



Kandidaatintutkielma

*Ophiocordyceps unilateralis* -sienen patogeeninen vaikutus *Camponotini*-  
heimon muurahaisissa

Nova Hongisto

Oulun yliopisto  
Biokemian ja molekyyli lääketieteen tiedekunta

2022

# Sisällysluettelo

|  |    |
|--|----|
| <b>1. Sienet taudinaiheuttajina</b> .....  | 4  |
| 1.1. Entomopatogeeniset sienet hyönteisissä .....  | 5  |
| <b>2. <i>Ophiocordyceps</i>-suvun sienet entomopatogeneina muurahaisissa</b> .....                       | 5  |
| 2.1. <i>Ophiocordyceps Unilateralis</i> sensu lato .....   | 6  |
| 2.2. <i>Camponotini</i> -heimon muurahaiset isäntäeliöinä.....   | 7  |
| 2.3. Muurahaisten immunologia ja suojaimekanismit .....  | 7  |
| <b>3. <i>Ophiocordyceps</i> -sienten rakenne</b> .....   | 9  |
| 3.1. Kotelosienet .....  | 9  |
| 3.2. Sienisolut.....   | 9  |
| 3.3. Sienipatogeenien appressoriajärjestelmä .....   | 10 |
| <b>4. Lisääntyminen ja lois-isäntä-suhde</b> .....   | 11 |
| 4.1. Suvullinen lisääntyminen.....   | 12 |
| 4.2. Suvuton lisääntyminen.....  | 13 |
| <b>5. Infektiosykli</b> .....  | 13 |
| 5.1. Kiipeäminen kasvillisuuteen .....   | 13 |
| 5.2. Kuolemanotteen mekanismi.....   | 14 |
| 5.3. Sieni-infektion kasvaminen ja muurahaisen valtaaminen.....  | 14 |
| <b>6. Manipulaation mekanismit</b> .....   | 15 |
| 6.1. <i>O. Unilateralis</i> en biokemialliset mekanismit manipulaatiolle.....                            | 16 |
| 6.2. Guanovoihapon ja sfingosiinin vaikutus muurahaisen keskushermostossa.....                           | 17 |
| 6.3. Enterotoksiinien vaikutus käyttäytymistä manipuloivien geenien ekspressoimiseen muurahaisissa ..... | 18 |
| <b>7. <i>Ophiocordyceps</i> -sienet lääketieteessä ja bioteknologiassa</b> .....                         | 19 |
| 7.1. Lääketieteellinen käyttö .....  | 19 |
| 7.2. <i>Ophiocordyceps</i> -sienten potentiaalinen käyttö biologisessa tuholaistorjunnassa.....          | 21 |
| <b>8. Kirjallisuusviitteet</b> .....   | 22 |

## Lyhennelistaus

|                        |  |
|------------------------|--|
| AMP                    | Antimikrobiaalinen proteiini                   |
| cAMP                   | Syklinen adenosiinitrifosfaatti                |
| DNA                    | Deoksiribonukleinihappo                        |
| GBA                    | Guanovoihappo                                  |
| GPCR1                  | G-proteiinivälitteisesti paritunut reseptori 1 |
| GPCR2                  | G-proteiinivälitteisesti paritunut reseptori 2 |
| HMG                    | High mobility group                            |
| IMD                    | Immune deficiency pathway                      |
| MAMP                   | Microbial associated molecular patterns        |
| MAPK                   | Mitogeeni-aktivoitu proteiinikinaasi           |
| MAT                    | Pariutumistyyppille spesifi transkriptiotekijä |
| Mbp                    | Megabasepairs                                  |
| MFa                    | Mating factor a                                |
| MF $\alpha$            | Mating factor $\alpha$                         |
| mTOR                   | Mammalian target of rapamycin                  |
| <i>O. Unilateralis</i> | <i>Ophiocordyceps unilateralis</i>             |
| PRR                    | Pattern recognition receptors                  |
| PGN                    | Peptidoglykaani                                |
| RNA-seq                | Ribonukleinihappo-sekvensointi                 |
| RIA                    | Radioimmunoassay                               |
| s.l.                   | Sensu lato                                     |
| SEM                    | Scanning electron microscopy                   |
| Toll                   | Toll pathway                                   |

## 1. Sienet taudinaiheuttajina

Sienet muodostavat elävien organismien joukosta yhden viidestä pääryhmästä. Ne ovat yksi- tai monisoluisia, eukaryootteja ja niitä esiintyy joka puolella luonnossa. Sienten luokittelu perustuu niiden morfologisiin rakenteisiin, toisin kuin vaikka bakteereilla, joiden luokittelussa käytetään pitkälti metabolisia ja biokemiallisia eroja bakteerien välillä. Sienet lisääntyvät paksuseinäisten itiöiden avulla, jotka voivat olla joko yksi- tai monisoluisia. Evoluution seurauksena sienet ovat tukeutuneet niin suvuttomaan, kuin suvulliseen lisääntymiseen, voidakseen optimoida adaptoitumisensa muuttuvaan ympäristöön. Infektiota aiheuttava sieni usein onkin peräisin ympäristöstä ja infektio saa alkunsa joko ruuansulatuskanavan tai hengitysteiden kautta. Sieni-infektio voi saada myös alkunsa vamman seurauksena, jolloin sieni pääsee infektoimaan eliötä vaurioituneen kudoksen tai solukon kautta. (Vaara et al. 2010.)

Sienten pääryhmä sisältää noin 6 miljoonaa lajia (Taylor et al. 2014) ja ne ovat suurimpia taudinaiheuttajia kasveissa sekä eläimissä, lukuun ottamatta nisäkkäitä. Hyönteisissä tunnetaan yli 700 infektoivaa sienilajia, joita kutsutaan nimellä entomopatogeeniset sienet. Eläinkunnassa eläinten fysiologiset ominaisuudet tarjoavat sienille haastavat olosuhteet ja useat eläimet kykenevät kontrolloimaan sieni-infektioita isännälle ominaisten fysiologisten torjuntamekanismien avulla. Tästä syystä nisäkkäillä tunnetaan vähemmän patogeenisiä sieni-infektioita kuin muilla eläimillä ja kasveilla. Sieni-infektion mahdollistaa usein isännän heikentynyt immunologinen vastustuskyky, jolloin sieni pääsee infektoimaan kasvia tai eläintä. Näitä sieniä kutsutaan zoofilisiksi sieniksi. (Sybren de Hoog 2018.) Ihmisillä tunnetaan lukuisia sienilajeja, jotka kuuluvat normaalisti ihmisen elimistön suojakerroksen mikrobiflooraan. Sieniä esiintyy ihmisillä muun muassa suussa, iholla, sisäelimissä, keuhkoissa ja vaginassa. Sienet voivat aiheuttaa ihmisille infektioita heikentyneen immuunipuolustuksen, perinnöllisten immuunipuolustuksen vioittuneisuuksien, sekä immuunipuolustusta heikentävien lääkkeiden vuoksi. (Kumar et al. 2018) Myös normaaliflooraan kuuluvat sienet voivat toisinaan aiheuttaa infektion. (Kobayashi 1996.)

Zoofiliset sienet elävät kaksittaiselämänsä aikana siten, että joko ympäristöä tai isäntää voidaan käyttää infektoivana leviämisenä. Zoofiliset entomopatogeeniset sienet infektoivat valtavissa määrissä hyönteisiä ympäri maailman ja ovat suuressa roolissa säätelemässä hyönteisten populaatioiden kokoa. Nämä sienet ovat kehittäneet evoluution myötä itselleen erittäin tehokkaita mekanismeja, joiden avulla ne kykenevät infektoimaan isäntiänsä. (Nguyen et al. 2018. Wheat et al. 2016.)

Yksiä kuuluisimpia hyönteisiä infektoivia sieniä ovat *Ophiocordyceps*-suvun loissienet, jotka infektoivat hyönteisiä manipuloiden niiden käyttäytymistä, jonka avulla ne mahdollistavat oman lisääntymisensä. Näiden entomopatoogeenisten sienten potentiaalia on tutkittu bioteknologiassa muun muassa biotorjunta-aineiden kehityksessä hyönteistuholaisia vastaan. (Fisher et al. 2012)

### **1.1. Entomopatoogeeniset sienet hyönteisissä**

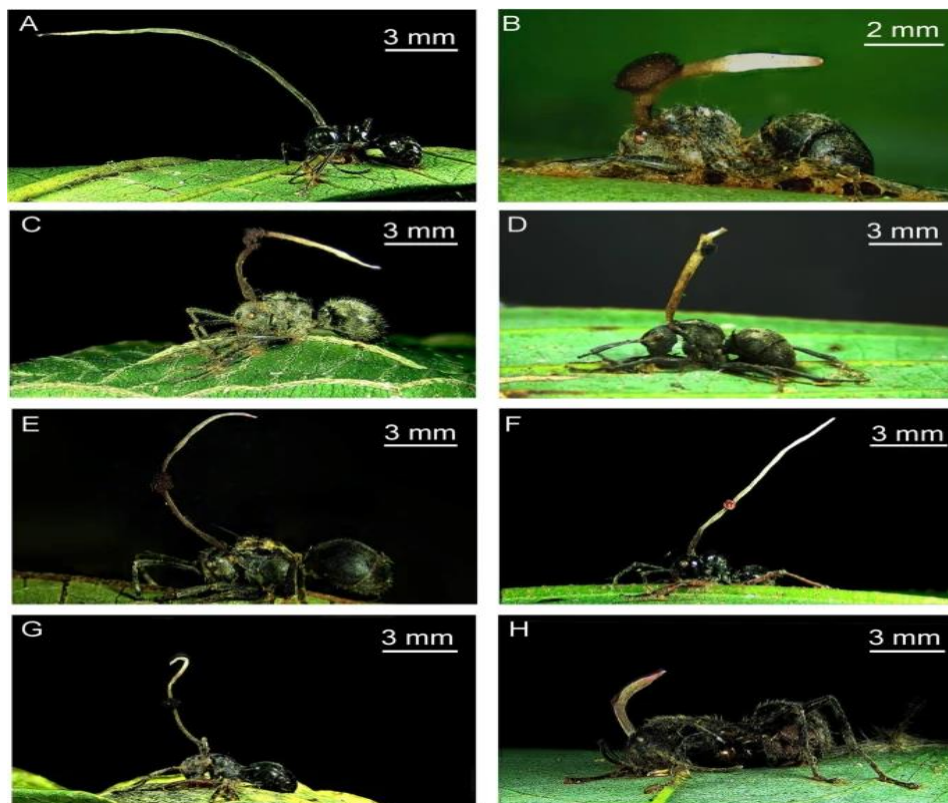
Yhteensä noin 1000 lajia harppuunasienten, piiskasiimasienten, Entomophthorales, kantasienten ja kotelosienten pääjaksoista tunnetaan infektoivan ja tappavan hyönteisiä. (Vega et al. 2012) Kotelosienien (*Ascomycetes*) *Hypocreales*-lahkosta tunnetuimmat lajit *Beauveria bassiana* ja *Metarhizium robertsii* ovat tutkituimpia patoogeenisten mekanismien fysiologisten interaktioiden suhteen, sienten ja hyönteisten välillä. Näitä lajeja käytetään usein biologisina kontrolleina, kun tutkitaan hyönteisten loisia ja niiden välisiä suhteita. (de Faria & Wraight 2007.) *Hypocreales*-lahkoon kuuluvat sienet ovat fylogeneettisesti läheistä sukua kasvipatoogeenille ja endofyyteille (Hu X et al. 2014) ja niiden lisääntymisvaiheet ovat samankaltaisia *Ophiocordyceps s.l.* -loisikoille. (Sung et al. 2007.) Tämän vuoksi näiden lajien välisiä loisinteraktioita tutkitaan usein rinnakkain, kun tutkitaan uusia sienipatoogeeniä ja niiden välisiä suhteita. Eroja kuitenkin löytyy, joten ei voida puhua täysin ortologisista geeneistä näiden lajien genomissa, sekä kyky infektoida useampia lajeja kerrallaan vaihtelee. (Andersen et al. 2009)

## **2. *Ophiocordyceps*-suvun sienet entomopatoogeenina muurahaisissa**

Osan entomopatoogeenisten sienten on tutkittu kykenevän muokkaamaan isäntänsä käyttäytymistä ja fysiologiaa ekspressoimalla omia geenejään, jotka saavat aikaan muutoksen parasiitin aiheuttamana isäntäeliössä. (Moore et al. 2005 Dawkins et al. 1982) *Ophiocordyceps*-suvun hyönteisiä infektoivat sienet käyttävät tätä taktiikkaa hyväkseen manipuloidakseen muurahaisia käyttäytymään kuin ”zombit”. Tämä saa aikaan muurahaisten sattumanmukaisen liikehdinnän, kouristukset ja kiipeämisen kasvillisuutta pitkin. Lehden tai varvun päällä isäntä puree lehden alapintaa, kiinnittyy siihen ja lopulta kuolee kasvin alapinnalle. Tätä kutsutaan, ”kuolemanotteeksi.” Muurahaisen kuoleman jälkeen sieni jatkaa kasvuaan isännän sisällä ja kasvattaa itiövarresta itiöemän eliön pään takaosan läpi. Parin viikon jälkeen infektiosta sieni tuottaa itiöitä itiöemästä, jolloin muurahaisen pään takaosa repeää ja itiöt pääsevät leijumaan ympäristöön infektoimaan uusia isäntämuurahaisia. (Andersen et al. 2009, Hughes et al. 2011)

## 2.1. *Ophiocordyceps Unilateralis* sensu lato

*Ophiocordyceps Unilateralis*, usein myös ”zombisieneksi” kutsuttu muurahaisloisikka on sienipatogeeni, joka on spesifinen muurahaisia infektoiva parasiitti. Jokaisella *Camponotini*-heimon muurahaislajilla on tutkittu olevan oma *Ophiocordyceps* -lajin loissieni, joita ne infektoivat. (Evans et al. 2011). *Ophiocordyceps*-suvun sienet ovat ensimmäisen kerran vakiinnutettu *Hypocreales*-lahkoon kotelosienissä brittiläisen tutkijan Tom Petchin toimesta 1931. (Lao et al. 2021) *Ophiocordyceps* -lajien on huomattu infektoivan muitakin kuin *Camponotus* -suvun hevosmuurahaisia, kuten *Polyrhachis* -suvun muurahaisia (Kuva 1.). *O. Unilateralis* useasti lyhennetään tutkimuksessa *O. Unilateralis* sensu lato (s.l.), jolla viitataan useisiin sieniin, jotka infektoivat samoja *Camponotini*-heimon muurahaisia, mutta kaikkia *O. unilateraliksen* alalajin sieniä ei ole vielä tunnistettu. Eri *O. Unilateraliksen* alalajien tunnetaan infektoivan ainoastaan tiettyjä *Camponotini*-heimon muurahaislajeja. Näitä lajeja on löydetty muun muassa, Thaimaasta, Japanista, Brasilian Amazonista ja Taiwanista. (Evans et al. 2011)



**Kuva 1.** *Ophiocordyceps Unilateralis* s.l. infektiokehitys kahdeksassa eri sympatrisessa muurahaislajissa. A) *Polyrhachis mesota*, B) *Polyrhachis wolfi*, C) *Polyrhachis vigilans* D) *Polyrhachis latona*, E) *Polyrhachis illaudata*, F) *Polyrhachis debilis*, G) *Polyrhachis dives* ja H) *Camponotus punctatissimus*. (Suomennettu ja muokattu lähteestä Lin et al. 2020.)

## 2.2. *Camponotini*-heimon muurahaiset isäntäeliöinä

*Camponotini*-heimon muurahaisiin kuuluu 10 sukua, joista 2 ovat kuolleet sukupuuttoon. *Camponotini*-heimon muurahaisia kutsutaan myös suomen kielellä hevosmuurahaisiksi ja niitä elää ympäri maailman suurimmaksi osaksi metsäekosysteemeissä. Hevosmuurahaiset ovat tunnettuja niiden suuresta koosta ja pyöreästä keskiruumiista.

*Camponotini*-heimon muurahaisille on ominaista, että ne useimmiten pesivät puihin. Ne kaivavat tunneleita puun sisään ja muodostavat yhteiskuntaansa käytäviä pitkin puunrunkoa. Tyypillisimpiä pesimäpaikkoja hevosmuurahaisille ovat, kaatuneet ja ontot puut tai oksistot ja vanhat puutalot kaupunkiekosysteemeissä. (Cranshaw & Redak 2013.)

Eri *Camponotini*-heimoon kuuluvia muurahaisia on tutkittu Linin ja hänen tutkimuskollegoidensa kanssa muun muassa *Polyrhachis* -ja *Camponotus*-suvun muurahaisissa kuten; *P. mesota*, *P. wolfi*, *P. Vigilans*, *P. latona*, *P. debilis*, *P. illaudata*, *P. Dives* ja *C. punctatissimus*, jotka ovat peräisin Taiwanista. Näiden eri isäntien välisiä suhteita *Ophiocordyceps Unilateraliksen* infektoimana tutkittiin ja huomattiin eroja ainoastaan sienien muodostaman strooman ja sen alustapahkan kehittämisessä eri muurahaislajeilla, sekä siinä kuinka korkealle muurahainen kiipeää infektoitumisen jälkeen kuolemaan. (Lin et al. 2020)

## 2.3. Muurahaisten immunologia ja suojamekanismit

Hyönteisten luontainen immuunipuolustus on erittäin tehokas ja pääpiirteittäin samankaltainen kuin selkärankaisilla, mutta hankittu vasta-ainevälitteinen immuunipuolustus on selkärankaisiin verrattuna puutteellinen. Hyönteisten on kuitenkin tavattu kehittävän toleranssia patogeenien toksisille aineille altistumalla aluksi pienille määrille myrkkyä, jonka jälkeen hyönteiset siedättyvät toksiineille ja kehittävät resistenssin haitallisille molekyyyleille. Tämän hankitun immuunipuolustuksen mekanismin mahdollistaa hyönteisten elimistön rakentamat hemosyytit ja antimikrobiaaliset peptidit, joita tuotetaan patogenejä vastaan. (Sheehan et al. 2020)

*Camponotus*-suvun hevosmuurahaisilla hankittu vastustuskyky kehittyy trofallaksisesti vastavuorotteisen eritteiden vaihdon avulla suusta suuhun oksentamalla. Antimikrobiaalisia aineita, jotka osallistuvat hankitun immunitietin kehittämiseen muurahaisilla ovat erilaiset mikrobeja tuhoavat peptidiproteaasit, kuten lysosomaaliset -ja katepsiini-D:n kaltaiset proteiinit.

Behavioristisen, sosiaalisen ja luontaisen immunologisen puolustuksen yhdistelmä takaa muurahaisille erittäin tehokkaan vastustuskyvyn evoluutionaaliseen selviytymiseen. (Hamilton et al. 2010) *Camponotus*-suvun hevosmuurahaisilla on tärkeitä elintoimintoihin, immuunipuolustukseen ja aineenvaihduntaan vaikuttavia endosymbiootteja, jotka ylläpitävät muurahaisten elimistön homeostasiaa. Mutualistinen suhde bakteerien, kuten *Blochmannia floridanus* -bakteerin ja *C. floridanus* -muurahaisten välillä on elintärkeää molemmille eliöille. Endosymbionttinen suhde joutuu kuitenkin usein koetukselle, sillä muurahaisten oma luontainen immuunipuolustus ja hankitusta immuunipuolustuksesta kerätyt toksiiniresistenssit vahingoittavat muurahaisen elintoiminnoille tärkeää bakteeripopulaatiota. (Ratzka et al. 2011)

Muurahaisten endosymbiootit pyrkivät välttymään isäntäeliön omalta immuunivasteelta aktiivisesti manipuloimalla ja inhiboimalla immuunipuolustuksen toimimista, sekä muokkaamalla muurahaista infektiivien patogeenien mikrobialisia molekyyllisiä malleja (MAMPs). (Zientz et al. 2004 & McFall-Ngai 2007.) Muurahaisen elimistössä patogeenien infektiomalleja tunnistavat PRR -reseptorit sitoutuvat MAMP:seihin, jolloin reseptorien aktivaatio saa aikaan Toll -ja IMD signalointireittien käynnistymisen. Nämä molekyylliset mikrobialiset mallit voivat olla Gram-positiivisten bakteerien soluseinän peptidoglykaaneja (PGN) tai sienipatogeenien beeta- 1,3-glykaaneja. Entomopatogeenisten sienten stimulatorisia Toll-reseptoreihin vaikuttavia yhdisteitä ei vielä tunneta. Bakteeri-infektiossa Toll -ja IMD signalointireittien aktivaatio saa aikaan signaalikaskadin käynnistymisen hyönteisten soluissa, jolloin hyönteisten luontainen immuunipuolustus ekspressoi näiden reaktioreittien avulla antimikrobialisia proteiineja (AMP) tuottavia geenejä. Näiden signalointireittien vasteena tuotetaan myös hyönteispatogeenia torjuvia hemosyyttejä. (Lemaitre & Hoffman 2007). Takahiro Tanjin ja hänen tutkimuskollegoidensa tutkimuksessa (2007) todettiin Toll -ja IMD signalointireittien toimivan yhdessä infektion aikana. Nämä signalointireitit yhdessä säätelevät banaanikärpäksillä transkriptioon osallistuvia NF- $\kappa$ B proteiineja, tuottaen AMP molekyyliä, kuten attasiinia, defensiiniä ja dipterisiiniä, jotka osallistuvat infektion torjuntaan hyönteisten luonnollisessa immuunipuolustuksessa. (Tanji et al. 2007)

Muita nerokkaita ulkoisia puolustautumistapoja *Camponotini*-heimon muurahaisilla on tutkittu Alice Laciny ja hänen kollegoidensa kanssa (2018) *Colobopsis Saundersi* tai aiemmin *Camponotus Saundersi* -lajin muurahaisilla. Näitä muurahaista kutsutaan arkikielellä ”räjähtäviksi muurahaisiksi”, sillä ne puolustautuvat räjäyttämällä itsensä ja vapauttamalla yhdisteitä elimistöstään. (Laciny et al. 2018) Nämä yhdisteet sisältävät muun muassa aromaattisia polyasettaatti -johdannaisia, kuten hydroksiasetofenoneja, alifaattisia hiilivetyjä, asyyllisiä monoterpeenejä, sekä syövyttäviä happoja.



Vapauttamalla näitä yhdisteitä elimistöstään muurahainen tekee itsemurhan viedäkseen hengen viholliseltaan ja suojatakseen pesäkavereitaan. (Jones et al. 2004.)

### 3. *Ophiocordyceps* -sienten rakenne

*Ophiocordyceps* sienilajit ovat nimetty niiden itiöemien ja koteloitiöiden morfologian perusteella. *Ophiocordyceps unilateralis s.l.* ovat kotelosieniä ja muodostavat kuromakannattimen, eli strooman *Camponotini*-heimon muurahaislajien pään läpi ja kasvattaa itiöemän strooman päätyyn. Sienen itiöemästä leviävät itiöt ovat pitkiä ja ”bumerangin” muotoisia. (Andersen et al. 2009) Itiöt leviävät ympäristöön laukaisualustalta, joka ampuu itiöt paineella ohjuksen omaisesti ympäristöön. Itiöt voivat kulkeutua suvuttomana anamorfeina kohde-eliöön tai suvullisesti teleomorfeina. Näiden eri sukupuolisten strategioiden on huomattu vaikuttavan merkittävästi siihen, onnistuuko seuraavan isäntäeliön infektoiminen ja osuuko itiöt kohteeseensa. (Evans et al. 1984)

#### 3.1. Kotelosienet

Kotelosienet ovat sienikaarista suurin kaari. Niihin kuuluu n. 64 % tunnetuista sienilajeista. Kotelosieniä on määritelty olevan arviolta 64 000 lajia. Kotelosienille tunnusomainen ominaisuus on säkinomainen itiökotelo, jossa syntyvät kotelosienet. Kotelosienet ovat lähes koko niiden elinkierron ajan haploideja, ja niiden kaksitumainen vaihe on lyhytaikainen. Kotelosieniä esiintyy lähes kaikissa kasvuympäristöissä ja ne ovat erittäin monimuotoisia. *Cordyceps*-suvun loisikoilla on noin millimetrin pituiset kotelopulloitiömät, joita syntyy kuromakannattimen silminnähtävään pahkaalustaan. Kotelosieniin kuuluu useita symbiontteja, kasvien ja eläinten patogeenejä, sekä saprotrofeja eli mädänsyöjiä. Kotelosienistä *Pezizomycota* alakaari sisältää suurimman osan eläimiä -ja kasveja infektoivia sienipatogeenejä. Lisäksi ryhmästä tunnetaan sienipatogeeni, joka voi vaihtaa elinkiertoaan siten, että isäntäkasvin kuoltua se ryhtyy elävältä kasvilta kuolleiden hajottajaksi. (Timonen & Valkonen 2018.)

#### 3.2. Sienisolut

Sienisolut jaotellaan kahteen morfologiseen perustyyppiin: monisoluisiin rihmasieniin ja yksisoluisiin hiivoihin. Sienten solut ovat aitotumaisia, niillä on sisäisiä solurakenteita ja soluseinä. Sienten johtava asema eliönä maanpäällisissä ekosysteemeissä johtuu niiden kyvystä muodostaa

sienirihmastoja ja levittäytyä erittäin tehokkaasti. (Bueno & Silva 2014) Sienisolulla on vankka kitiininen soluseinä ja eräiden sienipatogeenien on tutkittu jopa sietävän hydrostaattisen nestejäännityksen aiheuttaman 20 megapascalin paineen, jonka avulla kasvipatogeenien sienirihmat kykenevät mekaanisella paineella penetroitumaan kasvinsolukon sisään. Tästä syystä sienisolujen soluseinät ovat kaikista eliöistä vankkarakenteisimmat maailmassa. (Money 2001.) Glykaanit ja kitiini ovat hiilihydraatteja, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa sienisolun soluseinässä kovalenttisilla sidoksilla ristisilloituksen avulla. Sienisolujen soluseinien glykaanit voivat esiintyä mannoosin  $\alpha$ - ja  $\beta$  anomeereinä, sekä haaroittuneena galaktomannaanina. Kitiinit ovat N-asetyyli-glukosamiinin alayksiköstä koostuvia  $\beta$ -glukaaneja ja niitä esiintyy soluseinässä  $\alpha$ -glukaaniensa kanssa solukalvon yläpuolella. (Fontaine et al. 2000)

Sienisolulla on fosfolipideistä koostuva solukalvo, golgin laite, mitokondrioita, sekä muita samanlaisia solurakenteita kuin muilla eukaryoottisolulla. Sienisolut ovat kuitenkin erikoistuneet metaboliallaan useisiin erityisaineenvaihdunnan tuotteisiin, kuten mykotoksiineihin, antibiootteihin, statiineihin ja valontuotantoon. Näitä kutsutaan sienten sekundäärimetaboliiteiksi. Näiden lisäksi ne kykenevät aistimaan energian -, hiilen -, typen - ja feromonien lähteitä, sekä aistimaan muun muassa painovoimaa ja sähköä. Painovoiman vaikutusta sienet ohjailevat siirtämällä solujen tumaa solun sisällä, kääntämällä solujaan ja tasapainottelemalla painovoiman vuorovaikutuksen kanssa. Kotelosienillä painovoiman aistimista ei vielä tunneta. (Timonen & Valkonen 2013)

### **3.3. Sienipatogeenien appressoriajärjestelmä**

Monet patogeeniset sienet kykenevät infektoimaan isäntäeliön käyttämällä apressoriasoluiksi, kutsuttuja infektiosoluja. Nämä rakenteet toimivat porttina loiselle isäntäeliön tukirangan läpi niiden sisäisiin kudoserakenteisiin. Appressoriosolut käyttävät äärimmäistä fyysistä voimaa, sekä spesifejä entsyymejä rikkoakseen ulkoisen tukirakenteen suojauksen. Appressoriosolujen tehtävänä on myös erittää immuunipuolustusta heikentäviä tekijöitä, joiden avulla itiön rihmat voivat levittäytyä isäntäeliön sisään. Appressoriajärjestelmä koostuu septiini-välitteisestä uudelleenjärjestetystä F-aktiini ja mikrotubulus verkosta, joka ympäröi itiön soluseinää. Appressoriat jaotellaan eri pääryhmiin niiden rakenteen perusteella ja niitä ovat, yksisoluiset proto-apressoriat, hyaliiniapressoriat ja melanisoidut apressoriat, sekä yhdistelmäapressoriat. (Ryder et al. 2022)

Appressorioita on tutkittu hyvin laajasti infektiota aiheuttavilla sienillä. Appressorioiden solubiologiset ja biokemialliset mekanismit ovat herättäneet tutkijoissa paljon kiinnostusta, mutta isännän elimistöön tunkeutumisen ja infektioreittien mekanismeja ei vielä tunneta yhtä tarkkaan. Eroja kiinnittymiselle, sekä isäntäeliöön tunkeutumiselle on patogeenien välillä on jonkin verran, mutta periaate on sama niin kasvi- kuin sienipatogeeneilla. (Talbot 2019.) Eroavaisuudet eri appressoriasoluilla ovat muun muassa niiden muoto, sekä isännän kutikulan rakenne, tunkeutumisalueen tunnistaminen ja isäntäeliön immuunipuolustuksen torjuminen, kuten aiemmin mainittu. Näitä suojaavia immuunipuolustuksen tekijöitä ovat: (a) antimikrobiaaliset lipidit ja proteiinit, sekä aineenvaihdunnan tuotteet; (b) siistiytyminen, peseytyminen ja maan alle kätkeytyminen; (c) nahanluonnin yhteydessä vanhan nahan pois kuoriutuminen. (Porter 1973.) Useita sieniin yhdistettyjä signalointireittejä on tutkittu appressoriajärjestelmän yhteydestä tunkeutumiseen isäntäeliöön ja järjestelmän syntymekanismiin, kuten cAMP, MAP kinaasi -ja kalsium/kalmoduliini välitteiset signalointireitit. (Jurick et al. 2004, Kojima et al. 2002)

Tunkeutuessaan muurahaisen elimistöön *Ophiocordyceps s.l* tiedetään käyttävän isännän tunnistavia biokemiallisia faktoreita käynnistääkseen rihmaporien muodostumisen itiön appressoriajärjestelmän avulla. Appressoriajärjestelmässä rihmaporat tuottavat painetta muurahaisen ulkoiseen tukirankaan ja vapauttavat entsyymejä, kuten kitinaasia, lipaasia ja proteaaseja, joiden avulla sieni pääsee tunkeutumaan muurahaisen elimistöön. *O. Unilateralis s.l.* appressoriarakenteiden lisäksi patogeenilla on omat hienostuneet sekundäärirakenteet, jotka toimivat vakuutuksena muurahaiseen kiinnittymiselle. Sekundäärirakenteita kuvataan hiuslisäkkeen näköisiksi tahmeapäisiksi itiöiksi, joita on pystytty kasvattamaan laboratorio-olosuhteissa ja tutkimaan niiden rakennetta. (Evans et al. 2011)

#### **4. Lisääntyminen ja lois-isäntä-suhde**

Lisääntymisellä tarkoitetaan uusien eliöiden muodostumista, ja se voi tapahtua suvullisesti tai suvuttomasti. Suvuton lisääntyminen on sienillä paljon tärkeämpää ja se on tehokas keino auttaa sientä leviämään tehokkaasti. Suvuttomassa lisääntymisessä energiankulutus on vähäisempää kuin suvullisessa lisääntymisessä ja siihen kuuluvat ainoastaan mitoottiset solun -ja tumanjakautumiset. Tässä lisääntymistavassa lisääntyminen tapahtuu silmikoitumalla, jolloin solu jakautuu kahtia itiöiden rihmaston palojen, pesäke- tai kuromaitiöiden avulla.

Suvullinen lisääntyminen voi tapahtua usein alkusysäyksenä ravinteiden vähäisyydelle tai muuten epäsuotuisten olosuhteiden seurauksena. Sitä voi tapahtua myös itsehedelmöityksenä. Suvullisen lisääntymisen etuna on geeniyhdistelmien syntyminen, jotka tehokkaasti poistavat haitallisia geeniyhdistelmiä sienipopulaatiosta ja auttaa sopeutumaan muuttuvaan ympäristöön. Kotelosienten rihmasto on haploidia ja yksitumaista. Kotelosienet lisääntyvät kuromaitiöiden avulla. Kuromaitiöt eivät muodostu itiöpesäkkeisiin vaan kuromakannattimien päihin. Kuromakannattimen päässä on alustapahka, jonka sisällä on itiökoteloja kotelopulloissa. Kotelopulloissa kehittyneet itiökotelot leviävät vapauduttuaan ympäristöön ja primaarisena tartuntana infektoi kohde-eliönsä. (Timonen & Valkonen 2013)

#### **4.1. Suvullinen lisääntyminen**

Kaikilla sienillä suvullista lisääntymistä säädellään MAT-lokuksien avulla, jotka ovat geneettisiä alueita sienten genomissa ja vastaavat pariutumista ja sienikannan identiteetistä. MAT-lokuksien määrä ja rakenne morfologiassa voi vaihdella, mutta ne säätelevät kaikkien sienien suvullista lisääntymistä. Ensiaskelel suvulliseen lisääntymiseen sienillä tapahtuu rihmaston erittämiin feromoneihin, jotka ovat pieniä sienten tuottamia kemiallisia molekyyliä. Nämä feromonit tunnistetaan toisen rihmaston vastaanottajamolekyyleillä ja reagoidaan niihin sen mukaan. Kotelosienistä leivinihiivan *Saccharomyces Cerevisiae* lisääntyminen on eniten tutkittu. Pariutumistyyppiltään rihmastolliset kotelosienet ovat joko MF $\alpha$ - tai MF $\alpha$ -soluja. MF $\alpha$ -solut erittävät feromoneja, jotka MF $\alpha$ -solujen GPCR2 vastaanottajamolekyylit/reseptorit tunnistavat. Vastaavasti MF $\alpha$ -solut koirassukusolusta vapauttavat feromoneja, jotka siitosrihman MF $\alpha$ -solujen GPCR1 vastaanottajamolekyylit tunnistavat. Tunnistamisen jälkeen siitosrihma, eli munapesäkkeen uloke kasvaa polaaraisesti koirassukusoluja kohti ja lopulta ne yhtyvät. Useimmilla rihmamaisilla kotelosienillä on G-proteiinivälitteisiä reseptoreja, sekä samankaltaisia signaalimolekyylejä kuin *Saccharomyces Cerevisiae* hiivasienellä. Rihmamaisten kotelosienten heterotallisilla sienillä on MAT-lokus ja alleelit MAT1 ja MAT2, jotka koodaavat HMG transkriptiota sääteleviä polypeptidejä. Nämä proteiinit säätelevät vastaanottajamolekyylin, feromonien sekä itiöemien synteesiä. (Raudaskoski & Salo 2013.)

## 4.2. Suvuton lisääntyminen

Suvuton lisääntyminen rihmastollisilla kotelosienillä tapahtuu kuromaitiöiden avulla, joissa kuromaitiöiden haploidiin rihmaan muodostuu kotelo munapesäkkeestä. Munapesäkkeestä haploidit solut kulkeutuvat askogeenisen rihman hakaseen, joka käyristyy hakaseksi. Itiöt yhdistyvät hakasessa diploideiksi ja meioottisen jakautumisen seurauksena itiökotelo alkaa muodostua askogeenisen rihman päähän. Itiökotelon valmistuttua, askogeeniseen rihmaan muodostuu vierelle uusi hakanen, jossa uusi itiökotelo voi valmistua. Alustapahkassa itiökotelot ovat kotelopulloissa, jossa solulimat ja tumat yhtyvät. Kotelopullossa tapahtuu meioosia, josta itiöpulot vapautuvat ja ilmaleviävienä kulkeutuvat infektoimaan isäntää. (Salo & Timonen 2013)

## 5. Infektiosykli

Entomopatogeeniset sienipatogeenit kohtaavat useita esteitä matkallaan infektoimaan isäntäeliötään. Kyetäkseen onnistuneesti infektoimaan eliötä, niiden on taattava turvallinen kiinnittyminen niveljalkaisen ulkoiseen tukirankaan, tunkeuduttava sen läpi ja välttyä joutumasta torjutuksi jo aiemmin mainittujen isäntäeliön ulkoisten, mutta myös sisäisten puolustusmekanismien kautta. Parasitoivien sienten on myös kyettävä hallitsemaan isäntäeliön käyttäytymistä tappamatta isäntää, sekä suojeltava eliön ruumista saaliilta ja muilta loismikrobeilta. (Evans et al. 1984)

### 5.1. Kiipeäminen kasvillisuuteen

Mekanismeja muurahaisen manipuloinnille (Kuva 2.) ei vielä täysin tiedetä, mutta muurahaisen kulkeutumista korrelle *Ophiocordyceps* -lajien ohjailemana on tutkittu kasvattamalla infektoituja *Camponotini*-heimon muurahaisia. On huomattu, että verrattaessa terveisiin muurahaisiin, *Ophiocordyceps* sienipatogeenit aiheuttavat kouristuksia infektoiduissa muurahaisissa, jolloin muurahainen ei pääse kiipeämään n. 25 cm korkeammalle. Hevosmuurahaisille on tyypillistä, että ne pesivät n. 20 metrin korkeuteen metsän pohjakerroksesta ja kulkevat pohjakerrokseen ruoanhankintareissulla. Sieni-infektioita hevosmuurahaisilla ei tunneta pesimäalueen ympäristössä. Kouristuksien aiheuttaminen muurahaiselle takaa sen, että isäntä ei pääse kiipeämään loisikalle epäsuotuisaan korkeuteen, vaan se jää pohjakerrokseen sienen itiöiden levittäytymiselle suotuisampaan korkeuteen.

## 5.2. Kuolemanotteen mekanismi

Kuolemanotteessa (Kuva 2.), missä muurahainen tarttuu purentaelimistöllään lehden alapintaan, on huomattu lihasten rappeutumista, joka aiheutuu *Ophiocordyceps* muurahaisloisikan infektoivasta vaikutuksesta isäntäeliöön. Leukaraajan lukittumisesta lehteen kuluu noin 6 tuntia muurahaisen kuolemaan. Muurahaisen leukojen lihaksissa sarkoplastisen kalvoston tiheys on huomattavasti pienempi infektoituneella muurahaisella, sekä mitokondrioiden määrä ja teho ovat leukaraajojen alueilla heikommät. Tutkimuksessa on huomattu, että kuolemanotteen infektiivaihetta edeltävänä aikana atrofiaa leukaraajojen sarkoplastisessa retikkelissä ei esiinny, sillä leukojen avaamiselle tarpeellisia toimintoja tapahtuu ennen lehtisuoneen ankkuroitumista. Leukaraajojen avaamiseen kuluu runsaasti energiaa, sekä lehteen tarrautuminen vaatii voimakkaan kiinnittytymisen. Muutokset infektoituneilla muurahaisilla leuan lihaksistossa esiintyvät voimakkaana energiavajauksena. Lisäksi aktiini-myosiini sillat Z-linjassa ovat rikkoutuneet, joka aiheuttaa leukojen avautumisen fyysisen mahdottomuuden kuolemanotteen jälkeen. Kuolemanote saa näin ollen aikaan muurahaisen pysyvän ankkuroitumisen lehden alapuolen lehtisuoneen muurahaisen kuolemaan saakka. (Hughes et al. 2011)

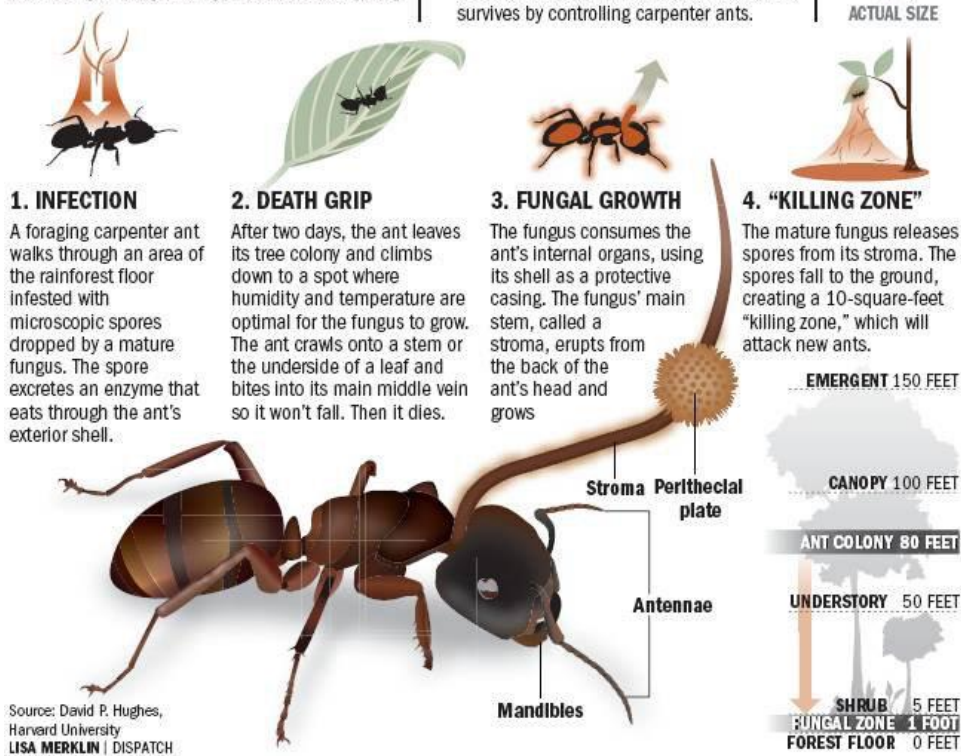
## 5.3. Sieni-infektion kasvaminen ja muurahaisen valtaaminen

*Ophiocordyceps* -loisten alustapahkan kotelopullon itiöiden kiinnittyminen hyönteiseen etenee hydrofobisten interaktioiden avulla. Sienen itiöiden kuoriproteiinien ja uuden isännän kuoriepiteelin lipidikerroksen välillä tapahtuu liimautuminen adhesiinien ja hydrofobiinien avulla. (Bayry et al. 2013) Liimautumisen jälkeen kuten aiemmin mainittu, infektoivat rihmat läpäisevät muurahaisen kuoren appressoriajärjestelmällä ja penetroituvat muurahaiseen. Infektoivat rihmat valtaavat muurahaisen hemoseelin, eli verilaguunin ympäri muurahaisen sisäistä tukirankaa, rihmat kasvavat muurahaisen sisällä samalla tavoin kuin vapaasti elävät hiivasienet. Muutaman päivän kuluttua hiivavaiheen jälkeen, sieni kolonisoituu verilaguuniin ja erittää muurahaisen käyttäytymiseen vaikuttavia toksineja. (Evans et al. 2013)

## How to make a zombie ant

*Ophiocordyceps unilateralis*, a fungus found in the tropical rainforests of Thailand, survives by controlling carpenter ants.

ACTUAL SIZE



**Kuva 2.** Kuvituskuva *Ophiocordyceps Unilateraliksen* infektiocyklin vaiheista, sekä hevosmuurahaisen ja sienipatogeenin morfologiasta. (David P. Hughes – Harvard University)

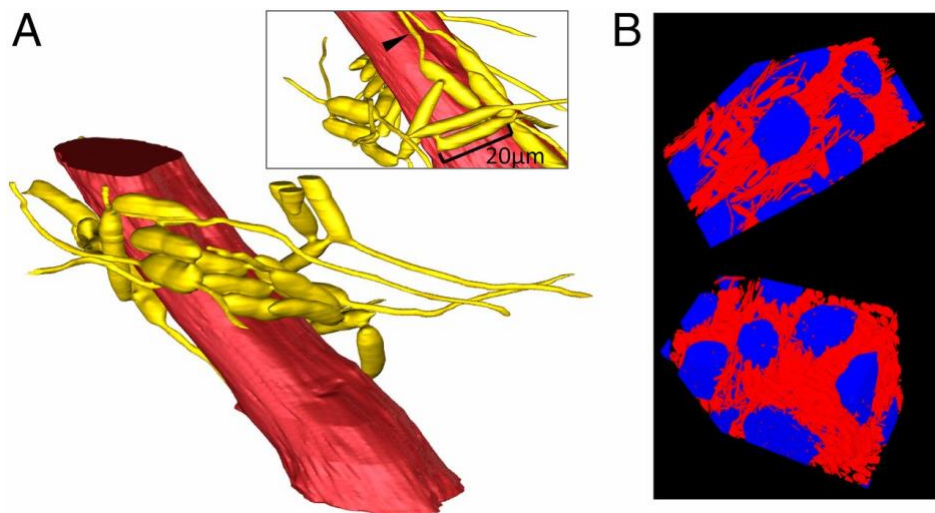
## 6. Manipulaation mekanismit

Patogeenisten organismien vaikutusta isäntäeliöön eri infektioreittien osalta, on tutkittu mahdollisuuksia kolmeen eriteltyyn mekanismiin, joilla loinen kykenee vaikuttamaan isäntänsä käyttäytymiseen. Nämä mekanismit vaikuttavat neuroimmunitettiin, jolloin patogeeni kykenevät biokemiallisesti ylittämään keskushermoston suojaimekanismit. Patogeeniset organismit voivat vaikuttaa synteeseihin, joilla valmistetaan isäntäeliön välittäjäaineita, ja inhiboida isännän välittäjäaineiden säätelyä eliön elimistössä. Kolmantena mekanismina voidaan vaikuttaa geenien ekspressioon, sekä proteiinien, kuten erilaisien entsyymien, rakenneproteiinien, sekä säätelyproteiinien tuottamiseen. Todennäköistä on, että monet mekanismit vaikuttavat yhdessä eliön käyttäytymisen säätelyyn, eivätkä nämä kolme ole todellisuudessa ainoita mekanismeja, jotka yksin osallistuvat käyttäytymisen manipulaatioon. (Kaiser et al. 2019)

## 6.1. *O. Unilateraliksen* biokemialliset mekanismit manipulaatiolle

*O. Unilateraliksen* tunnetaan erittävän kudosspesifisiä metaboliitteja ja muokkaavan isäntäeliönsä geeniekspressiota, sekä rappeuttavan hevosten leikkauksien lihaksia, kun muurahainen tarttuu kasvinosaan kuolemanotteella. (Hughes et al. 2011) Tarkkaan ei kuitenkaan tiedetä, kuinka nämä metaboliitit ja isäntäeliön geenien ekspresio saadaan aikaan muurahaisen liikkeen manipulaatiota. Kolmiulotteisella visualisoinnilla, sekä erilaisilla kuvantamismalleilla elektronimikroskopiassa on selvitetty, että *O. Unilateraliksen* sienisolut levittäytyvät pitkälle isäntämuurahaisen elimistöön, mutta ei lainkaan aivoihin saakka. Havainnosta voidaan päätellä, että eliön käyttäytymisen manipuloiminen lähtisi perifeerisistä osista muurahaista. Sienisolujen on huomattu myös kiertävän muurahaisen lihaksista rihmana, ympäröivän lihaskudosta verkkona pitkin eliön ruumista ja onnistuvan mahdollisesti sillä tavoin ohjailemaan muurahaisen liikkeitä.

Fredericksenin ja hänen tutkimuskollegojensa (2017) tutkimusta johdettiin siten, että *Camponotini*-heimon muurahaisia infektoidaan laboratoriossa *O. unilateralis s.l.* -sienillä ja kuvattiin SEM (Kuva 3.) elektronimikroskoopilla infektiosyklin viimeisessä vaiheessa. Biologisena kontrollina tutkimukselle käytettiin generalistista *Bauveria bassiana* patogeeniä, joka infektoi samoja muurahaisia, mutta ei manipuloi niiden käyttäytymistä. (Roy et al. 2006)



**Kuva 3.** Kolmiulotteinen kuvantamismalli sienirihmaston verkoista ympäröiden lihassäikeitä leikkauksen lihaksissa. A) Yksittäissäikeet, joissa keltaisella sienirihmasto. B) Hermostokimpuun useiden säikeiden ympärillä olevat punaiset sienirihmastot. (Suomennettu lähteestä Fredericksen et al. 2017)



Fredericksenin tutkimuksessa käytettiin elektronimikroskopiaa, sekä bioinformatiikan kuvantamisohjelmia, joiden avulla kyettiin mallintamaan tuloksia. Huomattiin, että *O. unilateralis* manipuloi muurahaisen käyttäytymistä, sekä kyseinen sienipatogeeni muodostaa myös rihmastoja muurahaisten lihassäikeisiin, luoden liitosten väliin huomattavia aukkoja. Toisin kuin *O. Unilateralis*, *B. Bassiana* ei osoittanut minkäänlaista sienirihmaston muodostamista isäntäeliön lihaksistossa. Terve lihaskudos on tiukasti kiinnittynyttä säiettä, jonka välissä ei ole ylimääräisiä välejä säikeiden liitoksessa. Tuloksia vertailemalla voidaan päätellä, että *O. Unilateralis* käyttää hyväkseen sienirihmastoja manipuloidessaan isäntäeliötään. Rinnakkaistutkimuksesta voidaan myös tulla siihen tulokseen, että muurahaisen manipulaatio ei tässä tapauksessa tapahdu aivojen alueella, vaan manipulaatio tapahtuu pikemminkin perifeeristä lihaksistoa ohjaamalla sienirihmastojen avulla, sekä erittämällä sekundäärimetaboliitteja lihaskudoksiin. Fredericksenin tutkimuksessa kuvantamismallista huomattiin, että useat sienirihman verkoista eivät suoraan koskettaneet lihassäikeitä, vaan pikemminkin epäsuorasti vaikuttivat ravinteiden kuljetukseen sienisoluihin. Sienirihmastojen sienisolut kykenevät kollektiivisesti kommunikoimaan toistensa kanssa ja lihassäikeisiin tunkeutuminen antaa ymmärtää, että tämä toimenpide lienee tärkeä biokemiallinen reitti isäntäeliön manipulaatiolle. (Fredericksen et al. 2017)

## **6.2. Guanovoihapon ja sfingosinin vaikutus muurahaisen keskushermostossa**

Charissa de Bekkerin tutkimuksessa (2014) hänen tutkijakollegoidensa kanssa he selvittivät *Ophiocordyceps Unilateralis s.l.* -sienten kykyä infektoida eri lajin muurahaisia, jopa niitä, joiden ei ole tavattu infektoituneen luonnossa. *Ophiocordyceps Unilateralis s.l.* huomattiin olevan kykenemätön manipuloimaan kaikkien muurahaislajien käyttäytymistä, ainoastaan kahden lajin. Tämän huomattiin johtuvan siitä, että kyseinen sienipatogeeni ei kykene vaikuttamaan kaikkien muurahaislajien aivoihin ja keskushermostoon (CNS). Bekker ja tutkimusta ajaneet kollegat tulivat siihen johtopäätökseen, että manipulaatioon vaikuttaa *Ophiocordyceps Unilateralis s.l.* tuottamat eri yhdisteet, jotka spesifisti manipuloivat vain tiettyjen muurahaislajien käyttäytymistä.

*Camponotus Castaneuksen* aivoista tunnistettiin kaksi suurella pitoisuudella *O. Unilateraliksen* leviäimestä rikastunutta yhdistettä, guanovoihappoa (GBA) ja sfingosinia. GBA:ta ja L-threo-sfingosinia injektioitiin eri kombinaatioilla *C. Castaneus* -lajin muurahaisiin. Injektioilla ei huomattu

olevan minkäänlaista vaikutusta, sillä muurahaiset eivät olleet infektoituneet *O. Unilateraliksella*, jolloin näiden yhdisteiden mahdollista vaikutusta muihin sienien tuottamiin tekijöihin ei voitu havaita. Koska molempia tuotteita tuotetaan eliöissä normaaliolosuhteissa, on todennäköistä, että GBA:n ja sfingosiinin rikastumiseen aivoissa on johtanut jotkin muut tekijät, jonka sienipatogeeni saa aikaan. Sienten tuottamia sieni-sfingosiineja ei tosin ole koskaan aikaisemmin raportoitu muuta kuin toksineina, jotka vaikuttavat sfingolipidien syntyyn. Tästä syystä voidaan sanoa, että *Ophiocordyceps Unilateralis s.l.* todellakin aiheuttaa sfingosiinien ja GBA-tasojen nousun muurahaisen aivoissa osana manipulaatiomekanismia muiden sienien tuottamien yhdisteiden mukana. (de Bekker et al. 2014)

### **6.3. Enterotoksiinien vaikutus käyttäytymistä manipuloivien geenien ekspressoimiseen muurahaisissa**

*Ophiocordyceps* -lajien genomeja vertaamalla on tutkittu Charissa de Bekkerin tutkimuksessa (2017) useita mahdollisia kandidaatteja ortologisille geeneille, jotka tuottavat käyttäytymistä manipuloivien reaktioreitteihin vaikuttavia proteiineja. Tutkimuksessa rakennettiin *Ophiocordyceps* -sienille luonnostelmagenomeja, käyttämällä kahta eri tyyppin DNA-kirjastoa. Rinnakkain asetetut genomit yhdisteltynä vaihtelivat 21.91–23.92 (Mbp) miljoonan emäsparin välillä. Tämä tehtiin, jotta voitiin ennustaa RNA-seqillä geenisekvenssejä ja geneettisiä toistojaksoja genomeissa. Vertaamalla viiden eri muurahaisia infektoivien *Ophiocordyceps* -lajien genomeja voitiin huomata, että näistä viidestä jokainen indusoi eri tasolla eliön manipulaatioon vaikuttavia patogeenisiä tekijöitä. Nämä viisi *Ophiocordyceps* -lajia tuottavat patogeenisyyteen liittyviä proteiineja, joita ei ole tavattu missään muissa tutkituissa kotelosienissä. Geneeissä, joiden on tutkittu liittyvän muurahaisten kuolemanotteen parentakäyttäytymiseen, on huomattu klusterisia sekundäärimetaboliitteja *Ophiocordyceps*-suvun entomopatogeenistä, jotka vaikuttavat geenien luentaan aktivoituneissa kuolemanotteissa. Sekundäärimetaboliittien on huomattu vaikuttavan erityisesti *Ophiocordyceps Unilateraliksen* infektoivassa vaikutuksessa *Camponotini*-heimon muurahaisiin.

De Bekkerin tutkimuksessa (2017) huomattiin, että vertailemalla eri *Ophiocordyceps* -lajeja keskenään voidaan todeta, että biokemialliset sienisolujen prosessit *Ophiocordyceps* -lajeilla ovat samankaltaisia kuin muillakin kotelosienillä. Näitä ovat muun muassa, transkriptio, signaalitransduktio ja proteiinien kuljetus. Kotelosienillä ei havaita kuitenkaan samoja peptidejä sisältäviä genejä, jotka koodaavat pieniä eritettyjä, bioaktiivisia proteiineja ja enterotoksiineja.

*Ophiocordyceps* -lajien enterotoksiineja on tutkittu fylogeneettisellä analyysillä, ortologisella klusteroinnilla, sekä proteomiikkaa hyväksi käyttäen. Yksi näiden sienten yhteisestä ortologisesta geenin tuottamista enterotoksiineista esiintyy muita useammin kuolemaotteen yhteydessä. Leukojen lukittumisen jälkeen kuolemanotteessa tämän kyseisen enterotoksiinin luenta lakkaa välittömästi. Enterotoksiinien vaikutuksesta bakteeri-infektioissa on huomattu kemosensoisten kykyjen heikentymistä, jonka perusteella voidaan uskoa, että enterotoksiineilla voisi olla vaikutusta myös sieni-infektion kulussa *Ophiocordyceps* -lajeilla. (De Bekker et al. 2017)

## 7. *Ophiocordyceps* -sienet lääketieteessä ja bioteknologiassa

### 7.1. Lääketieteellinen käyttö

Loisikoiden suku sisältää useita endoparasitoideja, jotka infektoivat laajasti eri suvun niveljalkaisia. Näiden patogeenin on tutkittu olevan loistavia kandidaatteja lääketieteelliselle kehitykselle, sekä tuhoeläinten biologiselle kontrolloimiselle bioteknologiassa. Kuuluisin lääketieteessä ja bioteknologiassa sovelletuista loisikoista on *Ophiocordyceps sinensis* eli Kiinanloisikka. *O. Sinensiksellä* on pitkä historia sen hyödyistä lääketieteessä. Sen farmaseuttiset, sekä lääkinnälliset ominaisuudet ovat tehneet siitä suuren tulonlähteen Nepalissa. *Ophiocordyceps*-suvun sienet tuottavat aineita, joilla on antitumoraalista ja immunostimulanttista vaikutusta. *Ophiocordyceps sinensis* infektoi perhosentoukkia Aasiassa kuumilla ja kosteilla alueilla. (Lindequist et al. 2005)

Yksiä tärkeimmistä loisikoista hyödynnetyistä tuotteista, joita käytetään lääketieteessä immunosuppressoreina ovat syklosporiinit. Näitä käytetään ihmisen elinsiirroissa, jotta estettäisiin uuden immuunipuolustuksen aiheuttamaa hylkimisreaktiota ihmisen elimistössä. Cordyceps tuotteita kutsutaan nimellä Cordysepiini (Ophiocordiini) ja sen rakenne on adensiinin kaltainen, se toimii nukleosidianalogina ja inhiboi puriinisynteesiä elimistössä. Cordysepiini myös sekaantuu mTOR-reseptoreiden signaalointiin ja sen inhibiittoreja tutkitaankin paljon syöpätutkimuksissa. (Chen et al. 2008) Loisikoiden tuottamia aineita on tutkittu laajasti ja niiden vaikutukset tiivistettynä liittyvät anti-inflammatorisiin, antidiabeettisiin, antioksidanttisiin, antituumorisiin, proseksuaalisiin, apoptoottisiin ja immuunipuolustusta inhiboiviin ja aktivoiviin vaikutuksiin. (Dworecka-Kazak 2014.)

*Ophiocordyceps sinensis* suosio aasialaisessa lääketieteessä johtuneen sen käyttötarkoituksesta parantaa ihmisten seksuaalista haluttomuutta ja impotenssia. *O. Sinensis* tuottamia yhdisteitä on kaupattu nimellä, ”Himalajan Viagra” Nepalin alueella. Aasialaisten kutsuma nimitys näille yhdisteille on, ”Yarsagumba” ja sen on mainittu olleen 2016 maailman kallein luonnosta kerätty lääketieteellinen lääkeaine, maksaen n. 128 000 USD per kilogramma. Himalajan viagran toivossa ihmiset ovat tunkeutuneet lain mukaan kielletyille alueille keräämään *O. Sinensistä*, jotta voisivat kasvattaa taloudellista tilannettaan tuottamalla kyseisestä sienipatogeenistä lääkeaineita. (Lalit & Poonam 2021)

Cordysepiinin vaikutusta miesten lisääntymiseen on tutkittu Buu-Miin Huanin ja hänen tutkimuskollegojensa hiiritutkimuksessa. Tutkimuksessa testattiin miesten lisääntymiselinten testosteronituotannon stimuloimista, sekä leydigin solujen steroidogeneesiin kiihdyttämistä eri pitoisuuksilla cordysepiiniä ja korionista gonadotropiinia radioimmunomäärityksellä (RIA). Eri konsentraatioita hyödyntämällä huomattiin, että testosteronin määrä nousi huomattavasti puhdistetuissa hiiren leydigin soluissa 3 tunnin vaikutuksen jälkeen. 3 mg/ml cordysepiiniä nosti testosteronin määrää soluissa 800pg/50000 solua vs. kontrollissa ilman cordysepiiniä samassa ajassa testosteronin määrä oli vain n. 200pg/50000 solua. Cordysepiinin konsentraatiota nostamalla huomattiin kuitenkin, että testosteronin steroidogeneesi laski lähelle pohjalukemia, jonka arvellaan johtuvan jonkinlaisesta palautejärjestelmästä leydigin soluissa. Korionisella gonadotropiinilla stimuloituilla soluilla huomattiin olevan cordysepiinin kanssa laskeva vaikutus testosteronin tuotantoon eri konsentraatioilla normaaleissa hiiren leydigin soluissa. Tutkimusta tehtiin myös syövällisten leydigin solujen avulla ja huomattiin, että steroidituotanto oli jälleen korkeampi cordysepiinin vaikutuksesta. Näiden erojen epäillään johtuvan siitä, että cordysepiini sitoutuu eri reseptoreihin syöpäsoluissa ja terveissä leydigin soluissa. Lisäksi syöpäsolujen palautejärjestelmä ei vastaa samalla tavalla inhibitosignaaleihin kuin terveillä soluilla. (Huang et al. 2001.)

## 7.2. *Ophiocordyceps* -sienten potentiaalinen käyttö biologisessa tuholaistorjunnassa

Entomopatogeeniset sienet ovat vaihtoehtoisia mahdollisuuksia hyönteismyrkyille, silloin kuin hyönteiset ovat vastustuskykyisiä kemiallisille hyönteismyrkyille ja geneettisesti modifioituille viljelmille. (Bates et al. 2005) Patogeenisten sienten markkinoille tuominen tuholaistorjunnassa on kuitenkin erittäin hidasta, sillä hyönteisiä infektoivat sienet ovat rajoittuneita niiden hitaan tappamistehokkuutensa vuoksi. Viljelmiä tuhoavat hyönteiset kerkeävät tehdä huomattavaa tuhoa, ennen kuin viljelmiin ruiskutetut hyönteispatogeeniset sienet ehtivät infektoida hyönteiset ja tappaa niitä. (St Leger et al. 1996)

Bioteknologiassa potentiaalisten hyönteisiä infektoivien sienten virulenssia ja kykyä sietää stressiä voidaan kuitenkin teknologian avulla muokata, jolloin eri tavoilla näitä sieniä muokkaamalla saadaan lisättyä niiden infektiotehokkuutta. (Fang et al. 2012) *Ophiocordyceps* lajien anamorfisten, eli suvuttomien muotojen kasvattaminen laboratorio-oloissa on erittäin haastavaa ja *Ophiocordyceps* -sienten lisääntyminen on hyvin hidasta. (Isaka et al. 2001) Tästä syystä *Ophiocordyceps* -lajien käyttöön tuholaistorjunnassa on käytännöllisiä haasteita. (Dworecka-Kazak 2014.) *Bauveria Bassiana* sienipatogeeniä sen sijaan käytetään muun muassa Kiinan metsiä tuhoavaan Massonin kuusentoukkaa vastaan. Yli 36 vuotta *B. Bassiana* ja sen geenimuunneltuja vaihtoehtoja on käytetty Kiinassa metsänhoitoon laskien dramaattisesti kemiallisten tuholaistorjunta-aineiden käyttöä alueella. (Lidder et. Sonnino 2012) Vaikka *B. Bassiana* patogeeniä on käytetty vuosikymmenten ajan bitorjunta-aineena, *B. Bassiana* käytössä bitorjunta-aineena on ollut samoja ongelmia kuin muidenkin sienipatogeenien käytössä tuholaistorjunnassa. *B. Bassiana* on ympäristöystävällinen vaihtoehto kemiallisille torjunta-aineille. Se tuottaa lukuisia toksiineja kuten, bauverisiinia, bassianiniinia, oksaalihappoa, beauverolidiitteja, oosporeiinia ja tenelliiniä. Tuholaishyönteisten on tavattu kuitenkin useasti kehittävän resistenssiä *B. Bassianalle*, muun muassa lisäämällä geenien ekspression säätelyä, jotka tuottavat epidermaalisia proteiineja ja sytokromi P450 hajottavia tekijöitä. (Kirkland et al. 2005)

Sienipatogeenien käyttöä bitorjunta-aineina tutkitaan ympäri maailmaa. Niiden vaikutus tuholaistorjunnalle tulevaisuudessa on ympäristölle edullisempi vaihtoehto, kuin kemikaalisten tuholaistorjunta-aineiden. Vastaisuudessa sienipatogeenien toksiinit ja GMM sienet tulevat näkymään laajemmin maa -ja metsätaloudessa. (McKinnon et al. 2017)

## 8. Kirjallisuusviitteet

1. Andersen SB, Gerritsma S, Yusah KM, Mayntz D, Hywel-Jones NL, Billen J, Boomsma JJ, Hughes DP. The life of a dead ant: the expression of an adaptive extended phenotype. *Am Nat.* 2009 Sep;174(3):424-33. doi: 10.1086/603640. PMID: 19627240.
2. Bates, S. L., Zhao, J. Z., Roush, R. T., & Shelton, A. M. (2005). Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature biotechnology*, 23(1), 57–62. <https://doi.org/10.1038/nbt1056>
3. Bayry J, Aimanianda V, Guijarro JI, Sunde M, Latgé JP. Hydrophobins-Unique fungal proteins. *PLoS Pathol.* 2013;8, e1002700.
4. Bueno, D.J., Silva J.O., FUNGI | The Fungal Hypha, *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, Academic Press, 2014, Pages 11-19, ISBN 9780123847331, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00132-4>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300001324>)
5. Chen, L. S., Stellrecht, C. M., & Gandhi, V. (2008). RNA-directed agent, cordycepin, induces cell death in multiple myeloma cells. *British journal of haematology*, 140(6), 682–391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06955.x>
6. Cranshaw, W., & Redak, R., (2013). *Bugs rule!: An Introduction to the World of Insects*, Princeton University Press, pages 329-331. ISBN 9781400848928
7. Dawkins, R. *The extended phenotype: the long reach of the gene*. Oxford University Press, Oxford (1982).
8. de Bekker, C., Quevillon, L.E., Smith, P.B. et al. Species-specific ant brain manipulation by a specialized fungal parasite. *BMC Evol Biol* 14, 166 (2014). <https://doi.org/10.1186/s12862-014-0166-3>
9. de Bekker, C., Ohm, R.A., Evans, H.C. et al. Ant-infecting *Ophiocordyceps* genomes reveal a high diversity of potential behavioral manipulation genes and a possible major role for enterotoxins. *Sci Rep* 7, 12508 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12863-w>
10. de Faria MR, Wraight SP (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control* 43: 237–256.
11. Dworecka-Kaszak B. Cordyceps fungi as natural killers, new hopes for medicine and biological control factors. *Ann Parasitol.* 2014;60(3):151-8. PMID: 25281812.

12. Evans H.C., Elliot SL, Hughes D.P. Ophiocordyceps unilateralis: A keystone species for unraveling ecosystem functioning and biodiversity of fungi in tropical forests? *Commun Integr Biol.* 2011 Sep;4(5):598-602. doi: 10.4161/cib.4.5.16721. Epub 2011 Sep 1. PMID: 22046474; PMCID: PMC3204140.
13. Evans, H. C., Elliot, S. L., & 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), e17024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017024>
14. Evans, H.C., 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*, Volume 82, Issue 1, 1984, Pages 127-150, ISSN 0007-1536, [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(84\)80219-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(84)80219-3).
15. Fang, W., & St Leger, R. J. (2012). Enhanced UV resistance and improved killing of malaria mosquitoes by photolyase transgenic entomopathogenic fungi. *PloS one*, 7(8), e43069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043069>
16. Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, Gurr SJ. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature.* 2012 Apr 11;484(7393):186-94. doi: 10.1038/nature10947. PMID: 22498624; PMCID: PMC3821985.
17. Fontaine, T., Simenel, C., Dubreucq, G., Adam, O., Delepierre, M., Lemoine, J., Vorgias, C. E., Diaquin, M., & Latgé, J. P. (2000). Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *The Journal of biological chemistry*, 275(36), 27594–27607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M909975199>
18. Fredericksen MA, Zhang Y, Hazen ML, Loreto RG, Mangold CA, Chen DZ, Hughes DP. Three-dimensional visualization and a deep-learning model reveal complex fungal parasite networks in behaviorally manipulated ants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Nov 21;114(47):12590-12595. doi: 10.1073/pnas.1711673114. Epub 2017 Nov 7. PMID: 29114054; PMCID: PMC5703306.
19. Hamilton, C., Lejeune, B. T., & Rosengaus, R. B. (2011). Trophallaxis and prophylaxis: social immunity in the carpenter ant *Camponotus pennsylvanicus*. *Biology letters*, 7(1), 89–92. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0466>
20. Hu X, Xiao G, Zheng P, Shang Y, Su Y, Zhang X, Liu X, Zhan S, St Leger RJ, Wang C. Trajectory and genomic determinants of fungal-pathogen speciation and host adaptation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Nov 25;111(47):16796-801. doi: 10.1073/pnas.1412662111. Epub 2014 Nov 3. PMID: 25368161; PMCID: PMC4250126.

21. Huang, B. M., Hsu, C. C., Tsai, S. J., Sheu, C. C., & Leu, S. F. (2001). Effects of *Cordyceps sinensis* on testosterone production in normal mouse Leydig cells. *Life sciences*, 69(22), 2593–2602. [https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/s0024-3205\(01\)01339-x](https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/s0024-3205(01)01339-x)
22. Hughes DP, Andersen SB, Hywel-Jones NL, Himaman W, Billen J, Boomsma JJ. Behavioral mechanisms and morphological symptoms of zombie ants dying from fungal infection. *BMC Ecol.* 2011 May 9;11:13. doi: 10.1186/1472-6785-11-13. PMID: 21554670; PMCID: PMC3118224.
23. Isaka, M., Jaturapat, A., Rukseree, K., Danwisetkanjana, K., Tanticharoen, M., & Thebtaranonth, Y. (2001). Phomoxanthonones A and B, novel xanthonone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis* species. *Journal of natural products*, 64(8), 1015–1018. <https://doi.org/10.1021/np010006h>
24. Jones, T. H., Clark, D. A., Edwards, A. A., Davidson, D. W., Spande, T. F., & Snelling, R. R. (2004). The chemistry of exploding ants, *Camponotus* spp. (cylindricus complex). *Journal of chemical ecology*, 30(8), 1479–1492. <https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1023/b:joec.0000042063.01424.28>
25. Kaiser, M., Arvidson, R., Zarivach, R., Adams, M. E., & Libersat, F. (2019). Molecular cross-talk in a unique parasitoid manipulation strategy. *Insect biochemistry and molecular biology*, 106, 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.11.009>
26. Kirkland, B. H., Eisa, A., & Keyhani, N. O. (2005). Oxalic acid as a fungal acaracidal virulence factor. *Journal of medical entomology*, 42(3), 346–351. <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.3.346>
27. Kobayashi GS. Disease Mechanisms of Fungi. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 74. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8103/>
28. Kojima, K., Kikuchi, T., Takano, Y., Oshiro, E., & Okuno, T. (2002). The mitogen-activated protein kinase gene *MAF1* is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*, 15(12), 1268–1276.
29. Kumar, V., van de Veerdonk, F.L. & Netea, M.G. Antifungal immune responses: emerging host–pathogen interactions and translational implications. *Genome Med* 10, 39 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0553-2>
30. Laciny, A., Zettel, H., Kopchinskiy, A., Pretzer, C., Pal, A., Salim, K. A., Rahimi, M. J., Hoenigsberger, M., Lim, L., Jaitrong, W., & Druzhinina, I. S. (2018). *Colobopsis explodens* sp. n., model species for studies on "exploding ants" (Hymenoptera, Formicidae), with biological



- notes and first illustrations of males of the *Colobopsis cylindrica* group. *ZooKeys*, (751), 1–40. <https://doi.org/10.3897/zookeys.751.22661>
31. Lalit, B.C, Poonam, B. Himalayan Viagra. 2021/01/21 Available from: [https://www.researchgate.net/publication/348648127\\_Himalayan\\_Viagra\\_Ophiocordyceps\\_Sinensis\\_A\\_review](https://www.researchgate.net/publication/348648127_Himalayan_Viagra_Ophiocordyceps_Sinensis_A_review)
  32. Lao, T. D., Le, T. A. H., & Truong, N. B. (2021). Morphological and genetic characteristics of the novel entomopathogenic fungus *Ophiocordyceps langbianensis* (Ophiocordycipitaceae, Hypocreales) from Lang Biang Biosphere Reserve, Vietnam. *Scientific reports*, 11(1), 1412. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78265-7>
  33. Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology*, 25, 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
  34. Lidder, P., & Sonnino, A. (2012). Biotechnologies for the management of genetic resources for food and agriculture. *Advances in genetics*, 78, 1–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394394-1.00001-8>
  35. Lin WJ, Lee YI, Liu SL, Lin CC, Chung TY, Chou JY. Evaluating the tradeoffs of a generalist parasitoid fungus, *Ophiocordyceps unilateralis*, on different sympatric ant hosts. *Sci Rep*. 2020;10(1):6428. Published 2020 Apr 14. doi:10.1038/s41598-020-63400-1
  36. Lindequist U, Niedermeyer TH, Jülich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence Based Complement Alternat Med*. 2005 Sep;2(3):285-99. doi: 10.1093/ecam/neh107. PMID: 16136207; PMCID: PMC1193547.
  37. McFall-Ngai, M. (2007). Care for the community. *Nature*, 445(7124), 153-153. <https://doi.org/10.1038/445153a>
  38. McKinnon, A.C., Saari, S., Moran-Diez, M.E. et al. *Beauveria bassiana* as an endophyte: a critical review on associated methodology and biocontrol potential. *BioControl* 62, 1–17 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10526-016-9769-5>
  39. Money, N.P. (2001). Biomechanics of Invasive Hyphal Growth. In: Howard, R.J., Gow, N.A.R. (eds) *Biology of the Fungal Cell. The Mycota*, vol 8. Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-06101-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-06101-5_1)
  40. Moore J, Adamo S, Thomas F. Manipulation: expansion of the paradigm. *Behav Processes*. 2005 Mar 31;68(3):283-7. doi: 10.1016/j.beproc.2004.10.005. Epub 2005 Jan 6. PMID: 15792709.
  41. Nguyen C, Barker BM, Hoover S, Nix DE, Ampel NM, Frelinger JA, Orbach MJ, Galgiani JN. Recent advances in our understanding of the environmental, epidemiological, immunological,

- and clinical dimensions of coccidioidomycosis. *Clin Microbiol Rev.* 2013 Jul;26(3):505-25. doi: 10.1128/CMR.00005-13. PMID: 23824371; PMCID: PMC3719491.
42. Porter J. R. (1973). Agostino Bassi bicentennial (1773-1973). *Bacteriological reviews*, 37(3), 284–288. <https://doi.org/10.1128/br.37.3.284-288.1973>
43. Ratzka, C., Liang, C., Dandekar, T., Gross, R., & Feldhaar, H. (2011). Immune response of the ant *Camponotus floridanus* against pathogens and its obligate mutualistic endosymbiont. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(8), 529–536. <https://doi-org.pc124152.oulu.fi:9443/10.1016/j.ibmb.2011.03.002>
44. Raudankoski, M., Timonen, S., Valkonen, J. (2013). *Sienten biologia. Gaudeamus.* S.172-174
45. Roy, H. E., Steinkraus, D. C., Eilenberg, J., Hajek, A. E., & Pell, J. K. (2006). Bizarre interactions and endgames: entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual review of entomology*, 51, 331–357. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150941>
46. Ryder, L. S., Cruz-Mireles, N., Molinari, C., Eisermann, I., Eseola, A. B., & Talbot, N. J. (2022). The appressorium at a glance. *Journal of cell science*, 135(14), jcs259857. <https://doi.org/10.1242/jcs.259857>
47. Salo V., Timonen, S., Valkonen, J. (2013). *Sienten biologia. Gaudeamus.* S.163-165
48. Sheehan, G., Farrell, G., & Kavanagh, K. (2020). Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence*, 11(1), 238–246. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1731137>
49. St Leger, R., Joshi, L., Bidochka, M. J., & Roberts, D. W. (1996). Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6349–6354. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.634>
50. Sung GH, Hywel-Jones NL, Sung JM, Luangsa-Ard JJ, Shrestha B, Spatafora JW. Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Stud Mycol.* 2007;57:5-59. doi: 10.3114/sim.2007.57.01. PMID: 18490993; PMCID: PMC2104736.
51. Sybren de Hoog G. 2018. In Seyedmousavi S, Sybren de Hoog G, Guillot J, Verweij PE (ed), *Emerging and Epizootic Fungal Infections in Animals.* Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland. Available from: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-319-72093-7>
52. Talbot NJ. Appressoria. *Curr Biol.* 2019 Mar 4;29(5):R144-R146. doi: 10.1016/j.cub.2018.12.050. PMID: 30836078.
53. Tanji, T., Hu, X., Weber, A. N., & Ip, Y. T. (2007). Toll and IMD pathways synergistically activate an innate immune response in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and cellular biology*, 27(12), 4578–4588. <https://doi.org/10.1128/MCB.01814-06>

54. Taylor DL, Hollingsworth TN, McFarland JW, Lennon NJ, Nusbaum C, Ruesch RW. 2014. A first comprehensive census of fungi in soil reveals both hyperdiversity and fine-scale niche partitioning. *Ecol Monogr* 84:3–20. <http://dx.doi.org/10.1890/12-1693.1>
55. Timonen, S., & Valkonen, J. (2013). Sienten biologia. *Gaudeamus*. S. 219-231
56. Vaara, M., Huovinen, P., Heikkinen, T., Hedman, K., Ahola, T., Meri, S., & Järvinen, A. (2010). Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet: Kirja 1, Mikrobiologia. *Duodecim*. s. 299-300
57. Vega FE, Meyling NV, Luangsa-Ard JJ, Blackwell M (2012) Fungal entomopathogens In: Vega F, Kaya HK, editors. *Insect Pathology*, 2nd ed San Diego: Academic Press; pp. 171–220.
58. Wayne M. Jurick II, Martin B. Dickman, Jeffrey A. Rollins, Characterization and functional analysis of a cAMP-dependent protein kinase A catalytic subunit gene (*pkA1*) in *Sclerotinia sclerotiorum*, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volume 64, Issue 3, 2004, Pages 155-163, ISSN 0885-5765, <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2004.07.004>.
59. Wheat LJ, Azar MM, Bahr NC, Spec A, Relich RF, Hage C. Histoplasmosis. *Infect Dis Clin North Am*. 2016 Mar;30(1):207-27. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.009. PMID: 26897068.
60. Zientz, E., Dandekar, T., & Gross, R. (2004). Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68(4), 745–770. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.745-770.2004>