

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

***Heterorhabditis-Photorhabdus* rovarpatogén fonálféreg-baktérium szimbiotikus komplexek elterjedése Magyarországon, a baktériumok szerepe a fonálféregek kompetíciós képességében**

Distribution of *Heterorhabditis-Photorhabdus* entomopathogenic nematode-bacterium symbiotic complexes in Hungary, the effects of the bacteria on the competitive ability of the nematodes

Tóth Tímea

Témavezető: Dr. Horváth Roland
Dr. Kovács Kornél



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2010

Bevezetés, célkitűzések

A Steinernematidae és a Heterorhabditidae családba tartozó fonálférgék a Nematoda törzs fajokban viszonylag szegény csoportját alkotják. A két családba összesen három nemzetséget (*Steinernema*, *Neosteinernema* ill. *Heterorhabditis*) sorolnak (Hunt, 2007), amelyek közös jellemzője, hogy az ide tartozó fajok a rovarok letális patogénjei. Valamennyi faj egyedei szoros szimbiotikus kapcsolatban élnek *Xenorhabdus* ill. *Photorhabdus* baktériumokkal. A baktériumok toxintermelésük révén szerepet játszanak a fertőzött rovarlárvák elpusztításában, antibiotikum termelésük megakadályozza, hogy a rovar tetemet más mikroorganizmusok is megfertőzzék, a rovar testanyagain felszaporodva pedig táplálékkul szolgálnak a fonálférgék számára. A fertőzött rovarból kijutó infektív fonálférgelárvák a szimbiota baktériumot továbbviszik újabb rovar gazdaszervezetet keresve. A *Xenorhabdus* és *Photorhabdus* baktériumok kizárólag a fertőzött rovarokban ill. a fonálférgék infektív lárvaiban találhatók meg, a talajban szabadon nem fordulnak elő (Boemar, 2002).

Az elmúlt két évtizedben a rovarpatogén fonálférgékkel és szimbiota baktériumaikkal foglalkozó kutatási projektek száma jelentősen emelkedett, ezzel egyidejűleg a leírt fajok száma is jelentősen nőtt. Ezt az érdeklődést egyértelműen motiválták ezen fonálférgék biológiai növényvédelmi célú alkalmazásának lehetőségei. Ma világszerte csaknem 20 cég gyárt kereskedelmi léptékben rovarpatogén fonálférg tartalmú terméket. Emellett számos olyan kutatási projekt is folyamatban van, amelyek közvetlenül már nem köthetők a biológiai növényvédelmi gyakorlathoz, hanem a fonálférgék és szimbiota baktériumaik kapcsolatának genetikai, molekuláris szabályozási, evolúciobiológiai vagy ökológiai vonatkozásaira fókuszálnak, ill. a szimbiota baktériumok antibakteriális hatóanyag termelését és entomotoxin produkcióját vizsgálják.

A vegyszermentes növényvédelmi technológiával előállított termékek iránti igény növekedése, valamint számos, a korábbi időszakok növényvédelmi gyakorlatában elterjedten használt kémiai hatóanyag forgalmazásának korlátozása miatt Magyarországon is jól érzékelhetően

nő az érdeklődés a biológiai növényvédelmi megoldások iránt, különösen a talajlakó rovarkártevők (pl. *Melolontha melolontha*) elleni védekezés vonatkozásában. Szisztematikus magyarországi kutatói és fejlesztői munka híján sokáig nem volt elképzelhető, hogy a hazai faunából izolált törzseken alapuló készítmények kerüljenek a piacra.

A rovarpatogén fonálférgeket használó biológiai növényvédelmi módszerek fejlesztéséhez szükséges hazai tudományos alapok megteremtését célozták azok a 2002-től induló, az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht. által kezdeményezett kutatási projektek, amelyek fő célkitűzései: (i) a hazai rovarpatogén fonálféreg fauna minél részletesebb megismerése, (ii) alkalmazott kutatási feladatokhoz alapot biztosító törzsgyűjtemény kialakítása, (iii) gyakorlati felhasználásra alkalmas fonálféregtörzsek kiválasztása, (iv) in vitro tömegtenyésztési technikák kifejlesztése és kultúra specifikus alkalmazási technikák kidolgozása. Ezen kutatási projektek biztosítottak szakmai és pénzügyi keretet a jelen értekezésben ismertetett vizsgálatokhoz is.

Az értekezés **célkitűzései** az alábbiakban foglalhatók össze:

- 1., A *Heterorhabditis* rovarpatogén fonálféreg fajok magyarországi előfordulási gyakoriságának leírása a rendelkezésre álló törzsgyűjteményi tételek alapján.
- 2., A Magyarországról begyűjtött *Heterorhabditis* fonálférgek *Photorhabdus* bakteriális szimbiontáinak jellemzése, az előforduló taxonok gyakoriságának meghatározása.
- 3., Azonos mintavételi helyről begyűjtött *Heterorhabditis megidis* és *H. downesi* fonálférgek bakteriális szimbionta által befolyásolt kompetíciós viszonyainak leírása laboratóriumi kísérletek segítségével.

1. *Heterorhabditis* rovarpatogén fonálféregfajok magyarországi előfordulása

1.1. A munka előzményei és célja: A különböző mezőgazdasági és erdészeti rovarkártevők elleni biológiai védekezési eljárások kidolgozásának alapja a megfelelően hatékony rovarpatogén szervezetek kiválasztása. Jelen vizsgálatok célja a rovarpatogén fonálféregre (EPN) ill. ezek szimbionta rovarpatogén baktériumaira (EPB) épülő termékfejlesztési munkához törzsgyűjtemény, és a hazai EPN faunára vonatkozó adatbázis biztosítása volt. A hazai faunából történő új izolációs vizsgálatok indoka, hogy a hazai kevésbé ismert EPN faunában feltételezhetően található a nálunk őshonos kártevőkre (pl. az igen gyakori *Melolontha melolontha* pajorjaira) specializált, vagy legalábbis azokat gazdaállatként hasznosítani képes EPN törzseket, amelyek jól alkalmazkodtak a hazai ökológiai viszonyokhoz. Az ilyen törzsek biológiai védekezési célú felhasználása feltételezhetően kellően hatékony, ugyanakkor a természetes életközösségekkel való kapcsolatuk miatt nem jelent komoly ökológiai kockázatot. Mivel az előzetes laboratóriumi tesztek és a szakirodalmi adatok alapján a *Melolontha melolontha* lárváit sikeresen *Heterorhabditis* fonálféreggel lehetett fertőzni, a munka során e nemzetségre koncentráltam.

1.2. Módszerek: A munkámat olyan projekt keretei között végeztem, amelynek elsődleges célja a cserebogár pajorjaival szemben hatékony védekezési eljárás kidolgozása volt, így elsősorban a cserebogarak természetes élőhelyeiről, az elegyes lomboserdőkből, erdőszegélyekből gyűjtöttünk mintákat. A mintavételi pontokat az ország azon részein jelöltünk ki, amelyek cserebogár pajorokkal közismerten erősen fertőzöttek, így Baranya, Bács-Kiskun, Nógrád, Pest, Somogy, Vas, Veszprém és Zala megyében. A mintavételek során egy-egy mintavételi pontról 5-5 talajmintát gyűjtöttünk be. A laboratóriumi kapacitás egy-egy alkalommal 50-100 minta feldolgozására adott lehetőséget, összesen 1000 mintát szállítottunk a laborba. Ez az ország különböző részeiről mintegy 200 mintavételi pontot jelentett. A mintákból az EPN törzsek izolálását tesztállat-csapda módszerrel végeztük, azaz a talajba a fonálféreg fertőzésre fogékony, a laboratóriumban könnyen tenyészthető nagy viaszmolymoly (*Galleria mellonella*) ill. lisztbogár (*Tenebrio molitor*) lárváit helyeztük. Az elpusztuló lárvákból a fonálféregket vizes csapdára helyezve futtattuk ki, majd a mosott tenyésztettel újra viaszmolymoly ill. lisztbogár lárvákat fertőztünk. Amennyiben az ismételt fertőzés sikeres

volt, úgy a törzset valóban rovarpatogénnek tekintettük és a további vizsgálatokhoz felhasználtuk. A begyűjtött izolátumokat molekuláris biológiai módszerekkel határoztam meg. A rovarpatogén fonálférgek molekuláris biológiai taxonómiája elsősorban a riboszómális RNS-t kódoló gének közé ékelődött, nem kódoló un. ITS régió vizsgálatán alapul. Ennek a régióknak a DNS szekvenciája valamennyi eddig leírt EPN fajra ismert (Nguyen és Hunt, 2007). Jelen munka során az ITS régiót PCR-RFLP módszerrel vizsgáltam. A DNS preparálásának lépéseit, a PCR körülményeit, a restriktív emésztés részleteit, a fragmentmintázat értékelésének módszereit az értekezés megfelelő fejezeteiben részletesen ismertetem.

1.3. Eredmények: A mintavételeket követően a laboratóriumba beszállított 1000 db talajmintába helyezett 5000 db tesztállatból (3000 viaszmolyl ill. 2000 lisztbogár lárva) 465 mintában összesen 981 db állat pusztult el (716 viaszmolyl ill. 265 lisztbogár lárva). A 981 elpusztult tesztállatból vizes csapdán 329 esetben sikerült fonálférgeket kifuttatni, ezek közül 244 bizonyult az ellenőrző fertőzést követően rovarpatogénnek. Az izolátumok azonosítását elvégezve, a 244 izolátum közül 83 a *Steinernema* nemzetségbe tartozott, míg 161 minta *Heterorhabditis* volt. Ez utóbbiak faji szintű azonosítása során három fajt sikerült kimutatnom: 61 izolátum *Heterorhabditis megidis* volt, 83 *H. downsi* és 17 pedig *H. bacteriophora*. A három faj előfordulási helyeit az értekezésben közölt térképeken mutatom be.

2., A Magyarországról begyűjtött *Heterorhabditis* fonálférgek *Photorhabdus* bakteriális szimbiontáinak jellemzése, az előforduló taxonok gyakoriságának meghatározása

2.1. A munka előzményei és célja: A rovarpatogén fonálférgekkel szimbiózisban élő baktériumok antibiotikum ill. entomotoxin termelésük révén a biológiai növényvédelmi célú kutatások önálló alanyai is lehetnek, ugyanakkor a rovarpatogén fonálférgek élelciklusában betöltött kulcsfontosságú szerepük miatt a baktérium szimbionta vizsgálata a fonálférgek in vitro előállítása szempontjából sem nélkülözhető. Az új EPN izolátumok szimbionta baktériumaiból szintén identifikált törzsgyűjtemény kialakítása volt a cél.

2.2. Módszerek: Az EPN szimbionta baktériumokat a fonálférgek infektív juvenilis stádiumú (módosult harmadik lárvastádium) egyedekből

izoláltuk (Gerritsen és mtsai., 1992). A felületileg sterilizált (Clorox oldattal mosott) lárvákat LB táptalajra helyeztük, az elpusztult lárvákból kiszabaduló baktériumokból különálló telepeket ismét LB táptalajon szélesztettünk, és a morfológiailag homogénnek tűnő telepeket McConkey és NBTA indikátor táptalajra oltottuk át. A festéket akkumuláló baktériumokból törzsanyagot helyeztünk el folyékony nitrogénben. A 136 *Heterorhabditis* fonálféregmintából származó *Photorhabdus* izolátum közül 67-et választottunk ki, amelyek a teljes gyűjteményt földrajzi elterjedés, ill. gazdaszervezet szempontjából is reprezentálják. A baktériumokat a telep morfológiai sajátosságai és tápanyag hasznosításuk alapján jellemeztem. A hemolitikus aktivitást defibrinált birkavért tartalmazó táptalajon, a DNS-bontó aktivitást toluidin-kék indikátort tartalmazó DNase agaron vizsgáltam. A fiziológiai paraméterek vizsgálatát API 20E (bioMérieux) tesztsíkok, ill. GN2 mikroplatek (Biolog) segítségével végeztem el. Az előbbivel olyan, az Enterobacteriaceae családba tartozó baktériumok határozása során fontos paramétereket lehet vizsgálni, mint az indolprodukción, a triptofán-deamináz aktivitás, vagy az ureáz aktivitás. Ezen túlmenően 10 különböző szénhidrát szénforráskénti hasznosítását is vizsgáltuk. A Biolog GN2 tesztrendszer segítségével 95 szerves vegyületről határoztuk meg, hogy az adott baktérium képes-e őket hasznosítani, mint kizárólagos szénforrást. A biokémiai adatok klaszter-analízisét az R Console programcsomag 2.4.1. verziójával (<http://cran.r-project.org>) végeztem el, "agglomerative nesting", és "Ward's clustering" módszerrel. A távolságmátrixot a különböző biokémiai tesztek során adott azonos reakciók számából kalkuláltuk (a távolság két izolátum között 0, ha valamennyi vizsgált paraméterre azonos reakciót adtak, és 1, ha valamennyi paraméterben különböztek).

A rovarpatogén baktériumok molekuláris biológiai azonosítása a 16S rDNS vizsgálatán alapul, ugyanakkor újabb adatok alapján a giráz enzim β alegységét kódoló gén DNS szekvenciája alapján a faj alatti kategóriák elkülönítése pontosabban elvégezhető (Daugat, 2002; Akhurst és mtsai., 2004). Éppen ezért az általunk izolált, morfológiailag jól elkülöníthető *Photorhabdus temperata* típusok esetén ez utóbbi módszert használtuk. Nyilvános adatbázisokban számos típus-törzs megfelelő DNS szekvenciája elérhető, ezek alapján akár PCR RFLP módszerrel, akár a teljes szekvencia vizsgálatával a törzsek nagy biztonsággal

beazonosíthatók. A módszer részletes ismertetését az értekezés tartalmazza.

2.3. Eredmények: A vizsgált baktérium izolátumok telepmorfológiájuk alapján elkülönített csoportjainak reprezentánsait a *gyrB* és a 16S rDNS szekvencia vizsgálata alapján a *Photorhabdus luminescens subsp. laumondii*, a *P. luminescens subsp. kayaii*, a *P. luminescens subsp. thracensis* és a *P. temperata subsp. temperata* alfajokként lehetett azonosítani. Ugyanakkor egy, a telepmorfológia és fiziológiai paraméterek alapján jól elkülöníthető csoport a DNS szekvenciák vizsgálata segítségével egyetlen addig leírt taxonnal sem volt azonosítható. A jellegzetes pigmenttermelése miatt szürke telepeket alkotó baktériumot *Photorhabdus temperata subsp. cinerea* néven önálló taxonként írtuk le. A munka során a *Photorhabdus* nemzetség valamennyi, palearktikus elterjedésű taxonjának (két faj összesen öt alfaja) előfordulását sikerült igazolni a magyarországi *Heterorhabditis* fonálféreg izolátumokból. A részletesen vizsgált 67 baktériumizolátumból 8 származott *H. bacteriophora*-ból, 27 *H. downesi*-ből, és 32 *H. megidis*-ből. Míg a *H. bacteriophora*-hoz 3 különböző bakteriális szimbionta (*P. luminescens subsp. kayaii*, *P. luminescens subsp. laumondii*, *P. luminescens subsp. thracensis*) tartozott, addig a másik két fonálféregből a *P. temperata subsp. temperata*, és a *P. temperata subsp. cinerea* baktériumot izoláltuk (*H. megidis* esetén az izolátumszám *P. t. temperata* 17 és *P. t. cinerea* 15, míg *H. downesi*-nél 19 és 8). A *H. bacteriophora* esetében két olyan mintavételi terület volt, ahol az adott fonálféregfajt két különböző bakteriális szimbiontával lehetett megtalálni (*P. luminescens subsp. laumondii* és *kayaii* Bugacról, míg *P. luminescens subsp. thracensis* és *kayaii* Nyírlugosról). A *H. megidis* és a *H. downesi* több mintavételi ponton együttesen fordult elő, s volt két olyan terület, ahol mindkét fonálféregfaj mindkét baktériummal (*P. temperata subsp. temperata* ill. *cinerea*) együtt fordult elő. Az eddigi ismeretek szerint egy adott *Heterorhabditis* faj ugyan több különböző bakteriális szimbiontával is élhet együtt, azonban a különböző baktériummal együtt élő fonálféregek földrajzilag izoláltak (Adams és mtsai., 2006). Saját vizsgálataink ezzel szemben mindhárom, Magyarországon előforduló *Heterorhabditis* faj esetén igazolták, hogy egy-egy élőhelyen egy adott fonálféregfaj különböző bakteriális szimbiontával is megtalálható.

A munka során Magyarországról előkerült *Photorhabdus* taxonok reprezentánsait nyilvános mikrobiológiai törzsgyűjteményekben (DSMZ, NCAIM) elhelyeztük, az azonosítást szolgáló 16S rDNS és *gyrB* szekvenciákat pedig a GenBank adatbázisba feltöltöttük. A nyilvántartási ill. azonosító számokat az értekezés megfelelő fejezeteiben közlöm.

3., Azonos mintavételi helyről begyűjtött *Heterorhabditis megidis* és *H. downesi* fonálféreg bakterialis szimbionta által befolyásolt kompetíciós viszonyainak leírása laboratóriumi kísérletek segítségével

3.1. A munka előzményei és célja: A 2. pontban ismertetett vizsgálatok egyik lényeges megállapítása volt, hogy található olyan területek, ahol azonos élőhelyen a *H. megidis* és a *H. downesi* együtt fordul elő, ráadásul mindkét faj két bakterialis szimbiontával él együtt, a *P. temperata subsp. cinerea* és *P. temperata subsp. temperata* alfajokkal. Ez az eredmény több szempontból is további vizsgálatra érdemes. Egyrészt, korábbi munkákból ismert volt, hogy a baktérium-fonálféreg szimbiotikus kapcsolat izolátum szinten specifikus, azaz a fonálféreg fitnessze még az azonos fajhoz tartozó, nem natív baktériummal mesterségesen kialakított kapcsolatban is alacsonyabb, mint a saját eredeti szimbiontájával való együttélés esetén (Gerritsen és mtsai., 1998; Sicard és mtsai., 2004; Sicard és mtsai., 2005). Másrészt, a különböző rovarpatogén baktériumok toxicitása eltérő lehet a különböző rovarokkal szemben. Ez felveti a fonálféreg fajok közötti kompetíció mellett a fajon belüli, a bakterialis szimbionta által befolyásolt kompetíció lehetőségét is. A témának gyakorlati alkalmazási jelentősége is van, hiszen ha igazolható az a feltételezés, amely szerint a bakterialis szimbionta befolyásolja az egyes rovarcsoportokkal szembeni fertőzőképességet, akkor ez fontos szempont lehet a különböző rovarkártevőkkel szembeni termékfejlesztéshez kiválasztandó fonálféreg-baktérium komplexekkel szemben is. A munka során igyekeztünk laboratóriumi vizsgálatok segítségével tisztázni a *H. megidis* és a *H. downesi* kompetíciós viszonyait két különböző rovarfaj lárváival (*Galleria mellonella* – Lepidoptera, *Tenebrio molitor* – Coleoptera) szembeni patogenitási folyamat során. Ehhez olyan helyről származó fonálféreg izolátumokat használtunk, amelyről a korábbi mintavételek során igazolható volt, hogy mindkét fonálféreg mindkét lehetséges bakterialis szimbiontával előfordul.

3.2. Módszerek: 2008 augusztusában Dány 11/C és 2/D (egymástól néhány száz méterre lévő) erdőtagból 10-10 talajmintát gyűjtöttünk. A laboratóriumban ezekbe 24 órán belül 5-5 *Galleria mellonella* ill. *Tenebrio molitor* lárvát helyeztünk. A lárvák mortalitását 7 nap múlva ellenőriztük, az elpusztult egyedeket külön-külön vizes csapdára tettük. A kifutó fonálférgeket számoltuk, és valamennyi mintából izoláltuk a bakteriális szimbiontát. A fonálférgeket PCR-RFLP módszerrel, míg a baktériumokat morfológiai sajátosságaik alapján identifikáltuk. A hűtőben vizes szuszpenzió formájában 1 hónapon át tárolt fonálférgekből négy izolátumot választottunk ki: *Heterorhabditis downesi* *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* szimbiontával, *H. downesi* *P. t. temperata* baktériummal, *H. megidis* *P. t. cinerea* és *H. megidis* *P. t. temperata* szimbiontával. A kísérletekhez az azonos szimbiotikus komplexekből azokat választottuk ki, amelyek élőegyedszáma a tárolás alatt nem csökkent jelentősen (élő egyedek aránya min. 90%), és amelyekből elegendő állt rendelkezésre a kísérletek beállításához (min. 100 000 egyed). A kiválasztott izolátumokból különböző elegyeket hoztunk létre (zárójelben a fonálférgek egyedszáma db/ml egységben):

I. *H. megidis*/*P. t. temperata* – *H. downesi*/*P. t. cinerea* (1000 – 0; 500 – 500; 0 – 1000)

II. *H. megidis*/*P. t. cinerea* – *H. downesi*/*P. t. temperata* (1000 – 0; 500 – 500; 0 – 1000)

III. *H. megidis*/*P. t. temperata* – *H. megidis*/*P. t. cinerea* (500 – 500)

IV. *H. downesi*/*P. t. temperata* – *H. downesi*/*P. t. cinerea* (500 – 500)

V. *H. megidis*/*P. t. temperata* – *H. downesi*/*P. t. temperata* (500 – 500)

VI. *H. megidis*/*P. t. cinerea* – *H. downesi*/*P. t. cinerea* (500 – 500)

A különböző összetételű szuszpenziókból 1 – 1 ml-rel (amely minden esetben 1000 db fonálférget tartalmazott) nedvesítettünk 90 mm átmérőjű petricsészékbe helyezett szűrőpapírkorongokat, amelyekre *Galleria mellonella* vagy *Tenebrio molitor* lárvákból 10 – 10 egyedeket helyeztünk. Az összes beállítást 5 ismétlésben végeztük el. A fertőzést követő 7 nap alatt meghatároztuk a tesztállatok mortalitását. Valamennyi elpusztult rovarlárvát sötétkamrában is megvizsgáltuk, és az értékelésnél csak azokat vettük figyelembe, amelyeknél megfigyelhető volt a *Photorhabdus* baktériumokra jellemző biolumineszcencia. Az elpusztult lárvákat szétválogattuk annak megfelelően, hogy melyik baktérium okozta pusztulásukat. Erre az adott lehetőséget, hogy a kísérletekben szereplő két baktérium jellemző színű pigmentet termel (a *P. t. temperata*

sárgát, míg a *P. t. cinerea* szürkét), így a fertőzött rovarlárvák színe is jól elkülöníthető volt. Az elpusztult rovarlárvákat vizes csapdára helyeztük (a különböző baktérium által fertőzött rovarlárvákat minden esetben külön kezelve), és meghatároztuk a kifutó fonálféregek számát. Amennyiben a rovarlárvákat két különböző fonálféregfaj elegyével kezeltük (I., II., V. és VI. beállítás), úgy a kifutó fonálféregeket morфомetriai bélyegek alapján identifikáltuk, ill. ha ez alapján a faji hovatartozás kétes volt, úgy PCR-RFLP vizsgálatot végeztünk.

3.3. Eredmények: A Dány környékéről begyűjtött 20 talajmintából 17 volt pozitív *Heterorhabditis* fonálféregre, és összesen 47 tesztállat pusztult el. Ezek közül 44 rovarlárvából sikerült fonálféregket kifuttatni. A fonálféregek közül 24 *H. downesi* volt, 20 pedig *H. megidis*. A bakteriális szimbionta szerinti megoszlás a következő volt (százalékos megoszlás az összes begyűjtött izolátumra vonatkoztatva): *H. downesi/P. t. temperata* 23%; *H. downesi/P. t. cinerea* 32%; *H. megidis/P. t. temperata* 32%; *H. megidis/P. t. cinerea* 13%. A fonálféreg reprodukciós sikere (kifutó infektív lárvák/rovarlárvá) mindkét fajnál statisztikailag is igazolhatóan nagyobb volt a *P. t. cinerea* bakteriális szimbionta esetén (75 900 ill. 42 300 *H. downesi*-nál és 93 900 ill. 34 700 *H. megidis*-nél).

A laboratóriumi kísérletek eredményei közül a legfontosabbak a következők voltak:

- A vizsgált *H. megidis* és *H. downesi* izolátumok az alkalmazott kísérleti rendszerben egy fertőzési ciklus alatt „lecserélhetik” bakteriális szimbiontaikat, azaz olyan rovartetemből is kifuttathatók, amelyben nem a saját eredeti szimbiontájuk szaporodott fel. *Galleria mellonella* tesztállatban ez a szimbiontacseré nagyobb valószínűséggel következik be, mint *Tenebrio molitor* lárváiban.

- Egy adott fonálféreg különböző baktériummal alkotott komplexeivel keverten végzett fertőzés esetén a *P. t. temperata* baktérium a rovarlárvák jelentősen nagyobb részében tud felszaporodni, mint a *P. t. cinerea*, ha *H. megidis* a szimbiotikus partner (III. kísérleti beállítás) függetlenül attól, hogy milyen típusú a rovarlárvá (Lepidoptera vagy Coleoptera). Ez a megállapítás *H. downesi* szimbiotikus fonálféreg (IV. beállítás) esetében csak a *Galleria mellonella* tesztállatra igaz, a *Tenebrio molitor*-nál a két baktérium azonos mértékben sikeres.

- Két különböző fajú fonálféreg egy adott baktériummal alkotott komplexeivel végzett kevert fertőzésnél a *H. megidis* patogenitási sikere

(a fertőzött rovarlárvák hány százalékából futnak ki infektív lárvái) mindkét rovarral szemben jelentősen nagyobb, mint a *H. downesi*-é, ha a szimbiotikus partner a *P. t. temperata* (V. beállítás). Ezzel szemben *P. t. cinerea* szimbiontával (VI. beállítás) csak *Galleria mellonella* tesztállat esetén sikeresebb a *H. megidis*, *Tenebrio molitor*-nál a helyzet éppen fordított.

Összegezve, a laboratóriumi fertőzési tesztek során a *H. megidis* és a *H. downesi* szimbiotikus kapcsolata a *Photorhabdus* baktériumokkal nem bizonyult rögzítettnek. A különböző rovarlárvák gazdaszervezetként való hasznosításában a fonálférgek eltérő kompetíciós képességűek, és ezt a sajátosságukat a bakteriális szimbionta befolyásolja.

Introduction, aims of the study

Steinernematidae and Heterorhabditidae are two species-poor families of Nematoda. Only three genera belong to these two taxa (*Steinernema*, *Neosteinernema* and *Heterorhabditis*) with species lethally pathogenic to insects. All nematodes of Steinernematidae and Heterorhabditidae live in a symbiotic relationship with entomopathogenic bacteria (EPB) *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively. In the pathogenic process the symbiotic bacteria of nematodes play an exceptionally important role: They produce wide range of toxins, hydrolytic exoenzymes and antibacterial compounds that are responsible for the death and bioconversion of the infected insect larvae and prevent other soil organisms from degrading the insect cadavers. Infective juveniles of nematodes emerging from insect cadaver transport the cells of symbiotic bacteria finding new hosts. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria can be found exclusively in the infected cadavers of insects or in the intestine of nematode infective juveniles.

During the last two decades the number of research projects regarding to the entomopathogenic nematodes (EPN) and their symbiotic bacteria increased exponentially, at the same time the described species of the two families grew quickly. This interest has been motivated by biocontrol potential of these organisms. There are about 20 commercial producers of EPNs worldwide. Moreover, there is lot of research projects aimed to genetic, molecular biological, evolutionary and ecological aspects of nematode-bacteria symbiosis.

With spreading of environmentally sound production systems and restriction of some harmful insecticides, soil dwelling pests, first of all grubs of *Melolontha melolontha* in Hungary, cause more and more damage in horticulture. Novel control strategies like biological control have gained much interest recently, and entomopathogenic nematodes are the most important candidates as effective control agents against soil dwelling grubs. In Hungary, the lack of detailed and reliable biogeographic data and the lack of a usable strain collection seriously restrict research on biological control techniques.

The research projects initiated by the Research and Extension Centre for Fruit Growing in Újfehértó intended to establish the scientific bases of biocontrol work with entomopathogenic nematodes. The main goals of

this work were: (i) detailed survey of Hungarian entomopathogenic nematode fauna; (ii) founding a strain collection; (iii) screening the Hungarian nematode strains for effective pathogens of key pests; (iv) elaborating in vitro mass production techniques and application technologies. These research projects provided scientific and financial framework for my work.

The main goals of this present thesis are:

1. Describing the Hungarian *Heterorhabditis* fauna and establishment a strain collection from newly isolated nematodes.
2. Characterizing the symbiotic *Photorhabdus* bacterial partners of *Heterorhabditis* species isolated from Hungary.
3. Studying the competition potential of *H. downesi* and *H. megidis* modified by their symbiotic partners.

1. Survey of the Hungarian *Heterorhabditis* entomopathogenic nematode fauna

1.1. Aim of the study: Selecting an effective strain is the most important basis of a work aimed to develop a biocontrol technique against different insect pests. The primary goal of the present study was to establish a strain collection from Hungarian *Heterorhabditis* nematode and symbiotically associated *Photorhabdus* bacteria species. During this work it was supposed, that can be found effective pathogens of indigenous insect pests (first of all *Melolontha melolontha*) in the Hungarian fauna. Using this type of strains in biocontrol practice would be reduced the ecological risk of mass application of a pathogenic organism. In the preliminary laboratory trials species of *Heterorhabditis* genus proved to be highly effective against grubs of *Melolontha melolontha*, therefore I preferred this taxon during faunistic survey.

1.2. Methods: The sampling areas include all regions highly infected by common cockchafer, as Baranya, Bács-Kiskun, Nógrád, Pest, Somogy Vas, Veszprém and Zala counties. All sampling sites were habitats typically preferred by *Melolontha melolontha*, including the peripheries of oak and other deciduous forests and new plantations. Five random soil samples were collected at each site and transported to the laboratory in plastic bags. In 2005, totally 1000 soil samples were collected. In 2005,

three larvae of *G. mellonella* and two larvae of *Tenebrio molitor* (Coleoptera, Tenebrionidae) were put into each sample. After seven days, larval mortality was recorded. Dead larvae were cultured in a water trap to obtain infective juvenile (IJ) of nematodes. After washing the emerging IJs, and a successful reinfection as a check of pathogenicity, the nematode material was stored in water suspension at 5 to 7°C. Identification was carried out by molecular biological approach, using PCR-RFLP analysis of ITS1-ITS2 region of the genome. The ITS1-ITS2 DNA sequence of all described EPN species is known (Nguyen and Hunt, 2007).

1.3. Results: Mortality among the 3000 *Galleria* and 2000 *Tenebrio* larvae placed into the 1000 soil samples was 716 and 265, respectively. From the totally 981 insect cadavers 329 nematode strains run out, and after reinfection 244 proved to be entomopathogenic (the remaining 85 were saprophytic). After identification, 83 nematode isolates proved to be *Steinernema* sp., while 161 nematodes belonged to genus *Heterorhabditis*. 61 isolates were identical with *Heterorhabditis megidis*, 83 isolates were *H. downesi*, while the remaining 17 were *H. bacteriophora*.

2., Characterization of the *Photorhabdus* bacterial symbionts of the Hungarian *Heterorhabditis* isolates

2.1. Aim of the study: Because of the exceptional role of symbiotic bacteria in the life cycle of entomopathogenic nematodes, studying of *Photorhabdus* bacteria is essential from the point of view of in vitro mass production of the Heterorhabditid nematodes. Furthermore, entomotxin and antibiotics production of the symbiotic bacteria contribute to effectiveness of nematode-bacteria complex against different kind of insects. The goal of this study was to establish a culture collection from the newly isolated *Photorhabdus* bacteria.

2.2. Methods: Bacteria were isolated directly from infective-stage nematodes (Gerritsen et al., 1992). The nematodes were surface sterilized in 0.25 % sodium-hypochlorite, and macerated with a glass rod. Samples of a macerated material were spread on NBTA agar (nutrient agar with 0.025% bromothymol blue and 0.04% triphenyltetrazolium-chloride) and incubated at 20 °C. After 48 hours dye adsorbing colonies were selected and subcultured every 3 or 4 days on nutrient agar, and all isolated strains

were maintained as cryopreserved material, as well. Among the 136 items of Hungarian entomopathogenic bacteria collection 67 *Photorhabdus* isolates were selected, which represented the whole collection from the point of view of sampling site and symbiotic partner distribution. First stage colony form of the *Photorhabdus* isolates were selected on NBTA indicator plates and used to all tests. Morphological characterization was carried out on nutrient agar plates, while physiological and biochemical tests were performed at 28 °C using GN2 microplates (Biolog) and API20E strips (Biomérieux). Cluster analysis of biochemical data (7 and 40 variable parameters from API20E and Biolog GN2 tests, respectively) was carried out by R Console (<http://cran.r-project.org>) version 2.4.1 using Cluster package, agglomerative nesting, Ward's clustering method. Calculation of dissimilarity matrix based on number of the same reaction (the distance between two isolates is 0, when all studied reaction give same results, and it is 1, when all studied reaction give different results).

The systematics of entomopathogenic bacteria based on the analysis of 16S rDNA, however, the *gyrB* gene provides more useful data for investigating intragenetic phylogenies of Enterobacteriaceae (Daugat, 2002) and *Photorhabdus* (Akhurst *et al.*, 2004). The DNA isolation and PCR amplification of the *gyrB* gene was carried out as described by Akhurst *et al.* (2004). DNA sequence of the PCR products was determined in the laboratory of Biological Centre of Szeged. The *gyrB* gene sequences were aligned against homologous sequences by using the program Clustal X version 1.81 (Thompson *et al.*, 1997). Evolutionary analyses were carried out with the MEGA 4.0 package (Tamura *et al.*, 2007).

2.3. Results: Representatives of bacterial groups separated by morphological and physiological data could be identified based on *gyrB* sequences as *Photorhabdus luminescens subsp. laumondii*, *P. luminescens subsp. kayaii*, a *P. luminescens subsp. thracensis* and *P. temperata subsp. temperata*. However, a clearly separated group characterized by grey pigment production was not identical with any described taxa of *Photorhabdus*. This group was described as a new subspecies, called *Photorhabdus temperata subsp. cinerea*. During the work, all of the palearctic taxa (two species with five subspecies) of *Photorhabdus* genus could be identified from Hungarian *Heterorhabditis* strains. From the detailed studied 67 bacterial isolates 8 were originated from infective juveniles of *H. bacteriophora*, 27 from *H. downesi* and 32

from *H. megidis*. While *H. bacteriophora* was symbiotically associated with three different bacterial taxa (*P. luminescens subsp. kayaii*, *P. luminescens subsp. laumondii*, *P. luminescens subsp. thracensis*), both of the other two nematodes were related to *P. temperata subsp. temperata*, and *P. temperata subsp. cinerea* (*H. megidis*: 17 *P. t. temperata* and 15 *P. t. cinerea*, *H. downesi*: 19 and 8, respectively). There were two sampling sites, where the *H. bacteriophora* could be isolated with two different bacteria (*P. luminescens subsp. laumondii* and *kayaii* from Bugac, while *P. luminescens subsp. thracensis* and *kayaii* from Nyírlugos). The *H. megidis* and *H. downesi* lived together in several sampling sites, and there were two areas, where both nematodes associated with both symbiotic bacteria (*P. temperata subsp. temperata* and *cinerea*). According to the earlier data about *Heterorhabditis-Photorhabdus* relations, a given *Heterorhabditis* species can be associated with several different *Photorhabdus* bacterial taxa, however, the *Heterorhabditis* strains related to different bacterial symbionts are isolated geographically (Adams *et al.*, 2006). In spite of this, our own results demonstrated that all of three recorded *Heterorhabditis* species can live together with two different symbionts in a given area.

Representatives of *Photorhabdus* taxa isolated from Hungary were placed in international culture collections (DSMZ, NCAIM); the *gyrB* and 16S rDNA sequences were submitted to public database (Genbank).

3. Laboratory competition experiments between *Heterorhabditis megidis* and *H. downesi* associated with different bacterial symbionts

3.1. Aims of the study: One of the most interesting results of previous part of this study was, that in several area *H. megidis* and *H. downesi* can be found together, furthermore, both nematodes are associated with two different bacterial symbionts, *P. temperata subsp. cinerea* and *P. temperata subsp. temperata*. Results of earlier studies suggested, that the nematode-bacteria mutualistic association is specific at strain level, i.e. the fitness of the nematodes associated with non native symbiont bacteria (which belong to the same species, as the native symbiotic partner) is lower, than the fitness of native symbiotic pair (Gerritsen *et al.*, 1998; Sicard *et al.*, 2004; Sicard *et al.*, 2005). On the other hand, the toxicity of the different entomopathogenic bacteria is variable against different insects. Possibility of symbiotic bacteria mediated intraspecific

competition is presumable based on these facts. The aim of this present study was to describe the competitive ability of *H. megidis* and *H. downesi* during pathogenic process against two different insect larvae (*Galleria mellonella* – Lepidoptera, *Tenebrio molitor* – Coleoptera).

3.2. Methods: 20 soil samples (each about 3 litres) were collected near to the village Dány (Central part of Hungary) from an 85-years old oak forest (*Quercus robur* – *Quercus cerris*). Within 24 hours 5-5 last instar larvae of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* in holed Eppendorf tubes were placed into the soil samples. The mortality was recorded in 7 days. The dead insect larvae were checked for bioluminescence in darkroom, and the „lighting” cadavers were used for the further studies only. The cadavers were placed on white traps separately, and the emerging infective juveniles were counted. The nematodes were identified by PCR-RFLP analysis of the ITS1-ITS2 part of the DNA. The symbiotic bacteria were isolated from the infective juveniles (Gerritsen *et al.*, 1992). Bacterial isolates were identified by morphological characters. Four nematode isolates were selected from the newly isolated material: *Heterorhabditis downesi* with *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* symbiotic bacteria, *H. downesi* with *P. t. temperata*, *H. megidis* with *P. t. cinerea* and *H. megidis* with *P. t. temperata*. Among the similar isolates were chosen that ones, which have higher number of living individuals (at least 100 000 IJ). Different mixtures were made from the selected isolates (in the parentheses is the number of nematodes, IJs/ml):

I. *H. megidis*/*P. t. temperata* – *H. downesi*/*P. t. cinerea* (1000 – 0; 500 – 500; 0 – 1000)

II. *H. megidis*/*P. t. cinerea* – *H. downesi*/*P. t. temperata* (1000 – 0; 500 – 500; 0 – 1000)

III. *H. megidis*/*P. t. temperata* – *H. megidis*/*P. t. cinerea* (500 – 500)

IV. *H. downesi*/*P. t. temperata* – *H. downesi*/*P. t. cinerea* (500 – 500)

V. *H. megidis*/*P. t. temperata* – *H. downesi*/*P. t. temperata* (500 – 500)

VI. *H. megidis*/*P. t. cinerea* – *H. downesi*/*P. t. cinerea* (500 – 500)

In Petri dishes 10-10 *Tenebrio molitor* or *Galleria mellonella* larvae were placed on filter paper disks wetted by different nematode mixtures (1-1 ml containing 1000 IJs). All treatments (nematode mixtures vs. insect larvae) were carried out with 5 replications. The insect mortality was checked in every 24 hours until 168 hours after the infections. All cadavers were checked for bioluminescence, and only the „lighting” cadavers were used for the further analyses. The dead insects were

separated by their colours, because both bacteria intensively produce pigments (*P. t. temperata* yellow, while *P. t. cinerea* grey pigments), therefore colour of cadavers referred to the infective bacteria. Dead insect larvae were placed on white traps, and number of emerging nematodes was determined. In the cases of infection with two different nematode species (I., II., V. and VI. treatments), the emerging nematodes were identified by morphometrical or PCR-RFLP method.

3.3. Results: The 20 soil samples collected near to village Dány were 17 positive for *Heterorhabditis* nematodes, and 47 test insect larvae (from 200) died. Nematodes emerged from 44 cadavers. Among them 24 were *H. downesi*, and 20 *H. megidis*. The distribution of isolates depending on the bacterial symbionts was the following (in the percentage of the totally 44 isolates): *H. downesi/P. t. temperata* 23%; *H. downesi/P. t. cinerea* 32%; *H. megidis/P. t. temperata* 32%; *H. megidis/P. t. cinerea* 13%. The reproductive success of nematodes (emerging IJs/insect cadaver) was higher with *P. t. cinerea* bacteria, than with *P. t. temperata* symbiont (*H. downesi*: 75 900 or 42 300; *H. megidis*: 93 900 or 34 700, respectively).

The most important results of the laboratory experiments:

- The studied *H. megidis* and *H. downesi* isolates can change their bacterial symbionts during one pathogenic step, i.e. both nematodes could emerge from a cadaver, in which grew up the non-native bacteria of the given nematode isolate. The symbiont change is more probable in *Galleria mellonella* larvae than in *Tenebrio molitor* cadavers.
- The *P. t. temperata* can grow up in the greatest part of insect cadavers, if the nematode host was *H. megidis*, independently of the insect species (III. treatment). Associated with *H. downesi*, *P. t. temperata* was more successful in *Galleria mellonella* larvae, while the two types of bacteria were equally frequent in *Tenebrio molitor* cadavers.
- Pathogenic success of *H. megidis* is higher against both insects, than the pathogenic success of *H. downesi* if the bacterial symbiont was *P. t. temperata* (V. treatment). If the bacterial symbiont is *P. t. cinerea*, the pathogenic success of *H. megidis* is higher, than the pathogenic success of *H. downesi* against *Galleria mellonella*, while *H. downesi* is more successful against *Tenebrio molitor* (VI. treatment).

Summarizing, the symbiotic relation between *H. megidis* or *H. downesi* and their associated *Photorhabdus* bacteria was not highly specific during laboratory experiments. The outcome of interspecific

competition between the two nematode species differed in the pathogenic process against different insects, and modified by the bacterial symbionts.

Irodalomjegyzék/Reference list

- Adams B., Fodor A, Koppenhöfer A.M., Stackebrandt E., Stock S.P., and Klein M.G. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biological Control* 37: 32-49.
- Akhurst RJ, Boemare NE, Janssen PH, Peel MM, Alfredson DA, and Beard CE. 2004. Taxonomy of Australian clinical isolates of the genus *Photorhabdus* and proposal of *Photorhabdus asymbiotica* subsp. *asymbiotica* subsp. nov. and *P. asymbiotica* subsp. *australis* subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 (Pt 4): 1301-1310.
- Boemar N. 2002. Biology, Taxonomy and Systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. in: Gaugler R. (ed.) *Entomopathogenic Nematology*, CABI Publishing, Oxon, New York, pp. 35-56.
- Daugat C. 2002. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of the Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematyc studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (531): 547.
- Gerritsen L.J.M., de Raay G., and Smits P.H. 1992. Characterization of form variants of *Xenorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 58 (6): 1975-1979.
- Gerritsen L.J.M., Wiegers G.L., and Smits P.H. 1998. Pathogenicity of new combinations of *Heterorhabditis* spp. and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* and *Tipula oleracea*. *Biological Control* 13: 9-15.
- Hunt D.J. 2007. Overview of taxonomy and systematics. in: Nguyen K.B. and Hunt D.J. (eds.) *Entomopathogenic nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*, Brill, Leinden-Boston, pp. 27-57.
- Nguyen K.B. and Hunt D.J. 2007. *Heterorhabditidae*: species description. in: Nguyen K.B. and Hunt D.J. (eds.) *Entomopathogenic nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*, Brill, Leinden-Boston, pp. 611-692.
- Sicard M, Ferdy JB, Pages S, Le BN, Godelle B, Boemare N, and Moulia C. 2004. When mutualists are pathogens: an experimental study of

the symbioses between *Steinernema* (entomopathogenic nematodes) and *Xenorhabdus* (bacteria). *J. Evol. Biol.* 17 (5): 985-993.

Sicard M, Ramone H, Le BN, Pages S, and Moulia C. 2005. Specialization of the entomopathogenic nematode *Steinernema scapterisci* with its mutualistic *Xenorhabdus* symbiont. *Naturwissenschaften* 92 (10): 472-476.

Az értekezés témájában megjelent közlemények/Publications of Tímea Tóth

a, Referált folyóiratokban megjelent publikációk/Papers in referred journals

Tóth T. (2006) Collection of entomopathogenic nematodes for the biological control of insect pests. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14: 225-230.

Lakatos T., Tóth T. (2006) Biological control of European cockchafer larvae (*Melolontha melolontha* L.) – preliminary results. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14: 73-79.

Tóth T., Lakatos T. (2008) *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* nematodes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58: 2579 - 2581. (IF 2008=2.22)

Tóth T., Lakatos T., Inántszy F. (2008) Elaboration of biological control techniques against key pests of fruit growing in Hungary. *Acta Horticulturae* 767: 105-108.

Tóth T., Lakatos T., Kaskötő Z. (2008) Identification and typing of *Photorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in Hungarian soils. *IOBC wprs Bulletin* 31: 138-143.

Sisak Cs., Kaskötő Z., Tóth T., Lakatos T. (2008) Cultivation conditions of biocomplexes applicable to control *Melolontha melolontha*. *IOBC wprs Bulletin* 31: 297-301.

Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Trdan, S. (2008) Entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) (Rhabditida: Steinernematidae), a new member of Slovenian fauna. *Acta Agriculturae Slovenica* 91: 351-359.

- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Trdan S. (2008) Entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) recorded for the first time in Slovenia. *Acta Agriculturae Slovenica* **91**: 37-45
- Tóth T., Lakatos T. (2009) Two different bacterial symbionts of *Heterorhabditis megidis* and *Heterorhabditis downesi* inside one population. *IOBC wprs Bulletin* **45**: 395-397.
- Laznik Ž., Ross J. L., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. (2009) First record of the nematode *Alloionema appendiculatum* Schneider (Rhabditida: Alloionematidae) in Arionidae slugs in Slovenia. *Russian Journal of Nematology* **17**: 137-139. (IF2008=0.395)
- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. (2009) First record of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) in Slovenia. *Helminthologia* **46**: 135-138. (IF2008=0.443)
- Laznik Z., Tóth T., Lakatos T., Trdan S. (2009) First field experiment with entomopathogenic nematodes in Slovenia. *IOBC wprs Bulletin* **45**: 361-364.
- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. (2009) Efficacy of two strains of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) against third-stage larvae of common cockchafer (*Melolontha melolontha* [L.], Coleoptera, Scarabaeidae) under laboratory conditions. *Acta Agriculturae Slovenica*, **93**: 293-299.
- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. (2009) *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar) - the first member from Heterorhabditidae family in Slovenia. *Acta Agriculturae Slovenica* **93**: 181-187.
- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. (2009) First record of a cold-active entomopathogenic nematode *Steinernema kraussei* (Rhabditida: Steinernematidae) in Slovenia. *Acta Agriculturae Slovenica* **93**: 37-42.
- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. (2010) The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. *Journal of Food, Agriculture & Environment* **8**: 150-154 (IF2008=0.282)
- Laznik Ž., Tóth T., Lakatos T., Vidrih M., Trdan S. (2010) *Oulema melanopus* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) adults are susceptible to entomopathogenic nematodes (Rhabditida) attack: results from a

laboratory study. *Journal of Plant Diseases and Protection* **117**: 30-32 (IF2008=0.566)

Laznik, Ž., Tóth, T., Lakatos, T., Vidrih, M., Trdan, S. 2010. Control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* [Say]) on potato under field conditions: a comparison of the efficacy of foliar application of two strains of *Steinernema feltiae* (Filipjev) and spraying with thiametoxam. *Journal of Plant Diseases and Protection* **117**: 129-135. (IF2008=0.566)

b, Szóbeli előadások/Oral presentations

Lakatos T., Tóth T. (2004) Biological control of grubs of European cockchafer *Melolontha melolontha* (L.): preliminary results. Hungarian Forest Research Institute: Biotic damage in forests, 12-16 September, 2004, Mátrafüred

Lakatos T., Tóth T., Lucskai A. (2005) Identification of new Hungarian *Heterorhabditis* isolates and their bacterial symbionts. COST 850 Meeting: Natural Occurrence and Evolution of EPNs, 14-17 January, 2005, Ceske Budejovice, Czech Republic

Lakatos T., Tóth T. (2005) Biological control of European cockchafer larvae (*Melolontha melolontha* L.) – preliminary results. Pest and Weed Control in Sustainable Fruit Production-International Workshop, 1-3 September, 2005, Skierniewice, Poland

Tóth T., Lakatos T., Kaskötő Z. (2007) Identification and typing of *Photorhabdus* isolates from entomopathogenic nematodes in Hungarian soils. IOBC/WPRS Working Group „Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes” 11th European Meeting, 03-07 June, 2007, Alés, France

Tóth T., Lakatos T. (2009) Two different bacterial symbionts of *Heterorhabditis megidis* and *Heterorhabditis downesi* inside one population. IOBC/WPRS Working Group „Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes” 12th Meeting: Future research and development into the use of microbial agents and nematodes for biological insect control, 22-25 June, 2009, Pamplona, Spain

c, Poszter előadások/Poster presentations

- Tóth T. (2004) Identification of entomopathogenic nematodes by molecular biological approach. Hungarian Forest Research Institute: Biotic damage in forests, 12-16 September, 2004, Mátrafüred
- Tóth T. (2005) Collection of entomopathogenic nematodes for the biological control of insect pests. Pest and Weed Control in Sustainable Fruit Production-International Workshop, 1-3 September, 2005, Skierniewice, Poland
- Tóth T., Lakatos T., Inántszy F. (2006) Elaboration of biological control techniques against key pests of fruit growing in Hungary. 27th International Horticultural Congress, 13-20 August, 2006, Seoul, Korea
- Somogyi I., Tóth T., Fodor I., Lakatos T. (2007) Üzemi kijuttatási technológia kifejlesztése rovarpatogén fonálféreg tartalmú növényvédelmi készítményhez. XXVIII.Integrált termesztés a kertészeti és szántóföldi kultúrákban konferencia, Budapest, 2007. november 27.
- Sisak Cs., Kaskötő Z., Tóth T., Lakatos T. (2007) Cultivation conditions of biocomplexes applicable to control *Melolontha melolontha*. IOBC/WPRS Working Group „Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes” 11th European Meeting, 03-07 June, 2007, Alés, France
- Laznik Z., Tóth T., Lakatos T., Trdan S. (2007) First record of entomopathogenic nematodes in Slovenia and perspectives of their use. IOBC/WPRS Working Group „Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes” 11th European Meeting, 03-07 June, 2007, Alés, France
- Lakatos T., Tóth T. (2007) Cytotoxic and antimicrobial compound producing activity of hungarian *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* isolates. IOBC/WPRS Working Group „Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes” 11th European Meeting, 03-07 June, 2007, Alés, France
- Laznik Z., Tóth T., Lakatos T., Trdan S. (2009) First field experiment with entomopathogenic nematodes in Slovenia. IOBC/WPRS Working Group „Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes” 12th Meeting: Future research and development in the

use of microbial agents and nematodes for biological insect control, 22-25 June, 2009, Pamplona, Spain

