

IMUNSKI SISTEM ŽUŽELK IN NJIHOV IMUNSKI ODZIV NA ENTOMOPATOGENE GLIVE

INSECT IMMUNE SYSTEM AND THEIR IMMUNE RESPONSE TO ENTOMOPATHOGENIC FUNGI

Eva PRAPROTNIK^{1,2}, Mojca NARAT³, Jaka RAZINGER¹

<http://dx.doi.org/10.3986/fbg0059>

IZVLEČEK

Imunski sistem žuželk in njihov imunski odziv na entomopatogene glive

Imunski sistem predstavlja enega izmed najbolj kompleksnih sistemov, saj nadzoruje interakcije med mikroorganizmi in gostitelji. Najbolj kompleksen imunski sistem imajo sesalci, vendar pa imajo tudi žuželke svoj imunski sistem in poznavanje le-tega ima posreden vpliv na ljudi. Težko je oceniti zdravstveni pomen in finančno breme škodljivih žuželk na ljudi. Ocenjuje se, da žuželke letno uničijo približno 15-18 % svetovne produkcije hrane, bolezni, ki jih prenašajo žuželke, pa so odgovorne za več milijonov smrti ljudi in domačih živali letno. To so razlogi, zakaj je že od konca 19. stoletja prejšnjega tisočletja imunski sistem žuželk predmet podrobnih raziskav, z namenom odkrivanja metod za biološki nadzor nad škodljivimi žuželkami. Namen tega prispevka je obravnavanje tematike in razjasnitev določenih pojmov v slovenskem jeziku, saj je slovensko izrazoslovje na področju imunskega obrambnega sistema nevretenčarjev pomanjkljivo.

Ključne besede: imunski sistem žuželk, entomopatogene glive, imunske signalne poti, parazitizem

ABSTRACT

Insect immune system and their immune response to entomopathogenic fungi

The immune system is one of the most complex systems, as it controls the interactions between microorganisms and hosts. Mammals have the most complex immune system, however insects also have their immune system and improved knowledge of it has an indirect effect on human life quality. It is difficult to assess the health significance and financial burden of harmful insects on humans. It is estimated that insects annually destroy approximately 15-18 % of global food production; furthermore insect-borne diseases are responsible for millions of deaths of people and domestic animals annually. Immune system of insects has been the subject of detailed research since the end of the 19th century in order to discover practical methods for the biological control of harmful insects. The purpose of this paper is to discuss and clarify certain concepts in the Slovenian language, since the Slovenian terminology of invertebrate immune system is sometimes inadequate.

Keywords: insect immune system, entomopathogenic fungi, immune signaling pathways, parasitism

¹ Kmetijski inštitut Slovenije, Hacquetova ulica 17, Ljubljana, SI-1000, Slovenija, e-mail: eva.praprotnik@kis.si, jaka.razinger@kis.si

² Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Jamnikarjeva 101, Ljubljana, SI-1000, Slovenija

³ Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, Domžale, SI-1230, Slovenija, e-mail: mojca.narat@bf.uni-lj.si

UVOD

Imunski sistem večceličnih organizmov temelji na prirojenem in pridobljenem imunskem sistemu. Prirojeni imunski sistem je evolucijsko starejši obrambni mehanizem in temelji na prepoznavanju in uničenju telesu tuje snovi. Prirojeni imunski sistem ni specifičen in reagira na vse morebitno škodljive elemente, ki so iz zunanjega okolja vdrl v telo (LAVINE & STRAND 2002). Pridobljeni imunski sistem pa temelji na specifičnem prepoznavanju tuje molekule, in sicer z vezavo antigena na receptorje limfocitov (BECKAGE 2003). Oba temeljna imunska sistema uporabljata tako celične kot tudi humoralne obrambne strategije, vendar se le-te med prirojenim in pridobljenim imunskim sistemom med seboj razlikujejo.

Pri žuželkah sta najpomembnejša celični in humoralni imunski odziv, ki sodita v okvir prirojenega oz. naravnega imunskega odziva. Žuželčji hemociti definirajo celični imunski odziv s procesi kot so fagocitoza, nodulacija in enkapsulacija, humoralni imunski odziv pa temelji na produkciji protibakterijskih, protiglivnih in protivirusnih molekul, ter melanizirajočega encima fenoloksidaza. Naloga gostiteljskega obrambnega sistema je, da prepreči vdor patogenov, oziroma, da ublaži posledice okužbe, medtem ko se patogeni

poskušajo izogniti imunskemu odzivu in v čim večji meri izkoristiti gostiteljske vire (BECKAGE 2003).

Glive so heterotrofni organizmi in so torej odvisne od organskih snovi, ki jih proizvedejo drugi organizmi. Eden od načinov pridobivanja organskih snovi, ki se ga poslužujejo glive, se imenuje parazitizem. Entomopatogene glive (EPG) so torej glive, ki uspešno parazitirajo žuželke in povzročijo njihovo smrt ali pa jih močno poškodujejo. Da so pri tem uspešne, je potreben stik z gostiteljem, penetracija in kolonizacija hemocela gostitelja (telesna odprtina členonožcev in nekaterih mehkužcev), ter uspešen razvoj spor. V večini primerov spore predstavljajo okuževalno enoto, torej enoto, ki je sposobna prenosa bolezni (ang. Infectious propagule), ta pa se veže na eksoskelet žuželke in prične s penetracijo hif v gostitelja (GILLESPIE IN SOD. 1997; TSAKAS & MARMARAS 2010; BUTT IN SOD. 2016). Koevolucija EPG in žuželk traja že zadnjih 400 milijonov let (LOVETT & ST. LEGER 2017). Najpogostejša interakcija med glivo in žuželko je parazit-gostitelj in je posledica selekcijskega pritiska, ki omogoča neprestani razvoj obrambnih mehanizmov žuželke ter strategije naselitve in preživetja gliv (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013).

IMUNSKI SISTEM ŽUŽELK

Kljub temu, da imajo žuželke le prirojeni imunski sistem, imajo tudi druge učinkovite načine obrambe pred patogenimi organizmi, med katerimi so najpogostejši bakterije, glive, protozoi, virusi in ogorčice (DUBOVSKIY IN SOD. 2016). Najefektivnejši način obrambe je izogibanje in odstranjevanje patogenih organizmov še preden pride do okužbe. Tako vedenje je največkrat prisotno pri socialnih žuželkah. Zaradi večje koncentracije osebkov na enoto površine imajo socialne žuželke povečano možnost okužbe s patogenimi organizmi (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013; BUTT IN SOD. 2016; LU & ST. LEGER 2016).

V primeru prisotnosti EPG *Metarhizium brunneum* mravlje delavke vrste *Lasius neglectus* s česanjem mehansko preprečujejo okužbo svojih ličink. Pri tem lahko uporabijo tudi strup, katerega glavna komponenta je mravljična kislina, s katero omogočijo kemijsko dezinfekcijo okuženega zaroda in delavk (TRAGUST IN SOD. 2013). Termiti vrste *Reticulitermes flavipes* se ob prisotnosti okuženega posameznika odzovejo z značilnim gibanjem, s katerim opozorijo ostale osebe, nato pa sledi pokop okuženega termita (MYLES 2002).

Kobilice vrste *Camnula pellucida* v primeru prisotnosti EPG *Entomophaga grylli* izkoriščajo sončno sevanje, zaradi katerega se njihova telesna temperatura dvigne 10-15°C nad temperaturo okolja. Daljša izpostavljenost temperaturam nad 35°C je za kobilice koristna, saj je to zgornja meja preživetja te glive, ki je ena izmed najpogostejših povzročiteljev naravne smrti pri kobilicah (CARRUTHERS IN SOD. 1992).

Težava pri prepoznavanju patogenov je njihova velika variabilnost, molekularna heterogenost ter za mikroorganizme značilna visoka stopnja mutacije. Vendar obstajajo določene molekularne strukture patogenov, ki so zelo specifične in visoko ohranjene, poleg tega pa pri posameznih patogenih določajo njihovo stopnjo patogenosti, zato morajo biti nujno prisotne. Take specifične molekularne vzorce imenujemo molekule DAMP (ang. Damage Associated Molecular Patterns) in molekule PAMP (ang. Pathogen Associated Molecular Patterns) (MEDZHITOV & JANEWAY 1997). Žuželke so razvile receptorje v hemolimfi, na membrani epidermisa in maščobnem telesu, ki so v primeru mehanske ali encimske poškodbe kutikule ter vdora

mikroorganizmov sposobni prepoznave specifičnih molekul DAMP in PAMP na površini patogena. Ti receptorji se imenujejo receptorji PRR (ang. Pattern-Recognition Receptors) in aktivirajo celični ali humoralni imunski odziv prirojenega imunskega sistema (GROSS 2006).

Celični imunski odziv

Žuželke nimajo krvnih žil; imajo odprt krvožilni sistem, pri katerem hemolimfa obliva tkiva in organe v telesni votlini, hemocelu (TSAKAS & MARMARAS 2010). Celični imunski odziv žuželke temelji na celicah, imenovanih hemociti, ki se nahajajo v hemolimfi. Morfologija hemocitov se med vrstami razlikuje, prav tako pa so lahko različni tudi med osebki iste vrste različnih starosti. Najpogostejši hemociti pri žuželah so granulociti in plazmatociti, ki sodelujejo pri procesih fagocitoze, nodulacije in enkapsulacije (VINSON 1991).

Hemociti lahko fagocitirajo patogene, ki so v primeru manjši od 1 μm (na primer bakterije in kvasovke). Proces se prične z vezavo patogenov (tarčnih celic) na receptorje hemocitov. Membrane posameznih hemocitov se uvihaajo, tvorijo prstu podobne psevdopodije, ki obdajo patogen. Sledi sprostitvev litičnih encimov v fagosom, ki patogen razkrojijo (ROSALÉS 2011).

Enkapsulacija je mehanizem edinstven za žuželke in temelji na združenem delovanju posameznih celic v hemolimfi. Enkapsulacija poteče, ko je tujek prevelik za fagocitozo. Hemociti se razporedijo po površini tujka, dokler ni v celoti prekrit z več plastmi hemocitov (SCHMIT & RATCLIFFE 1977). Enkapsulacija lahko poteče v nekaj minutah od pričetka penetracije patogena. Granulociti so navadno prve celice, ki pridejo v stik s patogenom in nato sprostijo svojo vsebino, ki na površini patogena tvori lepljiv matriks. Ta proces sproži vezavo številnih plazmatocitov, ki tvorijo kapsulo in tako izolirajo patogen. Na koncu sledi še plast granulocit, ki tvorijo tanko ovojnico okoli formirane kapsule. Te kapsule se nato vežejo na notranje strukture gostitelja, kot so maščobna telesa, malpighijeva telesa, žleza slinavka ipd., in so nato odstranjene iz obtoka (BECKAGE 2003).

Med procesom enkapsulacije hemociti, ki se nahajajo v notranjih slojih kapsule, nalagajo melanin in druge toksične molekule v kapsulo in povzročijo smrt parazita (BECKAGE 2003; DUBOVSKIY IN SOD. 2016). Melanin fizično omeji vsiljivca in tako prepreči oziroma upočasni njegovo rast, hkrati pa se med nastajanjem melanina sproščajo strupeni kvinonski intermedijati (CERENIUS & SÖDERHÄLL 2004). Melanizacija

patogenov in poškodovanih tkiv je ena izmed najpomembnejših funkcij prirojenega imunskega sistema in poteka v procesu proPO kaskade. Ob prisotnosti patogena pride do pretvorbe neaktivnega encima profenolo-lksidaza (proPO) v aktivni encim fenolo-lksidaza (PO), kar omogoča sintezo melanina in celjenje kutikule s procesom sklerotizacije. Sklerotizacija je kemijski proces, pri katerem pride do utrditve hitinske kutikule, ki je nato odpornejša na encimsko razgradnjo in tako lahko zavira delovanje glivnih proteaz, katerih funkcija je hidroliza kutikularnih proteinov (ANDERSEN 2003). Serinske proteaze regulirajo delovanje encima PO in tako preprečujejo nepotrebno proizvodnjo strupenih spojin (SÖDERHÄLL IN SOD. 2013). Hkrati serinske proteaze v primeru poškodbe uravnavajo koagulacijo hemolimfe z namenom preprečevanja izgube telesne tekočine in omejevanja gibanja mikrobov (THEOPOLD IN SOD. 2002).

Humoralni imunski odziv

Besedna zveza izhaja iz besede humorizem ali humoralizem in se nanaša na sistem medicine, ki so se ga posluževali starogrški filozofi. Osredotoča se na koncept, da imajo različne kombinacije štirih ključnih telesnih tekočin (kri, sluz, črni in rumeni žolč) značilne učinke na človekovo zdravje in vedenje. V okviru imunskega sistema pri sesalcih pod besedo humoralni imunski odziv razumemo nastanek specifičnih protiteles, ki se večinoma pojavijo v krvi (BROD IN SOD. 2014).

Humoralni imunski odziv žuželk temelji na izločanju protimikrobnih peptidov v hemolimfo, kjer vplivajo direktno na parazite ali posredno preko spodbujanja delovanja hemocitov (BECKAGE 2003). Navadno so sintetizirani iz maščobnega telesa in v manjši meri tudi iz hemocitov, reprodukcijjskih organov in žlez slinavk. Maščobno telo je največji organ v hemocelu in pri žuželah opravlja podobno funkcijo kot ledvice pri vretenčarjih. Poleg sinteze protimikrobnih peptidov deluje tudi kot shramba lipidov, ogljikovih hidratov in proteinov (HOFFMANN 2003; TSAKAS & MARMARAS 2010). Do sedaj je bilo izoliranih čez 150 žuželčjih protimikrobnih peptidov. Načeloma so to majhne molekule, ki se nahajajo v tkivih in organih, ki so izpostavljeni patogenom. Protimikrobni peptidi se vežejo na membrane patogenih organizmov in pri njih povzročijo okvaro ali smrt celic na način, da poškodujejo celično membrano, ustvarjajo luknjice, ki povzročijo izlitje celične vsebine, zavirajo sintezo proteinov ter DNK in RNK molekul ipd. (CHOI IN SOD. 2016).

IMUNSKÉ SIGNALNE POTI ŽUŽELK

Ko receptorji PRR na gostiteljskih celicah zaznajo mikroorganizem, se aktivira serija signalnih molekul znotraj celic. Glede na molekulo PAMP/DAMP, ki jo določena molekula na hemocitu prejme, se določi odziv celice na mikroorganizem. Vinska mušica *Drosophila melanogaster* je modelni organizem za preučevanje signalnih poti prirojenega imunskega sistema (HOFFMANN 2003). Pri žuželkah sintezo protimikrobnih peptidov omogočajo štiri znotrajcelične imunske signalne poti, in sicer Toll, Imd (ang. Immune Deficiency), JNK (ang. Jun Amino-terminal Kinase) in (JAK)/STAT (ang. Janus Kinase/Signal Transducer – Activator of Transcription; BOUTROS IN SOD. 2002). Gram-pozitivne bakterije in glive spodbudijo signalno pot Toll, Gram-negativne bakterije (in v nekaj primerih tudi Gram-pozitivne bakterije) spodbudijo signalno pot Imd (ROSALÉS 2017), glive in virusi pa signalno pot (JAK)/STAT (BUTT IN SOD. 2016).

Signalna pot Toll

Signalna pot Toll temelji na aktivaciji tollu podobnih receptorjev (ang. Toll-like receptors, TLR), ki so sposobni prepoznave določenih molekul PAMP na antigenih (Slika 1). TLR so transmembranski proteini, katerih naloga je prenos signala v procesu imunskega odziva. Aktivacija receptorja TLR zahteva vezavo citokinom podobnega polipeptida Spätzle (ligand) na zunajcelično domeno receptorja TLR, katere naloga je prepoznavanje liganda in prenos signala (EVANS IN SOD. 2006). Tri serinske proteaze so potrebne za aktivacijo polipeptida Spätzle. Sledi konformacijska sprememba (prehod v drugo obliko) TLR in aktivacija znotrajceličnih domen smrti (DD), ki skupaj s TLR tvorijo receptorski kompleks (HOFFMANN 2003). Aktivacija tega kompleksa vodi do fosforilacije proteina Cactus, ki je inhibitor proteina NF kappa B (proteinski kompleks, ki omogoča transkripcijo DNK – transkripcijski faktor), imenovanega Dorsal/Dif (ang. Dorsal Related Immunity Factor). Po degradaciji inhibitorja Cactus sledi translokacija Dorsal/Dif v jedro, kjer aktivira transkripcijo protimikrobnih peptidov (EVANS IN SOD. 2006; ROSALÉS 2017). Rezultat signalne poti Toll je nastanek protiglivnega peptida, imenovanega drozomicin in protibakterijskega peptida, imenovanega dipterin (LEMAITRE & HOFFMANN 2007).

Signalna pot Imd

Aktivacija signalne poti Imd poteče, ko transmembranski protein PGRP-LC (ang. Peptidoglycan reco-

gnition protein) prepozna poly PGN (ang. Polymeric DAP-type Peptidoglycan), ki je značilen za Gram-negativne bakterije. Sledi vezava znotrajceličnih domen smrti (DD) s proteinom Imd, ki skupaj s PGRP-LC tvorijo receptorski kompleks. Protein DREDD (ang. Death-Related ced-3/Nedd2-like Protein) loči protein Imd in tako aktivira njegovo vezavo s kompleksom TAB2 in TAK1. TAK1 je odgovoren za aktivacijo kompleksa IKK, katerega posledica je fosforilacija proteina NF kappa B, imenovanega Relish (HOFFMANN 2003; ROSALÉS 2017). Tega za razliko od Dorsal/Dif proteina (v Toll signalizacijski poti) ne inhibira Cactus, ampak sam vsebuje inhibitorsko sekvenco (DUSHAY IN SOD. 1996). Po fosforilaciji te inhibitorske domene lahko pride do translokacije proteina Relish v jedro, kjer aktivira transkripcijo protimikrobnih peptidov. Protein DREDD naj bi sodeloval pri cepitvi in translokaciji proteina Relish v jedro (STÖVEN IN SOD. 2003). Rezultat signalne poti Imd je nastanek protibakterijskih snovi dipterin, drosocin in atacin (HOFFMANN 2003).

Signalna pot JNK

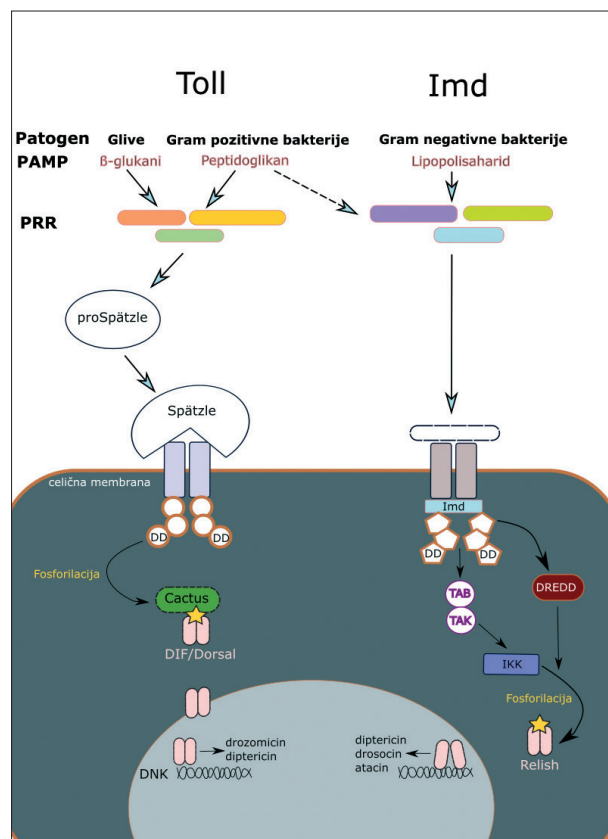
Aktivacija te signalne poti povzroči okoljski stres (sevanje, visoka temperatura, oksidativni stres, poškodbe DNK), vnetni citokini in rastni faktorji. MAPK kinaza (ang. Mitogen-Activated Protein Kinase) prenese signal na JNK. Sledi fosforilacija transkripcijskih faktorjev Jun in Fos, ki skupaj tvorita kompleks AP-1, ta pa aktivira transkripcijo tarčnih genov. Signalna pot JNK je vključena v številne biološke procese, kot so embrionalni razvoj, apoptoza, imunski sistem, uravnavanje stresa in diferenciacija celic. JNK signalna pot je kompleksna in je aktivirana s številnimi mehanizmi (GARVER IN SOD. 2013). Na izražanje citoskeletnih proteinov v signalni poti JNK naj bi imela vpliv tudi signalna pot Imd, kar bi lahko pomenilo povezavo med protimikrobnimi obrambnimi mehanizmi in procesi obnove tkiva (BOUTROS IN SOD. 2002).

Signalna pot JAK-STAT

Aktivacija signalne poti JAK-STAT povzroči vezavo citokinom podobnih proteinov v hemolimfi, imenovanih upd, na transmembranski receptor Dome, ki je vezan na protein JAK. Konformacijska sprememba receptorja Dome povzroči fosforilacijo proteina JAK in citoplazemske domene receptorja Dome, s čimer se

ustvarijo ustrezna mesta za vezavo proteina Stat92E. Sledi fosforilacija proteina Stat92E in translokacija njegove spremenjene oblike v jedro, kjer aktivira transkripcijo genov (BINA & ZEIDLER 2013). Geni vinske mušice kodirajo tudi proteine, ki zavirajo JAK-STAT

signalno pot. Eden izmed takih inhibitorjev je Socs36E (ROSALÉS 2017). JAK-STAT signalna pot je poleg imunskega sistema vključena tudi v embrionalni razvoj in-sektov, formacijo spola, trahealni sistem, hematopoezo in prebavni sistem (BINA & ZEIDLER 2013).



Slika 1: Poenostavljena skica imunskih signalnih poti. Signalna pot Toll: molekule PRR (ang. Pattern-Recognition Receptors) prepoznajo molekule PAMP (ang. Pathogen Associated Molecular Patterns) gliv in Gram-pozitivnih bakterij, čemur sledi pretvorba polipeptida Spätzel iz neaktivne v aktivno obliko. Transmembranski protein skupaj z DD (ang. Death Domain) tvori receptorski kompleks, čemur sledi fosforilacija proteina Cactus. Sledi sprostitvev transkripcijskega faktorja Dif/Dorsal v jedro, kjer aktivira transkripcijo protimikrobnih peptidov. Signalna pot Imd (ang. Immune Deficiency): molekule PRR prepoznajo molekule PAMP Gram-negativnih bakterij. Sledi vezava DD in proteina Imd s transmembranskim proteinom. DREDD (ang. Death-Related ced-3/Nedd2-like Protein) loči Imd in aktivira njegovo vezavo s kompleksom TAB2 in TAK1. Aktivira se kompleks IKK, zaradi katerega pride do fosforilacije proteina Relish. Sledi translokacija proteina v jedro, kjer pride do transkripcije protimikrobnih peptidov.

ODZIV IMUNSKEGA SISTEMA ŽUŽELK NA ENTOMOPATOGENE GLIVE

Glive, ki povzročajo bolezni in smrt pri žuželkah imenujemo entomopatogene glive. EPG so med številnimi mikroorganizmi najpomembnejše povzročiteljice bolezni in smrti pri žuželkah (MOORE IN SOD. 2000) in predstavljajo okolju prijaznejšo alternativo kemijskim insekticidom (ROBERTS & HAJEK 1992). Za zatiranje škodljivih žuželk se v kmetijstvu najpogosteje uporablja glive iz reda Hypocreales, med katerimi prevladujejo predstavniki rodov *Metarhizium* spp. in *Beauveria* spp. (ROBERTS & ST. LEGER 2004). Uporaba teh gliv prevladuje zaradi širokega razpona tarčnih gostiteljev, saj je mnogo vrst gliv znotraj teh rodov fakultativnih parazitov in posledično za dokončanje življenjskih ciklov niso popolnoma odvisni od svojega gostitelja (GOETTEL IN SOD. 2001).

Vstop EPG v telo gostitelja poteka po sledečem vrstnem redu: pričvrstitev konidijev (nespolna in negibliva glivna spora) na kutikulo žuželke, v mnogih, vendar ne v vseh primerih, tvorba apresorija, penetracija kutikule, kjer ob ustreznih pogojih spore pričnejo kaliti, kolonizacija hemocela in na koncu sporulacija. Imunski sistem gostitelja se tekom celotnega procesa poskuša upreti okužbi in kolonizaciji patogena.

Pričvrstitev konidijev na kutikulo

Kutikula predstavlja prvo in najpomembnejšo oviro za EPG, saj je zaradi UV svetlobe, spreminjajoče se temperature in vlage ter gostiteljskih obrambnih sistemov

to za glivo zelo zahtevno okolje (BUTT IN SOD. 2016; BUTT & GOETTEL 2000). Gostitelju je pomembno, da s samo strukturo in kemijsko sestavo kutikule onemogoči pričvrstitev čim večjega števila konidijev in posledično zmanjša njihovo stopnjo patogenosti (BOUCIAS & PENDLAND 1991).

Zunanjo plast kutikule predstavlja hidrofolni sloj, bogat z lipidi, kateremu sledijo sloji hitina in kutikularnih proteinov (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013; MUN IN SOD. 2015), zaradi katerih je posledično nepropustna za večino organizmov (npr. virusi, bakterije, protozoji). Ti v telo žuželke navadno vstopajo preko prebavnega trakta. Glive pa so razvile aktivne mehanizme za vezavo propagul (razmnoževalnih enot, navadno konidiji ali blastospore) na kutikulo. V kopenskih ekosistemih zračni konidiji pasivno potujejo preko zraka in proste vode, ki teče čez substrat, kjer so prisotni insekti. Konidiji se na hidrofolne površine eksoskeleta gostitelja vežejo s pomočjo proteinov imenovanih hidrofolini, ki se nahajajo v zunanjih slojih celične stene konidijev. Hidrofolini omogočajo tvorbo hidrofolnega ovoja (BOUCIAS IN SOD. 1988; WÖSTEN 2001). Zračni konidiji imajo slabo sposobnost vezave na hidrofilne površine, še posebej v vodnih okoljih. Konidiji EPG rodu *Metarhizium* se posledično težje pričvrstijo na površino komarjevih (vodnih) ličink kot pa na kopenske gostitelje, predvidoma zaradi hidrofilne narave in pomanjkanja specifičnih ogljikovodikov v kutikuli ličink (GREENFIELD IN SOD. 2014).

Poleg fizične odpornosti, gostiteljski organizem poseduje tudi druge mehanizme, ki povečujejo odpornost kutikule pred EPG. Na patogenezo gliv lahko vpliva z različnimi koncentracijami ogljikovodikov, estrov, alkoholov in ketonov (ANDERSEN 2010; GREENFIELD IN SOD. 2014), ter toksičnimi maščobnimi kisljinami, lipidi in aldehidi v zunanji plasti kutikule; gosenice vrst *Heliethis zea* in *Spodoptera fragiterda* imajo v kutikuli prisotno kaprilno kislino, ki zavira kalitev glive *B. bassiana* (SMITH & GRULA 1982), določeni lipidi in aldehidi v kutikuli stenice zelene smrdljivke *Nezara viridula* pa imajo fungistatični učinek (zavira rast gliv, vendar glive ne ubije) na vrsto *M. anisopliae* (SOSA-GOMEZ IN SOD. 1997). Gostiteljski organizem na patogenezo gliv vpliva tudi z levitvijo in metamorfozo, saj levitev potencialno zmanjša učinkovitost patogena (FARGUES & VEY 1974), ter z izborom simbiotov, ki proizvajajo fungistatične spojine; samice samotarske ose čebeljega volkca *Philanthus triangulum* gojijo bakterije iz rodu *Streptomyces* v posebnih antenskih žlezah, ki jih nanesejo na svoj zarod. Bakterija je posledično prisotna v kutikuli osje bube, kar znatno zmanjša možnost glivne okužbe in posledično poveča možnost preživetja bube (KALTENPOTH IN SOD. 2005).

Glive posedujejo številne gene, ki kodirajo proteine, odgovorne za vezavo konidijev na kutikulo, hkrati pa ti proteini vplivajo tudi na imunski sistem žuželk. Produkcijo hidrofolinov opredeljujejo geni *hyd*. Študija ZHANG IN SOD. 2011 je pokazala, da inaktivacija le-teh vpliva na spremembo površinskih elementov konidijev, zmanjša se hidrofolnost, adhezijska sposobnost in virulenca konidijev. Geni *mad* omogočajo produkcijo proteinov Mad1 in Mad2, ki pozitivno vplivajo na vezavo konidijev na kutikulo žuželk in korenine rastlin ter hkrati vplivajo na izražanje genov, ki so povezani s kalitvijo in formacijo blastospor (WANG & ST. LEGER 2007a). Protein celične stene *cwp10* povečuje hidrofolnost konidijev in sposobnost vezave konidijev EPG (LI IN SOD. 2010). Gen *MrCYP52* kodira encim, ki je potreben za učinkovito razgradnjo voskastih ogljikovodikov v zunanjih delih kutikule (LIN IN SOD. 2011).

Penetracija kutikule

Ko se konidij uspešno veže na kutikulo, prične z izražanjem kalitvene cevke. Na koncu le-te lahko pride do formacije apresorija (nabrekliina, ki olajša pritrditev in vdor glive v gostitelja s pomočjo prodornega klina; VEGA IN SOD. 2012). Lipidi predstavljajo enega izmed pomembnejših zalog hranil in so pred penetracijo transportirani v nastajajoči apresorij. Tam pride do razgradnje lipidov, pri čemer se sprošča glicerol, posledično pa se zviša tudi turgor (sila znotraj celice, s katero membrana pritiska na celično steno; WANG & ST. LEGER 2007b). Tvorba apresorija je pri večini EPG vrstno specifična in torej odvisna od hranil in fizikalno-kemijskih elementov na površini kutikule (ST. LEGER IN SOD. 1989). Penetracija glive nastopi z mehansko silo turgorja in uporabo encimov za razgradnjo kutikule. MCCAULEY IN SOD. 1968 so raziskovali penetracijo EPG *M. anisopliae* v kutikulo ličink štirih vrst pokalic (Elateridae). Ličinke pokalic se imenujejo strune in so pomembni škodljivci kmetijskih pridelkov tako v Sloveniji kot tudi drugje po svetu. Večina okužb se je pojavila v pregibnih intersegmentnih membranah in spiraklih (dihalne odprtine), saj se nanje lažje vežejo kot pa na hitinizirane in zunanjim dejavnikom izpostavljene dele kutikule. Hkrati višja vlaga v pregibnih delih poveča možnost kalitve.

Zunanji del epikutikule je odporen na kemijsko in encimsko razgradnjo, vendar je pri večini žuželk ta plast relativno krhka in torej bolj občutljiva na mehansko silo (HEPBURN 1958). Prokutikula vsebuje hitinske fibrile, ki so skupaj z lipidi vgrajeni v proteinski matriks, torej so pri razgradnji kutikule in prevzemanju

hranil najuspešnejši konidiji, ki vsebujejo encime, kot so proteaze, hitinaze, lipaze in drugi (CHARNLEY 2003).

V virulentnih konidijih je prisoten gen, ki kodira nastanek proteina Pr1, ki omogoča razgradnjo fungi-statičnih elementov na površini kutikule in sodeluje pri penetraciji hif znotraj kutikule gostitelja (SHAH IN SOD. 2005; SMALL & BIDOCHKA 2005). Gen *MPL1* je pri *M. anisopliae* vpet v akumulacijo lipidov in ima posledično velik vpliv na debelino hif in zmožnost mehanske penetracije konidija v telo gostitelja (WANG & ST. LEGER 2007b).

Kolonizacija hemocela

Večina notranjih parazitov odloži svoja jajčeca ali spore znotraj hemocela svojega gostitelja, saj so tam idealni prehranski in okoljski pogoji za nadaljnji razvoj (VINSON 1991). Na podlagi študij EPG *M. anisopliae* sta se razvili dve teoriji o strategijah, ki jih EPG uporabijo pri parazitiranju gostitelja:

1. Strategija rasti: glive se v hemocelu hitro in gosto razrastejo in porabljajo hranila svojih gostiteljev, fizično poškodujejo njihova tkiva ter blokirajo tok hemolimfe, kar privede do smrti žuželke (ANDERSON IN SOD. 2011).
2. Strategija produkcije toksičnih sekundarnih metabolitov: glive imajo v hemocelu počasnejšo vegetativno rast in svoje gostitelje ubijejo s produkcijo strupenih sekundarnih metabolitov (SRIVASTAVA IN SOD. 2009), ki pri žuželah povzročijo paralizo, krče, spremembo v obnašanju, motnje v koordinaciji... Destruksin na primer povzroči nepravilno delovanje kalcijevih kanalčkov v žuželčjih mišičnih membranah, sledi mišična paraliza in ob velikih koncentracijah tudi smrt (SAMUELS IN SOD. 1988; KERSHAW IN SOD. 1999).

Za uspešno kolonizacijo hemocela se morajo glive ubraniti pred napadom gostiteljskega imunskega odziva. Prepoznavi gostiteljskega imunskega sistema se izognejo z uporabo različnih strategij, in sicer EPG rodu *Entomophthora* se v dvokrilcih razmnožujejo v obliki protoplasta (glivne celice brez celične stene; VINSON 1991), EPG rodu *Metarhizium* uporabljajo »kamuflačno strategijo«, kjer hifne celice obdajo s hidrofilnim kolagenom (WANG & ST. LEGER 2006), EPG vrste *M. anisopliae* lahko s procesom fagocitoze vstopi v gostiteljske celice, s pomočjo katere lahko neovirano potuje po telesu gostitelja (KURTTI & KEYHANI 2008). Nekateri sevi rodov *Metarhizium* in *Beauveria* so odporni na drozomicin, glavni protiglivični peptid vinske mušice (LU & ST. LEGER 2016), nekatere EPG pa so

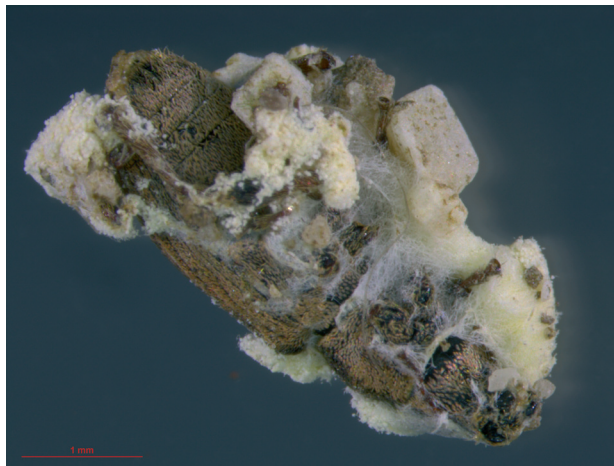
sposobne tvorbe sekundarnih metabolitov, na primer destruksin in oosporein, ki delujejo kot efektorske molekule, ki zavirajo proPO kaskado in posledično tvorbo protiglivičnih peptidov in melanizacije (FENG IN SOD. 2015). Veliko vrst EPG ob stiku s hemocelom spremeni svojo rast iz večcelične micelijske oblike v enocelično obliko kvasovk. Take glive imenujemo dimorfne glive. S spremembo rastne oblike se izognejo imunskemu odzivu gostitelja in se posledično lahko neovirano množijo v hemocelu (BOYCE & ANDRIANOPOULOS 2015). Mehanizmi, ki sprožijo dimorfizem gliv, so pri žuželah slabo poznani (GAUTHIER 2015), vendar temeljijo na tem, da gliva v stiku s hemocelom prične s tvorbo kvasnih celic, imenovanih blastospore, te pa nato pričnejo z brstitvijo. Blastospore EPG vrste *B. bassiana* izlevijo epitope (območje na antigenu, ki ga prepozna imunski sistem) na celični steni, imunski sistem žuželke pa jih zato ne prepozna kot tujke (WANCHOO & SOD. 2009).

Sporulacija

Ko EPG izčrpa svojega gostitelja, še posebej dušikovih virov, kvasna oblika zopet preide v micelijsko. Hife nato pričnejo rasti navzven, od znotraj predrejo kutikulo in tvorijo spore na vrhu hif (Slika 2). Sporulacija lahko poteče tako v živih kot tudi mrtvih gostiteljih (BROBYN & WILDING 1983; FREIMOSER IN SOD. 2003). Za uspešno kalitev konidiji potrebujejo vlago in ustrezna hranila, kot so sladkorji, lipidi, amino kisline in dolgoveržne maščobne kisline (SMITH & GRULA 1981). Proces produkcije, širjenja in preživetja spor je v veliki meri odvisen od zunanjih dejavnikov, zato glive proizvedejo veliko število spor (BELAY & TENKEGNA 2017) kot prilagoditev na visoko verjetnost, da večina teh spor ne bo preživela in uspešno okužila novega gostitelja. Glede na okoljske razmere, glivne hife začnejo bdisi s proizvodnjo infektivnih spor za takojšnji prenos na naslednjega gostitelja, ali mirujočih spor, ki postanejo aktivne ob ugodnejših razmerah (LOVETT & ST. LEGER 2017). Proizvodnja infektivnih spor za takojšnji prenos na naslednjega gostitelja velja za učinkovitejšo, saj dlje kot je žuželčje truplo izpostavljeno okolju, večja je možnost, da ga obrastejo saprofitske glive (gniloživke), je prestavljen na območje neugodno za sporulacijo ali pa ga pojejo mrhovinarji (ROY IN SOD. 2006). Glive so znane tudi po sposobnosti manipulacije gostiteljevega vedenja z namenom zagotovitve boljših pogojev za prenos spor. Najbolj znan je primer EPG vrste *Ophiocordyceps unilateralis*, katere gostitelj so mravlje. Okužena mravlja zapusti svoje mravljišče in se s svojimi mandibulami (spodnje čeljusti) oprime spodnje

strani drevesnega lista, kjer sta vlaga in temperatura najustreznejši za sporulacijo. Iz mravljinca trupla sča-

soma zrastejo spore, ki padejo na mimoidoče mravlje in krog se zaključí (ANDERSEN in sod. 2009).



Slika 2: Odrasle žuželke okužene z entomopatogenimi glivami; levo - dvokrilec iz družine pravih muh (Muscidae) okužen z glivo *Trichothecium roseum*; desno - predstavnik družine rilčkarjev (Curculionidae), okužen z EPG *Metarhizium robertsii*. Foto: Jaka Razinger

ZAKLJUČEK

Žuželke so neprestano izpostavljene potencialno patogenim mikroorganizmom in evkariontskim parazitom, zato so razvile različne obrambne mehanizme. Njihova obramba temelji na fizični obrambi s pomočjo kutikule ter odzivu prirojenega imunskega sistema s sintezo hemocitov in protimikrobnih peptidov. Kutikula žuželk skupaj z vedenjsko ekologijo in fizičnim odstranjevanjem patogenov predstavlja primarno obrambo žuželk, ki je hkrati tudi energijsko najvarčnejša. Sam imunski sistem predstavlja sekundarno obrambo, ki nastopi po vstopu patogena v gostitelja in ima veliko skupnega s prirojenim imunskim sistemom vretenčarjev, vključno z izločanjem protimikrobnih peptidov, fagocitozo in encimsko razgradnjo patogenih organizmov. Glivne spore v stiku z žuželčjo kuti-

kulo začnejo s tvorbo apresorija in prodornega klina, nato pa s pomočjo encimov in sile turgorja penetrirajo v telo gostitelja. Sledi kolonizacija hemocela, pri kateri pa se glivni patogeni soočajo s številnimi obrambnimi mehanizmi imunskega sistema žuželk.

Poleg ključne vloge v naravnih ekosistemi, entomopatogene glive predstavljajo alternativo kemičnim insekticidom, saj so glive najpogostejši naravni povzročitelji obolenja in smrti žuželk. V kmetijstvu imata torej proučevanje adhezijskih lastnosti mikroorganizmov veliko vlogo pri biološkem varstvu rastlin pred škodljivimi žuželkami in pleveli (OERKE & DEHNE 2004), v medicini pa predstavljajo učinkovito orodje za nadzor bolezni, ki se prenašajo preko žuželčjih vektorjev (KLEMPNER in sod. 2007).

SUMMARY

The immune system of multicellular organisms is based on the innate and acquired immune system. The innate immune system is an evolutionary older defense mechanism and is based on recognition and removal of foreign substances. The innate immune system is not specific and reacts to all possible harmful

elements that have entered the body from the external environment (LAVINE & STRAND 2002). The acquired immune system is based on the specific recognition of the foreign molecule by binding of the antigen to the lymphocytic receptors (BECKAGE 2003). Both types of the immune system use cellular and humoral defensive

strategies, although the strategies differ between innate and acquired immune system.

The immune system of insects is based on innate immunity, which is characterised by specific cellular and humoral immune response. Humoral immune response is based on the production of antibacterial, antifungal and antiviral molecules together with melanization reaction, which includes enzyme phenoloxidase. Insect hemocytes define cellular immune response with processes such as phagocytosis, nodulation and encapsulation (BECKAGE 2003). One cannot forget the importance of behavioral ecology and physical removal of pathogens which represents the primary and more energy-efficient defense of insects since it allows avoiding and removing pathogenic organisms before infection even occurs. This behavior is most often present in social insects. Due to the increased concentration of specimens per unit area, social insects have an increased possibility of infection with pathogens (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013; BUTT et al., 2016; LU & ST. LEGER 2016). Function of the host defense system is therefore to prevent the pathogen invasion, or to diminish the consequences of the infection, while the pathogen attempts to avoid the immune response and to make the most of the host resources (BECKAGE 2003).

The problem of identifying pathogens is their high variability, molecular heterogeneity and high degree of mutation. However, pathogens possess certain molecular structures that are very specific and conservative, therefore they need to be present in individual pathogens, as they determine their degree of pathogenicity. This specific molecular samples are called DAMP molecules (Damage Associated Molecular Patterns) and

PAMP molecules (Pathogen Associated Molecular Patterns) (MEDZHITOV & JANEWAY 1997). In case of mechanical or enzymatic damage of the cuticle, followed by the invasion of microorganisms, insects developed receptors in the hemolymphs, epidermal membranes and the fat body that are capable to identify specific DAMP and PAMP molecules on the surface of the pathogen. These receptors are called PRR receptors (Pattern-Recognition Receptors) and are crucial for activating proper cellular or humoral immune response (GROSS 2006).

Fungi are heterotrophic organisms and therefore depend on organic matter produced by other organisms. One way to obtain organic matter is in the form of parasitism. Entomopathogenic fungi (EPF) are therefore fungi that successfully infect insect's body and cause death or serious injury. In order to be successful, they need to come into physical contact with the host, followed by penetration and colonization of the host haemocoel (cavity between the organs of arthropods and some molluscs) and lastly a successful spore development. In most cases, spores represent infectious propagules that bind to the exoskeleton of an insect and begin the penetration of fungal hyphae into the host (GILLESPIE et al., 1997; TSAKAS & MARMARAS 2010; BUTT et al., 2016).

EPF and insects coevolved for over 400 million years (LOVETT & ST. LEGER 2017). The most frequent interaction between fungus and insect is the parasite-host interaction and is the result of selection pressure that allows the continuous development of insect defense mechanisms and the fungus attack strategy (ORTIZ-URQUIZA & KEYHANI 2013).

LITERATURA

- ANDERSEN, S.O., 2003: *Cuticle*. V: *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science (ZDA): 281-282.
- ANDERSEN, S. O., 2010: *Insect cuticular sclerotization: A review*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40(3): 166–178. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2009.10.007>
- ANDERSEN, S.B., S. GERRITSMA, K.M. YUSAH, D. MAYNTZ, N.L. HYWEL-JONES, J. BILLEN, J. J. BOOMSMA, & D.P. HUGHES, 2009: *The Life of a Dead Ant: The Expression of an Adaptive Extended Phenotype*. *The American Naturalist* 174(3): 424-433.
- ANDERSON, R. D., A. S. BELL, S. BLANFORD, K.P. PAAIJMANS, & M. B. THOMAS, 2011: *Comparative growth kinetics and virulence of four different isolates of entomopathogenic fungi in the house fly (Musca domestica L.)*. *Journal of Invertebrate Pathology* 107(3): 179–184. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.04.004>
- BECKAGE, N.E., 2003: *Immunology*. V: *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science (ZDA): 555-560.
- BELAY, Y. C., & T. A. TENKEGNA, 2017: *Bioassay and Pilot Mass Production of Entomopathogenic Fungus, Beauveria bassiana for the Control of Coffee Berry Borer (Hypothenemus hampei: Scolytidae)*, Ferrari. *J. Appl. Biosci. Journal of Applied Biosciences* 117: 11669–11683. <https://doi.org/10.4314/jab.v11i1.4>
- BINA, S., & M. ZEIDLER, 2013: *JAK/STAT pathway signalling in Drosophila melanogaster*. V: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Landes Bioscience (Austin, TX): 2000-2013.

- BOUCIAS, D. G., J. C. PENDLAND, & J. P. LATGE, 1988: *Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle*. Applied and Environmental Microbiology 54(7): 1795–1805.
- BOUCIAS, D. G., & J. C. PENDLAND, 1991: *Attachment of Mycopathogens to Cuticle. The Initial Event of Mycoses in Arthropod Hosts. V: The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. Plenum Press (New York): 101–105.
- BOUTROS, M., H. AGAISSE, & N. PERRIMON, 2002: *Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in Drosophila*. Developmental Cell 3: 711–722.
- BOYCE, K. J., & A. ANDRIANOPOULOS, 2015: *Fungal dimorphism: The switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host*. FEMS Microbiology Reviews 39(6): 797–811. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv035>
- BROBYN, P. J., & N. WILDING, 1983: *Invasive and developmental processes of Entomophthora muscae infecting houseflies (Musca domestica)*. Trans. Br. Mycol. Soc. 80(1): 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(83\)80157-0](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(83)80157-0)
- BROD S., L. RATTAZZI, G. PIRAS, & F. D'ACQUISTO, 2014: *'As above, so below' examining the interplay between emotion and the immune system*. Immunology 143: 311–318.
- BUTT, T. M., C. J. COATES, I. M. DUBOVSKIY, & N. A. RATCLIFFE, 2016: *Entomopathogenic Fungi: New Insights into Host-Pathogen Interactions*. Advances in Genetics 94. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2016.01.006>
- BUTT, T. M., & M. S. GOETTEL, 2000: *Bioassays of entomogenous fungi*. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. School of Biological Sciences, University of Wales (Swansea): 141–195. <https://doi.org/10.1079/9780851994222.0141>
- CARRUTHERS, R. I., T. S. LARKIN, H. FIRSTENCEL, & Z. FENG, 1992: *Influence of thermal ecology on the mycosis of a rangeland grasshopper*. Ecology 73(1): 190–204.
- CERENIUS, L. & K. SÖDERHÄLL, 2004: *The phenoloxidase-activating system in invertebrates*. Immunological Reviews 198: 116–126.
- CHARNLEY A.K., 2003: *Fungal Pathogens of Insects: Cuticle Degrading Enzymes and Toxins*. Advances in Botanical Research 40: 241–321.
- CHOI, M. K., S. SON, M. HONG, M. S. CHOI, J. Y. KWON, & J. LEE, 2016: *Maintenance of membrane integrity and permeability depends on a patched-related protein in Caenorhabditis elegans*. Genetics 202(4): 1411–1420. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.179705>
- DUBOVSKIY, I.M., N.A. KRYUKOVA, V.V. GLUPOV, & N.A. RATCLIFFE, 2016: *Encapsulation and nodulation in insects*. ISJ 13: 229–246.
- DUSHAY, M. S., B. ASLING, & D. HULTMARK, 1996: *Origins of immunity: Relish, a compound Rel-like gene in the antibacterial defense of Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences 93(19): 10343–10347. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.19.10343>
- EVANS, J. D., K. ARONSTEIN, Y.P. CHEN, C. HETRU, J.L. IMLER, H. JIANG, M. KANOST, G.J. THOMPSON, Z. ZOU, & D. HULTMARK, 2006: *Immune pathways and defence mechanisms in honey bees Apis mellifera*. Insect Molecular Biology 15 (5): 645–656.
- FARGUES, J., & A. VEY, 1974: *Modalités d'infection des larves de Leptinotarsa decemlineata par Beauveria bassiana au cours de la mue*. Entomophaga 19(3): 311–323.
- FENG, P., Y. SHANG, K. CEN, & C. WANG, 2015: *Fungal biosynthesis of the bibenzoquinone oosporein to evade insect immunity*. Proceedings of the National Academy of Sciences 112(36): 11365–11370. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503200112>
- FREIMOSER, F. M., A. GRUNDSCHÖBER, U. TUOR, & M. AEBI, 2003: *Regulation of hyphal growth and sporulation of the insect pathogenic fungus Entomophthora thripidum in vitro*. FEMS Microbiology Letters 222(2): 281–287. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00315-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00315-X)
- GARVER, L. S., G. DE ALMEIDA OLIVEIRA, & C. BARILLAS-MURY, 2013: *The JNK Pathway Is a Key Mediator of Anopheles gambiae Antiplasmodial Immunity*. PLoS Pathogens 9(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003622>
- GAUTHIER, G. M., 2015: *Dimorphism in Fungal Pathogens of Mammals, Plants, and Insects*. PLoS Pathogens 11(2): 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004608>
- GILLESPIE, J.P., M. R. KANOST, & T. TRENCZEK, 1997: *Biological mediators of insect immunity*. Annu. Rev. Entomol. 42: 611–43.
- GOETTEL, M.S., A.E. HAJEK, J.P. SIEGEL, & H.C. EVANS, 2001: *Safety of Fungal Biocontrol Agents. V: Fungi as Biocontrol Agents. Progress, Problems and Potential*. CABI Publishing (Wallingford): 347–377.

- GREENFIELD, B. P. J., A. M. LORD, E. DUDLEY, & T. M. BUTT, 2014: *Conidia of the insect pathogenic fungus, Metarhizium anisopliae, fail to adhere to mosquito larval cuticle*. Royal Society Open Science 1(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.140193>
- GROSS, L., 2006: *A Protean Insect Receptor Holds the Key to Broad-Based Pathogen Recognition*. PLoS Biol 4(7): e246. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040246>
- GROSS, J., K. SCHUMACHER, H. SCHMIDTBERG, & A. VILCINSKAS, 2008. *Protected by fumigants: Beetle perfumes in antimicrobial defense*. Journal of Chemical Ecology 34(2): 179–188. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9416-9>
- HEPBURN, H. R., 1985: *Structure of the integument*. V: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Pergamon Press (Oxford).
- HOFFMANN, J.A., 2003: *The immune response of Drosophila*. Nature 426(6): 33–38.
- KALTENPOTH, M., W. GÖTTLER, G. HERZNER, & E. STROHM, 2005: *Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation*. Current Biology 15: 475–479. DOI 10.1016/j.cub.2004.12.084
- KERSHAW, M. J., E. R. MOORHOUSE, R. BATEMAN, S. E. REYNOLDS, & A. K. CHARNLEY, 1999: *The Role of Destruixins in the Pathogenicity of Metarhizium anisopliae for Three Species of Insect*. Journal of Invertebrate Pathology 74(3): 213–223. <https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4884>
- KLEMPNER, M.S., T.R. UNNASCH, & L. HU, 2007: *Taking a Bite Out of Vector-Transmitted Infectious Diseases*. N Engl J Med. 356(25): 2567–2569. doi:10.1056/NEJMp078081
- KURTTI, T. J., & N. O. KEYHANI, 2008: *Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. Microbiology 154(6): 1700–1709. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/016667-0>
- LAVINE, M.D., & M.R. STRAND, 2002: *Insect hemocytes and their role in immunity*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1295–1309.
- LEMAITRE, B., & J. HOFFMANN, 2007: *The Host Defense of Drosophila melanogaster*. Annual Review of Immunology 25(1): 697–743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- LI, J., S. H. YING, L. T. SHAN., & M. G. FENG, 2010: *A new non-hydrophobic cell wall protein (CWP10) of Metarhizium anisopliae enhances conidial hydrophobicity when expressed in Beauveria bassiana*. Applied Microbiology and Biotechnology 85(4): 975–984. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2083-8>
- LIN, L., W. FANG, X. LIAO, F. WANG, D. WEI, & R. J. ST. LEGER, 2011: *The MrCYP52 cytochrome P450 monooxygenase gene of Metarhizium robertsii is important for utilizing insect epicuticular hydrocarbons*. PLoS ONE 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028984>
- LORD, J. C., 2005: *From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control*. Journal of Invertebrate Pathology 89(1): 19–29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2005.04.006>
- LOVETT, B., & R. J. ST. LEGER, 2017: *The Insect Pathogens*. Microbiology Spectrum 5(2): 1–19. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0001-2016>
- LU, H. L., & R. J. ST. LEGER, 2016: *Insect Immunity to Entomopathogenic Fungi*. Advances in Genetics 94: 251–285. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.002>
- MCCAULEY, V. J. E., R. Y. ZACHARUK, & R. D. TINLINE, 1968: *Histopathology of green muscardine in larvae of four species of Elateridae (Coleoptera)*. Journal of Invertebrate Pathology 12(3): 444–459. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(68\)90352-2](https://doi.org/10.1016/0022-2011(68)90352-2)
- MEDZHITOV, R., & C. A. JANEWAY JR, 1997: *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. Opinion in Immunology 9: 4–9.
- MELILLO, D., R. MARINO, P. ITALIANI, & D. BORASCHI, 2018: *Innate Immune Memory in Invertebrate Metazoans: A Critical Appraisal*. Frontiers in Immunology 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01915>
- MOORE, D., G. ROBSON, & A. TRINCI, 2000: *Fungi as pathogens of animals, including humans*. V: *21st Century Guidebook to Fungi*. Cambridge University Press (Cambridge): 411–448. doi:10.1017/CBO9780511977022.017
- MUN, S., M. Y. NOH, N. T. DITTMER, S. MUTHUKRISHNAN, K. J. KRAMER, M. R. KANOST, & Y. ARAKANE, 2015: *Cuticular protein with a low complexity sequence becomes cross-linked during insect cuticle sclerotization and is required for the adult molt*. Scientific Reports 5: 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep10484>
- MYLES, T. G., 2002: *Alarm, aggregation, and defense by Reticulitermes flavipes in response to a naturally occurring isolate of Metarhizium anisopliae*. Sociobiology 40(2): 243–255. <https://doi.org/10.1161/CIRCOUTCOMES.110.943621>
- NEYEN, C., A. J. BRETSCHER, O. BINGGELI, & B. LEMAITRE, 2014: *Methods to study Drosophila immunity*. Methods 68(1): 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.02.023>
- OERKE, E. C., & H. W. DEHNE, 2004: *Safeguarding production - Losses in major crops and the role of crop protection*. Crop Protection 23(4): 275–285. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.10.001>

- ORTIZ-URQUIZA, A., & N. O. KEYHANI, 2013: *Action on the surface: Entomopathogenic fungi versus the insect cuticle*. Insects 4(3): 357–374. <https://doi.org/10.3390/insects4030357>
- PANDEY, U. B., & C. D. NICHOLS, 2011: *Human Disease Models*. Pharmacological Reviews 63(2): 411–436. <https://doi.org/10.1124/pr.110.003293.411>
- ROBERTS, D.W., & A.E. HAJEK, 1992: *Entomopathogenic Fungi as Bioinsecticides*. V: *Frontiers in Industrial Mycology*. Springer (Boston, MA): 144–159.
- ROBERTS, D.W., & R. J. ST. LEGER, 2004: *Metarhizium spp., Cosmopolitan Insect-Pathogenic Fungi: Mycological Aspects*. Advances in applied microbiology 54.
- ROSALES, C., 2011: *Phagocytosis, a cellular immune response in insects*. ISJ 8: 109–131. ISSN 1824-307X.
- ROSALES, C., 2017: *Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity*. V: *Insect Physiology and Ecology*. IntechOpen (London): 179–212.
- ROY, H. E., D. C. STEINKRAUS, J. EILENBERG, A. E. HAJEK, & J. K. PELL, 2006: *Bizarre Interactions and Endgames: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts*. Annual Review of Entomology 51(1): 331–357. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150941>
- SAMUELS, R. I., S. E. REYNOLDS, & A. K. CHARNLEY, 1988: *Calcium channel activation of insect muscle by destruxins, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. Comparative Biochemistry and Physiology 90(2): 403–412. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(88\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(88)90018-7)
- SCHMIT, A. R., & N. A. RATCLIFFE, 1977: *The encapsulation of foreign tissue implants in Galleria mellonella larvae*. Journal of Insect Physiology 23(2). [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(77\)90027-0](https://doi.org/10.1016/0022-1910(77)90027-0)
- SHAH, F. A., C. S. WANG, & T. M. BUTT, 2005: *Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. FEMS Microbiology Letters 251(2): 259–266. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.010>
- SMALL, C. L. N., & M. J. BIDOCHKA, 2005: *Up-regulation of Pr1, a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen Metarhizium anisopliae*. Mycological Research 109(3): 307–313. <https://doi.org/10.1017/S0953756204001856>
- SMITH, R. J., & E. A. GRULA, 1981: *Nutritional requirements for conidial germination and hyphal growth of Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 37(3): 222–230. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(81\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90079-3)
- SMITH, R. J., & E. A. GRULA, 1982: *Toxic components on the larval surface of the corn earworm (Heliothis zea) and their effects on germination and growth of Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 39(1): 15–22. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(82\)90153-7](https://doi.org/10.1016/0022-2011(82)90153-7)
- SÖDERHÄLL, K., A. TASSANAKAJON, & P. AMPARYUP, 2013: *Prophenoloxidase-activating Enzyme*. V: *Handbook of Proteolytic Enzymes, 3rd Edition*. Elsevier: 3068–3074.
- SOSA-GOMEZ, D. R., D. G. BOUCIAS, & J. L. NATION, 1997: *Attachment of Metarhizium anisopliae to the southern green stink bug Nezara viridula cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes*. Journal of Invertebrate Pathology 69(1): 31–39. <https://doi.org/10.1006/jjipa.1996.4619>
- SRIVASTAVA, C. N., P. MAURYA, P. SHARMA, & L. MOHAN, 2009: *Prospective role of insecticides of fungal origin*. Entomological Research 39(6): 341–355. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5967.2009.00244.x>
- ST.LEGER, R. J., T. M. BUTT, M. S. GOETTEL, R. C. STAPLES, & D. W. ROBERTS, 1989: *Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae*. Experimental Mycology 13(3): 274–288. [https://doi.org/10.1016/0147-5975\(89\)90049-2](https://doi.org/10.1016/0147-5975(89)90049-2)
- STÖVEN, S., N. SILVERMAN, A. JUNELL, M. HEDENGREN-OLCOTT, D. ERTURK, Y. ENGSTRÖM, T. MANIATIS, & D. HULTMARK, 2003: *Caspase-mediated processing of the Drosophila NF- κ B factor Relish*. Proceedings of the National Academy of Sciences 100(10): 5991–5996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1035902100>
- THEOPOLD, U., D. LI, M. FABBRI, C. SCHERFER, & O. SCHMIDT, 2002: *The coagulation of insect hemolymph*. Cellular and Molecular Life Sciences 59: 363–372.
- TRAGUST, S., B. MITTEREGGER, V. BARONE, M. KONRAD, L.V. UGELVIG, & S. CREMER, 2013: *Ants disinfect fungus-exposed brood by oral uptake and spread of their poison*. Current Biology 23(1): 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.034>
- TSAKAS, S., & V. J. MARMARAS, 2010: *Insect immunity and its signalling : an overview Abstract The innate immunity is the immediate and sole response of invertebrates for the protection against foreign substances and pathogens . In insects , it relies on both humoral and cellular responses*. Invertebrate Survival Journal 7: 228–238.
- VEGA, F. E., N. V. MEYLING, J. J. LUANGSA-ARD, & M. BLACKWELL, 2012: *Fungal entomopathogens*. V: *Insect Pathology*. Academic Press (Cambridge). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384984-7.00006-3>

- VINSON, S.B., 1991: *Suppression of the insect immune system by parasitic Hymenoptera*. V: *Insect Immunity*. Kluwer Academic Publishers (Dordrecht, Boston and London): 171-187.
- WANCHOO, A., M. W. LEWIS, & N. O. KEYHANI, 2009: *Lectin mapping reveals stage-specific display of surface carbohydrates in in vitro and haemolymph-derived cells of the entomopathogenic fungus Beauveria bassiana*. Microbiology 155(9): 3121-3133. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029157-0>
- WANG, C., & R. J. ST. LEGER, 2006: *A collagenous protective coat enables Metarhizium anisopliae to evade insect immune responses*. Proceedings of the National Academy of Sciences 103(17): 6647-6652. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601951103>
- WANG, C., & R. J. ST. LEGER, 2007a: *The MAD1 adhesin of Metarhizium anisopliae links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants*. Eukaryotic Cell 6(5): 808-816. <https://doi.org/10.1128/EC.00409-06>
- WANG, C., & R. J. ST. LEGER, 2007b: *The Metarhizium anisopliae perilipin homolog MPL1 regulates lipid metabolism, appressorial turgor pressure, and virulence*. Journal of Biological Chemistry 282(29): 21110-21115. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609592200>
- WANG, C., & S. WANG, 2017: *Insect Pathogenic Fungi: Genomics, Molecular Interactions, and Genetic Improvements*. Annual Review of Entomology 62(1): 73-90. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035509>
- WÖSTEN, H. A. B. 2001: *Hydrophobins: Multipurpose Proteins*. Annual Review of Microbiology 55(1): 625-646. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.55.1.625>
- ZHANG, S., Y.X. XIA, B. KIM, N. O. KEYHANI, 2011: *Two hydrophobins are involved in fungal spore coat rodlet layer assembly and each play distinct roles in surface interactions, development and pathogenesis in the entomopathogenic fungus, Beauveria bassiana*. Molecular Microbiology 80(3): 811-826. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07613.x

