywel-Jones N. 2011. *Ophiocordyceps halabalaensis*: A new species of *Ophiocordyceps* pathogenic to *Camponotus gigas* in Hala Bala Wildlife Sanctuary, Southern Thailand. *Fungal Biology* 115(7): 608–614.

Luangsa-ard J., Tسانathai K., Thanakitpipattana D., Khonsanit A. in Stadler M. 2018. Novel and interesting *Ophiocordyceps* spp. (Ophiocordycipitaceae, Hypocreales) with superficial perithecia from Thailand. *Studies in Mycology* 89: 125–142.

Mangold C. A., Ishler M. J., Loreto R. G., Hazen M. L. in Hughes D. P. 2019. Zombie ant death grip due to hypercontracted mandibular muscles. *Journal of Experimental Biology* 222(14).

Money N. P. 2016. *Fungi: A Very Short Introduction*. Journal of Chemical Information and Modeling. Oxford University Press.

Mongkolsamrit S., Kobmoo N., Tسانathai K., Khonsanit A., Noisripoom W., Srikitikulchai P., Luangsa-ard J. J. 2012. Life cycle, host range and temporal variation of *Ophiocordyceps unilateralis/Hirsutella formicarum* on Formicine ants. *Journal of Invertebrate Pathology* 111(3): 217–224.

Peraza-Reyes L. in Berteaux-Lecellier V. 2013. Peroxisomes and sexual development in fungi. *Frontiers in Physiology*, 1–17.

Pontoppidan M. B., Himaman W., Hywel-Jones N. L., Boomsma J. J. in Hughes D. P. 2009. Graveyards on the move: The spatio-temporal distribution of dead *Ophiocordyceps*-infected ants. *PLoS ONE* 4(3): 1–10.

Sakolrak B., Blatrix R., Sangwanit U., Arnarnart N., Noisripoom W., Thanakitpipattana D., Kobmoo N. 2018. Ant-produced chemicals are not responsible for the specificity of their *Ophiocordyceps* fungal pathogens. *Fungal Ecology* 32: 80–86.

Sung G. H., Hywel-Jones N. L., Sung J. M., Luangsa-ard J. J., Shrestha B. in Spatafora J. W. 2007. Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology* 57: 5–59.

Unagul P., Wongsap P., Kittakoo P., Intamas S., Srikitikulchai P. in Tanticharoen M. 2005. Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32(4): 135–140.

Watkinson S., Boddy L. in Money P. N. 2008. *The Fungi*, Third Edition. Elsevier.