

Tartu Ülikooli

Loodus- ja tehnoloogiateaduskond

Ökoloogia ja Maateaduste instituut

Botaanika osakond

Robin Gielen

**Seltsi helekottseenelaadsed (*Hypocreales*) entomopatoogienide
peremeesspetsiifilisus**

Bakalaureusetöö

Juhendaja: teadur Kadri Põldmaa

Tartu 2015

Sisukord

1	Sissejuhatus	4
2	Entomopatogeensete seente evolutsioon ja ökoloogia	6
2.1	Putukaparasitluse evolutsiooni seeneriigis	6
2.1.1	Eeldused putukaparasitluseks	6
2.2	Elukäik ja peremehe nakatamine	7
2.2.1	Infektsioon	7
2.2.2	Immuunvastuse vältimine ja mütseeli vohamine	8
2.2.3	Sporulatsioon	8
2.3	Toitumistüübid	9
3	Entomopatogeensed helekottseenelaadsed (<i>Hypocreales</i>): fülogenees ja peremeesspetsiifilisus	10
3.1	Tungalteralised kitsas mõistes (<i>Clavicipitacea s.s.</i>)	10
3.1.1	<i>Hypocrella</i> , <i>Regiocrella</i> ja <i>Torrubiella</i>	10
3.1.2	<i>Metacordyceps</i>	11
3.1.3	<i>Aschersonia</i>	11
3.1.4	<i>Metarhizium</i>	11
3.1.5	<i>Nomuraea</i>	12
3.2	Madrustõlvikulised (<i>Ophiocordycipitaceae</i>)	12
3.2.1	Madrustõlvik (<i>Ophiocordyceps</i>)	12
3.2.2	<i>Purpureocillium</i>	13
3.2.3	<i>Tolypocladium</i>	13
3.2.4	<i>Polycephalomyces</i>	13
3.2.5	<i>Hirsutella</i>	13
3.2.6	<i>Hymenostilbe</i>	14
3.2.7	<i>Paraisaria</i>	14
3.3	Kedristõlvikulised (<i>Cordycipitaceae</i>)	14

3.3.1	<i>Cordyceps s.s.</i>	14
3.3.2	<i>Beauveria</i>	15
3.3.3	<i>Isaria</i>	15
3.3.4	<i>Lecanicillium</i>	16
4	Helekottseenelaadsete entomopatogeenide esinemine ökosüsteemides	17
4.1	Esinemine endofüütidena	17
4.2	Esinemine risosfääris	17
5	Putukparasiitsete seente kasutamine pestitsiididena	19
6	Arutelu	20
	Kokkuvõte	22
	Summary	23
	Tänuavaldused	25
	Kasutatud kirjandus	26

1 Sissejuhatus

Entomopatogeensed seened on putukatele spetsialiseerunud parasiidid (Kobmoo jt. 2012). Entomopatogeensus on võime nakatada ja tekitada haigust putukates ja teistes lüljalgstes (Pell jt. 2010). Sellised seened on levinud kõikides põhilistes seenehõimkondades, v.a. mükoriisasad moodustavas hõimkonnas krohmseened (*Glomeromycota*) (Boomsma jt. 2014). Seened suudavad nakatada kõige suuremat arvu putukaid võrreldes teiste entomopatogeenidega. Kuigi peremeesspetsiifilisus varieerub seeneliigiti on avastatud, et paljud generalistidest patogeeniliigid on molekulaarselt väga varieeruvad ning tõenäoliselt koosnevad kitsama peremeesspetsiifilisusega liikidest (Wright jt. 2007).

Kõige keerulisemate ja mitmekesisemate putukatega parasiitsetes suhetes olevate seente rühm on selts helekottseenelaadsed (*Hypocreales*) (Rehner 2009). See on maailmas kõige laiema areaaliga, kõige tavalisem, kõige tuntum ning ka kõige rohkem põllumajanduses kasutatav entomopatogeensete seente rühm (Castrillo & Humber 2009). Seltsi suurimasse sugukonda, tungalteralised (*Clavicipitaceae*), kuuluvad isendid moodustavad suure valiku patogeenseid, parasiitseid ja mutualistlikke suhteid erinevate elupuu liinide esindajatega seente, taimede, putukate ja teiste mikroselgrootute seas. Sugukonna tähtsaim perekond kedristõlvik (*Cordyceps*) on suurim entomopatogeenide perekond, kuhu kuulub üle 500 kirjeldatud liigi, kes lisaks nematoodidele ja seentele nakatavad putukaid kümnest seltsist. 2007. aastal avastati sugukonna polüfüleetilisus ning helekottseenelaadsete seltsi restruktureeriti kasutades molekulaarseid andmeid (Spatafora jt. 2007).

Käesoleva töö põhieesmärk on hinnata peremeesspetsiifilisuse taset entomopatogeensete helekottseenelaadsete hulgas ja meie arusaamade nihet selle kirjeldamisel. Antakse ülevaade molekulaarsete meetodite kasutuselevõtust tingitud muutustest putukaparasitide peremeesspetsiifilisuse ulatuse hindamisel antud seltsis. Entomopatogeensed seened omavad suurt potentsiaali ökoloogiliste pestitsiididena (Inglis jt. 2001), seega on tähtis mõista vastavate liikide peremeesspetsiifilisust ja ökoloogiat. Paljudel entomopatogeenidel helekottseenelaadsete seltsis on kirjeldatud kõrge peremeesspetsiifilisus sugulises arengujärgus, samas kui mittesuguline arengujärk kasvab märksa laiemal peremeeste ringil (Boomsma jt. 2014). Seetõttu valiti arvukate putukaparasitsete helekottseenelaadsete rühmade hulgast peremeesspetsiifilisuse hindamiseks eelkõige

erinevate mittesugulise arengujärgu tüüpe esindavaid taksoneid. Nende nimetamisel lähtutakse hiljutistest muudatustest arengutsüklis erinevaid järke omavate (pleomorfsete) seente nomenklatuuris. Perekondades, kus nimede ajakohastamine on veel teostamata kasutatakse paralleelselt seni käibelolnud teleo- ja anamorfinimesid. Mõistmaks peremeesspetsiifilisuse kujunemist ja mehhanisme alustatakse entomopatogeensete seente evolutsiooni ja elukäigu kirjeldusega. Lisaks käsitletakse üldisemalt spetsialiseerumise viise entomopatogeensete seente seas, entomopatogeensets seente esinemist erinevates ökosüsteemides ning nende kasutusvõimalusi pestitsiididena põllumajanduses.

2 Entomopatogeensete seente evolutsioon ja ökoloogia

2.1 Putukaparasitiitluse evolutsioon seeneriigis

Putukad ja seened on sarnastes keskkonnatingimustes kõrvuti eksisteerinud ja kooselu arendanud juba pikka aega (Vega & Blackwell 2005). Vanim teadaolev entomopatogeense seene fossiil on Myanmaris Liidu Vabariigist merevaigus oleval nokalisel (*Hemiptera*) parasiteeriv madrustõlviku laadne seen, mis on 100-110 miljoni aasta vanune (Sung jt. 2008). Helekottseenelaadsete seltsi eellaseks on arvatavasti olnud taimeparasiitne seen, millest arenesid erineva eluviisiga, see tähendab entomopatogeensed seened. Taime- ja putukapatogeenid omavad ühiseid omadusi, kuna mõlemad peavad nakatamiseks läbima vahased kutiikulastruktuurid (Vega jt. 2009). Fülogeneesi-puudel pole näha kindlat viidet, et entomopatogeensus oleks algselt evolutsioonis välja kujunenud ning siis divergeerumise käigus osades liinides kaduma läinud. See tähendab, et putukate kasutamine toiduks on seente evolutsioonis tekkinud korduvalt (Humber 2008; Boomsma jt. 2014).

2.1.1 Eeldused putukaparasitiitluseks

2.1.1.1 Kitinaasid

Kitinaase on vaja rakuseina remodelleerimiseks hüüfide kasvu ajal, toitainete saamiseks surnud seente või putukate kestade lagundamisel ning võitluseks konkureerivate seente või lüljalgsete vastu (Seidl 2008). Kitiin on lineaarne hüdrofoobne homopolümeer. See koosneb N-atsetüülglükosamiinist, mis on ühendatud β -1,4-otstest. Seentes leidub 10 kuni 25 erinevat kitiini lagundavaid ensüüme kodeerivat geeni. Seda on üllatavalt palju: näiteks bakteritel on genoomis tavaliselt 2 kuni 4 kitinaasi. Kuna putukate eksoskeleti põhikomponendiks on kitiin (Seidl 2008) annab selline assortii kitinaase seentele võimaluse kasutada putukate eksoskeleti toitainete saamiseks ning võimaldab ligipääsu energiarikkamale toidulauale putuka sisemuses (Humber 2008).

2.1.1.2 Trehhaloos

Trehhaloos on põhiline suhkur putukate hemolümfis (Thompson 2003) ning paljude seente ainus rakuväline süsinikuallikas (Jorge jt. 1997). Trehhaloos käitub seente tsütosoolis süsiniku varuna ning stressivastase ühendina. Trehhaloosi leidub seente püsieostes ning tekib vegetatiivsetes rakkudes stressisituatsioonides. Selleks on seentel avastatud kahte erinevat

sorti trehhalaase (Jorge jt. 1997). Trehhaloosi esinemine putuka hemolümfis muudab putuka väga rikkalikuks toiduallikaks (Thompson 2003).

2.2 Elukäik ja peremehe nakatamine

Loomad, kellel on kindel kasvurada ning etapid, et täiskasvanuikka jõuda, on seentele väga tülikateks kooselupartneriteks. Tänu putukate lühikesele elueale, on evolutsiooniliselt mõttekam peremees surmata, kuna seene levimiseks on vaja koniidikandjatel ja/või viljakehi kandvatel stroomadel välja kasvada putuka pehmetest kudetest ja putuka liikumine võib seda takistada (Boomsma jt. 2014). Putuka nakatamine toimub läbi peremehe tuvastamise eose poolt, temale kinnitumise, kesta penetreerimise ensüümide ja füüsilise surve toimetel. Putukas sees toimub immuunsüsteemi vältimine, mütseeli vohamine ning lõpuks peremehest väljakasvamine ja uute eoste moodustumine (Vega & Blackwell 2005).

2.2.1 Infektsioon

Putukate eksoskelett koosneb vahakihist, epikutiikulast, ekso- ja endokutiikulast. Viimased kaks moodustavad enamuse kesta paksusest. Ekso- ja endokutiikula moodustuvad proteiinidest maatriksis asuvatest kristalliseerunud kitiini kiududest, polüfenoolidest, veest ning vähesel määral ka lipiididest (Vincent & Wegst 2004). Epikutiikula moodustub lipiidide, pika-ahelaliste alkeenide, estrite ja rasvhapete segust (de Carolina Sánchez-Pérez jt. 2014). Kutiikula koosneb 60-70% proteiinidest (Charnley & Collins 2007).

Eos kinnitub putuka vahakihile läbi mittespetsiifiliste hüdrofoobsete mehhanismide. Kinnitumise tagab seeneeose hüdrofobiinide ja peremehe vaharikka kutiikula vahelised hüdrofoobsed interaktsioonid (Bouchias jt. 1988). Õige peremehe leidmine toimub läbi putuka kutiikula erinevate struktuursete ja keemiliste iseärasuste äratundmise seeneeose poolt (Wang & St. Leger 2006).

Seene lipaasid hüdrolüüsivad lipoproteiinide, vahade ja rasvade vahelt estersidemed katki ning seeläbi panustavad väga tugevalt epikutiikula läbistamise ning lisa toitainete tekitamise. Kui epikutiikula on läbitud hakkavad seened tootma suurtes kogustes proteaasi Pr1, mis lagundab ekso- ja endokutiikulas asuvaid proteiinilaadseid ühendeid (de Carolina Sánchez-Pérez jt. 2014). Kitinaasid koostöös proteaasidega degradeerivad putuka kutiikula (St. Leger jt. 1991).

2.2.2 Immuunvastuse vältimine ja mütseeli vohamine

Kutiikula läbistades lõpetab seen proteaaside tootmise, vältides sedamoodi peremehe immuunsüsteemi vastuse kujunemist. Seen organiseerib oma rakumembraani ümber nii, et see peaks vastu osmootsele rõhule (Wang jt. 2005). Peremehes olles tuleb seenel putuka immuunsüsteem hävitada, omastades samal ajal putukast piisavalt toitaineid, et sissetungi teistesse kudedesse jätkata. Selleks kasvatavad osad helekottseenelaadsete liigid spetsiaalseid vaheseintega hüüfe, mis tungivad peremehe lihaskiudude vahelistesse õõnsustesse (Schreiter jt. 1994). Mõned helekottseenelaadsete liigid produtseerivad samal ajal ka rakke lagundavaid toksine, mis aitab kaasa toitainete omastamisele putukast (Vega jt. 2012). Samas peab säilima piisav tasakaal seene kasvu ning toksiinide eritamise vahel, kuna peremees ei tohi ennem surra, kuni seen on omastanud piisavalt toitaineid putukast välja kasvamiseks ning eoste levitamiseks. Selleks on levinud ka strateegia liikuda putuka kehas pärmilaadsete kestata üherakuliste moodustistena (Butt jt. 1981, Dunphy & Chadwick 1985, Fan jt. 2013). Sellise kudedesse levimise viisi plussiks on kiirem toitainete omastamine läbi õhukese rakumembraani ning võimaldab ohutult parasiidi rakkudel hemolümfis jaguneda ilma putuka immuunsüsteemi sekkumiseta, kuna immuunsüsteem reageerib rakukesta valkudele (Dunphy & Chadwick 1985). Produtseeritakse lipaase, mis lagundavad kiirelt peremehe rasva varud (Barta & Cagàn 2006). Seene arenguks on siiski vaja lõpuks ümber lülituda ning hakata produtseerima rakukesti ning seenehüüfe, et tekitada nakatamisvõimelisi koniide (Butt jt. 1996). Kui see juhtub on putuka immuunsüsteem üle koormatud suure patogeeni biomassi poolt (Boomsma jt. 2014).

2.2.3 Sporulatsioon

Tavaliselt surmab seen putuka enne sporulatsiooni algust. Peremehe surma tingib koosmõju seene toksiinidest, vereringe füüsilisest takistusest, toitainete kaost ja parasiidi invasioonist organitesse (Fan jt. 2013). Kui kogu putuka kehaõõnsus on täidetud parasiidi mütseeliga, kasvab seeneniidistik putukast välja läbi vähem melaniseeritud kehaosade (Vega & Blackwell 2005), kattes kogu peremehe keha ja kinnitades selle all olevale substraadile (Chaverri jt. 2008). Sporulatsioon toimub kohe peale esimeste hüüfide väljatungimist peremehe eksoskeletist (Chaverri jt. 2008). Kõik entomopatogeensed seened vedavad mingi osa oma elutsüklist väljaspool peremeest, kas siis koniididena või puhkeeostena, lehtedel, puukoorel või mullas (Pell jt. 2010).

2.3 Toitumistüübid

Entomopatogeensete seente peremehest toitumise strateegiaid on kolm: biotroofia, nekrotoofia ja hemibiotroofia. Biotroof toitub peremehe elusatest rakkudest toitaineid omastades, mis lõpeb kui rakk sureb. Nekrotoof toitub peremehe surnud rakkude lagundamisest. Hemibiotroof on strateegia, kus seen toitub algul biotroofselt ning peale raku surma läheb üle nekrotoofsele toitumisele (Vega jt. 2009). Enamus helekottseenelaadsete seltsi entomopatogeensetest seentest on hemibiotroofid (Charnley & Collins 2007). Spetsialiseerunud entomopatogeensed seened on kaotanud evolutsiooni käigus alternatiivsetes peremeestes elamiseks vajalikud geenid. Kiirelt tapvate toksiinide ja metaboliitide kasutamise asemel on spetsialistid kohastunud peremehe immuunsüsteemi võitmisele ning tapavad putuka aeglaselt, kasutades veel elavat peremeest ära (Wang jt. 2009). Lisaks pikendab putuka elus hoidmine biotroofset toitumisaega. Ärakasutamine võib seisneda näiteks toitumises kasvava peremehe juurde tekkivatest kudedest (Wang jt. 2009) või peremehe käitumise mõjutamises, et aidata kaasa eoste levikule, nagu *O. unilateralis*-e puhul (Kobmoo jt. 2012). *O. unilateralis* mõjutab peremees-sipelgat ronima kõrgele taimelehele alla, kus putukas hammustab end leherootsu külge kinni ning sureb. Kõrge sporulatsiooni asukoht suurendab seene-eoste levikuraadiust (Kobmoo jt. 2012).

Kõige rohkem nakatavad entomopatogeensed seened karilasi ja kilptäilisi, kes tavaliselt moodustavad taimega seotud küllaltki tihedaid ja vähe liikuvaid populatsioone (Humber 2008). Kuigi enamus helekottseenelaadsete seente stroomad (eoskandjaid moodustav struktuur) on väikesed, peremehes leiduvate toitainete vähesuse tõttu, on siiski täheldatud ka osadel perekonna *Hypocrella* liikidel suuri stroomasid (Hywel-Jones & Samuels 1998). Need tekivad arvatavasti lisatoitainete ammutamisest taimest peale putuka surmamist (Vega jt. 2009), mis näitab, et entomopatogeensete seente roll ökosüsteemis ei piirne ainult interaktsioonidega oma peremehega.

3 Entomopatogeensed helekottseenelaadsed (*Hypocreales*): fülogenees ja peremeesspetsiifilisus

Helekottseenelaadsete seltsis on kõige rohkem putukaid nakatavate seente taksoneid (Humber 2008). Hiljuti tehtud uuringus näitasid Sung jt.(2007a), et varem tuntud sugukond tunglateralised (*Clavicipitaceae*) ei ole monofüleetiline vaid jaguneb kolmeks klaadiks. Üle 400 liigiga perekond kedristõlvik jaotus mitmete klaadide vahel, osutudes seega polüfüleetiliseks. Uue taksonoomia järgi (Sung jt. 2007a) kuulub enamik entomopatogeenseid liike helekottseenelaadsete seltsis sugukondadesse tungalateralised selle muutunud käsitluses (*Clavicipitaceae s.s.*), madrustõlvikulised (*Ophiocordycipitaceae*) ja kedristõlvikulised (*Cordycipitaceae*).

3.1 Tungalateralised kitsas mõistes (*Clavicipitacea s.s.*)

Selles sugukonnas on 4 lüljalgsetega seotud rühma. Kolm neist on tuntud kilptäiliste (*Coccoidea*) parasiitide perekonnad *Hypocrella*, *Regiocrella* ja *Torrubiella*. Neljandat rühma kirjeldati kui *Metacordyceps*, mis koosneb varasema kedristõlviku perekonna liikidest ning nende anamorfidest. Seda rühma iseloomustab lai peremehe spekter. Antud sugukonnas olevad anamorfsed perekonnad on *Aschersonia*, *Metarhizium* ja *Nomuraea* (Sung jt. 2007a). Selle sugukonna liigid nakatavad lehekõdus ja pindmises mullakihis elavaid putukaid (Kepler jt. 2013).

3.1.1 *Hypocrella*, *Regiocrella* ja *Torrubiella*

Kõik kolm perekonda on fülogeneetiliselt väga lähedases suguluses põhiliselt kilptäiliste ja kariliste (*Aleyrodoidea*) patogeenid (Chaverri jt. 2008). Perekond *Hypocrella* on polüfüleetiline, koosnedes tegelikult kolmest troopilistel aladel esinevast perekonnast: *Hypocrella s.s.*, *Moelleriella* ja *Samuelsia*. Perekond *Moelleriella* liigid on näidanud geograafilist spetsialiseerumist samas kui kõigi kolme perekonna, *Hypocrella* laias tähenduses, liigid on aga teadmata peremehe valiku suurusega (Chaverri jt. 2008).

Perekond *Regiocrella* liigid on näidanud geograafilist spetsialiseerumist. Tema kaks liiki, *R. sinensis* ja *R. camerunensis*, on levinud vastavalt Hiinas ja Kamerunis (Chaverri jt. 2005)

Perekond *Torrubiella* on kahe eelmise suhtes basaalne (Chaverri jt. 2005). Ta koosneb umbes kaheksakümnest (Kobayasi & Shimizu 1982) kosmopoliitsetest ämblikulaadsete (*Arachnida*) ja lüliljalgsete (*Arthropoda*) patogeenist. Perekond on tuntud just ämblikulaadsete parasiitide poolest. Putukatest on perekonna *Torrubiella* liigid virulentsed kilptäiliste, liblikaliste (*Lepidoptera*) ja kahetiivaliste (*Diptera*) suhtes. Perekonna *Torrubiella* liigid on spetsialiseerunud putuka seltsile või sugukonnale. Täpsemat peremehe spetsiifilisust ei ole aga teada, sest peremehe määramine liigi või perekonna tasemel pärast seene sporulatsiooni on väga raske, kuna seen degradeerib peremehe täielikult (Kobayasi & Shimizu 1982). Kõik kolm perekonda näitavad spetsialiseerumist, mille ulatust veel täies mahus tänapäeval ei teata (Chaverri jt. 2008).

3.1.2 *Metacordyceps*

Perekonna *Metacordyceps* liikide peremeesspetsiifilisus on väga lai. Kõige enam parasiteerivad antud perekonna liigid mullas elavate mardikaliste ja liblikaliste isenditel. Siiski on liikide kuuluvus perekonda *Metacordyceps* veel segane ning vajab paremat uurimist (Kepler jt. 2012).

3.1.3 *Aschersonia*

Perekonna *Aschersonia* liikide areaal on troopilises ja lähistroopilises kliimavöötmes (Chaverri jt. 2008). *Aschersonia* liigid on kilptäiliste ja kariliste parasiidid (Sung jt. 2007b), kuid enamike liikide täpsem peremeesspetsiifilisuse tase on veel teadmata (Chaverri jt. 2008).

3.1.4 *Metarhizium*

Perekond *Metarhizium* koosneb mullas elavatest kosmopoliitsetest liikidest (Vega & Blackwell 2005). *Metarhizium* perekonna populatsioonid, mis on näidanud spetsialiseerumise teket mingile kindlale putukarühmale, on troopilise ja lähistroopilise levikuga (Bridge jt. 1997). Sellises kliimas võisid peremeesputukad olla saadaval aasta läbi juba tuhandeid aastaid, mis võis viia seenepopulatsioonide spetsialiseerumiseni hoopis teatud putukaliikidele, mitte enam keskkonnale (Vega & Blackwell 2005).

Driver jt. (2000) konstrueeritud fülogeneesipuu jagas perekonna *Metarhizium* kümneks klaadiks, millest omakorda üks, *Metarhizium album*, näitas spetsialiseerumist kindlale peremehele. Kepleri jt. (2014) näitasid oma töös selle liigi jagunemist vähemalt kaheks liigiks. Järelikult vajab *M. album* täiendavaid fülogeneetilisi uuringuid.

Metarhizium anisopliae-d on kasutatud juba 130 aastat putukatest kahjurite biokontrolliks (Zimmermann 2007). Kuni hiljutise ajani peeti teda laia peremeesringiga liigiks, kes nakatas putukaid neljateistkümnest selstist (Goettel jt. 1990). Bischoff jt. (2009) tööst selgus aga *M. anisopliae* jagunemine üheksaks fülogeneetiliselt erinevaks liigiks, millest neli on spetsialiseerunud kindlale putukaseltsile, vastavalt üks mardikalistele (*Coleoptera*), üks sihktiivalistele (*Orthoptera*) ja kaks liblikalistele (*Lepidoptera*).

Teine väga laia peremeeste valikuga liik, *M. flavoviride*, on Kepler jt. (2014) poolt määratud krüptiliseks liigiks, mille peremeesspetsiifilisus vajab täpsemaid uuringuid.

3.1.5 *Nomuraea*

Perekonna *Nomuraea* liigid on tuntud liblikaliste parasiidid (Kepler jt. 2014). Nende töös tuli välja, et perekond *Nomuraea* on polüfüleetiline, kuna *N. rileyi* on eraldi-seisev kompleks ning *N. cylindrospora* ja *N. viridula* on fülogeneetilised sugulased hoopis *Metarhizium album*-iga moodustades ainult nokalistele spetsialiseerunud parasiitide klaadi. *Nomuraea rileyi* peremeestena on määratud üle 30 liblikalise liigi (Suwannakut jt. 2005). Uurides *N. rileyi* DNA järjestusi ei tulnud välja kitsama spetsialiseerumise või levikuga rühmi (Han jt. 2002). Olenemata esinemisest kolmel kontinendil ning parasiteerimisest väga erinevatel putukatel on *N. rileyi* isolaadid siiski geneetiliselt väga homogeensed. Seega näib *N. rileyi* tõesti olevat generalistlik putukaparasit (Suwannakut jt. 2005).

3.2 Madrustõlvikulised (*Ophiocordycipitaceae*)

Sugukonda kuuluvad putuka patogeenide perekonnad: madrustõlvik (*Ophiocordyceps*), *Purpureocillium* ja *Tolypocladium* (Quandt jt. 2014). Entomopatogeensetest anamorfide perekondadest kuuluvad siia *Polycephalomyces*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe* ja *Paraisaria* (Sung jt. 2007a), mis moodustavad perekonna madrustõlvik liikidega ühise rühma. Lähtudes Quandt jt. (2014) ettepanekust, hakkavad tulevikus kõik nende perekondade liigid tõenäoliselt kandma perekonnanime *Ophiocordyceps*.

3.2.1 Madrustõlvik (*Ophiocordyceps*)

Perekond madrustõlvik on madrustõlvikuliste seltsi suurim perekond (Quandt jt. 2014). Perekonna tähtsaim liik on *Ophiocordyceps sinensis* (= *Cordyceps sinensis*). Temaga nakatunud putukate vastseid kasutatakse Hiina meditsiinis. Liik on Lääne-Hiinas levinud endem (Liang jt. 2008). *O. sinensis* peremeesteks on määratud sugukonna eisterkedriklasted

(*Hepialidae*) 57 liiki seitsmest perekonnast (Wang & Yao 2011). Quan jt. (2014) määrasid oma töös ära kolm *O. sinensis*-e rühma, mis spetsialiseerusid geograafilisele alale ning ainult vastaval alal leiduvale sugukonna esiterkedriklassed liikidele. Geneetiline varieeruvus nende rühmade vahel polnud piisav eraldiseisvate liikide olemasoluks, kuid tõendab siiski kõrget peremeesspetsiifilisust selles liigikompleksis. *O. sinensis*-e rühmad on oma peremeestega koos evolutsioneerunud tänu geograafilisele eraldatusele (Quan jt. 2014).

3.2.2 *Purpureocillium*

Perekond *Purpureocillium* koosneb kolmest üle maailma mullas levinud liigist: *P. lilacinus* (Luangsa-Ard jt. 2011b), *P. lavendulum* ja *P. takamizusanense* (Perdomo jt. 2013). *P. lilacinus* on väga laia ulatusega parasiit olles võimeline nakatama inimesi, nematoode ja erinevaid putukaid kärsiklaste (*Curculionidae*) sugukonnast ning sarnastiivaliste (*Homoptera*) ja liblikaliste (*Lepidoptera*) seltsist. *P. lilacinus* vajaks aga täpsemat uurimist, kuna selle liigi erinevad isolaadid on seotud erineva spetsialiseerumisega elualale ja –keskkonnale (Eberhard jt. 2014).

3.2.3 *Tolypocladium*

Perekonda *Tolypocladium* kuulub meditsiinilise tähtsusega liik *T. inflatum*, millest saadakse immunosupressanti tsüklosporiini. See liik on spetsialiseerunud mardikaliste vastsetele (Bushley jt. 2013).

3.2.4 *Polycephalomyces*

Perekonna *Polycephalomyces* liigid on parasiitideks mardikaliste, liblikaliste vastsetele ja nokaliste nümfidele (Kepler jt. 2013).

3.2.5 *Hirsutella*

O. unilateralis, (= *Hirsutella formicarum*) on troopilistel aladel levinud hobusipelgate (*Camponotus*) ja mägisipelgate (*Polyrhachis*) parasiit (Mongkolsamrit jt. 2012). Evans jt. (2011a) avastasid Brasiiliast liigil neli erinevat morfoloogilist vormi, millest igauks parasiteeris erineval peremeesliigil. Nende andmeid toetab ka Kobmoo jt. (2012) uurimus, mis näitas *O. unilateralis*/ *H. formicarum*-i jagunemist kolmele erinevale sipelgaliigile (*C. leonardi*, *C. saundersi* ja *P. furcata*) spetsialiseerunud liigiks. Luangsa-Ard jt. (2011a) isoleerisid hobusipelgalt *C. gigas* *O. unilateralis*-e, mis molekulaarsete markerite järgi oli uus ainult sellele liigile spetsialiseerunud liik *O. halabalaensis*. Selle anamorf erines koniidide

mõõtnetelt *H. formicarum*-ist. Perekonnaga *Hirsutella* seotud liigid on väga spetsialiseerunud peremeesputukale liigi tasemel.

3.2.6 *Hymenostilbe*

Ophiocordyceps nutans (= *Hymenostilbe nutans*) on nokaliste parasiit, kelle peremeesteks on 16 liiki neljast sugukonnast. Hiljuti Jaapanis läbi viidud uuringus leiti, et *O. nutans* koosneb tegelikult kahest klaadist. Esimesse klaadi kuuluvad ainult sugukonna *Coreidae* liikidel parasiteerivad isolaadid ning teise klaadi isendid, kes parasiteerivad kõikide teiste sugukondade esindajatel välja arvatud sugukond *Coreidae* (Sasaki jt. 2012).

3.2.7 *Paraisaria*

Ophiocordyceps gracilioides (= *Paraisaria gracilioides*) (Sung jt. 2007a) kirjeldati Hiinas mailaste (*Cossidae*) sugukonna vastsetelt (Li jt. 2002). Teine perekonna esindaja *P. dubia*, mis nüüd kuulub ka *O. gracilis*-e alla Sung jt. järgi (2007a), leiti parasiteerimas liblikaliste vastsetelt (Samson & Brady 1983).

3.3 Kedristõlvikulised (*Cordycipitaceae*)

Koosneb entomopatoogenide perekonnast kedristõlvik kitsas mõistes (*Cordyceps s.s.*), mille anamorfe on kirjeldatud perekondades *Beauveria*, *Isaria* ja *Lecanicillium* (Sung jt. 2007a).

3.3.1 *Cordyceps s.s.*

Perekonda *Cordyceps s.s.* kuulub Sanjuan jt. (2014) fülogeneetilise uuringu järgi kolm liiki: *C. locustiphila*, *C. acridophila* ja *C. diapheromeriphila*, mis omavad ühist esivanemat perekonna *Beauveria* liikidega. *Cordyceps locustiphila* ja *Cordyceps diapheromeriphila* on väga spetsiifilise peremehe valikuga nakatades vastavalt sihktiivaliste (*Orthoptera*) seltsi perekonna *Colpolopha* ja kojuseliste (*Phasmida*) seltsi perekonna *Diapheromeridae* liike. Seevastu *C. acridophila* on väga laia peremehe valikuga, parasiteerides liikidel kuuest putuka sugukonnast. Sanjuan jt. (2014) töös näidati aga *C. acridophila* jagunemist kolmeks rühmaks, mis erinevad geograafilise asuala poolest. Kitsamat peremehele spetsialiseerumist neis rühmades ei täheldatud. Kuigi *C. locustiphila* ja *C. acridophila* omavad sama areaali ning mõlemad parasiteerivad põhiliselt sihktiivaliste seltsi liikidel, näitab fülogenees ühe spetsialiseerunud ning teise generaliseerunud toitumist. See tähendab, et spetsialiseerumine

toiduallikale aitab entomopatogeensete seente seas kaasa liikide eristumisele (Sanjuan jt. 2014).

3.3.2 *Beauveria*

Perekonna *Beauveria* liigid on parasiitideks üle 700 putukaliigil, mille suhtes perekonna virulentsus on väga varieeruv. Kuigi perekond on üks vanimaid teadaolevaid putukaparasitsete seente perekondi on selle evolutsiooni ja geneetika uuringud alles hiljuti hakanud tulemusi andma tänu uute tehnoloogiate kasutuselevõtule. *Beauveria* perekonnas on morfoloogiliselt eristatavaid liike kuus (Vega & Blackwell 2005).

Rehner & Buckley (2005) määrasid *Beauveria* perekonnas viis fülogeneetilist klaadi. Kaks määratud klaadi vastasid morfoloogiliselt *B. bassiana*-le. Esimene neist oli levinud üle maailma ja parasiteeris putukatel seitsmest seltsist. Myelin jt. (2009) uurimus näidas Euroopast leitud isendite järgi selle klaadi jagunemist omakorda viieks fülogeneetiliseks liiniks, millest kaks olid laia peremehe valikuga, kaks liiki nakatasid ainult kahte nokaliste (*Hemiptera*) esindajat ning üks *B. bassiana* liik, nakatas ainult ühte liiki: *Anthocoris nemorum* (*Hemiptera: Anthocoridae*). Teine Rehner & Buckley määratud *B. bassiana* klaad parasiteeris kuuel putukaseltsil, kuigi Euroopa isolaatide põhjal määrasid Myelin jt. (2009) selle liigi nokaliste liigile peremeesspetsiifiliseks.

Liigi *B. brongniartii* puhul eristus kaks geograafilise spetsialiseerumisega rühma: Euroopas ja Aasias, millest mõlemad parasiteerisid ainult mardikalistel (Rehner & Buckley 2005, Myelin jt. 2009).

Hilisemas Rehner jt. (2011) uuringus näidati perekonna *Beauveria* jagunemist 12 erinevasse liini, millest kuus langesid kokku juba varem tuntud *Beauveria* liikidega, kuut liini kirjeldati uute liikidena. Uutest liinidest viis olid seotud kindla mandriga ning olid kitsalt spetsialiseerunud, parasiteerides ühe, harva kahe putukate sugukonna esindajatel. Üks uus liin (*B. pseudobassiana*) aga omas ülemaailmset levikut ning laia peremeeste ringi.

3.3.3 *Isaria*

Liigid *Isaria tenuipes*, *I. farinosa*, *I. fumosorosea*, *I. amoenerosea* ja *I. javanica* moodustasid monofüleetilise grupi. Kuigi mingit spetsialiseerumist peremehele või asukohale *Isaria* liikidel ei avastatud on enne järelduste tegemist vajalik täpsem uuring (D'Alessandro jt. 2013).

3.3.4 *Lecanicillium*

Perekond *Lecanicillium* koosneb laialdase leviku ja peremehe valikuga seentest. Siia maani puudub täielik arusaam perekonnas leiduvate liikide fülogeneetilisest põlvnemisest ja taksonoomilisest kuulumisest (Brodeur 2012). On teada ainult kahe liigi *L. lecanii* ja *L. longisporum* peremeesspetsiifilisus. Nad parasiteerivad seltsi sarnastiivalised (*Homoptera*) esindajatel (Kouvelis jt. 2008).

4 Helekottseenelaadsete entomopatogeenide esinemine ökosüsteemides

Paljudel entomopatogeensetel seentel on looduses lisaks putukate populatsiooni regulatsioonile veel täiendavaid rolle. Näiteks on viimastel aastatel avastatud nende esinemine endofüütidena ja risosfääri elementidena (Vega jt. 2009).

4.1 Esinemine endofüütidena

Endofüütideks nimetatakse organisme, kes elavad taime maapealsetes kudedes tekitamata taimele haiguslikke sümptomeid (Vega jt. 2009). Entomopatogeensete seente hulgas on endofüütidena esinemist täheldatud liikidel *B. bassiana* ja *L. lecanii* (Gurulingappa jt. 2010). Sellised entomopatogeensetest seentest endofüüdid on näidanud võimet kaitsta taime nii otseselt kui ka kaudselt teiste patogeenide ja parasiitide eest. Otsene kaitse hõlmab endas teistele patogeenidele mürgiste metaboliitide tootmist, nišši hõivet ning taime kaitsemehhanismide aktiivsuse säilitamist (Ownley & Windham 2007). On ka andmeid, et endofüütidega nakatunud taime söömisel nakatub putukas entomopatogeense seenega, kuigi seeneeoseid pole taime kudedes täheldatud. See tähendab, et ka piisavas koguses seene hüüfid on sisse söömisel infektsioonivõimelised (Powell jt. 2009). Kaudse kaitsena on täheldatud, et endofüütidega nakatunud taimedest toitunud lehetäiliste järeltulijaid sünnib vähem, kui tervetest taimedest toitunud lehetäilistel. Lisaks järeltulijate arvu vähendamisele aeglustas nakatunud taimedest toitumine ka lehetäiliste reproduktsiooni kiirust (Akello & Sikora 2012).

4.2 Esinemine risosfääris

Muld pakub entomopatogeenidele kaitset kahjulike keskkonnafaktorite eest (Vega jt. 2009). Mullas ellu jäämine on seotud rohkem taimede olemasolu kui peremeesputukate olemasoluga, kuna taimed eritavad juurtega entomopatogeenidele vajalikke aineid. Tänu sellisele toitainete allikale leidub *M. anisopliae* liike taimede läheduses sügavamal mullas kui ilma taimedeta mullas (Hu & St. Leger 2002). Taimed loovad oma lähedusse head elutingimused herbivooride vaenlastele, et end ümbritseda oma kahjurite vastastest (Elliot jt. 2000). Entomopatogeensete seentega nakatunud taimede juurte ümbruses esineb vähem mikropatogene kui tavalistel taimedel (Ownley jt. 2008). Taimed vabastavad kahjurite ründe

alla sattudes ka aineid, mis teavitavad kahjurite olemasolust nende vaenlasi (Cory & Ericsson 2010). See on siiski seente puhul vähe oluline, kuna seened on küllaltki immobiilsed ning ei suuda reageerida sama efektiivsusega kui teised kiskjad (Cory & Ericsson 2010). On täheldatud, et *B. bassiana* esinemine mullas turgutab isegi taime kasvu (Gurulingappa et al. 2010).

Mullas on entomopatoogenidele ka segavaid faktoreid. Näiteks võib muld olla täis konkurentide sekreteeritud ainevahetussaadusi, mis võivad seene elutegevust raskendada (Vega jt. 2009). Entomopatoogeni poolt nakatatud surev või juba surnud putukas on ka hea energiaallikas mullas elavatele oportunistlikele saproobidele. Nende vältimiseks toodab seen sekundaarseid metaboliite, mille ainus eesmärk on soovimatute konkurentide eemal hoidmine (Strasser jt. 2000).

Myeling jt. (2011) leidsid, et haritavas mullas esineb kõige rohkem perekonna *Metarhizium* liike, samas kui teiste uuritud perekondade liike leiti vähe (alla 10% juhtudest). Seega taluvad perekond *Metarhizium* liigid paremini mullahäiringuid kui teised entomopatoogeensed seened. Hekialade mullast leiti perekonna *Beauveria* ja *Isaria* liike ning *Metarhizium*-i esindajaid peaaegu et ei olnud. Samast uurimusest tuli välja, et *M. anisopliae* ja *I. fumosorosea* esinesid ainult mullas, samas kui *B. bassiana*, *I. farinosa* ja *M. flavoviride* esines nii mullas kui ka maapeal. Järelikult erineb entomopatoogeensete seente suhe ja kooslus maapeal ja mullas (Myeling jt. 2011).

5 Putukparasiitsete seente kasutamine pestitsiididena

Põllumajandus kaotab igal aastal 20-50% toodangust putukate, umbrohtude ja taimehaiguste tõttu (Thacker 2002). Kõikide putukaid nakatavate mikroorganismide seas on seened erilised, kuna nad sisenevad putukasse läbi eksoskeleti ning ei vaja seega sissesöömist (Cory & Ericsson 2010). Järelikult on seened ka ainsad mikroorganismid, kes suudavad nakatada taimemahlu imevaid putukaid, nagu lehetäid või sihktiivalised (Roberts & Hajek 1992), ja putukate mittetoituvaid arenguetappe nagu munad või nukud (Charnley & Collins 2007). Entomopatogeensed seened ei sõltu kahjurputuka populatsioonist vaid suudavad omastada toitaineid ka teistest allikatest kui peremeesputukas, näiteks taimi või risosfääri asustades (Vega jt. 2009). Seente hulgast on arvukaid näiteid tulemusrikkast putukkahjurite mahasurumisest, mis annab alust arvata, et seened omavad suurt potentsiaali ökoloogilise pestitsiidina (Inglis jt. 2001).

Entomopatogeensete seente kasutamisel pestitsiididena on levinuimad strateegiad: külvata seene eoseid, külvata seene eoseid koos keemiliste pestitsiididega või turgutada antud piirkonnas levinud entomopatogeenseid seeni (Charnley & Collins 2007). 2007. aasta seisuga toodeti maailmas teadaolevalt 171 mükoloogilist päritolu putukatõrjetoodet seitsmeteistkümnest seeneliigist (de Faria & Wraight 2007). Enamus tooteid olid tehtud kasutades esindajaid perekondadest *Bassiana*, *Metarhizium*, *Isaria* ja *Lecanicillium*, kuna neid on lihtne massiliselt toota (Vega jt. 2009). Siiski seentest pestitsiidide kasutamine pole alati olnud tulemusterikas, kuna nakatumise ning peremeesputuka tapmist algatavad faktorid on väga keerulised, sõltudes nii putukast, patogeenist, keskkonnast kui ka ajast (Inglis jt. 2001). Valdavalt on kasutusel olnud seene-eoste külvamise taktika, kas siis üksi või koos keemiliste pestitsiididega (Charnley & Collins 2007), kuigi paremaid tulemusi võib anda hoopis ökosüsteemides juba olevate seente turgutamine. Selle strateegia kasutamiseks on vaja häid teadmisi seene ökoloogiast (Vega jt. 2009).

Uus putukatõrje strateegia võib peituda entomopatogeensete endofüütide ära kasutamises (Vega jt. 2009).

6 Arutelu

Viimase paarikümne aasta jooksul kasutusele võetud molekulaarsete meetoditega on lisandunud palju teavet seltsi helekottseenelaadsed entomopatogeensete liikide spetsialiseerumise kohta. Enamikel juhtudel on entomopatogeenseid seeni senini peetud valdavalt generalistideks. Kuigi on ka vastupididseid näiteid (*Nomuraea rileyi*, *Cordyceps acridophila*, *Beauveria pseudobassiana*), ilmneb DNA järjestuste põhjal leitud fülogeneesipuudest, et enamikel helekottseenelaadsete perekondade ja liikide peremeeste ring on märksa kitsam kui varem arvati.

Spetsialiseerumine ei pea tähendama ainult toiduvaliku vaid ka elukoha (geograafilise piirkonna, kliimavöötmel) kitsenemist (Poisot jt. 2011). Herbivoorsetel putukatel on uuritud spetsialiseerumise sõltuvust laiuskraadist ning taimede liigirikkusest. Ilmnes, et spetsialiseerunud parasiitide arv kasvas ekvaatori suunas (laiuskraadi kahanedes), samas kui liigirikkus oli mõjutav aga mitte määrav faktor (Forister jt. 2015). Käesolevas töös on näiteid spetsialistide esinemisest eelkõige troopilistel aladel (perekondades *Hypocrella*, *Regiocrella*, *Torrubiella*, *Metarhizium* ja *Hirsutella*), kuigi üldistuste tegemiseks oleks tarvis täpsemaid uuringuid.

Helekottseenelaadsete hulgas on veel palju perekondi, mille peremeesspetsiifilisus vajab täpsemaid molekulaarseid uuringuid. Paljude seente spetsiifilisuse ulatus on veel mõistmata, kuna varem toimus liikide määramine morfoloogia järgi (Sung jt. 2007a). Seente peremeesspetsiifilisuse mõistmine väliste vaaltuste põhjal on raskendatud, kuna paljudel juhtudel nakatuvad putukad vastsestaadiumis ning neid on raske määrata. Seen võib ka peremehest välja kasvades deformeerida putukat tundmatuseni (Shresta jt. 2010). Entomopatogeenide peremeesspetsiifilisuse tundmine on vajalik nende kasutamiseks pestitsiididena. Ainult kindlat putukaliiki nakatav pestitsiid oleks muule loodusele ohutu ja keskkonnasõbralik alternatiiv keemilise putukamürgi asemel. On teada, et mõned keemilised pestitsiidid reostavad põhjavett või akumuleeruvad toiduahelasse (Inglis jt. 2001). Seega spetsialiseerunud entomopatogeenid tapavad taimekahjurid, aga ei mõjuta kahjuritest toituvaid putukaid. Mükoloogilist laadi pestitsiidid oleks lahenduseks olukordades, kus keemilised pestitsiidid on keelatud, nende kasutamine on piiratud või kus kahjurid on omandanud juba teatava immuunsuse tavaliste pestitsiidide vastu (Inglis jt. 2001). Siiski võtab entomopatogeensetel seentel putukapopulatsiooni surmamine rohkem aega kui keemilisel pestitsiidil. Aeg, mis kulub patogeenil infektsioonist uute nakkavate eoste

moodustumiseni, võib varieeruda vastavalt peremehe massist, eoste moodustamise strateegiast, seene liigist ning keskkonnatingimustest vastavalt 3 kuni 20 päeva (Hajek jt. 2012). Siiski ajavahemikul infektsioonist putuka surmani hakkab nakatunud putukas vähem toitu tarbima ja tema elutegevus aeglustub, mis tähendab, et rohkem taimi jääb puutumata ning putukas ei pruugi jõuda viljakasse ikka (Inglis et al. 2001). Entomopatogeensed seened suudavad elada ka lihtsalt mullas, mis tähendab, et ideaalis peab pestitsiidi alale kandma vaid ühe korra. Soodsatest tingimustest jääb seen pinda püsima hoides putukate populatsiooni looduslikult kontrolli all. Sellise strateegia rakendamiseks oleks vaja paremaid teadmisi antud seeneliigi ökoloogiast.

Entomopatogeensete seente kasutusala ei piirdu vaid putukatõrjega. Neid annab kasutada ka kui kaitsevahendeid taimepatogeenide vastu mullas ning isegi taimekasvu kiirendajatena. Täiesti uudne strateegia oleks rakendada endofüütseid entomopatogene põllumajanduses. Akello & Sikora (2012) näitasid oma töös, et põldubade nakatamine entomopatogeensetest seentest endofüütidega vähendas lehetäiliste arvu 33 korda võrreldes tavaliste põldubadega. Lisaks hõivavad sellised endofüüdid kahjulikemate taimepatogeenide nišši, kaitstes seega taimi ka mikroobide eest (Ownley & Windham 2007). Entomopatogeensed seened vajavad rohkem tähelepanu, kuna nad omavad potentsiaali olla inimestele laialdaselt kasulikud.

Kokkuvõte

Putukad ja seened on asustanud samu nišše juba miljoneid aastaid, mis on viinud väga mitmekesiste suhete tekkimiseni. Seened on ainulaadsed entomopatogeendid, sest suudavad putukat nakatada läbi kutiikula. Teised entomopatogeendid vajavad putuka nakatamiseks sissesöömist. Seega on seened ainsad entomopatogeendid, kes suudavad nakatada ka putukate mittetoituvaid arenguetappe nagu munad ja nukud.

Valdav osa entomopatogeensetest seentest kuulub helekottseenelaadsete (*Hypocreales*) seltsi. Siia kuulub nii väga laialt levinud kui ka väga konkreetse asualaga putukate parasiite, kes on väga varieeruva peremeesspetsiifilisusega. Siiski on viimase kümne aasta jooksul tehtud molekulaarsed uuringud näidanud, et paljud varem morfoloogiliselt määratletud liigid on tegelikult mitmete liikide kogumid. Käesolevas töös uuriti helekottseenelaadsete entomopatogeenide peremeesspetsiifilisust molekulaarsete uuringutega koostatud fülogeneesipuude kaudu. Selgus, et sel moel mitmetes rühmades eristunud liigid on märksa kitsama peremeesputukate ringiga kui seda on näidanud senine liigikäsitus. Vastupidised näiteid morfoloogiliste liikide osutumisest üheks, laiema peremehe valikuga liigiks, on märksa haruldasemad. Spetsialiseerumine näitab seente evolutsioneerumist peremehe aeglasema surmamise poole eesmärgiga võimalikult palju putukat ära kasutada. Entomopatogeensete seente suurim mitmekesisus on troopikas, kus on kirjeldatud suurim hulk ja sealhulgas ka kitsalt spetsialiseerunud liike. Mõned helekottseenelaadsetest entomopatogeenidest suudavad elada ka taimedes endofüütidena, kaitstes taime nii herbivoorsete putukate kui ka teiste mikroobsete taimepatogeenide eest. Endofüütidena esinemine annab alust arvata helekottseenelaadsete entomopatogeenide potentsiaali taimekaitstes.

Entomopatogeensete helekottseenelaadsete liikide kasulikkus taimekasvatuses ilmneb ka mullakomponendis. Lisaks mullas olevate putukate tapmisele, kaitsevad entomopatogeendid ka taime risosfääri ning võivad mõjuda isegi taimekasvu edendajatena.

Entomopatogeenide kasutamiseks putukatõrjes on väga oluline mõista milline seeneliik või liigisisene rühm milliseid putukataksoneid nakatab. Seda teades saame rakendada kõige efektiivsemat tõrjemeetodit, mis ei löö ülejäänud ökosüsteemi liikmeid paigast ära. Käesoleva töö käigus ilmnis, et helekottseenelaadsete entomopatogeenide seas

esinevad valdavalt kitsalt spetsialiseerunud liigid, kuigi on ka palju helekottseenelaadsete perekondi ja liike, mille peremeesspetsiifilisus vajab täpsemat uurimist.

Summary

Host specificity in entomopathogenous *Hypocreales* species

Insects and fungi have occupied the same ecological niches for millions of years. During this time they have developed an assemblage of complicated relationships. Fungi are unique amongst entomopathogens because they are able to infect their host through cuticle structures. This gives them advantage over other entomopathogenous species because they do not need to be ingested. Because of that they are able to infect insects in nonfeeding stages such as eggs or pupae.

Hypocreales is one of the most studied and most specious order among entomopathogenic fungi. It consists of species with wide distribution as well as species found in small areas. Fungi of *Hypocreales* can be specialised on few host insects or have a wide variety of hosts. In current work host specificity was examined in phylogenetic trees constructed by molecular evidence. Molecular studies conducted in past ten years have indicated that the majority of old morphologically identified species are actually complexes of many new species. Those species are usually more specialised on host species than old complex was thought to be. Examples of joining species into more generalist species are not so common. Specialisation on host species indicates the strategy of killing the host slower in order to exploit the insect to the maximum. There are also indications of entomopathogenic fungal specialists being more distributed in the tropics than other areas. Some entomopathogens of the order *Hypocreales* have not yet evolved rigid relationships with insects and are found also as endophytes in plants. Such a form protects the plant from herbivore insects and other microbial plant pathogens. The ability of entomopathogenic fungi to be an endophyte has strong potential of use in plant protection.

Entomopathogenic fungi of the order *Hypocreales* have also use in plant protection as a component of risosphere. There they have the ability to infect insects, defend plants risosphere and even promote plant growth.

The knowledge of host specificity level is crucial in order to use entomopathogenic fungi as pest control agents. Knowledge of which fungus species or isolate attacks certain

insect species can be used to apply the most effective insect control method that does not disrupt the normal balance of the environment. There are still many species and genus level entomopathogens in the order *Hypocreales* whose host specificity needs further studies. Despite that this study reveals that entomopathogenic fungi of the order *Hypocreales* have a tendency of being more specialists than generalists.

Tänuavaldused

Tahaksin tänada oma juhendajat Kadri Põldmaad kiirete, alati asjalike näpunäidete ja usu eest minusse. Tänud ka kursakaaslastele nende kolme ilmelise aasta eest.

Kasutatud kirjandus

- Akello, J. and Sikora, R. 2012. Systemic acropedal influence of endophyte seed treatment on *Acyrtosiphon pisum* and *Aphis fabae* offspring development and reproductive fitness – *Biological Control* 61(3): 215-221.
- Barta, M. and Cagàn, L. 2006. Amphid-pathogenic Entomophthorales (their taxonomy, biology and ecology) – *Biologia Bratislava* 61: 543-616.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. and Humber, R.A. 2006. *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex – *Mycologia* 98(5): 737-745.
- Bischoff, J.F., Rehner, S.A. and Humber, R.A. 2009. A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage – *Mycologia* 101(4): 512-530.
- Boomsma, J.J., Jensen, A.B., Meyling, N.V. and Eilenberg, J. 2014. Evolutionary Interaction Networks of Insect Pathogenic Fungi – *Annual Review of Entomology* 59: 467-485.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. and Latge, J.P. 1988. Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteroomycetes to Host Insect Cuticle - *Applied and Environmental Microbiology* 57: 1795-1805.
- Bridge, B.D., Prior, C., Sagbohan, J., Lomer, C.J., Carey, M. and Buddie, A. 1997. Molecular characterization of isolates of *Metarhizium* from locusts and grasshoppers. – *Biodiversity and Conservation* 6: 177-189.
- Brodeur, J. 2012. Host specificity in biological control: insights from opportunistic pathogens – *Evolutionary Applications*.
- Bushley, K.E., Raja, R., Jaiswal, P., Cumbie, J.S., Nonogaki, M., Boyd, A.E., Owensby, C.A., Knaus, B.J., Elser, J., Miller, D., Di, Y., McPhail, K.L. and Spatafora, J.W. 2013. The Genome of *Tolypocladium inflatum*: Evolution, Organization, and Expression of the Cyclosporin Biosynthetic Gene Cluster - *PLoS Genetics*, 9(6). doi:10.1371/journal.pgen.1003496
- Butt, T.M., Beckett, A. and Wilding, N. 1981. Protoplasts in the in vivo life cycle of *Erynia neoaphidis* – *Microbiology* 127: 417-421.

- Butt, T.M., Hajek, A.E. and Humber, R.A. 1996. Gypsy moth immune defenses in response to hyphal bodies and natural protoplasts of entomophthoralean fungi – *Journal of Invertebrate Pathology* 68: 278-285.
- Castrillo, L.A. and Humber, R.A. 2009. Molecular Methods for Identification and Diagnosis of Fungi – In: Stock, S.P., Glazer, I. and Vandenberg, J.(eds.). *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques*. CABI publishing: 50-70.
- Chamberlain, K., Guerrieri, E., Pennacchio, F., Pettersson, J., Pickett, J.A., Poppy, G.M., Powell, W.A., Wadhams, L.J. and Woodcock, C.M. 2001. Can aphid-induced plant signals be transmitted aerially and through the rhizosphere? – *Biochemical Systematics and Ecology* 29(10): 1063-1074.
- Charnley, A.K. and Collins, S.A. 2007. Entomopathogenic Fungi and Their Role in Pest Control – In: Kubicek, C.P.(ed.) and Druzhinina, I.S.(ed.), *The Mycota 4: Environmental and Microbial Relationships*. Springer: 159-187.
- Chaverri, P., Bischoff, J.F., Evans, H.C. and Hodge, K.T. 2005. *Regiocrella*, a new entomopathogenic genus with a pycnidial anamorph and its phylogenetic placement in the *Clavicipitaceae* – *Mycologia* 97(6): 1225-1237.
- Chaverri, P., Liu, M. and Hodge, K.T. 2008. A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*, *Moelleriella*, and *Samuelsia* gen. nov. (*Ascomycota*, *Hypocreales*, *Clavicipitaceae*) and their aschersonia-like anamorphs in the Neotropics – *Studies in Mycology* 60: 1-66.
- Cory, J.S. and Ericsson, J.D. 2010. Fungal entomopathogens in a tritrophic context – *BioControl* 55: 75-88.
- D'Alessandro, C.P., Jones, L.R., Humber, R.A., López Lastra, C.C. and Sosa-Gomez, D.R. 2014. Characterization and phylogeny of *Isaria* spp. Strains (*Ascomycota*: *Hypocreales*) using ITS1-5.8 S-ITS2 and elongation factor 1-alpha sequences – *Journal of Basic Microbiology* 54(S1): S21-S31.
- de Carolina Sánchez-Pérez, L., Barranco-Florido, J.E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J.F. and Ramos-López, M.Á. 2014. Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights – *Advances in Enzyme Research* 2: 65-76.

- de Faria, M.R. and Wraight, S.P. 2007. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types – *Biological Control* 43: 237–256.
- Driver, F., Milner, R.J. and Trueman, J.W.H. 2000. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data – *Mycological Research* 104(2): 134-150.
- Dunphy, G.B., Chadwick, J.M. 1985. Strains of protoplasts of *Entomophthora egressa* in spruce budworm larvae – *Journal of Invertebrate Pathology* 45: 255-259.
- Eberhard, W., Pacheco-Esquivel, J., Carrasco-Rueda, F., Christopher, Y., Gonzalez, C., Ramos, D., Urbina, H. and Blackwell, M. 2014. Zombie bugs? The fungus *Purpureocillium* cf. *lilacinum* may manipulate the behavior of its host bug *Edessa rufomarginata* – *Mycologia* 106(6): 1065-1072.
- Elliot, S., Sabelis, M., Janssen, A., van der Geest, L., Beerling, E. and Fransen, J. 2000. Can plants use entomopathogens as bodyguards? – *Ecology Letters* 3: 228-235.
- Evans, H.C., Elliot, S.L. and Hughes, D.P. 2011a. Hidden Diversity Behind the Zombie-Ant Fungus *Ophiocordyceps unilateralis*: Four New Species Described from Carpenter Ants in Minas Gerais, Brazil – Moreau, C. (ed.) *PLoS One* 6(3). doi:10.1371/journal.pone.0017024
- Fan, J., Xie, Y., Xue, J. and Liu, R. 2013. The Effect of *Beauveria brongniartii* and its Secondary Metabolites on the Detoxification Enzymes of the Pine Caterpillar, *Dendrolimus tabulaeformis* – *The Journal of Insect Science* 13(1). doi: 10.1673/031.013.4401
- Goettel, M.S., Poprawski, T.J., Vandenberg, J.D., Li, Z. and Roberts, D.W. 1990. Safety to nontarget invertebrates of fungal biocontrol agents – In: Laird, M., Lacey, L.A. and Davidson, E.W.(eds), *Safety of microbial insecticides*. CRC Press: 209-232.
- Hajek, A.E., Papierok, B. and Eilenberg, J. 2012. Methods for study of the Entomophthorales. – In: Lacey, L.L. (ed.), *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Amsterdam: Academic: 285-316.
- Han, Q., Inglis, G.D. and Hausner, G. 2002. Phylogenetic relationships among strains of the entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*, as revealed by partial β -tubulin sequences and inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis – *Letters in Applied Microbiology* 34(5): 376–383.

- Hu, G. and St. Leger, R.J. 2002. Field studies using recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is rhizosphere competent – Applied and Environmental Microbiology 68(12): 6383–6387.
- Humber, R.A. 2008. Evolution of entomopathogenicity in fungi – Journal of Invertebrate Pathology 98: 262-266.
- Hywel-Jones, N.L. and Samuels, G.J. 1998. Three species of *Hypocrella* with large stromata pathogenic on scale insects – Mycologia 90(1): 36-46.
- Inglis, G.D., Goettel, M.S., Butt, T.M. and Strasser, H. 2001. Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pests – In: Butt, T. M.(ed.), Jackson, C.(ed.) and Magan, N.(ed.), Fungi As Biocontrol Agents : Progress, Problems and Potential. CABI Publishing: 23-71.
- Jorge, J.A., Polizeli, M.L.T.M., Thevelein, J.M. and Terenzi, H.F. 1997. Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi – In: Boden, R. (ed.), FEMS Microbiology Letters: 165-171.
- Kepler, R.M., Ban, S., Nakagiri, A., Bischoff, J., Hywel-Jones, N.L., Owensby, C.A. and Spatafora, J.W. 2013. The phylogenetic placement of hypocrealean insect pathogens in the genus *Polycephalomyces*: An application of One Fungus One Name – Fungal Biology 117(9): 611-622.
- Kepler, R.M., Humber, R.A., Bischoff, J.F. and Rehner, S.A. 2014. Clarification of generic and species boundaries for *Metarhizium* and related fungi through multigene polygenetics – Mycologia 106(4): 811-829.
- Kepler, R.M., Sung, G.H., Ban, S., Nakagiri, A., Chen, M.J., Huang, B., Li, Z. and Spatafora, J.W. 2012. New teleomorph combinations in the entomopathogenic genus *Metacordyceps* – Mycologia 104(1): 182-197.
- Kobayasi, Y. and Shimizu, D. 1982. Monograph of the genus *Torrubiella* – Bulletin of the National Science Museum, Tokyo 8: 43-78.
- Kobmoo, N., Mongkolsamrit, S., Tasanathai, K., Thanakitpipattana, D. and Luangsa-Ard, J.J. 2012. Molecular phylogenies reveal host-specific divergence of *Ophiocordyceps unilateralis sensu lato* following its host ants – Molecular Ecology 21(12): 3022-3031.

- Kouvelis, V.N., Sialakouma, A. and Typas, M.A. 2008. Mitochondrial gene sequences alone or combined with ITS region sequences provide firm molecular criteria for the classification of *Lecanicillium* species – *Mycological Research* 112(7): 829-844.
- Li, C.R., Ming, L., Fan, M.Z. and Li, Z.Z. 2002. *Paraisaria gracilioides* comb. nov., the anamorph of *Cordyceps gracilioides* – *Mycosystema* 23(1): 165-166.
- Liang, H.H., Cheng, Z., Yang, X.L., Li, S., Ding, Z.Q., Zhou, T.S., Zhang, W.J. and Chen, J.K. 2008. Genetic Diversity and Structure of *Cordyceps sinensis* Populations from Extensive Geographical Regions in China as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat Markers – *Journal of Microbiology* 46(5): 549-556.
- Luangsa-Ard, J.J., Houbraeken, J., van Doorn, T., Hong, S.B., Borman, A.M., Hywel-Jones, N.L. and Samson, R.A. 2011b. *Purpureocillium*, a new genus for the medically important *Paecilomyces lilacinus* – *FEMS Microbiol Letters* 321: 141-149.
- Luangsa-Ard, J.J., Ridkaew, R., Tسانathai, K., Thanakitpipattana, D. and Hywel-Jones, N.L. 2011a. *Ophiocordyceps halabalaensis*: a new species of *Ophiocordyceps* pathogenic to *Camponotus gigas* in Hala Bala Wildlife Sanctuary, Southern Thailand – *Fungal Biology* 115(7): 608-614.
- Mongkolsamrit, S., Kobmoo, N., Tسانathai, K., Khonsanit, A., Noisripoom, W., Srikitikulchai, P., Somnuk, R. and Luangsa-Ard, J.J. 2012. Life cycle, host range and temporal variation of *Ophiocordyceps unilateralis*/*Hirsutella formicarum* on Formicine ants – *Journal of Invertebrate Pathology* 111(3): 217-224.
- Myeiling, N.V., Lübeck, M., Buckley, E.P., Eilenberg, J. and Rehner, S.A. 2009. Community composition, host range and genetic structure of the fungal entomopathogen *Beauveria* in adjoining agricultural and seminatural habitats – *Molecular Ecology* 18: 1282-1293.
- Myeiling, N.V., Thorup-Kristensen, K. and Eilenberg, J. 2011. Below- and aboveground abundance and distribution of fungal entomopathogens in experimental conventional and organic cropping – *Biological Control* 59(2): 180-186.
- Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K. and Pereira, R.M. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control – *Journal of Invertebrate Pathology* 98(3): 267-270.

- Ownley, B.H. and Windham, M. 2007. Biological control of plant pathogens – In: Triggiano, R.N.(ed.), Windham, M.T.(ed.), Windham, A.S.(ed.). *Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises*, 2nd edn. CRC Press, Boca Raton, Florida: 423-436.
- Pell, J.K., Hannam, J.J. and Steinkraus, D.C. 2010. Conservation biological control using fungal entomopathogens – *BioControl* 55: 187-198.
- Perdomo, H., Cano, J., Gené, J., García, D., Hernández, M. and Guarro, J. 2013. Polyphasic analysis of *Purpureocillium lilacinum* isolates from different origins and proposal of the new species *Purpureocillium lavendulum* – *Mycologia* 105(1): 151-161.
- Poisot, T., Bever, J.D., Nemri, A., Thrall, P.H. and Hochberg, M.E. 2011. A conceptual framework for the evolution of ecological specialisation – *Ecology Letters*. doi: 10.1111/j.1461-0248.2011.01645.x
- Powell, W.A., Klingeman, W.E., Ownley, B.H. and Gwinn, K.D. 2009. Evidence of endophytic *Beauveria bassiana* in seed-treated tomato plants acting as a systemic entomopathogen to larval *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) – *Journal of Entomological Science* 44(4): 391-396.
- Quan, Q.M., Wang, Q.X., Zhou, X.L., Li, S., Yang, X.L., Zhu, Y.G. and Cheng, Z. 2014. Comparative phylogenetic relationships and genetic structure of the caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* and its host insects inferred from multiple gene sequences – *Journal of Microbiology* 52(2): 99-105.
- Quandt, C.A., Kepler, R.M., Gams, W., Araújo, J.P.M., Ban, S., Evans, H.C., Hughes, D., Humber, R., Hywel-Jones, N.L., Li, Z., Luangsa-Ard, J.J., Rehner, S.A., Sanjuan, T., Sato, H., Shrestha, B., Sung, G.H., Yao, Y.J., Zare, R. and Spatafora, J.W. 2014. Phylogenetic-based nomenclatural proposals for *Ophiocordycipitaceae* (*Hypocreales*) with new combinations in *Tolyplocladium* – *IMA Fungus* 5(1): 121-134.
- Rehner, S.A. 2009. Molecular Systematics of Entomopathogenic Fungi – In: Stock, S.P., Glazer, I. and Vandenberg, J.(eds.). *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques*. CABI publishing: 145-166.
- Rehner, S.A. and Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs – *Mycologia* 97(1): 84-98.

- Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.H., Luangsa-Ard, J.J., Devotto, L. and Humber, R.A. 2011. Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria* – *Mycologia* 103(5): 1055-1073.
- Roberts, D.W. and Hajek, A.E. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides – In: Leatham, G.F. (ed.), *Frontiers of industrial mycology*. Chapman & Hall, New York: 144-159.
- Samson, R.A. and Brady, B.L. 1983. *Paraisaria*, a new genus for *Isaria dubia*, the anamorph of *Cordyceps gracilis* – *Transactions of the British Mycological Society* 81(2): 285-290.
- Sanjuan, T., Tabima, J., Restrepo, S., Læssøe, T., Spatafora, J.W. and Franco-Molano, A.E. 2014. Entomopathogens of Amazonian stick insects and locusts are members of the *Beauveria* species complex (*Cordyceps* sensu stricto) – *Mycologia* 106(2): 260-275.
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Yamamoto, A., Tamai, Y. and Yajima, T. 2012. Relationship between intraspecific variations and host insects of *Ophiocordyceps nutans* collected in Japan – *Mycosciense* 53: 85-91.
- Schreiter, G., Butt, T.M., Beckett, A., Vestergaard, S. and Moritz, G. 1994. Invasion and development of *Verticillium lecanii* in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* – *Mycological Research* 98: 1025-1034.
- Seidl, V. 2008. Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions – *Fungal Biology Reviews* 22(1): 36-42.
- Spatafora, J.W., Sung, G.H., Sung, J.M., Hywel-Jones, N.L. and White, J.F. 2007. Phylogenetic evidence for an animal pathogen origin of ergot and the grass endophytes – *Molecular Ecology* 16(8): 1701-1711.
- St. Leger, R.J., Cooper, R.M. and Charnley, A.K. 1991. Characterization of Chitinase and Chitobiose Produced by the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* – *Journal of Invertebrate Pathology* 58: 415-426.
- Strasser, H., Abendstein, D., Stuppner, H. and Butt, T.M. 2000. Monitoring the distribution of secondary metabolites produced by the entomogenous fungus *Beauveria brongniartii* with particular reference to oosporein – *Mycological Research* 104(10): 1227-1233.

- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M., Luangsa-Ard, J.J., Shrestha, B. and Spatafora, J.W. 2007a. Phylogenetic classification of *Cordyceps* and the clavicipitaceous fungi – *Studies in Mycology* 57: 5-59.
- Sung, G.H., Hywel-Jones, N.L., Sung, J.M. and Spatafora, J.W. 2007b. A multi-gene phylogeny of Clavicipitaceae (Ascomycota, Fungi): Identification of localized incongruence using a combinational bootstrap approach – *Molecular Phylogenetics and Evolution*. doi: 10.1016/j.ympev.2007.03.011
- Sung, G.H., Poinar, G.O. and Spatafora, J.W. 2008. The oldest fossil evidence of animal parasitism by fungi supports a Cretaceous diversification of fungal-arthropod symbioses – *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49(2): 495-502.
- Suwannakut, S., Boucias, D.G. and Wiwat, C. 2005. Genotypic analysis of *Nomuraea rileyi* collected from various noctuid hosts – *Journal of Invertebrate Pathology* 90(3): 169-176.
- Thacker, J.R.M. 2002. *An Introduction to Arthropod Pest Control* – Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Thompson, S.N. 2003. Trehalose – The Insect ‘Blood’ Sugar – *Advances in Insect Physiology* 31: 205-285.
- Vega, F.E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes – *Journal of Invertebrate Pathology* 98(3): 277–279.
- Vega, F. E. and Blackwell, M. 2005. *Insect-Fungal associations : Ecology and Evolution* – Oxford University Press, USA.
- Vega, F.E., Meyling, N.V., Luangsa-Ard, J.J. and Blackwell, M. 2012. Fungal entomopathogens. In *Insect Pathology* – Amsterdam: Academic: 171-220.
- Vincent, J.F.V. and Wegst, U.G.K. 2004. Design and mechanical properties of insect cuticle – *Arthropod Structure & Deveopment* 33(3): 187-199.
- Wang, C.S., Hu, G. and St. Leger, R.J. 2005. Differential gene expression by *Metarhizium anisopliae* growing in root exudate and host (*Manduca sexta*) cuticle or hemolymph reveals mechanisms of physiological adaptation – *Fungal Genetics and Biology* 42(8): 704-718.

Wang, C.S. and St. Leger, R.J. 2006. A collagenous protective coat enables *Metarhizium anisopliae* to evade insect immune responses – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103(17): 6647-6652.

Wang, S.B., Leclerque, A., Pava-Ripoll, M., Fang, W.G. and St. Leger, R.J. 2009. Comparative genomics using microarrays reveals divergence and loss of virulence-associated genes in host-specific strains of the insect pathogen *Metarhizium anisopliae* – Eukaryotic Cell 8(6): 888-898.

Wang, X.L. and Yao, Y.J. 2011. Host insect species of *Ophiocordyceps sinensis*: a review – Zookeys 127: 43-59.

Wraight, S.P., Inglis, G.D. and Goettel, M.S. 2007. Chapter IV-4 Fungi – In: Lacey, L.A.(ed.) and Kaja, H.K.(ed.) Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Springer: 223-248.

Lihlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Robin Gielen,

(*autori nimi*)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihlitsentsi) enda loodud teose
Seltsi helekottseenelaadsed (*Hypocreales*) entomopatogeenide
peremeesspetsiifilisus

—,

(*lõputöö pealkiri*)

mille juhendaja on teadur Kadri Pöldmaa,

(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
 3. kinnitan, et lihlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus 26.05.2015