



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

doktori (PhD) értekezés

Tóth Tímea

Témavezetők:

Dr. Horváth Roland
Dr. Kovács Kornél

DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
Debrecen, 2010

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Természettudományi Doktori Tanács Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola Teresztris és Kvantitatív Ökológia programja keretében készítettem a Debreceni Egyetem természettudományi doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2010. július 2.

Tóth Tímea

Tanúsítom, hogy Tóth Tímea doktorjelölt 2009 - 2010. között a fent megnevezett Doktori Iskola Teresztris és Kvantitatív Ökológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Debrecen, 201

Dr. Horváth Roland

Tanúsítom, hogy Tóth Tímea doktorjelölt 2005 - 2008. között a Szegedi Tudományegyetem Bilológia Doktori Iskola Biotechnológia programjának keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult. Az értekezés elfogadását javasolom.

Szeged, 201

Dr. Kovács Kornél

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

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
a Biológia tudományágban

Írta: Tóth Tímea okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskolája
(Terresztrisz és Kvantitatív Ökológia programja) keretében

Témavezetők: Dr. Horvát Roland
Dr. Kovács Kornél

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.

A doktori szigorlat időpontja: 20... ..

Az értekezés bírálói:

Dr.
Dr.
Dr.

A bírálóbizottság:

elnök: Dr.
tagok: Dr.
Dr.
Dr.
Dr.

Az értekezés védésének időpontja: 20... ..

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1.
2. Célkitűzések.....	3.
3. Irodalmi áttekintés.....	5.
3.1. A rovarpatogén fonálférgekkel és szimbionta baktériumaikkal kapcsolatos általános ismeretek	5.
3.1.1. Rovarpatogén fonálférgesek	5.
3.1.2. Szimbionta baktériumok	6.
3.2. A rovarpatogén fonálférgesek és szimbionta baktériumaik taxonómiája	10.
3.2.1. A <i>Steinernema</i> és <i>Heterorhabditis</i> génusz taxonómiája, identifikálása	10.
3.2.2. A <i>Xenorhabdus</i> és <i>Photorhabdus</i> génusz taxonómiája, identifikálása	13.
3.3. A fonálféreg – baktérium szimbiózis, a „szimbiotikus komplex” jellemzése	15.
4. Módszerek	19.
4.1. EPN izolálás	19.
4.2. EPN meghatározás	19.
4.2.1. DNS minta előkészítése fonálféregből	20.
4.2.2. Az ITS szekvencia PCR amplifikációja	20.
4.2.3. A PCR termék restrikciós analízise	21.
4.2.4. A restrikciós emésztések ellenőrzése	21.
4.2.5. A fragmentmintázat detektálása	21.
4.2.6. A fragmentmintázat elemzése	22.
4.3. Az EPN törzsek szimbionta baktériumainak izolálása.....	22.
4.4. A baktériumok fiziológiai paramétereinek vizsgálata.....	22.
4.5. A baktériumok antibakteriális hatóanyag- és toxintermelő képességének vizsgálata	24.
4.5.1. Az antibakteriális hatóanyagtermelés meghatározása	24.
4.5.2. A toxintermelő képesség mérése	24.
4.6. A baktériumok meghatározása	25.

4.6.1. A 16S rDNS ill. a giráz B alegységének PCR amplifikációja	25.
4.6.2. A bakteriális PCR termék restrikciós analízise	26.
4.6.3. A fragmentmintázat detektálása	26.
4.6.4. A fragmentmintázat elemzése	27.
4.6.5. Teljes DNS szakaszok szekvenciájának meghatározása	27.
4.7. Laboratóriumi kompetíciós vizsgálatok	27.
4.7.1. A felhasznált izolátumok begyűjtése	27.
4.7.2. A kísérleti beállítások	28.
4.7.3. A vizsgált paraméterek	28.
4.8. Statisztikai módszerek	29.
4.8.1. A baktériumok fiziológiai paramétereinek elemzése.....	29.
4.8.2. DNS szekvenciák vizsgálata, filogenetikai elemzések.....	29.
4.8.3. A kompetíciós vizsgálatok statisztikai módszerei	29.
5. Eredmények	31.
5.1. A magyarországi rovarpatogén fonálféreg fauna feltérképezése.....	31.
5.2. A fonálféreg izolátumok szimbionta partnereinek azonosítása	34.
5.2.1. Morfológiai csoportok kialakítása	34.
5.2.2. Fiziológiai vizsgálatok	35.
5.2.3. Az izolátumok antibiotikum-, és toxintermelő képességének tesztelése	40.
5.2.4. Molekuláris biológiai vizsgálatok	45.
5.2.5. A <i>Photorhabdus temperata subsp. cinerea</i> leírása.....	50.
5.3. Kompetíciós kísérletek	53.
6. Az eredmények megvitatása	65.
6.1. Magyarország <i>Heterorhabditis</i> faunája	65.
6.2. A rovarpatogén fonálféreg szimbionta baktériumai	67.
6.3. A kompetíciós kísérletek	70.
6.4. Az értekezésben bemutatott eredmények gyakorlati hasznosításának lehetőségei	73.
7. Összefoglalás	75.
7.1. Bevezetés, célkitűzések	75.
7.2. Módszerek	76.
7.3. Eredmények	78.
7.3.1. A magyarországi <i>Heterorhabditis</i> fauna felmérése.....	78.
7.3.2. A rovarpatogén fonálféreg szimbionta baktériumai.....	78.
7.3.3. A kompetíciós kísérletek	79.

8. Summary	81.
8.1. Introduction, aims of the study	81.
8.2. Methods	82.
8.3. Results	84.
8.3.1. The Hungarian <i>Heterorhabditis</i> fauna	84.
8.3.2. Symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes.....	84.
8.3.3. Results of competition experiments	85.
9. Köszönetnyilvánítás	87.
10. Irodalomjegyzék	89.
Képek, függelék.....	99.

1. Bevezetés

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 táplálékul szolgálnak a fonálférgék számára. A fertőzött rovarból kijutó infektív fonálféreglárvák a szimbionta baktériumot továbbviszik újabb rovar gazdaszervezetet keresve. A *Xenorhabdus* és *Photorhabdus* baktériumok kizárólag a fertőzött rovarokban, ill. a fonálférgék infektív lárvaiban találhatóak meg, a talajban szabadon nem fordulnak elő (Boemare, 2002).

Az elmúlt két évtizedben a rovarpatogén fonálférgékkel és szimbionta baktériumaikkal foglalkozó kutatási projektek száma jelentősen emelkedett, ezzel egyidejűleg a leírt fajok száma is jelentősen nőtt. Ezt az érdeklődést egyértelműen ezen fonálférgék biológiai növényvédelmi célú alkalmazásának lehetőségei motiválták. Ma világszerte csaknem 20 cég gyárt kereskedelmi léptékben rovarpatogén fonálféreg tartalmú terméket. Emellett számos olyan kutatási projekt is folyamatban van, amelyek közvetlenül már nem köthetők a biológiai növényvédelmi gyakorlathoz, hanem a fonálférgék és szimbionta baktériumaik kapcsolatának genetikai, molekuláris szabályozási, evolúciobiológiai vagy ökológiai vonatkozásaira fókuszálnak, ill. a szimbionta 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 fonálféregket használó biológiai növényvédelmi módszerek fejlesztéséhez szükséges hazai tudományos alapok megteremtését célozták azok a 2002-től induló, az Újfehértói Gyümölcstermesztési 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.

2. Célkitűzések

Az értekezésben ismertetett vizsgálatok kivétel nélkül olyan kutatási projektek keretében valósultak meg, amelyek a rovarpatogén fonálférgék biológiai növényvédelmi célú gyakorlati alkalmazásának elősegítését célozták meg konkrét termékfejlesztési feladatok megvalósításával, vagy pedig ezek szakmai alapjainak biztosításával.

Magyarországon elsősorban a kertészeti kultúrákban okoz jelentős kárt a májusi cserebogár (*Melolontha melolontha*) talajlakó lárvája, de más növénytermesztési ágazatokban is kiemelt jelentőségű kártevőnek tekintik, és az erdőgazdálkodásnak is csaknem felbecsülhetetlen károkat okoz. Az ellene való védekezés szintetikus inszekticidekkel megoldhatatlan a korábban rendelkezésre álló hatóanyagok használatának korlátozása miatt, ill. az egyre elterjedtebb környezetkímélő termesztési rendszerek (integrált termesztés, biológiai vagy organikus szemléletű termesztési rendszerek) korlátozó előírásainak megfelelően. Egyetlen valós alternatívaként az ún. biológiai növényvédelmi módszerek alkalmazása maradt. A májusi cserebogár lárváival szemben leginkább perspektivikus lehetőségnek a *Heterorhabditis* génuszba tartozó fonálférgék alkalmazása tűnik (Földes és Lakatos, 2004). Ezek hazai elterjedése azonban gyakorlatilag ismeretlen volt, így a faunisztikai célú vizsgálatoknak közvetlen gyakorlati jelentősége is van.

A *Heterorhabditis* fonálférgék élelciklusában kiemelkedő szerepet betöltő *Photorhabdus* baktériumok (lásd 3.1.2. fejezet) ismerete nélkül a fonálférgék ipari léptékű *in vitro* tömegtenyésztése megoldhatatlan. Ráadásul a baktériumok egyes tulajdonságai a vele együttélő fonálféreg gyakorlati alkalmazási lehetőségeit is behatárolhatják.

A *Heterorhabditis-Photorhabdus* szimbiotikus kapcsolat taxonómiai összetétel szempontjából meglepő változékonyságot mutatott a munka keretében begyűjtött izolátumok esetében. A taxonómiailag eltérő és nyilvánvalóan számos egyéb tulajdonságában is különböző bakteriális szimbiotával való együttélés fonálféreg számára megnyilvánuló előnyeinek tisztázása hozzásegíthet a különböző, mezőgazdasági kártevőnek tekintett rovarokkal szemben hatékony fonálféreg izolátumok kiválasztásához.

Az értekezés konkrét célkitűzései az elmondottaknak megfelelően 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* fonálféregek *Photorhabdus* bakteriális szimbiontáinak jellemzése, az előforduló taxonok gyakoriságának meghatározása.

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

3. Irodalmi áttekintés

3.1. *A rovarpatogén fonálférgekkel és szimbiota baktériumaikkal kapcsolatos általános ismeretek*

3.1.1. Rovarpatogén fonálférgék

A rovarpatogén fonálférgék a Steinernematidae és a Heterorhabditidae család tagjai. Három génusz tartozik ide: a *Steinernema*, a *Neosteinernema*, illetve a *Heterorhabditis*. A három génuszba mintegy 70 leírt, valid faj tartozik.

Bár a két család egymással nem áll közeli rokonságban (Blaxter és mtsai, 1998), ennek ellenére számos közös sajátsággal bírnak. Ezen sajátságok – melyek közül a rovarpatogén baktériummal képzett szimbiotikus kapcsolat a legfontosabb – alapján feltételezhető, hogy a két család konvergens evolúció eredménye (Poinar, 1993). A Steinernemákra és a Heterorhabditisekre egyaránt jellemző, hogy egyetlen szabadon élő formájuk egy módosult harmadik stádiumú lárva, az infektív juvenilis lárva (IJ), mely bélcsatornájában hordozza a vele szimbiotikus komplexet képező *Xenorhabdus* ill. *Photorhabdus* génuszba tartozó baktériumát (Boemare és mtsai, 1993).

Az IJ nem táplálkozó, viszont helyváltoztató mozgásra képes lárvatípus, amely képes a talajban felkutatni a gazdaszervezetet, és annak száján, ánusán vagy légzőnyílásán bejutni a rovar testüregébe (Dowds és Peters, 2002). Ott kiengedi bélcsatornájából a magával hozott bakteriális szimbiotáját. A baktériumok elszaporodnak a tápanyagban gazdag hemolimfában toxintermelésükkel a rovarlárva pusztulását okozva, általában 24-48 órán belül. A fonálférgék a baktériumok által termelt, eddig pontosan nem definiált kémiai anyagok hatására (Ehlers és Shapiro-Ilan, 2005) a nem táplálkozó módosult harmadik stádiumú lárvaállapotból negyedik, táplálkozó lárvastádiumúvá alakulnak, és a felszaporodott baktériumtömeget fogyasztva felnőtt egyedekké válnak, majd szaporodnak. A tápanyagforrás függvényében egy, vagy több generációt a gazdaszervezetben töltenek, majd a rovar tetem jelentette tápanyagforrás kimerülése után módosult harmadik stádiumú egyedekként jutnak a talajba új gazdaszervezet után kutatva.

A Steinernemák és a Heterorhabditisek reprodukciós tulajdonságaikban erősen eltérnek egymástól. A Heterorhabditisek jellemzője, hogy az infektív lárvákból kialakuló első generáció csak öntermékeny hermafroditákból áll, és váltivarú egyedek csak későbbi generációkban keletkeznek (Dix és mtsai, 1992). A Steinernemák esetében minden generáció amfimixissel szaporodik (Poinar, 1990). Tehát míg a Heterorhabditisek esetén elég egyetlen IJ-nek a gazdaszervezetbe bejutni, képes lesz ott elszaporodni, Steinernemák esetén minimum egy hím és egy nőtény egyednek be kell jutni a rovarba, és ott találkozniuk is kell a szaporodáshoz.

A szaporodás utolsó fázisa, hogy a petéket lerakják a gazdaszervezetbe. Néhány idős nőtény, vagy hermafrodita a petéket nem rakja le, hanem uteruszában tartja azokat, az L1-es lárvák az anya szövetein fejlődnek, majd végül szétrepesztik és kijutnak az anyából. A folyamat „endotokia matricida” néven ismert (Johnik és Ehlers, 1999).

3.1.2. Szimbionta baktériumok

A fonálféreg-baktérium szimbiózis ismerete elengedhetetlen a patogenitási folyamatok megértéséhez, illetve a sikeres tömegtermelés kivitelezéséhez. Mindkét partner hasznot húz a kapcsolatból: a baktérium okozza a rovar gyors pusztulását toxintermelése révén, ellátja a fonálférget a szaporodásához és növekedéséhez szükséges tápanyaggal, és antibiotikumtermelésével megakadályozza egyéb mikroorganizmusok elszaporodását a rovar tetemen. A fonálféreg cserébe védi a baktériumot a külső környezeti hatásoktól, bejuttatja a rovar testüregébe, és egyes kapcsolatokban a rovar immunrendszerének szuppresszáásával segíti a baktériumot.

A baktérium szimbionta két fázisvariánsa ismert. „Vad” fonálférgekből kizárólag az I. fázisvariáns izolálható. Ezeket kifejezett antibiotikumtermelés és festék-adszorpció jellemzi (Akhurst, 1980). *In vitro* tenyésztések során változó számú klón jelenhet meg, amelyek nem rendelkeznek ezzel a két tulajdonsággal, és fenotípusos eltérést is mutathatnak az eredeti mintához képest. Ezek a II. fázisvariánsú sejtek, melyek kolónia-, és sejt morfológiában, mozgékonyaságban, endo-, és exoenzim-aktivitásban és szekunder metabolit termelésben is eltérhetnek az I-től (Boemare és Akhurst, 1988; Smigielski és mtsai, 1994; Givaudan és mtsai, 1995). A II. fázisvariáns ökológiai szerepe máig sem tisztázott. Bár képes elpusztítani a rovarlávát, és képes szimbiotikus komplexet képezni, de természetes körülmények között élő fonálféreggel sosem fordul elő (Akhurst és Boemare, 1990). Ezen felül néhány *Photorhabdus*

törzs II. fázisvariánsa ártalmas is lehet az eredetileg vele komplexet képző *Heterorhabditis* fonálférgék számára (Ehlers és mtsai, 1990). Tehát nincs meggyőző ökológiai magyarázat a II. fázisvariáns szerepére, habár egyes feltételezések szerint lehet akár egy túlélő forma is (Smigielski és mtsai, 1994).

3.1.2.1. A szimbionta baktériumok által termelt aktív molekulák

Az első feltételezések a Steinernemák bakteriális szimbiontáinak antimikrobiális aktivitásáról 1959-ből származnak (Webster és mtsai, 2002). Aztán hosszú csend övezte a témát, egészen 1981-ig, amikor Paul és munkatársai *Xenorhabdus* fajok által termelt antibakteriális hatással bíró vegyületet izoláltak és identifikáltak, amelyek a hidroxistilbének, ill. az indolok csoportjába tartoztak (Paul és mtsai, 1981). 1982-ben kísérletekkel igazolták *Xenorhabdus* kultúrák aktivitását a következő mikroorganizmusok ellen: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Ascherichia*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, illetve *Candida* és *Saccharomyces*. Mindezt úgy, hogy az antimikrobiális hatóanyag nem volt ismert (Akhurst, 1982).

Ezt követően leírták a xenorhabdinokat (McInerney és mtsai, 1991a), a xenocoumacinokat (McInerney és mtsai, 1991b), a xenorxideket (Li és mtsai, 1998), és a nematophinokat (Li és mtsai, 1997).

Ezután publikációk sora jelent meg mind *Xenorhabdus*, mind *Photorhabdus* fajok által termelt anyagok kémiaijáról és bioaktivitásáról (Forst és Nelson, 1996; Webster és mtsai, 1998). A következő nagy áttörést *Photorhabdus* kultúrák által termelt óriásmolekulájú rovartoxinek felfedezése jelentette (Ensign és mtsai, 1990). A felfedezés újabb kísérletek sorát indította meg, *in vitro* kultúrák vizsgálata során számos szekunder metabolitot találtak, melyek széles spektrumú antibakteriális és antifungális hatást mutattak, esetenként akár a gyógyszerkutatások szempontjából fontos humánpatogén gombákkal és élesztőkkel szemben is (McInerney és mtsai, 1991a; Li és mtsai, 1997). Igazolt antineoplasztikus hatásuk (Webster és mtsai, 2000) teszi ezeket az anyagokat fontossá a gyógyszerkutatások, gombaölő és nematocid hatása pedig a mezőgazdaság és erdészet számára.

Több mint 30 biológiailag aktív, *Xenorhabdus* ill. *Photorhabdus* tenyészetekből származó, kémiaiilag különböző csoportba tartozó szekunder metabolitot írtak le eddig. Ezek közül a puromycint és a madumycin II-t már izolálták korábban *Streptomyces*esekből (Suhadolkin, 1970; Tavares és mtsai, 1996). Általánosan elmondható, hogy a legtöbb faj nemcsak egyféle szekunder metabolitot termel, és hogy ezek a

metabolitok sokkal diverzebbek Xenorhabdusoknál, mint Photorhabdusoknál. A xenorhabdinokat a *Xenorhabdus bovienii*, a xenocoumacinokat a *Xenorhabdus nematophyla* míg az anthraquinonokat *Photorhabdus* fajok termelik. Ezek a metabolitok nemcsak kémiaiilag nagyon eltérők, hanem nagyon széles spektrumú bioaktivitás is jellemzi őket, úgymint antibiotikus, antimycotikus, antivirális, inszekticid és nematocid hatás, antiulcerikus és antineoplasztikus hatás (Webster és mtsai, 2002).

1994-ben jelent meg egy széles fungicid spektrumot bemutató tanulmány, ahol szimbionta baktériumok erős antimycotikus aktivitását írtak le *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Mucor piriformis*, *Pythium coloratum*, *Pythium ultimum*, *Penicillium spp.*, *Rhizoctonia solani*, *Trichoderma pseudokingii* és *Verticillium dahliae* ellen (Chen és mtsai, 1994).

Miután a fonálféreg bejuttatta szimbionta *Photorhabdus* vagy *Xenorhabdus* partnerét a rovarlárva testüregébe a baktérium szaporodni kezd a rovar testanyagain, különféle toxinokat termel és juttat ki a gazda szervezetébe, melyek hatására az elpusztul (French-Constant és mtsai, 2003). A különféle toxinok precíz biológiai szerepe a fertőzési folyamatban még nem teljesen tisztázott. A vizsgálatok során kiderült, hogy egyes toxinok rovarlárvába injektálva és orálisan, a lárvával „feletve” is kifejti hatásukat, míg mások csak injektálva voltak toxikusak.

A Tc toxinok nagy molekulatömegű, több alegységből álló inszekticid hatású toxinok, amelyek Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumoknál is kimutathatók (Waterfield és mtsai, 2001a). Ezen toxinokat kódoló géneket, azaz a tc géneket először rovarpatogén fonálférgekkel együtt élő *Photorhabdus* és *Xenorhabdus* fajokból írták le. Ezt követően tc-szerű lókusztokat más baktériumfajokból is leírtak, ezek közt van olyan, ami rovarokkal kapcsolatosan él (pl. a *Serratia entomophila*), és olyan, amely rovarokkal egyáltalán nem áll kapcsolatban (Waterfield és mtsai, 2001b). Az első Tc toxinokat a *Photorhabdus luminescens* W14 jelzésű törzséből írták le, mint a felülúszóban megjelenő, nagy molekulatömegű, inszekticid hatású komplex molekulát (Bowen és mtsai, 1998; Bowen és Ensign, 1998). Számos tisztítási lépés után a komplexet négy alegységre lehetett bontani, a Tca, a Tcb, a Tcc és a Tcd alegységre (Bowen és mtsai, 1998). Ezek közül a Tca az, amelyik roncsolja a rovar középbélének epitéliumát, hasonlóan egyes Bt toxinokhoz. A komplex többi része az orális aktivitáshoz szükséges.

Az első nem Photorhabdushoz vagy Xenorhabdushoz kapcsolódó Tc toxinokat *Serratia entomophila*-ban írták le (Hurst és mtsai, 2000). Ez a baktérium okozza Új-Zélandon a *Costelytra zealandica* pajorok

borostyán-megbetegedését. Tc-szerű lókuszt kimutattak *Yersinia* fajokban is. Egyes kutatások szerint a *Yersinia pestis*, amit a relatíve ártalmatlan *Yersinia pseudotuberculosis*-ból eredeztetnek, úgy tudott világméretű járványok okozójává válni, hogy elvesztette tc génjeit, inszekticid hatású toxinok nélkül pedig a bolhák hordozó vektorukká válhattak (ffrench-Constant és mtsai, 2007). Olyan géneket, amelyek a tc génekkel nagyfokú hasonlóságot mutatnak találtak már rovarokkal nem asszociált baktériumokban is, ilyen pl. a *Pseudomonas syringae pv tomato*, a *Pseudomonas fluorescens* és a *Fibrobacter succinogenes*. Ezen baktériumoknál a tc-szerű gének termékeinek szerepe még nem tisztázott. A Tc toxinok egyik csoportjába a „Photorhabdus insect related” gének által kódolt, PirAB kétkomponensű toxin tartozik. Eredetileg *Photorhabdus luminescens* TT01 törzsében írtak le 2 lókuszt, 1-1 pár génnel, melyeket *E. coli*-ban szupresszáltatva igazolták, hogy toxinokat kódolnak (Duchaud és mtsai, 2003). Mindkét lókusztól termelődött toxin orális aktivitást mutatott káposztamoly (*Plutella xylostella*) ellen, illetve különböző moszkító fajok ellen. A génpár egyikére nézve knock-out mutáns génterméke elvesztette aktivitását. Hasonló génpárokat találtak *Photorhabdus asymbiotica*-ban, illetve PirB homológot *Yersinia intermedia*-ban is. A PirB nagyfokú hasonlóságot mutat két, működését tekintve jól körülírható toxinnal, a leptinotarsinnal és a Bt Cry toxinnal. (Crosland és mtsai, 1984, 2005; Madeddu és mtsai, 1985; Miljanich és mtsai, 1988). A hasonlóságból következtethető, hogy a PirB is valószínűleg neurotoxinként működik, az idegdúcok Ca²⁺ csatornáira való hatása révén (Waterfield és mtsai, 2005).

A „Photorhabdus virulence cassettes”, azaz a PVC toxinok leírása más baktériumok toxinjához való feltételezett homológián alapul. Az előzőekben említett *Serratia entomophila* tc génjein kívül rendelkezik egy profág-szerű lókussszal, melynek terméke okozza a lárván az „anti-feeding” hatást, azaz a lárva beszünteti a táplálkozást (Hurst és mtsai, 2004). A *Photorhabdus luminescens* TT01 típus törzs és a *Photorhabdus asymbiotica* ATCC43949 is tartalmaz ilyen lókusztokat, nagy kópiaszámban. Ezeket a termékeket *E. coli*-ban expresszáltatva, majd viaszmosly lárvába injektálva erős inszekticid hatást mutattak. Elektronmikroszkópos vizsgálatok viszont azt mutatták, hogy ezek a PVC-k hasonló szerkezetűek, mint az antibakteriális R-típusú pyocinek. A strukturális hasonlóságon kívül viszont más egyezés nem volt, azaz a PVC-k nem rendelkeztek antibakteriális hatással. Ezért vetődött fel az a hipotézis, hogy a bakteriocin-szerű PVC-k elvesztették antimikrobiális hatásukat, miközben az eukarióta gazdaszervezet sejtjeinek elpusztítására módosultak (ffrench-Constant és mtsai, 2007).

Az Mfc-ek (Makes caterpillars floppy) csoportjába tartozó toxinok a rovarokba jutva azok középbelét roncsolják, minek hatására a lepkék teljes testükben elvesztik turgorukat, „floppy”-vá (petyhüdt, lötytyedt) válnak (Daborn és mtsai, 2002). Az első Mfc toxint, az Mfc1-et *E. coli*-ban termeltették és lárvákba injektálva vizsgálták hatását. A rovarok petyhüdtté válásán túl megfigyelhető volt, hogy a toxin tönkretette a rovar fagocitáit (hemocitáit), elindítva azok apoptózisát. Az apoptózist indukáló hatás emlős sejtvonalakon (African green monkey kidney cells, Swiss mouse fibroblast) is kimutatható volt (French-Constant és mtsai, 2007). Mitokondrium-roncsoló hatását a mitokondriális membránpotenciál és a citokróm c aktivitásának megváltoztatásával fejt ki.

A szimbionta baktériumok által termelt toxinok növényvédelmi célú alkalmazásának lehetőségét évek óta vizsgálják. A Bt toxinok széles körű alkalmazása maga után vonta a rezisztencia kialakulását, ezért fordul egyre nagyobb figyelem a *Photorhabdus* és *Xenorhabdus* toxinok felé. Transzgénikus *Arabidopsis*-ban, Tca toxinalgységet expresszáltatva már sikerült a növényt védetté tenni *Manduca* hernyó ellen (Liu és mtsai, 2003), és kutatások folynak a gazdaszervezet-spektrum bővítésére is.

3.2. A rovarpatogén fonálférges és szimbionta baktériumok taxonómiája

3.2.1. A *Steinernema* és *Heterorhabditis* génusz taxonómiája, identifikálása

A rovarpatogén fonálférges és szimbionta baktériumok taxonómiáját a Nguyen és Hunt (2007) által szerkesztett „Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts” alapján mutatom be.

A Steinernematidae család első faja az 1923-ban Steiner által leírt *Aplectana kraussei*, amit 1917-ben izolált Dr. Krausse Németországban. A rendszertani bélyegek korrekt leírását és a pontos rendszertani besorolást övező hosszas vita után mint *Steinernema kraussei* lett a család típusfaja. A *Steinernema* génusz fajleírásait mindig nagy bizonytalanság jellemezte. A besorolás olyan mikroszkopikus bélyegek alapján történt, amelyek esetenként a specialisták számára is félreérthetőek voltak, így a klasszikus morfológiai módszerek használata nehézkessé, néhol lehetetlenné vált. Továbbá, egyes morfológiai bélyegek csak a felnőtt egyedeken figyelhetők meg, amelyeket viszont csak a fertőző rovarlárvákból lehet kipreparálni. Így sok fajleírás csak hiányos anyagra alapult. A Steinernemák kutatásának utolsó dekádjában a fajleírások

száma megugrott, amelynek több oka is van: egyrészt a rovarpatogén fonálférgék a kutatások előterébe kerültek, mint a biológiai növényvédelem potenciális szervezetei, másrészt megindultak a vizsgálatok a fonálférgék elterjedésének szempontjából ez idáig feltérképezetlen afrikai és ázsiai területeken is. A legfontosabb azonban, hogy a molekuláris biológiai technikák oly mértékben fejlődtek, hogy segítségükkel tisztázhatók voltak a bizonytalan és nehézkes morfológiai alapokon nyugvó taxonómia munkák ellentmondásai. Napjainkig mintegy 55 valid fajleírás létezik. A fajleírás fejlődését jól példázzák a következők: valid fajokból 46-ot 1990-óta írtak le, ezekből 31-et pedig csak 2000 után. Ezzel szemben a '20-as és a '30-as években csupán 2-2, az '50-es és '60-es években 1-1, a '80-as években pedig 4 valid fajleírás történt.

A *Steinernema kraussei*, mint a Steinernematidae család típusfaja mellett az iparilag fontos fajok a következők (zárójelben az adott faj leírásához használt típusanyag izolálásának helye és időpontja):

S. feltiae (Dánia, 1934), *S. carpocapsae* (Csehszlovákia, 1955), *S. riobrave* (USA, 1994), *S. scapterisci* (Uruguay, 1990), *S. glaseri* (USA, 1929). Ezek a Steinernemák azok, amelyek tömegtermelésével biológiai növényvédelmi célú készítményeket állít elő mintegy 20 gyártó, szerte a világban (Kaya és mtsai, 2006).

A *Neosteinernema* génusz bevezetése 1994-ben Nguyen és Smart nevéhez fűződik. A Steinernemáktól klasszikus morfológiai módszerekkel alig elkülöníthető nemzetségbe egyetlen faj, egyben típusfaj tartozik: a *Neosteinernema longicurvicaudata* (Nguyen és Smart, 1994).

A Heterorhabditidae család első tagja talán az 1937-ben Pereira által izolált *Rhabditis hambletoni* (Nguyen és Hunt, 2007), mostanra ez a faj *species inquirenda*. Az első végleges leírás a rovarpatogén fonálférgék kutatásának csak relatíve kései szakaszában történt, a *Heterorhabditis bacteriophora* leírása 1976-ban Poinar nevéhez fűződik. Bár ugyanebben az évben Khan és munkatársai javasoltak egy új nemzetséget és leírtak egy új fajt *Chromonema heliothidis* néven (Khan és mtsai, 1976), később ezek azonosnak bizonyultak, és Poinar néhány hónappal korábbi elnevezése élvezett prioritást. Ő a faj leírásával javaslatot tett a Heterorhabditidae család elnevezésre is, melynek a leírt *H. bacteriophora* a típusfaja.

A leírt Heterorhabditisek száma jóval kevesebb, mint a Steinernemáké: mai napig 15 fajt írtak le, szemben az 55 *Steinernema* fajjal. Ennek legvalószínűbb oka, hogy életciklusuk jelentősen eltér a Steinernemákétól, míg azok első, a fertőzött rovarban kialakuló generációja amfimiktikus, a Heterorhabditisek első generációja kizárólag hermafrodita (lásd 3.1.1.) egyedekből áll. Ennek megfelelően a

Steinernemákat nagyobb genetikai és morfológiai variabilitás jellemzi. Az viszont a Heterorhabditisekről is elmondható, hogy napjainkban a molekuláris biológiai módszerek fejlődése kulcsfontosságú szerepet játszik diagnosztikájukban, a fajleírások száma emelkedik.

A Heterorhabditidae család típus- (és egyben az egyetlen) nemzetsége a *Heterorhabditis* génusz, melynek típusfaja a *Heterorhabditis bacteriophora*. Ezen kívül iparilag fontos fajok még a *Heterorhabditis megidis* (USA, 1987), a *Heterorhabditis indica* (India, 1992) és a *Heterorhabditis marelatus* (USA, 1996).

A *Heterorhabditis* génusz fajai közül Európában is előfordul a *H. bacteriophora*, a *H. megidis* és a *H. downesi* (Hominick, 2002).

Identifikálás klasszikus morfológiai módszerekkel:

A fonálféreg-kutatás korai szakaszának módszere, ami nagy felkészültséget és szaktudást igényel, mikroszkópos morfometriai méréseken alapul. A vizsgálatok során a következő paramétereket mérik, illetve számolják (Nguyen és Hunt, 2007):

L: testhossz, MBD: test legnagyobb átmérője, EP: az anterior vég és a kiválasztó pórus távolsága, NR: az anterior vég és az idegyűrű távolsága, ES: garat hossza, T: farok hossza, ABD: anális testátmérő, SL: spiculum hossza, GL: gubernaculum hossza, $a = L/MBD$, $b = L/ES$, $c = L/T$, $D\% = EP/ES \times 100$, $E\% = EP/T \times 100$, $SW\% = SL/ABD \times 100$, $GS\% = GL/SL \times 100$

Az identifikáláshoz hím egyedekre illetve a módosult 3. lárvastádiumú ún. dauer lárvákra (infektív juvenilis lárvá, IJ) van szükség. Ez annyiban bonyolítja meg a vizsgálatokat, hogy míg IJ lárvá létezik szabadon, sőt elég jól tárolható is, addig hím egyedeket közvetlenül az elhullott rovartetemből lehet csak preparálni a fertőzés után, ha a fonálféreg életciklusa elérte a megfelelő stádiumot. Továbbá, a felnőtt egyedek hosszabb távon nem életképesek a tetemen kívül, kizárólag tartósított anyagként tárolhatók. Az egyedeket fixálják, a nemi szerveket preparálják, majd mérik a fenti paramétereket. A méréseket természetesen nem egy, hanem 20-25 egyedden végzik. Mindezek tükrében nem túlzás a módszert nehéznek és időigényesnek nevezni.

Molekuláris biológiai vizsgálatok:

A rovarpatogén fonálféregek filogenetikai kapcsolatainak meghatározására napjainkban az ITS régiót használják (Adams és mtsai, 1998). Az ITS régió (Internal transcribed spacer) a riboszóma alegységeit kódoló gének közé ékelődő, nem funkcionáló szakasz. Az ITS1 a 18S rDNS és az 5,8S

rDNS között, az ITS2 az 5,8S rDNS és a 28S rDNS között helyezkedik el. Használata széles körben elterjedt, ennek oka, hogy könnyű felszaporítani, és magas fokú variabilitás jellemzi már közeli rokonságban álló fajok esetén is. A PCR-rel felszaporított ITS régió kétféleképpen használható tovább:

(i) Restriction fragment length polymorphism (RFLP): A PCR-RFLP kiváló eszköz a Steinernemák és Heterorhabditisek faji szintű elkülönítésére, illetve evolúciós viszonyok megjelenítésére. Hátránya, hogy pontos restriktációs térkép nélkül nem működik. (ii) DNS szekvencia analízis: A fonálféreg-rendszeren módszere napjainkban. Izolátumszintű azonosítást tesz lehetővé, és a különböző taxonómiai szintek között a filogenetikai kapcsolatok nagyon pontos feltérképezését.

3.2.2. A *Xenorhabdus* és *Photorhabdus* génusz taxonómiája, identifikálása

A *Xenorhabdus* (Thomas és Poinar, 1979) és *Photorhabdus* (Boemare és mtsai, 1993) nemzetségbe tartozó baktériumok mutualisztikus viszonyt tartanak fenn a Steinernematidae és Heterorhabditidae család fonálférgeivel. A talajban szabadon nem fordulnak elő, fonálféreg szimbionta partnereikkel a rovarok letális patogénjei. A *Xenorhabdus*ok és *Photorhabdus*ok az Enterobacteriaceae család tagjai (Nguyen és Hunt, 2007). Ezek mindegyike Gram-negatív pálcá, fakultatív anaerobok, negatívok oxidázra, nem sporulálnak, kemoorganikus heterotrófok respiratorikus és fermentációs metabolizmussal (Brenner, 1999; Brenner és Farmer, 2005). A két génusz a családon belül egy jól definiálható, kivételes csoportot képez, mind fenotípusosan (Holt és mtsai, 1994), mind genotípusosan (Brenner és Farmer, 2005) jól elkülönülnek a többi nemzetségtől, azonban mindkettő termeli az összes Enterobacteriaceae-ra jellemző közös antigént (Ramia és mtsai, 1982). A *Xenorhabdus*ok katalázt nem termelnek, ami a *Shigella* csoport jellemzője. Sem a *Xenorhabdus*ok, sem a *Photorhabdus*ok nem képesek nitrátredukcióra, ebben néhány *Erwinia*-ra és *Yersinia*-ra hasonlítanak.

A *Xenorhabdus*ok és *Photorhabdus*ok között a legnagyobb különbség, hogy míg a *Photorhabdus* izolátumok kataláz aktivitást mutatnak, és egy kivétellel mindegyiket biolumineszcencia jellemzi, addig a *Xenorhabdus* izolátumoknak kataláz aktivitása nincs, illetve nem világitanak (Forst és mtsai, 1997). Ezen kívül egy, a 16S rDNS-ben meglévő szignálszekvencia (*Xenorhabdus*: TTCG, *Photorhabdus*: TGAAAG) is gyors elkülönítésre ad lehetőséget (Szállás és mtsai, 1997).

Az első entomopatogén fonálféregből származó szimbionta baktériumot 1965-ben izolálták a *Steinernema carpocapsae* DD136-os jelzésű törzséből, és mint új faj, *Achromobacter nematophilus* néven került leírásra (Poinar és Thomas, 1965). Mivel a génusznév a későbbiekben elvetésre került, az *Achromobacter nematophilus* pedig semmilyen addig leírt génuszba nem volt besorolható, a szerzők 1979-ben egy új génuszt vezettek be, a *Xenorhabdus*-t, amely magába foglalta a *X. nematophilus*-t és a *X. luminescens*-t, amelyeket *Steinernema* és *Heterorhabditis* fajokból izoláltak (Thomas és Poinar, 1979). A *X. luminescens* azonban sem fenotípusosan, sem molekuláris biológiai karakterét tekintve nem illett az új nemzetségbe. Hosszas összehasonlító elemzések után kiderült, hogy a DNS homológia a többi *Xenorhabdus* izolátummal nem éri el a megfelelő szintet, ezért 1993-ban egy új génuszt hoztak létre a Heterorhabditisek szimbiontáinak, ez a *Photorhabdus* génusz (Boemare és mtsai, 1993).

A *Photorhabdus* nemzetséget Boemare és mtsai (1993) egyetlen faj, a *Xenorhabdus luminescens* új génuszba sorolásával írták le. Ezt követően a rovarpatogén fonálférgekkel kapcsolatos faunisztikai munkák járulékos eredményeként egyre több *Photorhabdus* izolátum vizsgálatára volt lehetőségük a kutatóknak, és egyértelmű molekuláris biológiai bizonyítékok utaltak a *P. luminescens* faj polimorfizmusára (Szállás és mtsai, 1997). A nemzetség jelenleg érvényes faji felosztását Fisher-Le Saux és mtsai (1999) végezték el. A *P. luminescens* három alfaja közül a *P. luminescens subsp. luminescens* elsősorban az Észak-Amerikából származó *Heterorhabditis bacteriophora* szimbiontájaként ismert, a *P. luminescens subsp. akhurstii* az Ázsiában, Ausztráliában és Amerikában elterjedt *H. indica* izolátumaiból került elő, míg a *P. luminescens subsp. laumondii* a *H. bacteriophora* európai elterjedésű szimbiontája.

A *P. temperata* a *H. megidis* európai és ázsiai izolátumaiból volt ismert, de egyes észak-amerikai és óceániai *H. bacteriophora* fonálférgekből is ezt a fajt azonosították. Fisher-Le Saux és mtsai (1999) publikációjukban a faj egy alfaját is elkülönítették, *P. temperata subsp. temperata* néven, ez kizárólag mérsékelt égövi fonálféreg izolátumokból került elő.

A nemzetség harmadik faja a *P. asymbiotica*. A faj neve is elárulja, hogy szemben a génuszba sorolt többi baktériummal, nem volt ismert fonálféreg szimbionta partnere, és hosszú ideig csak humán klinikai izolátumai voltak ismertek. A faj jellemző sajátossága, hogy valamennyi rendelkezésre álló izolátuma a nemzetség atipikus képviselője, hiszen sem jelentős pigmenttermeléssel, sem festékakkumulációval, sem pedig antibiotikumtermeléssel nem jellemezhetők, tulajdonképpen a szekunder fázisvariánsú *Photorhabdus*sokra emlékeztető tulajdonságokat mutatnak.

A *Photorhabdus* nemzetség faji felosztását követően viszonylag gyorsan kiderült, hogy a kialakított rendszer számos baktériumizolátum besorolására nem alkalmas (Marokházi és mtsai, 2003). Ezt követően Akhurst és mtsai (2004) a *P. asymbiotica* két alfaját írták le (az észak-amerikai izolátumok alapján a *P. asymbiotica subsp. asymbiotica* és az ausztráliai izolátumok alapján a *P. asymbiotica subsp. australis* alfajt), míg Hazir és mtsai (2004) törökországi *H. bacteriophora* fonálférgekből izolálták a *P. luminescens subsp. thracensis* és a *P. luminescens subsp. kayaii* taxonok típusörzseit. Az utóbbi alfaj érdekessége, hogy több izolátumára egyáltalán nem jellemző a biolumineszcencia.

A génusz történetének további jelentős eseménye Gerrard és mtsai (2006) közleménye. Ők egyértelműen igazolták, hogy a korábban csak humánpatogénként ismert *P. asymbiotica* is rendelkezik fonálféreg szimbiotával, és azt *H. indica*-ként azonosították. Plichta és mtsai (2009) később pontosították a megfigyelést, és a *P. asymbiotica* fonálféreg szimbiotáját új fajként írták le, *H. gerrardi* néven.

A baktériumfajok jelenleg használatban lévő leírása egy önkényes és mesterséges rendszer, ami azonban egységesen működőképes (Stackebrandt és mtsai, 2002). A baktériumfaj különböző izolátumok genomikailag egységes csoportja, ami számos független tulajdonság magas százaléku hasonlóságán, illetve megkülönböztethető fenotípuson alapul (Roselló-Mora és Amann, 2001; Stackebrandt és mtsai, 2002; Adams és mtsai, 2006).

A fajleírás tartalmazza a majdnem teljes 16S rDNS szekvenciát (több, mint 1300 nukleotid, kevesebb, mint 0,5% bizonytalanság), a típusfaj típusörzseinek G+C tartalmát (mol%), a típusörzs fenotípusát, és a kemotaxonomiai paramétereket (Stackebrandt és mtsai, 2002). Ezek vizsgálhatók hagyományos mikrobiológiai módszerekkel (hemolitikus aktivitás), vagy standardizált módszerekkel, pl. API szubsztrát paneleken (szénhidrát metabolizmus és egyéb biokémiai tesztek), illetve Biolog plate-n (szubsztrátmetabolizmus).

3.3. A fonálféreg – baktérium szimbiózis, a „szimbiotikus komplex” jellemzése

Ahogy a korábbiakban láthattuk, a rovarpatogén fonálférgek életciklusában rendkívül sokrétű szerepet töltenek be a mutualista baktériumok, így nem meglepő, hogy a fonálférgek és a baktériumok közötti szimbiotikus kapcsolat vizsgálata rendkívüli figyelemnek örvend. A gyakorlati, a fonálférgeket a biológiai növényvédelmi munkához

felhasználni kívánó szakemberek számára természetesen a kapcsolat vizsgálata azért fontos, mert felmerül annak a lehetősége, hogy a fonálféreg-baktérium „komplex” hatékonysága a partnerek cseréjével, esetleg valamelyik partner módosításával („nemesítésével”) fokozható. Ehhez számos elméleti kérdést kell tisztázni, például azt, hogy a kapcsolat milyen előnyökkel, ill. hátrányokkal jár a fonálféreg és a baktérium számára, és mennyire specifikus. Ennek megértéséhez pedig ismerni kell(ene) a kapcsolat szabályozásának molekuláris hátterét is.

A minden feltételezés szerint mutualisztikus kapcsolat kísérletes vizsgálata szempontjából az egyik kulcsfontosságú lépés volt, amikor sikerült aposzimbiotikus (axénikus – a szimbionta bakteriális partnert nem hordozó) fonálférgeket előállítani. Az egyik első ilyen kísérletes munka négy különböző *Heterorhabditis* izolátum és ezek baktériumainak kombinációjával előállított új komplexek patogenitási sikerét jelentősen alacsonyabbnak mérte, mint az eredeti szimbionta párok hasonló mutatóját (Gerritsen és mtsai, 1998), de a szimbiontacseré megvalósíthatóságát nem zárta ki. Han és Ehlers (2000) szintén aposzimbiotikus fonálférgekkel végzett vizsgálatai szerint a *Steinernema carpocapsae* szimbionta baktériuma nélkül is képes elpusztítani a rovarlárvákat, sőt, abban teljes életciklusát leélve szaporodni is képes, bár a reprodukciós sikere drámaian elmarad a szimbiotikus partner jelenlétében mért értékhez képest. Ugyanakkor, a *Heterorhabditis bacteriophora* sem a rovarlárva elpusztítására, sem pedig reprodukcióra nem volt képes a szimbionta partner jelenléte nélkül. Ezek a megállapítások két szempontból voltak fontosak. Egyrészt első alkalommal sikerült kísérletesen igazolni, hogy a szimbiotikus kapcsolat egy fonálféreg számára obligát, másrészt rávilágított arra, hogy a kapcsolat szorossága fajtól (esetleg nemzetségtől) függő.

Sicard és mtsai (2004) *Steinernema scapterisci* fonálféreg esetén egyértelmű negatív korrelációt kaptak a fonálféreg különböző baktériumokkal képzett komplexei esetén a fonálféreg reprodukciós sikere és az adott baktérium, ill. a fonálféreg natív baktériumának filogenetikai távolsága között. Ugyanezt az összefüggést *S. carpocapsae* esetén is sikerült igazolni (Sicard és mtsai, 2006). Chapuis és mtsai (2009) *S. feltiae* és *S. carpocapsae* fajokkal ezt a megfigyelést a fonálféreg fitnessére találták érvényesnek (amelybe beleértették a patogenitási sikert, a reprodukciós sikert és a szabadon élő forma túlélési rátáját tárolás során). Továbbá megállapították, hogy a nem saját natív baktériumával a *S. carpocapsae* patogenitási sikere csökkent jelentősen, míg a *S. feltiae* infektív lárváinak mortalitása nőtt.

Aposzimbiotikus és baktériummal együtt élő *S. carpocapsae*, *S. riobrave* és *S. scapterisci* fonálférgek összehasonlítása során az

aposzimbiotikus fonálféreg fitnessze (itt a patogenitási és a reprodukciós sikert értik alatta) minden esetben csökkent a normál, baktériummal együtt élő fonálféreghez képest (Sicard és mtsai, 2003), és minél nagyobb mértékű volt ez a csökkenés, annál nagyobb számú baktériumsejtet hordoztak a fonálféreg infektív lárvái magukkal a rovarlárvából kijutva. Azaz, minél inkább obligát jellegű a fonálféreg – baktérium kapcsolat, annál inkább igyekszik a fonálféreg „bebiztosítani” magát, nagyobb számú szimbionta partnert hordozva. Ez utóbbi megfigyelés annak fényében különösen érdekes, hogy az infektív lárvák mortalitása aposzimbiotikus fonálféreg esetén kisebb, mint baktériumot hordozó fonálféregnél, azaz, a baktériummal való kapcsolatnak a fonálféreg számára egyértelmű „költsége” van (Emelianoff és mtsai, 2007). A gondolatmenetet továbbvive érdekes konfliktusra világít rá az a kísérleti eredmény, amely szerint a fonálféreg patogenitási sikere és az infektív lárvák tárolás alatti mortalitása egyaránt pozitívan korrelál az infektív lárvák által hordozott baktériumsejtek számával (Emelianoff és mtsai, 2008).

Szintén aposzimbiotikus fonálféreg felhasználásával sikerült igazolni, hogy a szimbionta baktériumoknak egyértelmű szerepük van a különböző fonálféreg fajok közötti kompetícióban. *S. carpocapsae* és *S. scapterisci* gazdaállaton belüli kompetíciójának kimenete teljes mértékben ellentétes, ha a szimbionta baktériumok jelen vannak, mint ha aposzimbiotikus fonálféregket használnak (Sicard és mtsai, 2005). *S. carpocapsae* esetén pedig azt is sikerült kimutatni, hogy a szimbionta baktériumnak szerepe van az intraspecifikus kompetícióban is (Vigneux és mtsai, 2008).

A fonálféreg-baktérium kapcsolat molekuláris biológiai szabályozásának felderítése még csak korai fázisában tart (Clarke, 2008). Bennett és Clarke (2005) leírtak egy gént (pbgE1), amelynek mutációja esetén a *Photorhabdus luminescens subsp. laumondii* TT01 törzs nem tudta kolonizálni a szimbionta fonálférget, így valószínűsíthető ezen gén szerepe a szimbiotikus kapcsolatban. Gaudriault és mtsai (2006) pedig 31 olyan régiót írtak le a *Photorhabdus* *flexibilis* génkészletén belül, amelyek potenciálisan szerepet játszhatnak a szimbiotikus kapcsolatban.

4. Módszerek

4.1. EPN izolálás

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. Az értekezésben bemutatott munka mintavételi része 2005-ben valósult meg. 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 tenyésztethető nagy viaszmosoly (*Galleria mellonella*), ill. lisztbogár (*Tenebrio molitor*) lárváit helyeztük (1. kép). Az elpusztuló lárvákból a fonálférgeket vizes csapdára helyezve futtattuk ki (2. kép), majd a mosott tenyészettel újra viaszmosoly, ill. lisztbogár lárvákat fertőztünk. Amennyiben az ismételt fertőzés sikeres volt, úgy a törzset valóban rovarpatogénnek tekintettük és a további vizsgálatokhoz felhasználtuk.

4.2. EPN meghatározás

A rovarpatogén fonálférgek molekuláris biológiai taxonómiája elsősorban a riboszómális RNS-t kódoló gének közé ékelődött, nem kódoló ún. ITS régió vizsgálatán alapul. Az ITS régió vizsgálatának előnye, hogy nagymértékben konzervatív DNS szakaszok között helyezkedik el, így azonosítása a genomon belül egyszerű, ugyanakkor viszonylag nagy variabilitással rendelkezik, mivel evolúciós nyomás nem nehezedik a nem kódoló szakaszokra. Az ITS régió DNS szekvenciája valamennyi eddig

leírt EPN fajra ismert (Nguyen és Hunt, 2007). Jelen munka során az ITS régiót PCR-RFLP módszerrel vizsgáltam (Hominick és mtsai, 1997)

4.2.1. DNS minta előkészítése fonálféregből

1. 10 µl WLB-be (50 mmol KCl, 10 mmol TRIS pH=8,3, 2,5 mmol MgCl₂, 0,45% Tween-20, 0,01% zselatin, 60 µg/ml proteináz K) steril tüvel 10 db infektív lárvát, vagy 3 db felnőtt egyed (4 napja elpusztult *Galleria mellonella* lárvából) helyezünk bele
2. A fonálférgeket tartalmazó Eppendorf csöveket -80 °C-os mélyhűtőbe helyezzük 10 percre.
3. A csöveket 65 °C-on inkubáljuk 1 órán keresztül.
4. Ezt követően 95 °C-on tartjuk 10 percig őket, hogy a proteináz K inaktiválódjon.
5. A lizátumot jégen hűtjük, majd centrifugáljuk (12000 rpm, 2 perc).
6. 5 µl felülúszót használunk a PCR-hez.

4.2.2. Az ITS szekvencia PCR amplifikációja

Felhasznált primerek (Hominick és mtsai, 1997):

AB 28 (forward)

5'-ATA TGC TTA AGT TCA GCG GGT-3'

TW 81 (reverse)

5'-GTT TCC GTA GGT GAA CCT GC-3'

Reakcióelegy:

-5 µl fonálféreg-lizátum

-25 µl 2X PCR Master Mix (Fermentas)

-18 µl ioncserélt víz

-1-1 µl forward és reverse primer

A reakció menete (Eppendorf MasterCycler PCR készülék):

1. lépés: 94 °C-on 2 perc

2. lépés: 94 °C-on 30 másodperc

3. lépés: 45 °C-on 60 másodperc

4. lépés: 72 °C-on 90 másodperc

5. lépés: vissza a 2.-hoz 40X

6. lépés: 75 °C-on 5 perc

4.2.3. A PCR termék restrikciós analízise

A hasításhoz használt restrikciós endonukleázok és hasítóhelyeik (zárójelben a Fermentas cég által megadott név):

- <i>Alu</i> I	AG/CT
- <i>Hae</i> III (<i>Bsu</i> RI)	GG/CC
- <i>Hha</i> I (<i>Hin</i> 6I)	GCG/C
- <i>Hin</i> fI	G/ANTC
- <i>Hpa</i> II (<i>Msp</i> I)	C/CGG
- <i>Rsa</i> I	GT/AC

Reakcióelegy:

8 µl DNS templát

1 µl restrikciós endonukleáz

1 µl 10X restrikciós puffer

Inkubálás: 37 °C, min. 12 óra.

4.2.4. A restrikciós emésztések ellenőrzése

A minták kiértékelését 5%-os poliakrilamid, vagy 3%-os nagyfelbontású MetaPhor agaróz (Cambrex) gélen végeztük. Ilyen koncentrációjú gélen választhatóak el a 80-500 bp méretű fragmentek.

Hordozó oldatként mindkét gélnél 6X Loading Dye Solutiont használtunk.

A standardok a következők voltak:

-pBR322 DNA/*Bsu*RI (*Hae*III) Marker (Fermentas)

-GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus ready-to-use (Fermentas)

-pUC18 DNA *Dpn*I digest (Sigma)

A futtatás 4 °C-on, 8 V/cm feszültséggel (poliakrilamid gél), vagy szobahőmérsékleten, 7 V/cm feszültséggel (agaróz gél) történt.

4.2.5. A fragmentmintázat detektálása

Az etídium-bromiddal festett gélt UV asztalon vizsgáltuk, a képet GeneSnap 6.0 számítógépes program segítségével rögzítettük, míg a

fragmentméretek meghatározásához a GeneTools Analysis Software 3.0-t (SynGene, Synoptics Ltd., Cambridge, England) használtuk.

4.2.6. A fragmentmintázat elemzése

Az RFLP mintázat elemzéséhez identifikált, ismert ITS1-ITS2 szekvenciájú fonálféreg törzsek azonos feltételekkel készült RFLP mintázatát használtuk referenciaként. A fonálféreg törzsek a következők voltak: *Heterorhabditis megidis* H295, *H. downesi* H267, és *H. bacteriophora* Huft28 (Lucskai és Tóth, 2004).

4.3. Az EPN törzsek szimbionta baktériumainak (EPB) izolálása

Az EPN szimbionta baktériumokat a fonálféregek infektív juvenilis stádiumú (módosult harmadik lárvastádium) egyedeiből izoláltuk. A felületileg sterilizált (5%-os Clorox oldattal mosott) lárvákat LB (10 g tripton, 10 NaCl, 5 g élesztő kivonat és 15 g agar-agar 1000 ml vízben) táptalajra helyeztük, az elpusztuló lárvákból kiszabaduló baktériumokból különálló telepeket ismét LB táptalajon szélesztettünk, és a morfológiailag homogénnek tűnő telepeket MacConkey (17 g kazein-pepton, 3 g húspepton, 5 g NaCl, 10 g laktóz, 1,5 g epesó, 0,03 g neutrálvörös, 0,001 g kristályibolya, 15 g agar-agar 1000 ml desztillált vízben) és NBTA (5 g NaCl, 5 g pepton, 3 g húskivonat, 15 g agar-agar 1000 ml desztillált vízben, 0,025% bromotimolkékkel és 0,04% trifeniltetrazolim-kloriddal kiegészítve) indikátor táptalajra oltottuk át. A festéket akkumuláló baktériumokat válogattuk ki a további munkához (Akhurst, 1980).

4.4. A baktériumok fiziológiai paramétereinek vizsgálata

A mintegy 140 *Photorhabdus* tételt tartalmazó törzsgyűjteményből kiválasztottam 67 izolátumot, amelyek a teljes gyűjteményt földrajzi elterjedés ill. szimbionta fonálféreg szempontjából is reprezentálják. A kiválasztott, folyékony nitrogénben lefagyasztott izolátumokat NBTA indikátor táptalajon növesztettem, és a primer fázisvariánsú telepeket használtam a további vizsgálatokhoz. A hemolitikus aktivitást defibrinált birkavért tartalmazó táptalajon (22 g pepton, 5 g NaCl, 13 g agar-agar, 50

ml defibrinált birkavér 1000 ml desztillált vízben, pH=7,3), a DNS-bontó aktivitást toluidinkék indikátort tartalmazó DNase agaron (Biolab) vizsgáltam. A baktériumok színét nutrient agar (5 g húspepton, 3 g húskivonat és 12 g agar-agar 1000 ml desztillált vízben) lemezekre oltott, 48-72 órás telepek alapján határoztam meg. A fiziológiai paraméterek vizsgálatát API 20E (bioMérieux) tesztsíkok, ill. GN2 mikroplatek (Biolog) segítségével végeztem el. Az előbbivel az Enterobacteriaceae családba tartozó baktériumok határozása során fontos paramétereket lehet vizsgálni (β -galaktozidáz aktivitás, arginin dihidroláz aktivitás, lizin dekarboxiláz aktivitás, ornitin dekarboxiláz aktivitás, citrát hasznosítás, H₂S produkció, ureáz aktivitás, triptofán-deamináz aktivitás, indol produkció, acetoin produkció (Voges Proskauer reakció), zselatináz (proteáz) aktivitás, ill. kizárólagos szénforrásként hasznosítható-e a D-glükóz, D-mannitol, inozitol, D-szorbitol, L-ramnóz, D-szacharóz, D-melibióz, amigdalin, L-arabinóz), míg a Biolog GN2 tesztrendszer segítségével 95 szerves vegyületről dönthetjük el, hogy az adott baktérium képes-e őket hasznosítani, mint kizárólagos szénforrást. Az API 20E és a Biolog GN2 tesztrendszereket mindenben a gyártó előírása szerint alkalmaztam, kivéve, hogy a Biolog GN2 plateket nem a gyártó által forgalmazott készülékkel, hanem MRX TC Revelation mikroplate olvasóval értékeltem 530 nm hullámhosszon. Az egyes szénforrások esetén a reakciót pozitívnak tekintettem, ha teljesült az alábbi feltétel:

$$ab_x - ab_0 > 0,1*(ab_m - ab_0)$$

ahol ab_x egy adott lyukra mért abszorbancia, ab_0 a negatív kontroll abszorbanciája, míg ab_m az adott plate esetén mért legnagyobb abszorbancia.

A fiziológiai paraméterek vizsgálatát hasonló módon elvégeztük a DSMZ törzsgyűjteményből származó *Photorhabdus temperata* XINach^T, *P. luminescens* subsp. *luminescens* Hb^T, *P. luminescens* subsp. *laumondii* TT01^T és *P. luminescens* subsp. *akhurstii* FRG04^T törzsekkel, amelyek az adott taxon típusörzsei.

4.5. A baktériumok antibakteriális hatóanyag- és toxintermelő képességének vizsgálata

4.5.1. Az antibakteriális hatóanyagtermelés meghatározása

Az antibakteriális hatóanyagtermelést klasszikus agarlemezes diffúziós lyukteszttel vizsgáltam. Ehhez primer fázisú telepekről szójapepton leves (30 g szójapepton és 5 g élesztő 1000 ml desztillált vízben) tápoldatban, 28 °C-on 48 órás baktériumkultúrát állítottam elő. A sejtmentesített fermentlé aktivitását *Staphylococcus aureus subsp. aureus* DSM346 és *Bacillus subtilis* DSM704 baktériumokkal szemben vizsgáltam antibiotikum táptalajon (1,5 g húskivonat, 3 g élesztőkivonat, 4 g tripton, 6 g húspepton, 1 g D-glükóz, és 15 g agar-agar 1000 ml vízben) vagy *Bacillus subtilis* lemezen (6 g húspepton, 6 g húskivonat, 4 g élesztőkivonat és 20 g agar-agar 1000 ml desztillált vízben). Kontrollként 100 ppm streptomycint használtam. A 10 mm-es, 100 µl sejtmentes fermentlével feltöltött lyukak körül kialakuló feltisztuló zónát 16 órás, 37 °C-on végzett inkubációt követően mértem.

4.5.2. A toxintermelő képesség mérése

A baktériumok sejtmentesített fermentlevének citotoxikus aktivitását két rovar sejtvonala használatával mértem. A *Drosophila melanogaster* S2 sejtvonala a legelterjedtebb laboratóriumi Diptera sejtvonala, míg a *Spodoptera frugiperda* Sf9 jelzésű sejtvonala kereskedelmi forgalomban is beszerezhető Lepidoptera vonal. A citotoxikus aktivitást MTT sejt proliferációs teszttel mértem. Ehhez 96 lyukú, lapos aljú mikrotiter lemezeken 200 µl térfogatban log fázisú sejtekhez adtam a baktériumok sejtmentes fermentlevét, eltérő végkoncentrációban (1%, 5% és 10%). 16 órás, 20 °C-on (S2), ill. 28 °C-on (Sf9) végzett inkubációt követően 100 µl sejtmentes felülúszót eltávolítottam, és 100 µl 1 mg/ml koncentrációjú MTT-t (3-(4,5-dimetil-thiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazolium-bromid) tartalmazó szérumentes Shields & Sang (S2), ill. Grace (Sf9) rovarsejt tápoldattal cseréltem le. 2-4 órás inkubációt követően az oldatot óvatosan eltávolítottam, és a kiülepedett vörös formazán kristályokat 100 µl dimetil-szulfoxidban oldottam fel. A színintenzitást (amely a sejtaktivással és így az élő sejtek számával arányos) MRX TC Revelation mikroplate-olvasóval mértem, 530 nm-en. Az élő sejtek számának meghatározásához kalibrációs görbét készítettem, minden egyes kísérleti beállításhoz külön-külön. Ehhez az adott sejtvonala

tenyészetéből hígítási sort készítettem, és a különböző sejtkoncentrációjú szuszpenzióval is elvégeztem az MTT-s inkubációt, ill. színmérést. A sejtkoncentrációt Neubauer kamra segítségével, Zeiss AxioStar fénymikroszkóp alatt, 100x nagyítás mellett határoztam meg.

4.6. A baktériumok meghatározása

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

4.6.1. A 16S rDNS ill. a giráz B alegységének PCR amplifikációja

A 16-24 órás, aktívan növekvő baktériumkultúrából a genomiális DNS-t Puregene Yeast/Bact. kit (Qiagen) segítségével izoláltam.

Felhasznált primerek (Yamamoto és Harayama, 1995, ill. Tailliez és mtsai, 2006):

GyrB forward primer

5'-GAT AAC TCT TAT AAA GTT TCC GG-3'

GyrB reverse primer

5'-TAT TCG TCA CGG CCA ATA CCG CA-3'

16SP1 forward primer

5'-GAAGAGTTTGATCATGGCTC-3'

16SP2 reverse primer

5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

Reakcióelegy (50 μ l):

-5 μ l 16S forward primer (20 pmol/ μ l)

-5 μ l 16S reverse primer (20 pmol/ μ l)

-2 μ l tisztított genomiális DNS templát

- 25 µl 2X PCR MasterMix (Fermentas)
- 13 µl ioncserélt víz

A reakció menete (Eppendorf MasterCycler PCR készülék):

1. lépés: 94 °C-on 2 perc
2. lépés: 95°C-on 30 másodperc
3. lépés: 63 °C-on 30 másodperc
4. lépés: 72 °C-on 1 perc
5. lépés: vissza a 2.-hoz 35X
6. lépés: 72 °C-on 7 perc

4.6.2. A bakteriális PCR termék restrikciós analízise

A hasításhoz használt restrikciós endonukleázok és hasítóhelyeik (zárójelben a Fermentas által megadott név)

- <i>AluI</i>	AG/CT
- <i>EcoRI</i>	G/AATC
- <i>HaeIII (BsuRI)</i>	GG/CC
- <i>HhaI (Hin6I)</i>	GCG/C
- <i>Hinfi</i>	G/ANTC
- <i>HpaII (MspI)</i>	C/CGG
- <i>MseI (TruI)</i>	T/TAA
- <i>RsaI</i>	GT/AC

Reakcióelegy:

- 8 µl DNS templát
- 1 µl restrikciós endonukleáz
- 1 µl 10X restrikciós puffer

Inkubálás: 37 °C, min.12 óra.

4.6.3. A fragmentmintázat detektálása

A minták kiértékelését 3%-os nagy felbontású MetaPhor (Cambrex) agaróz gélen végeztem.

Hordozó oldatként 6X Orange Loading Dye Solutiont használtam.

A standardok a következők voltak:

- pBR322 DNA/*BsuRI (HaeIII)* Marker (Fermentas)
- GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus ready-to-use (Fermentas)
- pUC18 DNA *DpnI* digest (Sigma)

A futtatás szobahőmérsékleten, 7 V/cm feszültséggel történt.

4.6.4. A fragmentmintázat elemzése

A baktériumizolátumok RFLP mintázat alapján elkülönített csoportjaiból néhány izolátum esetén a teljes *gyrB* szekvenciát meghatároztam, és a faji/alfaji szintű identifikációt ezen szekvenciák alapján végeztem el.

4.6.5. Teljes DNS szakaszok szekvenciájának meghatározása

A fonálférgek, ill. a baktériumok DNS-éből származó PCR termékek szekvenciájának meghatározásához a PCR terméket QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) segítségével izoláltam vissza. A szekvenáláshoz fonálférgek esetében a 4.2.2. pontban megadott primereket használtuk. A bakteriális 16S rRNS-t kódoló gén szekvenciájának meghatározása során a 4.6.1. pontban megadott 16SP2 (reverse) primert, valamint az alábbi primereket használtam:

SP1 5'-ACCGCGGCTGCTGGCACG-3' (reverse)

SP2 5'-CTCGTTGCGGGACTTAAC-3' (reverse)

A *gyrB* gén szekvenálásához a 4.6.1. pontban ismertetett *gyrB* forward és *gyrB* reverse primerek mellett az UP-3Sr (5'-AGAAGAGAATTTTGGATCAG-3') primert használtam. A szekvenálást valamennyi esetben az MTA SzBK Szekvenáló laboratóriumában végezték el.

4.7. Laboratóriumi kompetíciós vizsgálatok

4.7.1. A felhasznált izolátumok begyűjtése

2008 augusztusában Dány 11/C és 2/D (egymástól néhány száz méterre lévő) erdőtagból 10-10 mintát gyűjtöttünk a talaj felső 30 cm-es rétegéből, egyenként 2-3 liter térfogatúakat. A laboratóriumban ezekbe 24 órán belül 5-5 *Galleria mellonella* és *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 (lásd 4.3. pont). A fonálférgeket PCR-RFLP módszerrel (lásd 4.2. pont), míg a baktériumokat morfológiai sajátosságai alapján identifikáltuk. A hűtőben vizes szuszpenzió formájában 1 hónapon át tárolt fonálférgekből négy izolátumot választottunk ki: *Heterorhabditis downesi* *Photorhabdus*

temperata subsp. *cinerea* szimbiontával (jelzése 5a), *H. downesi* *P. t. temperata* baktériummal (11a), *H. megidis* *P. t. cinerea* (14a) és *H. megidis* *P. t. temperata* (16a) szimbiontával. A négy kiválasztott fonálféreg izolátum faji meghatározását a teljes ITS1-2 szakasz szekvenciájának meghatározásával is megerősítettük. 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).

4.7.2. A kísérleti beállítások

A kiválasztott izolátumokból különböző elegyeket hoztunk létre (zárójelben a fonálféreg 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 egyedet helyeztünk. Az összes beállítást 5 ismétlésben végeztük el. A petricsészéket 20 °C-on tároltuk.

4.7.3. A vizsgált paraméterek

A fertőzést követő 7 nap alatt meghatároztuk a teszttállatok mortalitását. Valamennyi elpusztult rovarlárvét 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 rovarlárva színe is jól elkülöníthető volt. Az elpusztult rovarlárvékat

vizes csapdára helyeztük (a különböző baktérium által fertőzött rovarlárvákat minden esetben külön kezelve), és meghatároztuk a kifutó fonálféreg számát. Amennyiben a rovarlárvákat két különböző fonálféregfaj elegyével kezeltük (I., II., V. és VI. beállítás), úgy a kifutó fonálférgeket testhosszuk mérése alapján identifikáltuk (minimum 15 egyeden végezve el a mérést), ill. ha ez alapján a faji hovatartozás kétes volt, úgy PCR-RFLP vizsgálatot végeztünk.

4.8. Statisztikai módszerek

4.8.1. A baktériumok fiziológiai paramétereinek elemzése

A biokémiai adatok klaszter-analízisét az R Console programcsomag 2.4.1. verziójával (<http://cran.r-project.org>) végeztük 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).

4.8.2. DNS szekvenciák vizsgálata, filogenetikai elemzések

A DNS szekvenciák filogenetikai elemzése során a szekvenciák egymáshoz illesztését (alignment) Clustal_X (Thompson és mtsai, 1997) programcsomaggal, míg a további elemzéseket Mega 4.0 (Tamura és mtsai, 2007) programcsomag felhasználásával végeztem. A filogenetikai távolságok számítását Kimura kétparaméteres módszere szerint (Kimura’s two-paramteres method, K2P) végeztem, és a bázishelyenkénti báziscsere gyakoriság egységében fejeztem ki. A törzsfát neighbour-joining módszerrel rajzoltam meg. A modellek választásánál döntő szempont volt, hogy a kapott eredmények a releváns publikációkkal (Akhurst és mtsai, 2004; Tailliez és mtsai, 2006) közvetlenül összevethetők legyenek.

4.8.3. A kompetíciós vizsgálatok statisztikai módszerei

A különböző kísérleti beállítások esetén a fonálféreg egyedszámok elemzését ln transzformáció után egyutas variancia-analízissel végeztük, a varianciák homogenitását Levene-teszttel ellenőrizve. A csoportok szétválasztásához Tukey tesztet használtunk. Amennyiben a varianciák

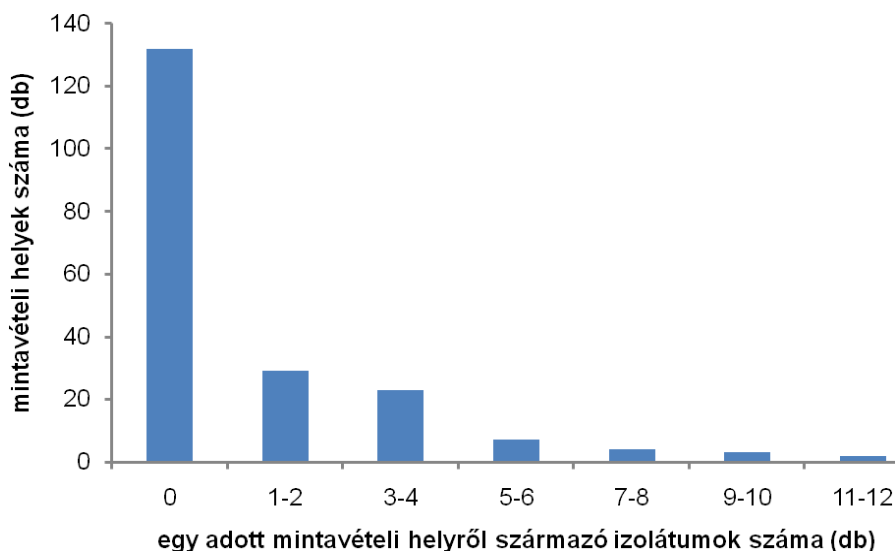
inhomogenitása miatt az elemzést variancia-analízissel nem tudtuk elvégezni, úgy Kruskal-Wallis nemparaméteres tesztet használtunk. Az adatok elemzését SPSS 11.0 statisztikai programcsomaggal végeztük.

5. Eredmények

5.1. A magyarországi rovarpatogén fonálféreg fauna feltérképezése

A laboratóriumba beszállított 1000 db talajmintába helyezett 5000 db testállatból (3000 viaszmolylevél, ill. 2000 lisztbogár lárva) összesen 465 mintában 981 db állat pusztult el (716 viaszmolylevél, ill. 265 lisztbogár lárva). A 981 elpusztult testállatból vizes csapdán 329 esetben sikerült fonálférgeket kifuttatni, ezek közül 244 bizonyult az ellenőrző fertőzést követően rovarpatogénnek.

A mintavételi helyek 2/3-áról, 133 helyről nem került elő új izolátum. 28 helyről került elő az 5 talajmintába helyezett összesen 25 testállatból 1 vagy 2, 23 helyről 3-4, 7 helyről 5-6, 4 helyről 7-8, 3 helyről 9-10 izolátum. Mindössze csak 2 helyről sikerült 10-11 db új izolátumot begyűjtenünk (5.1. ábra).



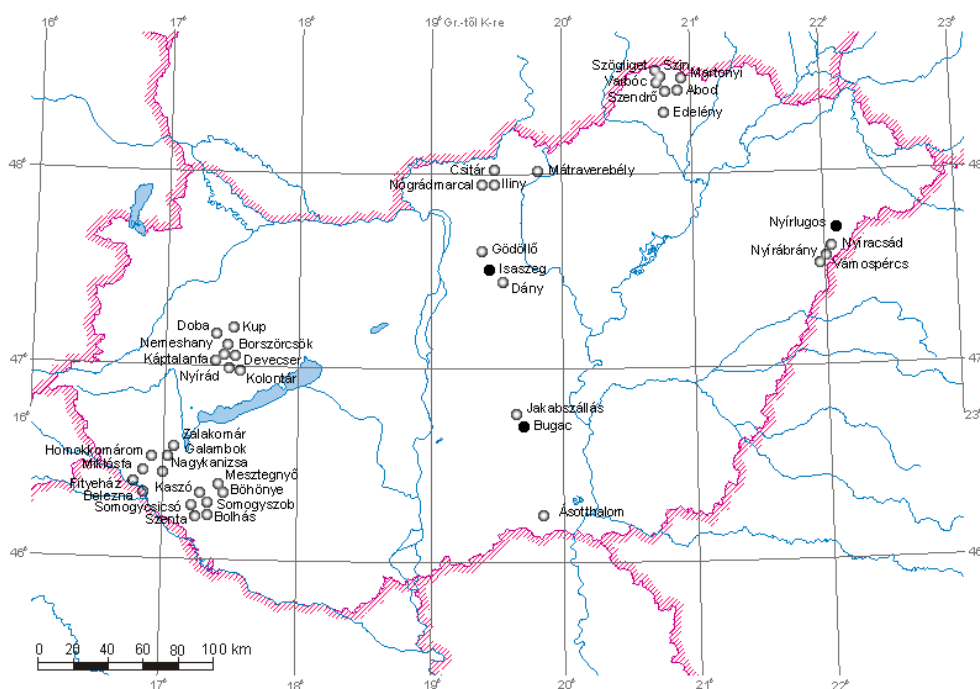
5.1. ábra: A mintavételi helyek megoszlása az előkerült új rovarpatogén izolátumok száma szerint

Az összesen 244 izolátum azonosítását elvégeztem, ezek közül 36 mintavételi helyről származó 83 izolátum *Steinernema* génuszba tartozott, míg 161 minta volt *Heterorhabditis*. A *Heterorhabditis* faji szintű azonosítását követően kiderült, hogy 6 helyről 17 db *H. bacteriophora* izolátumot, 23 helyről 83 db *H. downesi* izolátumot, illetve 19 helyről 61 db *H. megidis* izolátumot sikerült begyűjtenünk (5.1. táblázat).

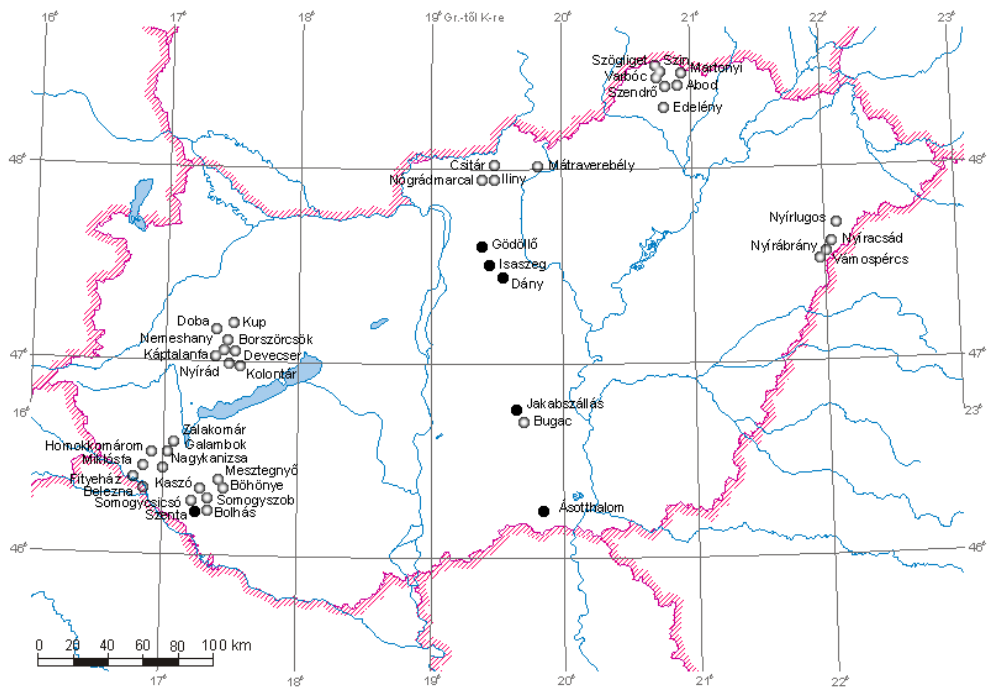
A *H. bacteriophora*-ra pozitív talajminták begyűjtési helyét az 5.2. ábra, a *H. downesi*-ét az 5.3. ábra, míg a *H. megidis*-ét az 5.4. ábra mutatja.

5.1. táblázat: A különböző fonálféreg fajok előfordulása

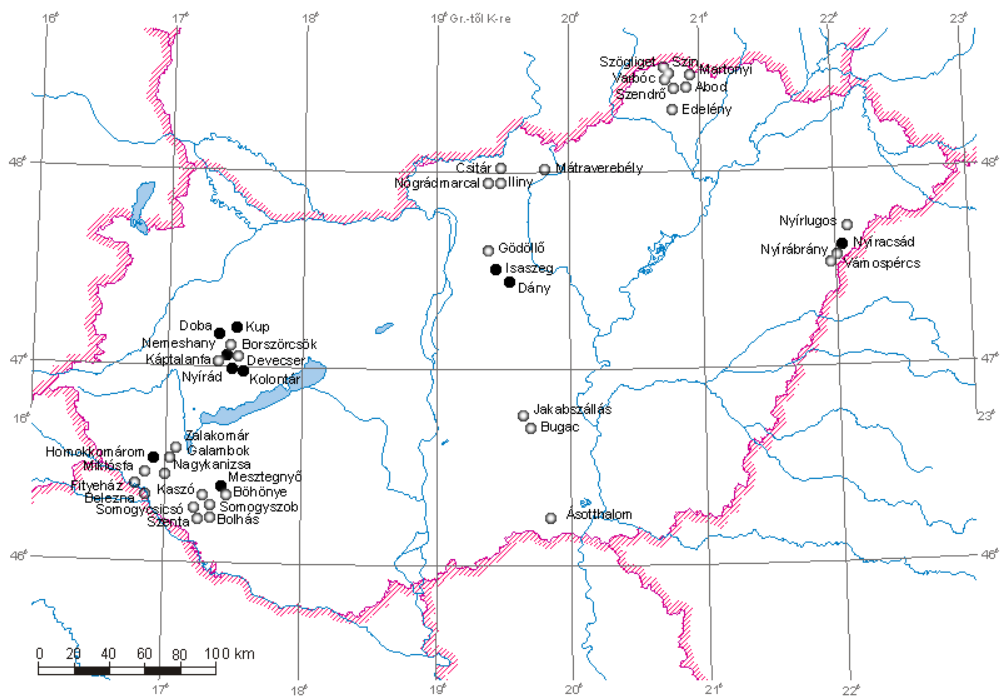
Faj	Mintavételi hely (db)	Izolátumok száma (db)
<i>H. bacteriophora</i>	6	17
<i>H. downesi</i>	23	83
<i>H. megidis</i>	19	61
<i>Steinernema</i> sp.	36	83



5.2. ábra: *Heterorhabditis bacteriophora* elterjedése. Az üres körök a mintavételi helyeket, a teli körök az adott faj előfordulását jelzik.



5.3. ábra: *Heterorhabditis downesi* előfordulása. Az üres körök a mintavételi helyeket, a teli körök az adott faj előfordulását jelzik.



5.4. ábra: *Heterorhabditis megidis* előfordulása. Az üres körök a mintavételi helyeket, a teli körök az adott faj előfordulását jelzik.

Míg 133 mintavételi helyről származó talajmintákban egyáltalán nem találtunk rovarpatogén fonálférgeket, 51-ben pedig 1 faj jelenlétét tudtuk igazolni, addig volt 15 olyan mintavételi hely, ahonnan 2 fajt, illetve 1 olyan is, ahonnan 3 fajt tudunk izolálni, illetve egymás mellett élését igazolni (5.2. táblázat).

5.2. táblázat: A fajok számának alakulása mintavételi helyek szerint

Fajok száma mintavételi helyenként	Mintavételi hely száma (db)
0	133
1	51
2	15
3	1

5.2. A fonálféreg izolátumok szimbionta partnereinek azonosítása

5.2.1. Morfológiai csoportok kialakítása

A munka során begyűjtött valamennyi fonálféreg szimbionta partnerét izoláltam az infektív lárvákból, és elhelyeztem azt folyékony nitrogénes tárolónkban törzsanyagként. Mivel a nagyszámú baktérium izolátum részletes vizsgálata és azonosítása meghaladta volna labor-, és munkakapacitásomat, a további vizsgálatokhoz kiválasztottunk 67 db *Photorhabdus* izolátumot úgy, hogy azok gazdaszervezet és földrajzi elterjedés alapján reprezentálják a teljes gyűjteményt.

Az NBTA táptalajon primer fázisvariánsú telepekre szelektált, majd NA táptalajra kioltott baktériumok jelentős morfológiai eltérést mutattak. A mintákat különböző színű és erősségű pigmenttermelés jellemezte. A szürke színű izolátumok a pigmenteket nemcsak a baktériumsejteken belül akkumulálták, hanem ki is választották azt a táptalajba, szürke elszíneződést okozva a telepek körül. A színen kívül nagy eltérést mutattak az izolátumok nyálkatermelésükben, ill. viszkozitásukban is. Míg egyes telepeket könnyedén le lehetett szedni a táptalaj felszínéről, addig mások erősen ragadtak hozzá, eltávolításukkor hosszú nyálkafonalat húzva.

Ezek alapján az izolátumokat a következő csoportokba lehetett sorolni:

1. Fehér: pigmentet és nyálkát alig termel
2. Citromsárga: közepesen pigmentált és nagyon ragadós

3. Narancssárga: erősen pigmentált, a táptalajt is megszínezi, mérsékelt nyálkás
4. Okker: gyengén pigmentált, erősen ragadós
5. Vörös: nagyon erősen pigmentált, nyálkát alig termel
6. Szürke: közepesen pigmentált, de a táptalajt nagymértékben elszínezi, erős nyálkatermelő

A 6 típust a 3. kép, az izolátumok szín szerinti eloszlását az 5.3. táblázat mutatja. Az egyes csoportok mellett feltüntettem, hogy milyen fonálféregből izoláltunk ilyen színű baktériumot.

5.3. táblázat: Az elkülöníthető színcsoportokhoz tartozó izolátumok száma és a szimbionta partner

Az izolátum színe	Az izolátumok száma (db)	Szimbionta partner
Fehér	4	<i>H. bacteriophora</i>
Citromsárga	13	<i>H. megidis</i> (8) <i>H. downesi</i> (5)
Narancssárga	17	<i>H. megidis</i> (7) <i>H. downesi</i> (10)
Okker	4	<i>H. bacteriophora</i>
Vörös	6	<i>H. megidis</i> (2) <i>H. downesi</i> (4)
Szürke	23	<i>H. megidis</i> (15) <i>H. downesi</i> (8)

5.2.2. Fiziológiai vizsgálatok

A szín szerinti csoportosításon túl széles körű fiziológia vizsgálatoknak vetettük alá a kiválasztott 67 izolátumot.

5.2.2.1. DNáz és hemolitikus aktivitás tesztelése

A DNáz és hemolitikus aktivitást *Photorhabdus* típusörzsekhez viszonyítottuk. Az izolátumok mindegyike rendelkezett ilyen aktivitással: mérsékelt hemolitikus aktivitást 28 db izolátumnál, erős aktivitást 39 izolátumnál találtunk (4. kép), mérsékelt DNáz aktivitást 32 izolátum mutatott, erős aktivitást 30, míg 5 izolátum nagyon gyenge DNáz aktivitással bírt. Általánosan elmondható, hogy a szürke és citromsárga csoport tagjai bírtak erősebb aktivitással, míg a vörös baktériumok a mérsékelt csoportot alkották. A fehér csoportra volt jellemző a csökkent aktivitás.

5.2.2.2. API 20E tesztsíkkal tesztelt paraméterek

A kiválasztott 67 db baktérium izolátum mindegyikét teszteltük API 20E teszttel (5. kép). Valamennyi izolátum negatív volt a következő reakciókra: β -galaktozidáz aktivitás, lizin dekarboxiláz aktivitás, ornitin dekarboxiláz aktivitás, H_2S produkció, D-mannitol, inozitol, D-szorbitol, L-ramnóz, D-szacharóz, D-melibióz, amigdalín, L-arabinóz hasznosítás, mint kizárólagos szénforrás. Valamennyi izolátum egyetlen reakcióra volt pozitív, a D-glükóz bontására.

A vizsgált 67 izolátum az alábbi 7 reakcióra variabilitást mutatott (zárójelben a pozitív reakciót adó izolátumok száma): arginin-dihidroláz aktivitás (46), citrát hasznosítás (49), ureáz aktivitás (22), triptofán-deamináz (13), indol produkció (8), acetoin produkció (6), proteáz aktivitás (60).

5.2.2.3. Biolog GN2 platekkel tesztelt paraméterek

A kiválasztott 67 db baktérium izolátum mindegyikét teszteltük Biolog GN2 platen is. A 95 féle szénforrás hasznosításra a következő eredményeket kaptuk:

Valamennyi izolátum negatív volt az alábbi 27 szénforrásra: α -ciklodextrin, adonitol, L-arabinóz, D-arabitol, erythritol, α -D-laktóz, laktulóz, D-mannitol, D-melibióz, β -metil-D-glükozid, D-pszikóz, D-raffinóz, L-rhamnóz, szacharóz, D-galaktonsav - laktát, D-galakturosav, D-glükózaminsav, β -hidroxibutírsav, γ -hidroxibutírsav, itakonsav, α -ketovaleriánsav, malonsav, 1, 8-oktán-dikarboxilsav, L-fenilalanin, D,L-karnitin, γ -amino-butírsav, 2,3-butándiol.

Valamennyi izolátum pozitív volt az alábbi 28 szénforrásra: Tween-80, N-acetil-D-galaktózamin, N-acetil-D-glükózamin, D-fruktóz, α -D-glükóz, m-inozitol, maltóz, D-mannóz, D-trehalóz, piruvátsav-metilészter, szukcinátsav-mono-metil-észter, D-glukonsav, p-hidroxi-fenilacetátsav, L-alanin-amid, D-alanin, L-alanin, L-alanil-glicin, L-aszparagin, L-aszpartámsav, L-glutámsav, glicil-L-glutámsav, L-prolin, L-szerin, inozin, uridin, timidin, glicerol.

Tehát, ez az 55 paraméter nem volt alkalmas arra, hogy az izolátumokat elkülönítsük egymástól.

Ellenben a vizsgált 67 izolátumból az alábbi 40 szénforrást csak némelyik tudta hasznosítani (zárójelben a pozitív reakciót adó izolátumok száma): dextrin (44), glikogén (22), Tween 40 (54), D-cellobióz (28), L-fukóz (45), D-galaktóz (18), gentiobióz (6), D-szorbitol (11), turanóz (6), xilitol (35), ecetsav (41), cisz-akonitsav (50), citromsav (47), hangyasav (47), D-glükuronsav (9), α -hidroxibutársav (54), α -keto-butársav (55), α -

keto-glutársav (12), D,L-tejsav (47), propionsav (57), quinonsav (5), D-szaharinsav (4), szukcinátsav (58), bromoszukcinátsav (37), szukcinamiksav (5), glükuronamid (5), L-hisztidin (56), hidroxil-L-prolin (41), L-leucin (8), L-ornitin (22), L-piroglutamiksav (5), D-szerin (48), L-treonin (53), urokaniksav (20), feniletil-amin (5), putreszcin (5), 2-aminoetanol (14), D,L- α -glicerol-foszfát (50), α -D-glükóz-1-foszfát (11), D-glükóz-6-foszfát (19).

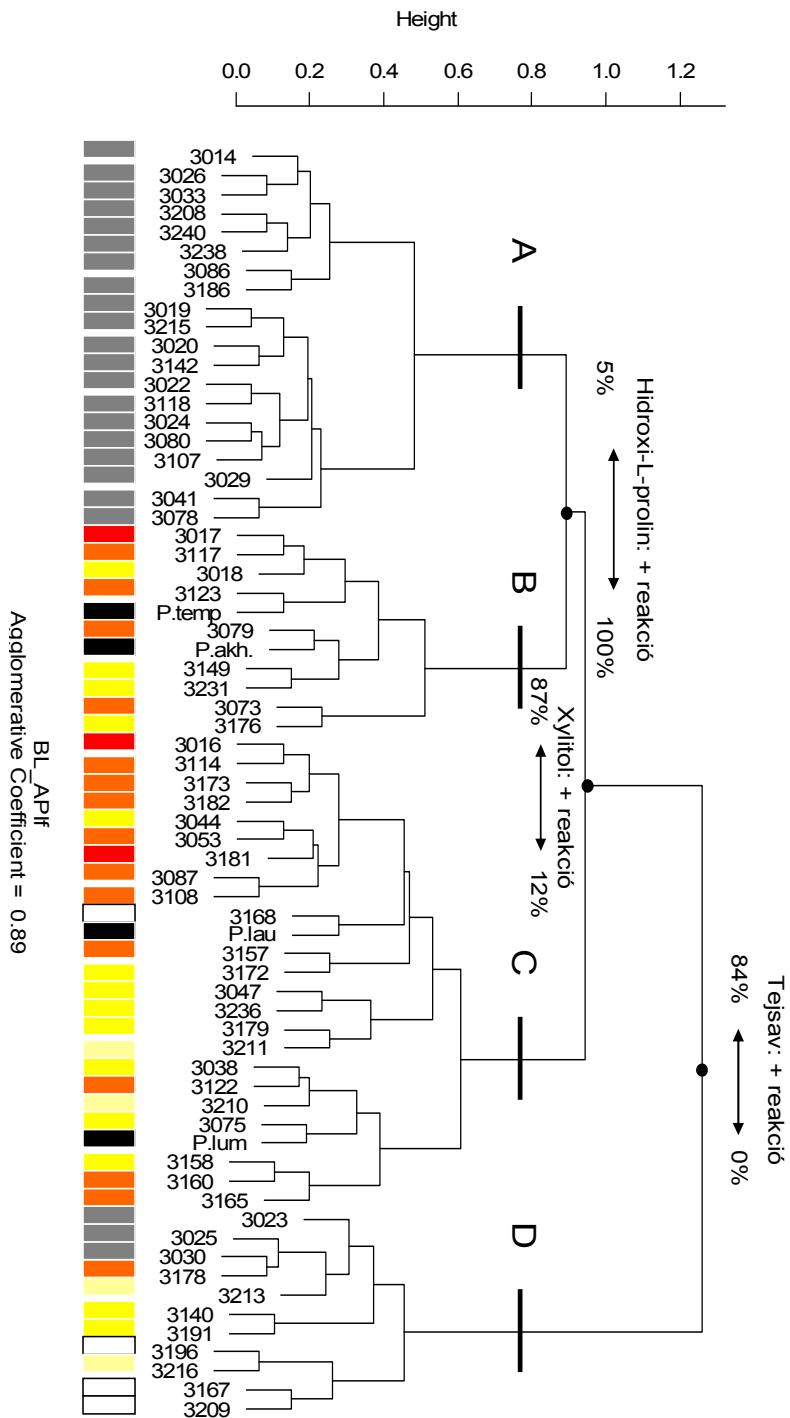
A fiziológiai paraméterek közül azon 47 (40 a szénforrás hasznosítás alapján, míg további 7 az API tesztcsík reakciói közül) alapján, amely a baktérium izolátumok között variabilisnek bizonyult, az 5.5. ábrán bemutatott csoportosítást lehetett felrajzolni. Az ábra a négy típusörzson kívül 63 izolátum adatainak feldolgozásával készült, mivel négy izolátum adatsora az adott paraméterekre nem volt teljes, vagy az elemzés idején már nem ellenőrizhető bizonytalanságot tartalmazott.

Az 5.5. ábra alapján kialakított négy csoportra leginkább jellemző paramétereket az 5.4. táblázatban mutatom be, míg az egyes csoportokba tartozó baktériumok fonálféreg szimbiontáinak megoszlását az 5.5. táblázatban ismertetem.

Az 5.4. táblázat alapján egyértelmű, hogy az 5.5. ábrának megfelelően kialakított csoportok határozott szénforrás-hasznosítási profíllal jellemezhetők (ezek közül néhány jellemzőt az 5.5. ábrán is feltüntettem). Igen jelentős az eltérés abból a szempontból, hogy az adott csoportba sorolható baktériumok összesen hány szénforrást képesek hasznosítani (természetesen a valamennyi izolátum által hasznosítani képes 28 szénforráson felül). A B jelzésű csoport háromszor annyi szénforrást képes felhasználni, mint a D jelzésű, az A és C csoport ehhez képest átmeneti helyzetű.

Az ábrán feltüntetett színek alapján jól látható, hogy a fiziológiai paraméterek alapján történő csoportosítás csak részben fedti a morfológiai jellemzők által kialakított felosztást, hiszen kizárólag a szürke színű izolátumok különültek el egyértelműen a többi baktériumtól. A fiziológiai paraméterek vizsgálata alapján a típusörzsek elkülönítése sem egyértelmű.

A fiziológiai paraméterek alapján kialakított csoportok a fonálféreg szimbionta megoszlás alapján sem jellemezhetők markánsan (5.5. táblázat), mindössze annyi mondható el, hogy a *H. bacteriophora* bakteriális partnerei kizárólag a C és a D jelzésű, átlagosan a legkevesebb szénforrást hasznosítani képes csoportokba sorolhatók.



5.5. ábra (az előző oldalon): A baktériumizolátumok Biolog GN2 plate 40, és az API20E tesztesík 7 paramétere segítségével képzett dendrogramja (a módszertani részleteket lásd 4.7. fejezet). A színes sávok a baktériumok színét szimbolizálják, feketével jelölve a típusörzseket. A dendrogram csomópontjaihoz az alcsoportok jellemző biokémiai tulajdonságát tüntettem fel.

5.4. táblázat: A baktérium izolátumok fiziológiai paraméterek alapján kialakított, az 5.5. ábrán bemutatott csoportjaira jellemző néhány tulajdonság. Az egyes szénforrásoknál megadott %-os értékek azt jelzik, hogy az adott csoportba sorolható izolátumok közül mennyi képes hasznosítani a konkrét vegyületet (a pozitív reakció aránya)

Csoport	n*	összes pozitív reakció**	Hidroxihidroxiprolin	Xylitol	Tejsav	Ecetsav	α -D-glükóz-1-foszfát
A	20	19,50	5%	100%	100%	75%	0%
B	11	27,45	100%	64%	91%	100%	73%
C	25	16,44	92%	12%	68%	60%	20%
D	11	9,18	64%	55%	0%	0%	0%

* - beleértve a típusörzseket is; ** - a szénforrás hasznosítás szempontjából, kizárólag a 40 variábilis paraméterből (28 szénforrást valamennyi izolátum képes hasznosítani, lásd 5.2.2.3. fejezet)

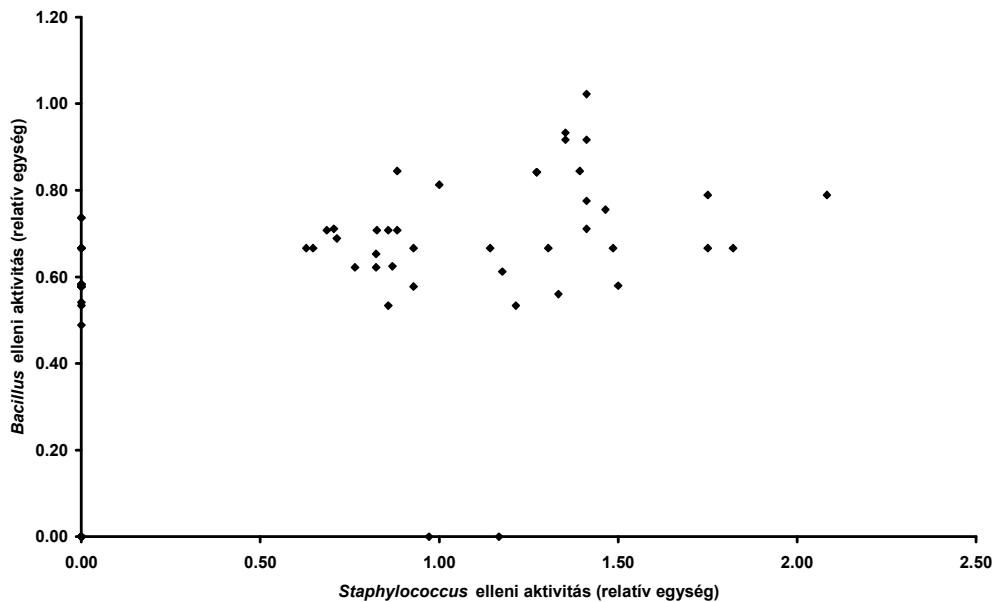
5.5. táblázat: A baktériumizolátumok fonálféreg szimbiontái az 5.5. ábrán bemutatott csoportosítás szerint, a típusörzsek figyelembe vétele nélkül

Csoport	<i>H. bacteriophora</i>	<i>H. downesi</i>	<i>H. megidis</i>
A	0	8	12
B	0	3	6
C	3	10	10
D	5	2	4

5.2.3 Az izolátumok antibiotikum-, és toxintermelő képessége

Az antibakteriális hatóanyagtermelés tesztelését 48 órás folyadékkultúrás mintából végeztem. A sejtmentesített fermentlé aktivitását *Staphylococcus aureus subsp. aureus* DSM346 és *Bacillus subtilis* DSM704 baktériumokkal szemben vizsgáltam agarlemez-es diffúziós lyuktesztel, 100 ppm streptomycin kontroll mellett (6. kép).

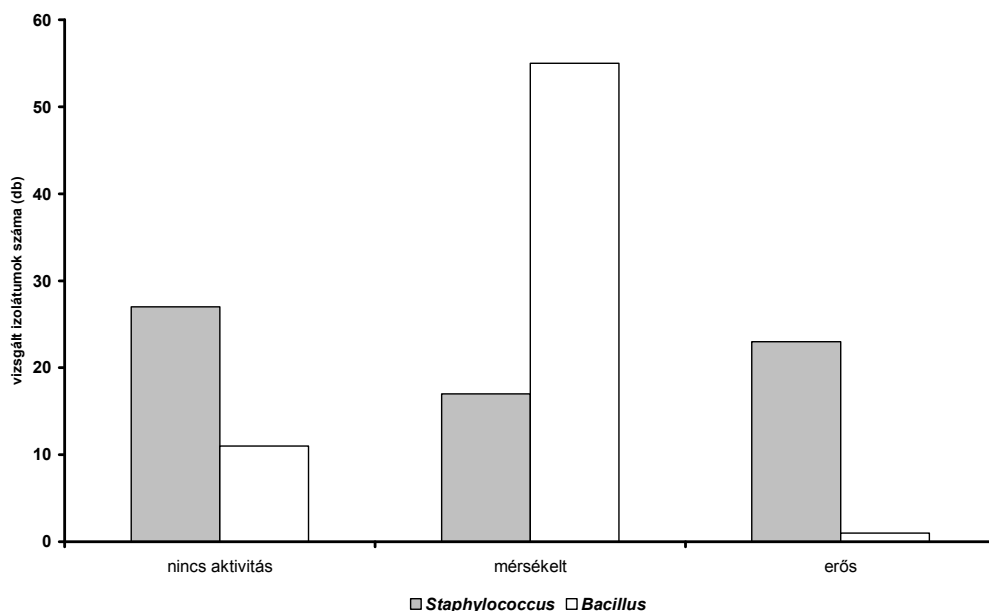
Minden izolátum fermentlevét teszteltük mindkét tesztbaktériummal szemben. A két különböző baktériummal szembeni aktivitási érték kapcsolatát az 5.6. ábra mutatja. Jól látszik, hogy a fermentlevek két tesztörzsszel szembeni antibakteriális hatása nem korrelál szoroson, a pontok szóródása nagy. Ez arra utalhat, hogy a hatóanyag (legalábbis a baktériumok egy részénél) nem homogén.



5.6. ábra: A baktériumok sejtmentes fermentlevének antibakteriális aktivitása *Bacillus subtilis*, ill. *Staphylococcus aureus subsp. aureus* ellen, agardiffúziós lyuktesztel mérve. Az aktivitás egysége: a vizsgált minta körül feltisztuló zóna átmérője osztva a 100 ppm streptomycin körül kialakuló zóna átmérőjével.

Az 5.7. ábra mutatja az antibakteriális hatás megoszlását. *Staphylococcus aureus* ellen. 27 vizsgált izolátumnak egyáltalán nem volt hatása, 17 mérsékelt hatást mutatott, míg 23 jelentős antibakteriális hatással bírt. *Bacillus subtilis* esetén teljesen más képet kapunk: 11 izolátum volt hatástalan, 55 bírt mérsékelt hatással, míg erős

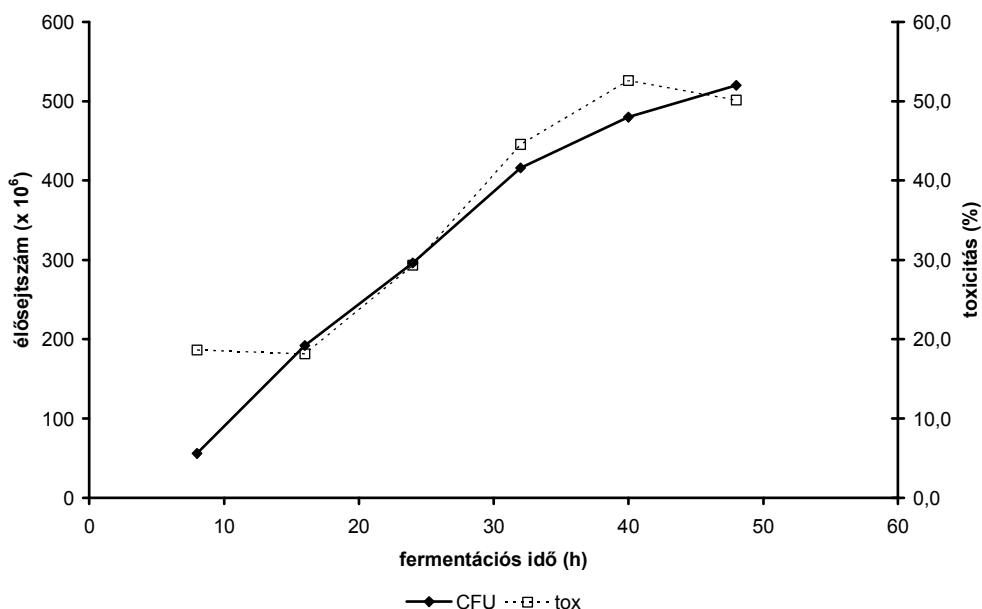
antibakteriális hatást csak egyetlen izolátum tudott kifejteni. Ez is több aktív komponens jelenlétét támasztja alá.



5.7. ábra: A különböző baktériumizolátumokból származó fermentlevék antibakteriális aktivitásának megoszlása *Bacillus subtilis* és *Staphylococcus aureus subsp. aureus* baktériumokkal tesztelve. Nincs aktivitás – nem alakult ki feltisztuló zóna a tesztlyuk körül; mérsékelt – detektálható aktivitás, de a feltisztuló zóna mérete kisebb, mint a 100 ppm streptomycin kontroll körül; erős – nagyobb a feltisztuló zóna mérete, mint a kontroll körül.

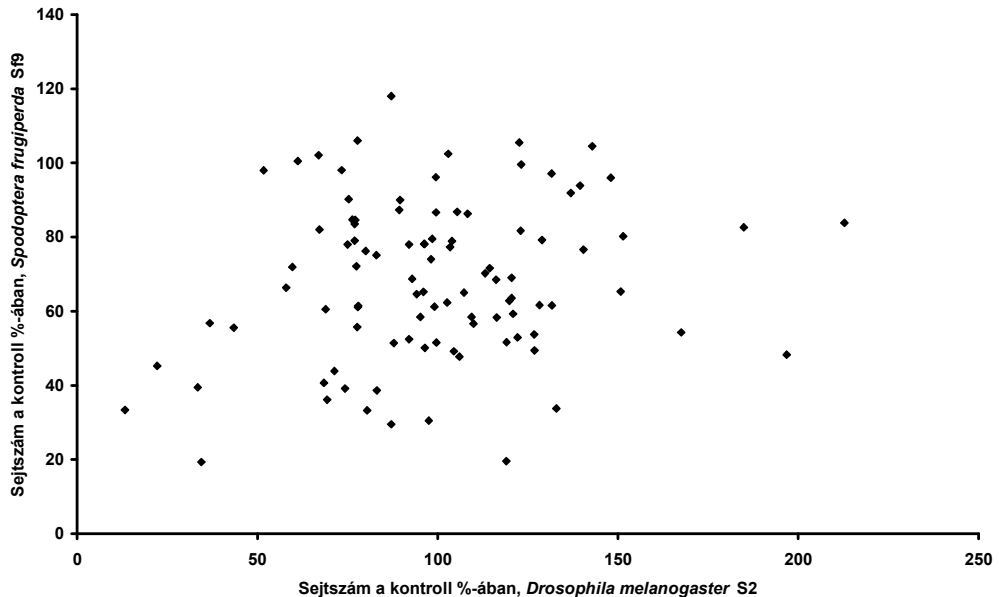
A toxicitás mérését rovar sejtvonalakon, MTT sejt-proliferációs teszttel végeztük. A 7. kép egy jó toxintermelő izolátum, a 3179-es fermentlevének teszteredményeit mutatja, Sf9 sejtek ellen. A kontroll lyukak mellett 4-4 ismétlésben látható a fermentáció 8., 16., 24., 32., 40. és 48. órájában vett minta toxikus hatása, illetve egy kalibrációs sor, ami a sejtekből hígítással készült. A lila szín csökkenése jelzi a sejtszám csökkenését, citotoxikus hatás esetén a toxicitással fordított arányban.

A toxikus hatás növekedését az idő függvényében mutatja az 5.8. ábra. A 3209-es jelű izolátum 0-48 órás tenyésztének sejtszámváltozása, illetve a sejtmentes fermentlé toxikus hatásának változása követhető rajta nyomon. Az ábrán jól látszik, hogy az idő előrehaladtával a fermentlé rovarsejtekre gyakorolt gátló hatása nő, a növekedés üteme a tenyésztet élősejtszám-növekedésével párhuzamosan történik. Mire a 48 órás tenyésztetben az élősejtszám elérte az 5×10^8 -os értéket, a sejtmentes fermentlé toxicitása már 50% körül alakult.



5.8. ábra: A *Photorhabdus luminescens subsp. kayaii* 3209 izolátum fermentációja során a sejtszám (CFU) változása, valamint a sejtmentes fermentlé toxicitása Sf9 rovarsejtekre (toxicitás= $100 \times (A_0 - A_t) / A_0$, ahol A_0 a kontroll sejtaktivitása, míg A_t a vizsgált minta sejtaktivitása)

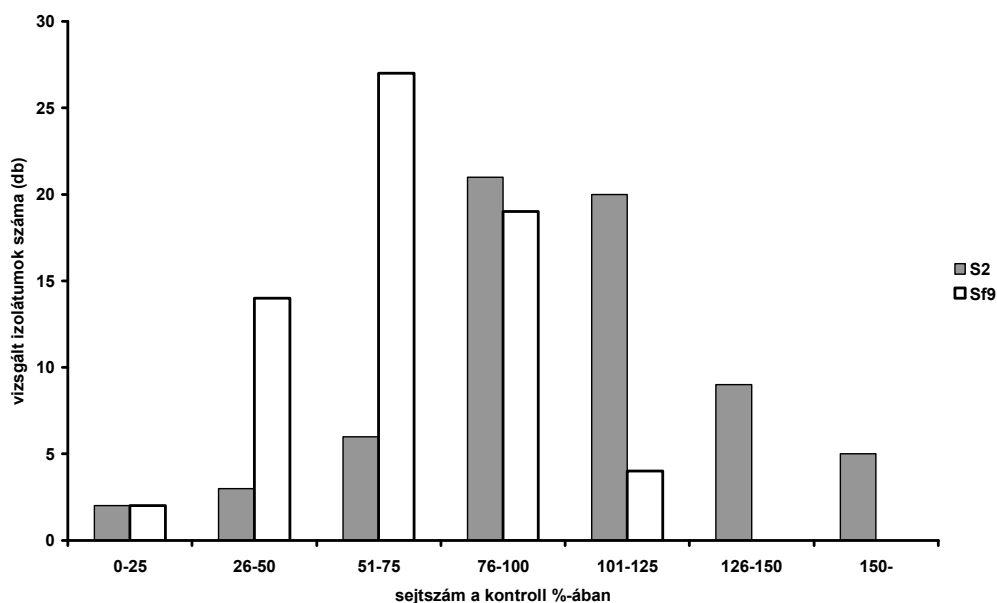
Minden izolátum fermentlevének citotoxikus hatását teszteltük S2 és Sf9 sejtvonalon is. A két sejtvonalon mért érték összefüggését az 5.9. ábra mutatja. Jól látszik, hogy a fermentlevék két sejtvonallal szembeni citotoxikus hatása itt sem korrelál, mint ahogy az antimikrobiális hatás esetén sem korrelált a kétféle baktérium tesztörzsön végzett vizsgálat eredménye, a pontok szóródása ebben az esetben is nagy.



5.9. ábra: Különböző baktériumizolátumok fermentlevének gátló hatása Sf9 ill. S2 sejtvonalakra

A citotoxikus hatás megoszlását az 5.10. ábra mutatja. A fermentlevek S2 sejtvonalon történt tesztelése a következő eredményt adta: 2 izolátum hatására csökkent a sejtszám a kontrollhoz viszonyítva 25% alá, 3 izolátum esetén a sejtszám a kontroll 26-50% volt, 6 izolátum csökkentette a sejtszámot 51-75% közé. 21 izolátum fermentleve nem volt különösebb hatással a sejtekre, számuk a kontrollhoz viszonyítva 76-100% között maradt. Fellépett az a furcsa jelenség is, hogy néhány fermentlé hatására a sejtszám gyarapodott: 20 izolátum esetén kismértékű (101-125% a kontrollhoz képest), 9 izolátum esetén pedig már jelentős (126-150%) növekedés volt mérhető. 5 izolátum hatására a sejtszám a kiindulási érték 50%-ával, vagy annál többel nőtt, tehát itt erős sejtszaporodás-serkentő hatást mértem.

Más a kép Sf9 sejtek esetén. Nagyon erős gátló hatást itt is csak 2 izolátum tudott kifejteni (0-25% sejtszám a kontrollhoz képest), de 14 izolátum már 26-50% közé tudta csökkenteni a sejtszámot. 27 izolátum bírt gyenge gátló hatással (51-75%), 19 izolátum hatása nem volt jelentős (76-100%), és csak 4 izolátum hatására volt kismértékű sejtszaporodás (101-125%). Tehát az Sf9 sejt vonal sejtjei érzékenyebbek voltak a *Photorhabdus* izolátumok fermentlevére, mint az S2 sejtek, illetve a fermentlevek hatására (kevés kivételtől eltekintve) nem is kezdtek el szaporodni, szemben az S2 sejtekkel, amik egyes esetekben 50%-nál is nagyobb sejtszámnövekedést mutattak.



5.10. ábra: A különböző baktériumizolátumokból származó fermentlevek gátló hatásának megoszlása S2 ill. Sf9 sejtvonalakon tesztelve

5.6. táblázat: A szín szerint csoportokba sorolható izolátumok antibakteriális és citotoxikus hatásának mértéke

Izolátum színe	Antibakteriális aktivitás		Citotoxikus hatás	
	<i>S. aureus</i> ellen	<i>B. subtilis</i> ellen	S2 sejtvonalon	Sf9 sejtvonalon
Fehér	nincs/közepes/jó	közepes	nincs/közepes	nincs/közepes/jó
Okker	közepes/jó	közepes	nincs/közepes	közepes/jó
Citrom-sárga	nincs/közepes/jó	nincs/közepes	nincs/közepes/jó	közepes/jó
Narancs-sárga	nincs/közepes/jó	nincs/közepes/jó	nincs/közepes	közepes/jó
Vörös	közepes/jó	közepes/jó	nincs/közepes	közepes
Szürke	nincs/közepes	nincs/közepes	nincs/közepes	nincs/közepes/jó

Megj.: Közepes aktivitás: a fermentlé kevésbé hatékony, mint 100 ppm streptomycin, jó aktivitás: a fermentlé hatékonyabb, mint 100 ppm streptomycin, közepes toxicitás: a sejttaktivitás a kontroll sejtek 51-100%-a, jó toxicitás: sejttaktivitás kisebb, mint a kontroll sejtek 50%-a
Az adott csoportban leggyakrabban előforduló kategóriákat vastagon szedtem.

Az 5.6. táblázat mutatja, hogy az egyes szín csoportba sorolható baktériumok milyen aktivitással bírnak. A táblázatból egyértelműen kiderül, hogy a szín szerinti csoportok nem homogének az antibakteriális,

illetve citotoxikus aktivitás szempontjából. Kiemelném azonban, hogy a szürke jelzésű csoport általában gyenge antibakteriális aktivitással és mérsékelt citotoxicitással jellemezhető.

5.2.4. Molekuláris biológiai vizsgálatok

A baktériumok identifikálásának első lépéseként valamennyi izolátum *gyrB* szekvenciájának RFLP analízise elkészült (8. kép). Az *AluI* és *HinI* restriktációs endonukleázzal történt hasítás után kapott fragmentméreteket az 5.7. táblázat mutatja. Jól látszik, hogy a morfológiai csoportok némelyike (sárga-narancs) nem különíthető el egymástól ilyen módon sem, míg más csoport (fehér) egyértelműen heterogén mintázatot adott.

5.7. táblázat: A különböző morfológiai csoportba sorolható baktériumok *gyrB* génjéről készült PCR termék restriktációs endonukleázokkal történt hasítása után kialakuló fragmentméretek (bp). A restriktációs endonukleáz neve mögött zárójelben a hasítási szekvencia van feltüntetve

	<i>AluI</i> (AG↓CT)	<i>HinI</i> (G↓ANTC)
szürke	500,180, 150, 130, 80	560, 410, 80
fehér I.	760, 300	-
fehér II.	760, 300	440, 360, 100, 80
okker	500, 300, 180, 80	970, 80
piros	500, 300, 180, 80	560, 410, 80
sárga	580, 300, 180	970, 80
narancs	580, 300, 180	970, 80

Minden színcsoportból megszekvenáltattunk néhány izolátumot. A fehér csoportból a kétféle fragmentmintázatot adó mintákból (3196, 3209) választottunk egyet-egyed, a szürke csoportból 4 db izolátumot, az okkerből és pirosból egyet-egyed, a narancssárgából hármat, a citromsárgából négy mintát szekvenáltattunk meg. Az izolátumok filogenetikai kapcsolatait *gyrB* szekvenciák alapján ábrázoló törzsfá az 5.11. ábrán látható. A törzsfá megrajzolásához valamennyi már leírt *Photorehabdus* taxon típusörzisének adatait felhasználtuk, az elemzéshez használt típusörzések azonosítói az 5.8. táblázatban adtam meg.

A törzsfá alapján elmondható, hogy a citromsárga, a narancssárga és a piros izolátumok bár jelentős morfológiai, ill. fiziológiai eltérést mutatnak, mindannyian a *Photorehabdus temperata subsp. temperata* alfajba tartoznak. Az okker színű izolátum a *Photorehabdus luminescens subsp. thracensis* alfajhoz (bár a *gyrB* szekvencia elemzése alapján ez a taxon a *Photorehabdus temperata* fajba tartozónak tűnik), míg a kétféle

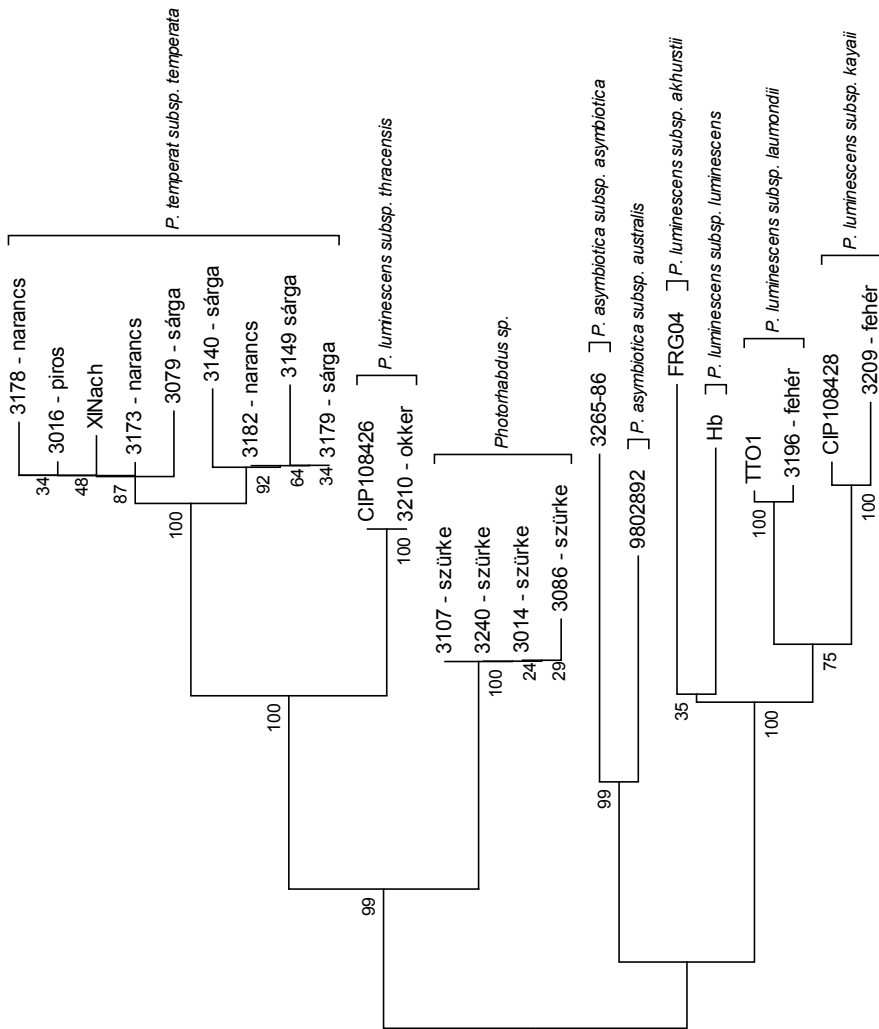
fehér izolátum a *Photorhabdus luminescens subsp. kayaii*, ill. a *Photorhabdus luminescens subsp. laumondii* alfajhoz tartoznak.

Ezzel szemben a szürke izolátumok beazonosítása nem volt lehetséges; egyetlen ez idáig leírt taxon típusörzséhez sem hasonlított, a törzsfán egy teljesen különálló, egységes csoportot alkotva. A csoportból kiválasztottunk 3 izolátumot, elhelyeztük őket hazai és nemzetközi törzsgyűjteményben, gyrB, ill. 16 rDNS szekvenciáikat feltöltöttük a GenBank adatbázisba, és új alfajként írtuk le őket.

Az 5.9. táblázat összesítve mutatja 11 db, általunk izolált, beazonosított, GenBank azonosítóval ellátott izolátumok adatait. A hiányzó 4 szekvenciaadat visszaellenőrzése és feltöltése az adatbázisba folyamatban van.

Az 5.10. összesítő táblázat (a későbbi kompetíciós vizsgálatok alapja) a kiválasztott 67 db *Photorhabdus* izolátum megoszlását mutatja a vele komplexet képező *Heterorhabditis* fonálférgék alapján.

5.11. ábra (következő oldal): A baktérium törzsgyűjtemény egyes tételei, és a *Photorhabdus* génuszba tartozó leírt fajok és alfajok típusörzseinek filogenetikai kapcsolata a gyrB gén elemzése alapján. Az evolúciós kapcsolatokat a Neighbor-Joining módszer (Saitou és Nei, 1987) segítségével becsültük meg. Az ábrán az optimális fa látható, az ágak teljes hossza = 0,39692309. Az elágazási pontok mellett feltüntettük, hogy a rokon taxonok az esetek hány százalékában kapcsolódtak a bootstrap teszt (Felsenstein, 1985) során (1000 ismétléssel számolva). Az ábra méretarányos, ahol az ágak hossza megegyezik az evolúciós távolságokkal. Az evolúciós távolságokat Kimura 2 paraméteres modelljével számoltuk (Kimura, 1980), az egység a bázishelyenkénti báziscsere gyakorisága. A bázishiányt, vagy adathiányt tartalmazó pozíciókat nem vettük figyelembe az elemzés során (complete deletion option). Összesen 668 pozíció szerepelt az elemzésben, amelyet MEGA4 programmal végeztünk (Tamura és mtsai, 2007).



5.8. táblázat: A *Photorhabdus* génuszon belüli taxonok típusörzsei, és a gyrB gén szekvenciájának GenBank azonosítója

Faj/alfaj	Típusörz	GenBank azonosító	Szerző
<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>asymbiotica</i>	3265-86	AY278494	Akhurst és mtsai, 2004
<i>P. asymbiotica</i> subsp. <i>australis</i>	9802892	AY278495	Akhurst és mtsai, 2004
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>akhurstii</i>	FRG04	EU930347	Fisher Le-Saux és mtsai, 1999
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	CIP108428	EU930348	Hazir és mtsai, 2004
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	TT01	BX571859	Fisher Le-Saux és mtsai, 1999
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>luminescens</i>	Hb	AY278501	Fisher Le-Saux és mtsai, 1999
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>thracensis</i>	CIP108428	EU930351	Hazir és mtsai, 2004
<i>P. temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	XINach	AY278517	Fisher Le-Saux és mtsai, 1999

5.9. táblázat: Saját izolátumaink alfaji besorolással, GenBank szekvenciaazonosítókkal

Faj/alfaj	Izolátum jelzése	gyrB szekvencia	16S rDNS szekvencia
<i>P. temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	3016	EU053166	
<i>P. temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	3173	EU053169	
<i>P. temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	3179	EU053170	
<i>P. temperata</i> subsp. <i>temperata</i>	3182	EU053171	
<i>P. temperata</i> subsp. <i>cinerea</i>	3014	EU155110	EU136625
<i>P. temperata</i> subsp. <i>cinerea</i>	3086	EU053167	
<i>P. temperata</i> subsp. <i>cinerea</i>	3107	EU053168	EU136626
<i>P. temperata</i> subsp. <i>cinerea</i>	3240	EU053174	EU136627
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	3167		GU080060
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>kayaii</i>	3209		GU080061
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>laumondii</i>	3196	EU053172	
<i>P. luminescens</i> subsp. <i>thracensis</i>	3210	EU053173	

5. 10. táblázat: A kiválasztott 67 db *Photorhabdus* izolátum megoszlása szimbionta partner szerint

Rovarpatogén fonálféreg faj	Szimbionta baktérium alfaj	Izolátumszám (db)
<i>H. bacteriophora</i>	<i>P. luminescens subsp. kayaii</i>	2
	<i>P. luminescens subsp. laumondii</i>	2
	<i>P. luminescens subsp. thracensis</i>	4
<i>H. downesi</i>	<i>P. temperata subsp. temperata</i>	19
	<i>P. temperata subsp. cinerea</i>	8
<i>H. megidis</i>	<i>P. temperata subsp. temperata</i>	17
	<i>P. temperata subsp. cinerea</i>	15

5.2.5. A *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. *novum* leírása

Az előző fejezetek alapján látszik, hogy az izolációs munka során jól elkülönült egy szürke pigmentet termelő, a fiziológiai paraméterek alapján homogén csoport. A DNS vizsgálatok eredményeként kiderült, hogy ezek a baktériumok egyetlen ez idáig leírt *Photorhabdus* taxonnal sem mutattak egyezést, ezért új taxonként írtuk le (Tóth és Lakatos, 2008).

A csoport minden tagjára egy olyan szürke pigment termelése volt jellemző, amelyet az LB, NA, TSY lemezen történő tenyésztés során a baktérium kiválasztott a tápközegbe, ezzel szürkére festve azt. Erre utal a „cinerea” elnevezés. A teljes csoportból, azaz 23 izolátumból kiválasztásra került három (3107^T, 3014, 3240), amelyek telepmorfológiai szempontból, illetve szénforrás-hasznosítási paraméterei alapján reprezentálták a csoportot.

A *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. *novum* sejtjei nagy, 4,8 (2-7) x 1,0 µm-es pálcák. Erős biolumineszcencia jellemzi. A telepek semleges színű táptalajon lazacrózsaszínűek, vagy világosszürkék, tömegesen sötétszürkébe hajlók, a telepek körül szürke táptalaj-elszíneződéssel. A telepek erősen mukózusak. Festékakkumulálásra képesek. Maximális növekedési hőmérsékletük 35-37 °C (3107^T), vagy 36-37 °C (3014). Hemolitikus aktivitásuk jelentős. A főbb biokémiai paraméterek jellemző értékeit az 5.11. táblázat mutatja.

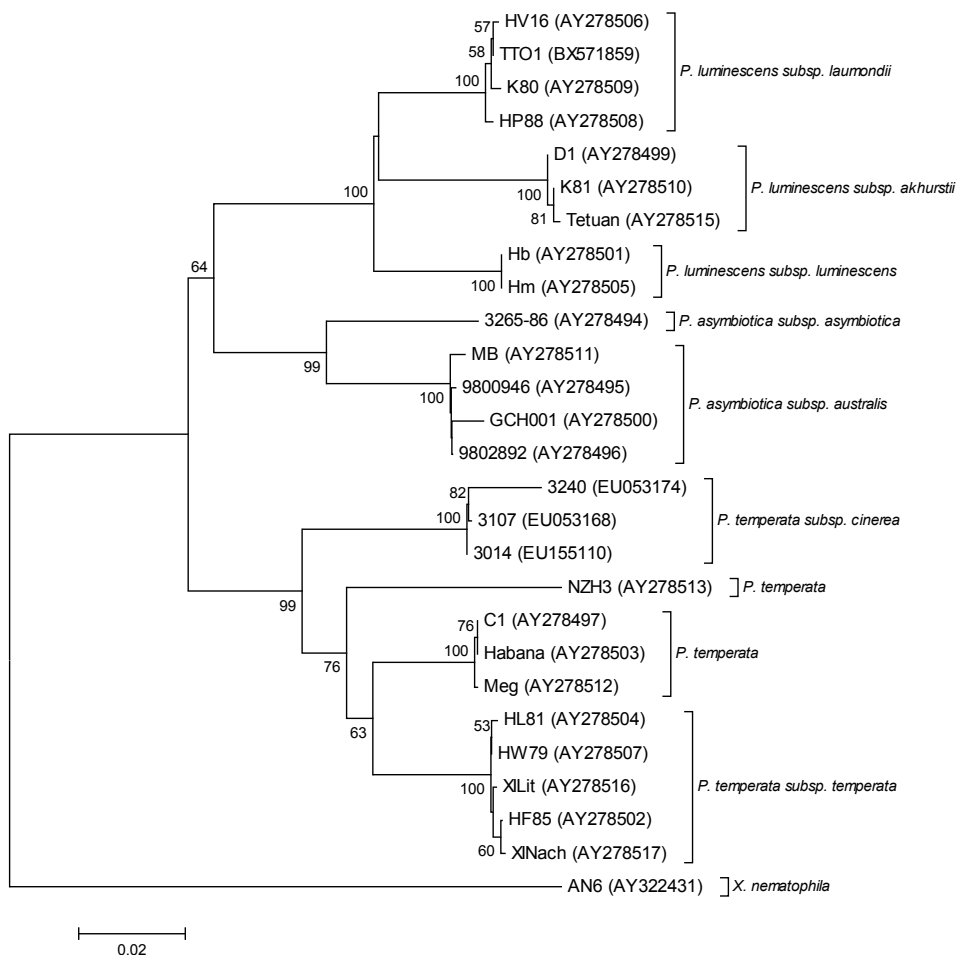
Az új alfaj típus törzse a 3107^T (DSM 19724T, ill. NCAIM B02271T), melyet *Heterorhabditis downesi*-ből izoláltunk. A fonálféreg begyűjtési helye: Ásotthalom, 95D erdőtag, lombhullató erdő, humuszos homok. A többi törzs *H. downesi*-ből és *H. megidis*-ből került elő, 5 különböző földrajzi helyről Magyarország területéről.

A 3107^T, a 3014 és a 3240 jelzésű *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. *novum* izolátumok filogenetikai kapcsolatát a többi *Photorhabdus* taxonnal az 5.12. ábrán lévő törzsfá mutatja. A törzsfá alapja a gyrB szekvencia.

5.11. táblázat: Az újonnan javasolt *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* alfajt a többi, leírt taxontól megkülönböztető fenológiai tulajdonságok. Az adatok részben saját vizsgálatokból származnak, részben a következő munkákból: Akhurst és mtsai (2004) - 1,2; Hazir és mtsai (2004) - 4,7.

Törzsek: 1, *P. asymbiotica* subsp. *asymbiotica* (3265-86^T); 2, *P. asymbiotica* subsp. *australis* (9802892^T); 3, *P. luminescens* subsp. *akhurstii* (FRG04^T); 4, *P. luminescens* subsp. *kayaii* (1121^T); 5, *P. luminescens* subsp. *laumondii* (TT01^T); 6, *P. luminescens* subsp. *luminescens* (Hb^T); 7, *P. luminescens* subsp. *thracensis* (39-8^T); 8, *P. temperata* (XINach^T); 9, *P. temperata* subsp. *cinerea* (23 izolátum adatai alapján, a 3107^T törzsre jellemző adat zárójelben). Jelölések: + pozitív reakció, - negatív reakció, NA – nincs adat, a pozitív reakciójú izolátumok aránya szerepel a 9. oszlopban

Tulajdonság	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Max. növekedési hőm. (°C)	38	40	38	36	36	38	35	34	35
Indol produkció	-	-	+	+	+	+	-	-	4% (-)
DNase aktivitás	-	+	-	+	+	-	+	+	100% (+)
Ureáz aktivitás	+	-	+	+	+	-	+	-	35% (-)
Triptofán deamináz aktivitás	-	-	-	NA	-	-	NA	-	57% (-)
Citrát reakció	+	+	+	+	-	+	+	+	87% (+)
Hemolízis birkavéres agaron	+	+	+	+	-	+	+	+	100% (+)
Hasznosítja:									
L-Fukóz	-	-	+	-	-	+	-	+	96% (+)
L-Hisztidin	+	-	-	-	+	+	+	+	100% (+)
<i>myo</i> -Inozitol	-	+	+	+	+	+	-	-	100% (+)
D,L-Lactát	-	-	+	-	-	-	-	-	87% (+)
D-Mannitol	-	-	+	-	-	+	-	-	0% (-)
Maltóz	+	+	+	+	+	+	+	-	100% (+)
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	100% (+)



5.12. ábra: A *Photorhabdus* génusz filogenetikai kapcsolatai a *gyrB* gén szekvenciájának elemzése alapján.

Az evolúciós kapcsolatokat a Neighbor-Joining módszer (Saitou és Nei, 1987) segítségével becsültük meg. Az ábrán az optimális fa látható, az ágak teljes hossza = 0,50650502. Az elágazási pontok mellett feltüntettük, hogy a rokon taxonok az esetek hány százalékában kapcsolódtak a bootstrap teszt (Felsenstein, 1985) során (1000 ismétléssel számolva). Az ábra méretarányos, ahol az ágak hossza megegyezik az evolúciós távolságokkal. Az evolúciós távolságokat Kimura 2 paraméteres modelljével számoltuk (Kimura, 1980), az egység a bázishelyenkénti báziscsere gyakorisága. A bázishiányt, vagy adathiányt tartalmazó pozíciókat nem vettük figyelembe az elemzés során (complete deletion option). Összesen 994 pozíció szerepelt az elemzésben, amelyet MEGA4 programmal végeztünk (Tamura és mtsai, 2007).

5.3. Kompetíciós kísérletek

Az előzőekben leírt izolációs munka során találtunk olyan talajmintákat, amelyekben *H. downesi* és *H. megidis* egymás mellett élését lehetett igazolni. A szimbionta partnerek azonosítása során pedig kiderült, hogy ezek a fonálféreg 2-2 különböző baktériummal is képesek sikeres szimbiotikus komplexet képezni, sőt egyes mintavételi helyeken mindkét fonálféreg mindkét bakteriális szimbiontával előfordult. Ezért újabb talajmintákat gyűjtöttünk be Dány térségéből, ahol a faunisztikai vizsgálatok adatai szerint a fentebb vázolt helyzet előfordult (ezen kívül még Jakabszállás térségében is dokumentáltuk a két fonálféreg és baktérium együttes jelenlétét). Az ezekből a talajmintákból izolált fonálféreg-baktérium páros előfordulását, ill. reprodukciós sikerét az 5.12. táblázat mutatja. A produktivitás mindkét fonálféreg fajnál nagyobb volt, ha a szürke típusú baktériummal (*P. t. subsp. cinerea*) képzett komplexet.

5.12. táblázat: A Dány 11/C és 2/D erdőtagból 2008. augusztus 5-i mintavétel során begyűjtött 20 talajmintából származó fonálféreg izolátumok faj és bakteriális szimbionta szerinti megoszlása, ill. a teszttállatokból kifutó fonálféregek átlagos száma

Fonálféreg/baktérium	Izolátumok száma	Reprodukció (IJ/fertőzött lárva)
<i>H. downesi/P. temperata subsp. temperata</i>	10	42 298 a
<i>H. downesi/P. temperata subsp. cinerea</i>	14	75 948 b
<i>H. megidis/P. temperata subsp. temperata</i>	14	34 744 a
<i>H. megidis/P. temperata subsp. cinerea</i>	6	93 859 b

p<0,01*

* - egyutas varianciánálisis, *ln* transzformált adatok

Mindegyik fonálféreg-baktérium kombinációból kiválasztottunk 1-1 izolátumot, és azokkal kevert fertőzéseket végeztünk. A vizsgálatok célja az volt, hogy megtudjuk, van-e valamilyen interakció a fonálféregek között a rovarlárvában, és ezt az esetleges kapcsolatot befolyásolja-e a szimbionta baktérium.

Az adott kísérleti rendszerben a *Galleria* ill. *Tenebrio* teszttállatok mortalitása minden esetben nagy (90-100%) volt, ebből a szempontból

nem lehetett különbséget találni a kezelések között (részletesen be nem mutatott adatok).

5.13. táblázat: Különböző fonálféreg-baktérium kombinációkkal, *Galleria mellonella* tesztállat felhasználásával végzett kevert fertőzések során az egy-egy petricsészéből kifutó infektív fonálféreg lárvák száma (IJ/petricsésze), függetlenül azok faji összetételétől (10-10 tesztállat/petricsésze, n=5)

a-b*	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
1000-0	263 636	146 279	263 636	432 302	263 636	146 279
500-500	242 777	218 571	212 875	148 644	251 840	27 040
0-1000	169 974	432 302	146 279	169 974	432 302	169 974
p**	n.s.	p<0,05	n.s.	p<0,05	n.s.	p<0,05

* - a fertőzéshez használt elegy összetétele (IJ/ml), lásd 4.7.2. alfejezet:

A szimbionta baktérium pigmenttermelése alapján elnevezett csoportok. A „sárga” előtagú fonálféreg *P. t. subsp. temperata*, a „szürke” megjelölésű pedig *P. t. subsp. cinerea* baktériumot hordoz.

I.: sárga *H. megidis* – szürke *H. downesi*

II.: szürke *H. megidis* – sárga *H. downesi*

III.: sárga *H. megidis*. – szürke *H. megidis*

IV.: sárga *H. downesi* – szürke *H. downesi*

V.: sárga *H. megidis* – sárga *H. downesi*

VI.: szürke *H. megidis* – szürke *H. downesi*

** - a szignifikancia Kruskal-Wallis teszttel vizsgálva

A különböző kombinációkkal végzett kevert fertőzések eredményeit *Galleria mellonella* tesztállat esetén az 5.13. táblázat mutatja. A táblázat 1000-0 és 0-1000 megjelölésű sora az a beállítás, amikor mind a 6 kezelésnél csak az egyik, vagy csak a másik fonálféreggel történt a fertőzés. Tehát ez a két sor mutatja a kompetíció nélkül kialakuló egyedszámot. A középső 500-500 jelzésű sor pedig annak a fertőzésnek az eredménye, amit az adott kombináció 1:1 arányú elegyével végeztünk. Ha nem lenne a két fonálféreg között semmiféle interakció, akkor a középső sorban a két külön fertőzés (1000:0, 0:1000) átlagát kellene kapnunk. Ezzel szemben a kapott eredmények azt mutatják, hogy a két fonálféreg izolátum mind a 6 esetben csökkentette egymás reprodukciós sikerét, a II, IV., és VI. beállítás esetén ez a gátló hatás statisztikailag is igazolható volt. Ez egyúttal a (III. és IV. beállítás esetén) a fajon belüli kompetíció meglétét is igazolja.

Az 5.14. táblázat ugyanezen beállítások eredményeit mutatja *Tenebrio molitor* tesztállaton. Az izolátumok egymásra gyakorolt gátló hatása itt is megfigyelhető volt mind a 6 esetben, a III. beállításban pedig statisztikailag igazolható volt a fajon belüli kompetíció is.

5.14. táblázat: Különböző fonálféreg/baktérium kombinációkkal, *Tenebrio molitor* tesztállat felhasználásával végzett kevert fertőzések során az egy-egy petricsészből kifutó infektív fonálféreg lárvák száma (IJ/petricsésze), függetlenül azok faji összetételétől. (10-10 tesztállat/petricsésze, n=5)

a-b*	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.
1000-0	83 683	111 846	83 683	48 714	83 683	111 846
500-500	47 238	27 048	23 645	37 054	40 535	67 965
0-1000	130 255	48 714	111 846	130 255	48 714	130 255
p**	n.s.	n.s.	p<0,05	n.s.	n.s.	n.s.

* - a fertőzéshez használt elegy összetétele (IJ/ml), lásd 4.7.2. alfejezet, és 5.13. táblázat magyarázata

** - a szignifikancia Kruskal-Wallis teszttel vizsgálva

Az 5. 15. táblázat a két izolátumot 1:1 arányban tartalmazó eleggyel végzett fertőzések eredményeként a fonálféreg reprodukciós sikerét mutatja faji összetétel szerint, *Galleria mellonella* tesztállaton. A táblázatban a sorok elején feltüntetett fonálféreg-baktérium komplex reprodukciós sikerét adom meg az oszlopok tetején feltüntetett fonálféreg-baktérium komplex jelenléte mellett. Értelemszerűen mindig van egy érték, ahol minden izolátum önmagával szerepel egy beállításban, tehát önállóan történt a fertőzés (vastagon szedett értékek). Ezeket az adatokat tartalmazza az 5.13. táblázat 0:1000, ill. 1000:0 sora is. A táblázatot soronként elemezve látszik, hogy egy-egy fonálféreg-baktérium kombináció több esetben más fonálféreg jelenléte mellett jelentősen kisebb egyedszámot képes produkálni, mint ha csak önállóan fertőztünk volna vele. A *H. downesi/P. t. cinerea* kombináció ezzel szemben *H. megidis/P. t. temperata* mellett nagyobb egyedszámot ért el, mint önállóan (ez az I. kísérleti beállítás). De a *H. megidis/P. t. temperata* esetén sem igazolható a reprodukciós siker csökkenése, ha *H. downesi/P. t. temperata* (V. kísérlet), vagy *H. megidis/P. t. cinerea* (III. kísérlet) volt a kevert fertőzésnél használt másik kombináció.

Más a helyzet *Tenebrio molitor* tesztállat esetén (5.16. táblázat). Ekkor valamennyi kevert fertőzési beállításnál csökkent a fonálférgek reprodukciós sikere függetlenül attól, hogy milyen volt a szimbionta baktériumuk és milyen fonálféreg/baktérium komplex volt még jelen. A legkisebb negatív hatás a *H. downesi/P. t. cinera* kombináció esetén volt tapasztalható, *H. megidis/P. t. cinerea* mellett (VI. kísérleti beállítás).

Az 5.15. és 5.16 táblázat összevetésekor (azaz a *Galleria* ill. a *Tenebrio* tesztállattal végzett kísérletek eredményeinek összevetésekor) a legfeltűnőbb különbség, hogy nem kevert fertőzés esetén *Galleria*

tesztállatban mindkét fonálféregfaj szaporodása hatékonyabb *P. t. temperata* baktérium szimbiontával, mint *P. t. cinera* szimbiontával, ugyanakkor *Tenebrio* tesztállatnál a helyzet éppen fordított, a *P. t. cinerea* szimbiontájú fonálféreg reprodukciós sikere a nagyobb. Megjegyzendő, hogy a *H. downesi* reprodukciós sikere sokkal inkább változott a bakteriális szimbionta függvényében, mint a *H. megidis*-é.

5.15. táblázat: A különböző fonálféreg-baktérium komplexek reprodukciós sikere (IJ/petricsésze) *Galleria mellonella* tesztállatba történő kevert fertőzés esetén. A fertőzéshez kétféle komplexet (500-500 IJ/petricsésze arányban) használtam. Vastagon kiemelve az az eset, amikor az adott (a sorok elején feltüntetett) fonálféreg-baktérium kombinációval önállóan történt a fertőzés (ekkor 1000 IJ/petricsésze)

	H.d./P.t.t.	H.d./P.t.c.	H.m./P.t.t.	H.m./P.t.c.
H.d./P.t.t.	432 302	148 644	67 168	212 197
H.d./P.t.c.	0	169 974	232 458	13 464
H.m./P.t.t.	184 671	10 318	263 636	179 132
H.m./P.t.c.	6 373	27 039	42 178	146 279

10-10 tesztállat/petricsésze, n=5

H.d. – *Heterorhabditis downesi*; H.m. – *H. megidis*; P.t.t. – *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*; P.t.c. – *P. temperata* subsp. *cinerea*

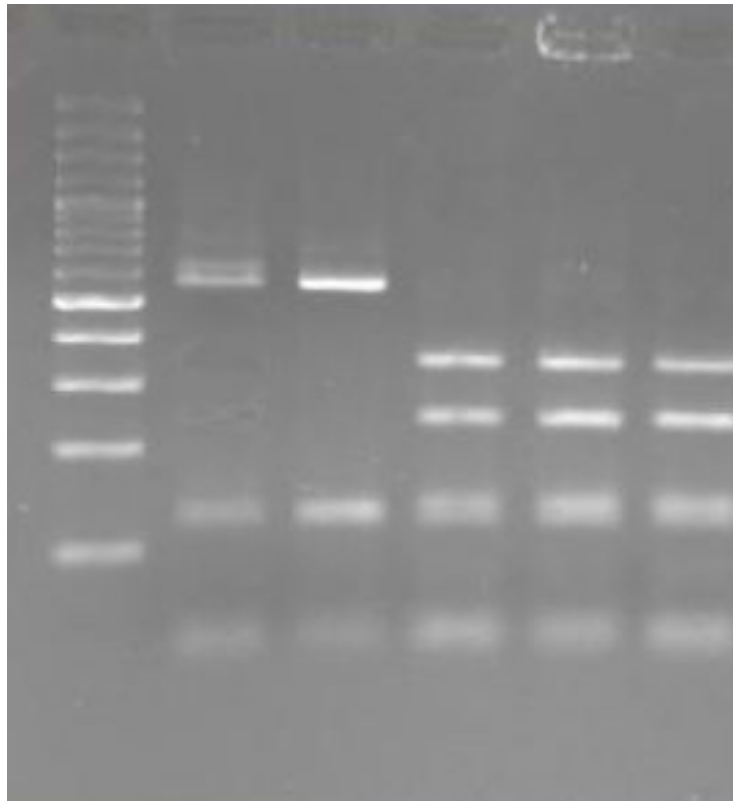
5.16. táblázat: A különböző fonálféreg-baktérium komplexek reprodukciós sikere (IJ/petricsésze) *Tenebrio molitor* tesztállatba történő kevert fertőzés esetén. A fertőzéshez kétféle komplexet (500-500 IJ/petricsésze arányban) használtam. Vastagon kiemelve az az eset, amikor az adott (a sorok elején feltüntetett) fonálféreg-baktérium kombinációval önállóan történt a fertőzés (ekkor 1000 IJ/petricsésze)

	H.d./P.t.t.	H.d./P.t.c.	H.m./P.t.t.	H.m./P.t.c.
H.d./P.t.t.	48 714	7 228	6 772	7 642
H.d./P.t.c.	29 825	130 255	18 717	55 688
H.m./P.t.t.	33 762	28 520	83 683	10 576
H.m./P.t.c.	11 493	12 277	10 576	111 846

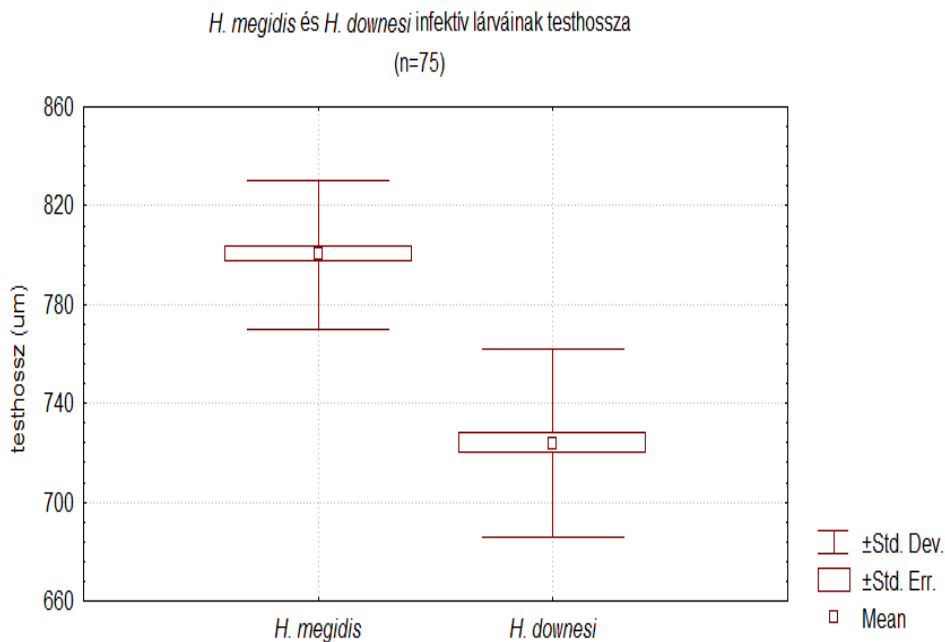
10-10 tesztállat/petricsésze, n=5

H.d. – *Heterorhabditis downesi*; H.m. – *H. megidis*; P.t.t. – *Photorhabdus temperata* subsp. *temperata*; P.t.c. – *P. temperata* subsp. *cinerea*

A kevert fertőzések során a rovartetemetek 7 nap után szétválogattam szín szerint, azaz annak megfelelően, hogy melyik baktérium tudott felszaporodni bennük (9. kép). Meghatároztam a kifutó fonálféregek számát, és morfológiai mérések (bizonytalan esetekben PCR-RFLP analízis) alapján a fajtát is (5.13. ábra, 5. 14. ábra).

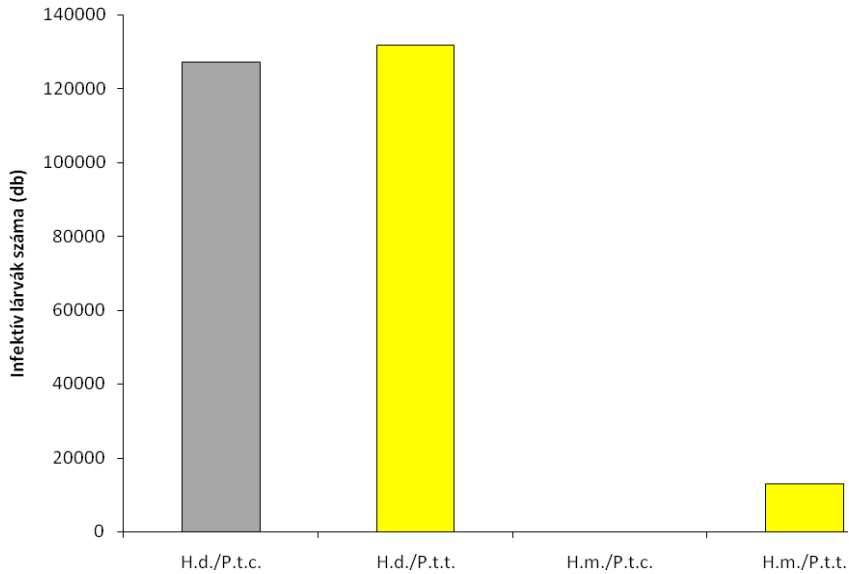


5.13. ábra: A *Heterorhabditis megidis* és a *H. downesi* ITS1-ITS2 régiójának RFLP analízise. A hasítás Fast Digest *RsaI* (Fermentas) restrikciós endonukleázzal végezve, MetaPhor agaróz gélen futtatva. Az 1. oszlop: molekulaméret marker 100 bp Ladder plus (Fermentas); 2.-3. oszlop: *H. downesi*; 4.-6. oszlop: *H. megidis*

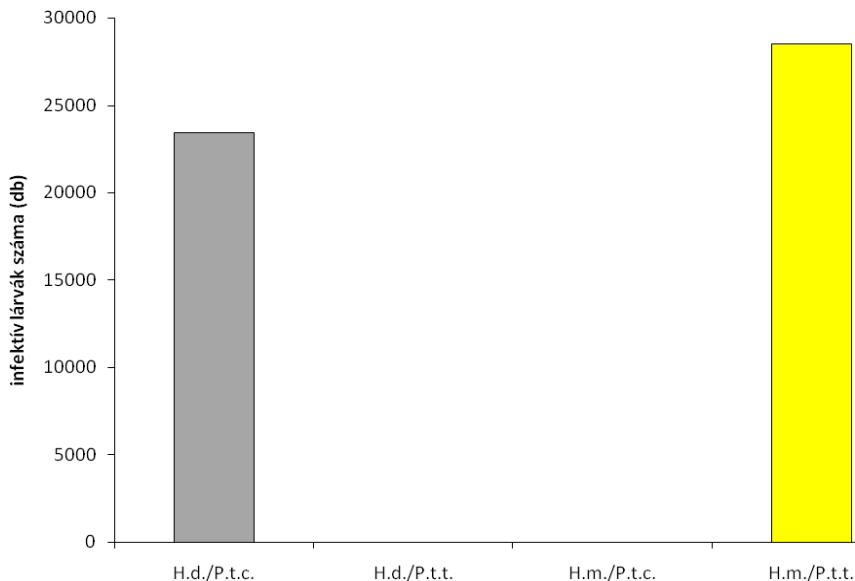


5.14. ábra: A *Heterorhabditis megidis* és a *H. downesi* infekzív lárváinak testhossza.

Az I. beállítás (*H. downesi*/*P. t. cinerea* és *H. megidis*/*P. t. temperata*) eredménye *Galleria* tesztállaton az 5.15. ábrán látható. Meglepő módon az eredeti kombinációkon kívül egy új kombinációt is kaptunk: a sárga színű rovar tetemekből nemcsak *H. megidis*-t, hanem annál jóval több *H. downesi*-t is azonosítottunk. Ezzel szemben *H. megidis* nem került elő a szürke tetemekből. Ez arra utal, hogy egy rovar tetembe bejuthatott mindkét típusú fonálféreg, de a *H. downesi* a *H. megidis*-ből kiszabaduló és a rovar tetemben felszaporodó baktériumtömeget hasznosítva képes volt szaporodni, és meggátolni a másik fonálféregfaj szaporodását. A kifutó *H. downesi*-val végzett ellenőrző fertőzésekkel igazoltuk, hogy a fonálféreg magukkal vitték a *P. t. temperata* sejtjeit, azaz lecserélték a sikeresebb baktériumra saját szimbióta partnerüket.



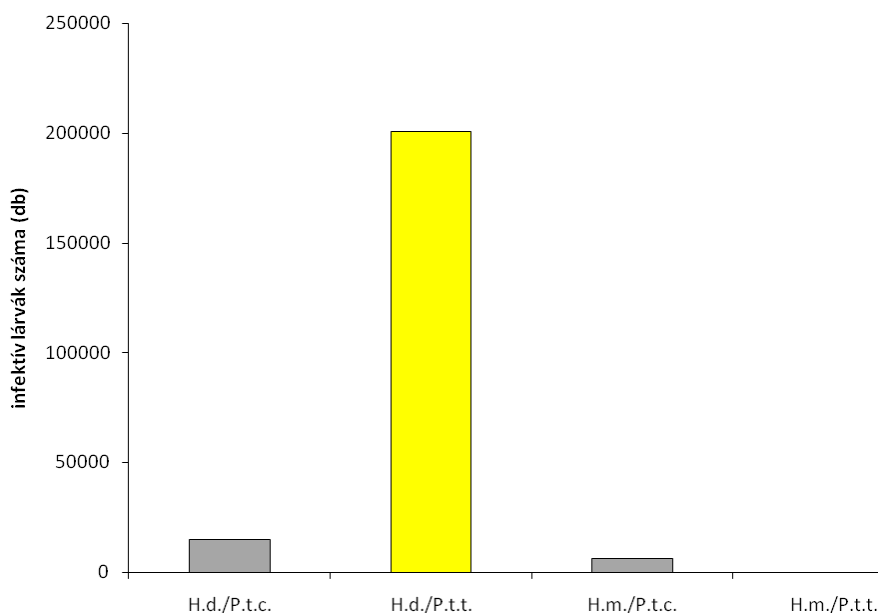
5.15. ábra: A *H. downesi*/*P. t. cinerea* és *H. megidis*/*P. t. temperata* elegyével fertőzött *Galleria mellonella* lárvákból kifutó infekatív fonálféreglárvák száma. A szürke oszlop jelzi a *P. t. cinerea* által szürkére, a sárga pedig a *P. t. temperata* által sárgára színezett rovar tetemekből kifutó fonálférgek mennyiségét.



5.16. ábra: A *H. downesi*/*P. t. cinerea* és *H. megidis*/*P. t. temperata* elegyével fertőzött *Tenebrio molitor* lárvákból kifutó infekatív fonálféreglárvák száma. A szürke oszlop jelzi a *P. t. cinerea* által szürkére, a sárga pedig a *P. t. temperata* által sárgára színezett rovar tetemekből kifutó fonálférgek mennyiségét.

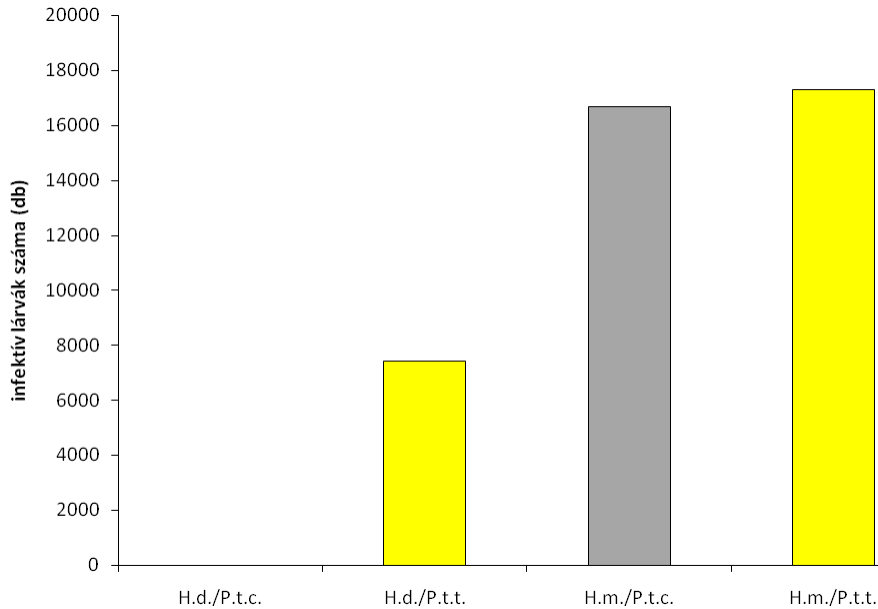
Tenebrio molitor lárvákon tesztelve ez a jelenség nem volt megfigyelhető: az eredeti kombinációknak megfelelő fonálféreg-baktérium komplexeket kaptunk a szín szerint szétválogatott lárvákból (5. 16. ábra).

A II. beállítás (*H. downesi*/*P. t. temperata* és *H. megidis*/*P. t. cinerea*) esetében is felmerült az előbb leírt jelenség. *Galleria* tesztállat esetén a sárga színű elpusztult rovar tetemekből csak *H. downesi* típusú fonálférget izoláltunk, de a szürke tetemekben megjelent a *H. megidis* mellett (annál kicsit több) a *H. downesi* is (5.17. ábra).



5.17. ábra: A *H. downesi*/*P. t. temperata* és *H. megidis*/*P. t. cinerea* elegyével fertőzött *Galleria mellonella* lárvákból kifutó infektív fonálféreglárvák száma. A szürke oszlop jelzi a *P. t. cinerea* által szürkére, a sárga pedig a *P. t. temperata* által sárgára színezett rovar tetemekből kifutó fonálférgek mennyiségét.

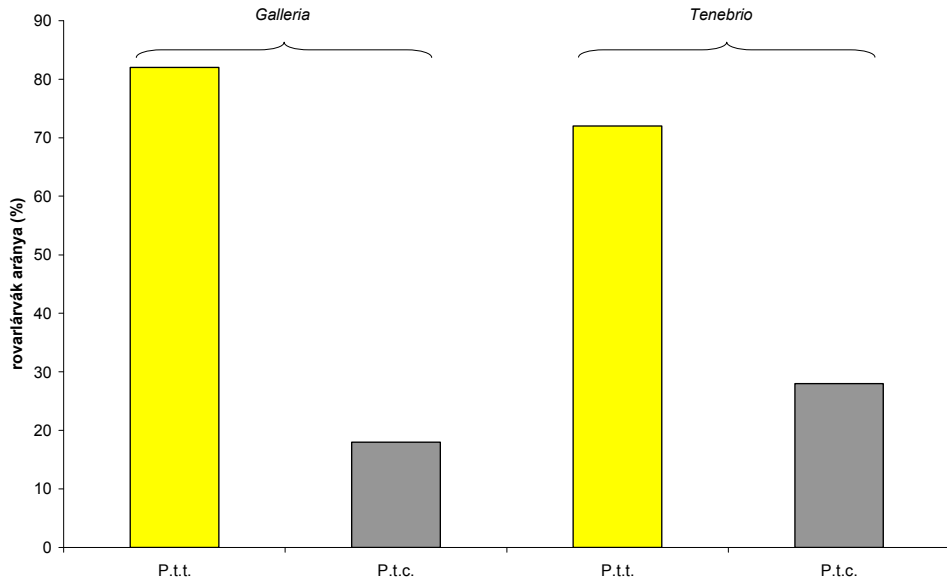
Kicsit más a kép *Tenebrio* tesztállat esetén. Itt a szürke tetemekben találtuk meg kizárólag az eredeti *H. megidis*/*P. t. cinerea* kombinációnak megfelelő *H. megidis*-t, a sárga tetemekből az eredeti kombinációt képviselő *H. downesi*-hoz képest kétszer annyi újra kombinálódott *H. megidis* futott ki, azaz itt a *H. megidis* „cserélte le” bakteriális szimbiontáját (5.18. ábra).



5.18. ábra: A *H. downesi*/*P. t. temperata* és *H. megidis*/*P. t. cinerea* elegyével fertőzött *Tenebrio molitor* lárvákból kifutó infektív fonálféreglárvák száma. A szürke oszlop jelzi a *P. t. cinerea* által szürkére, a sárga pedig a *P. t. temperata* által sárgára színezett rovar teteméből kifutó fonálférgek mennyiségét.

Azonos fonálféreg különböző baktériumokkal képzett komplexeinek kevert fertőzése (III. beállítás) esetén a sárga és szürke tetemek arányát mutatja az 5. 19. ábra.

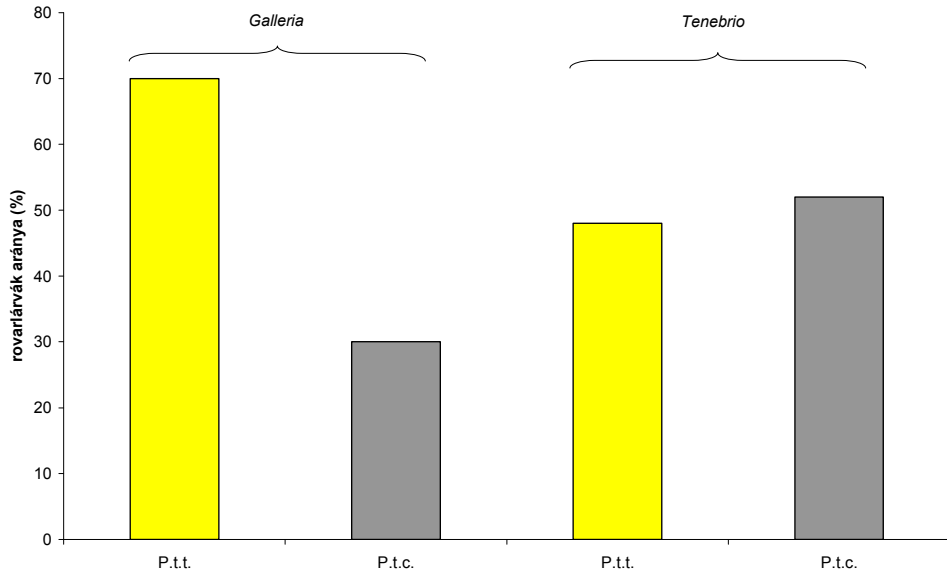
Az elpusztult tetemek mind *Galleria*, mind *Tenebrio* tesztállat esetén nagyobb részben sárgák voltak, tehát a *P. t. temperata* baktérium szaporodott fel sikeresebben.



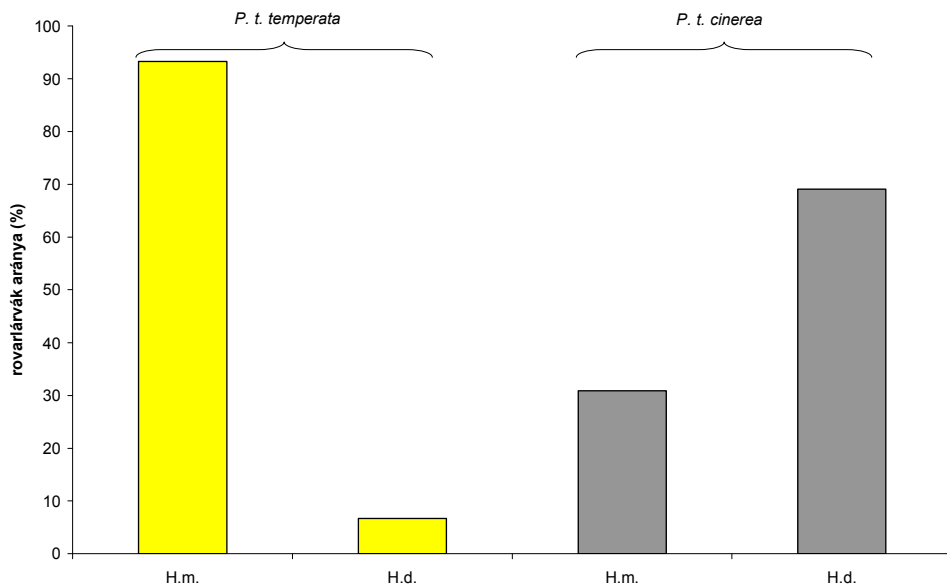
5.19. ábra: A *H. megidis*/*P. t. temperata* és *H. megidis*/*P. t. cinerea* elegyével fertőzött *Galleria mellonella* ill. *Tenebrio molitor* lárvák közül a *P. t. temperata* által sárgára (sárga oszlop), valamint a *P. t. cinerea* által szürkére színezett (szürke oszlop) rovarlárák aránya.

Amikor *H. downesi* fonálféreg és különböző baktériumok komplexeinek elegyével történt a fertőzés (5.20. ábra, IV. beállítás) *Galleria* tesztállat esetén hasonló képet kapunk, azaz a sárga baktérium kb. kétszer annyi rovar volt képes kolonizálni, mint a szürke, de *Tenebrio* tesztállat esetén ez a különbség eltűnt: a *P. t. temperata* és a *P. t. cinerea* egyformán hatékonyak bizonyult.

Ugyanazon baktériumok különböző fonálféreggel alkotott komplexeinek egyes fertőzését (V., ill. VI. beállítás) mutatja az 5.21. ábra *Tenebrio* tesztállaton. A diagramon jól látszik, hogy a sárga színű *P. t. temperata* baktérium mellett a *H. megidis* jóval sikeresebb volt, mint a *H. downesi*. Ezzel szemben a szürke *P. t. cinerea* mellett a *H. downesi* (ha nem is akkora különbséggel) volt az, amelyik nagyobb reprodukciós sikert ért el.



5.20. ábra: A *H. downesi*/*P. t. temperata* és *H. downesi*/*P. t. cinerea* elegyével fertőzött *Galleria mellonella* ill. *Tenebrio molitor* lárvák közül a *P. t. temperata* által sárgára (sárga oszlop), valamint a *P. t. cinerea* által szürkére színezett (szürke oszlop) rovarlárvák aránya



5.21. ábra: A *H. megidis*/*P. t. temperata* – *H. downesi*/*P. t. temperata* (sárga oszlop) valamint a *H. megidis*/*P. t. cinerea* – *H. downesi*/*P. t. cinerea* (szürke oszlop) elegyekkel fertőzött *Tenebrio molitor* lárvák aránya a kifutó fonálférgek faji hovatartozásának függvényében.

6. Az eredmények megvitatása

6.1. Magyarország Heterorhabditis faunája

Az első, rovarpatogén fonálférgekre vonatkozó magyarországi faunisztikai adat több mint 20 évvel ezelőtti (Mracek és Jenser, 1988). Ekkor az ubiquista elterjedésű *Steinernema feltiae* és *Heterorhabditis bacteriophora* előfordulását igazolták a szerzők. Egy évtizeddel később Griffin és mtsai (1999) a *H. downesi* jelenlétéről számoltak be a Visegrádi-hegységben gyűjtött minták alapján. A fajt ekkor még mint *H. megidis* 'Irish-type' néven jelölték, a tényleges fajleírás későbbi (Stock és mtsai, 2002). Az első hazai, szisztematikus mintavétel alapján végzett faunisztikai vizsgálat néhány évvel később, Szabolcs-Szatmár-Bereg megye területére korlátozódott ugyan, de a korábról ismert fajok mellett egy további faj, a *H. megidis* előfordulását is igazolta (Lucskai és Tóth, 2004). Ennek a munkának további eredménye volt, hogy nem sikerült különbséget találni a természetközeli élőhelyek (elegyes lomboserdők, őshonos fafajokkal) valamint a bolygatott területek (tájidegen fafajokkal létesült ültetvényeszerű erdők, gyümölcsösök, stb.) között a rovarpatogén fonálférgek előfordulási gyakorisága alapján (Földes és Lakatos, 2004).

A 2005-ben végzett, és a jelen értekezésben ismertetett munka a korábbiakhoz képest annyiban feltétlenül előrelépést jelentett, hogy a mintavétel az ország egész területére kiterjedt, és a nagyobb mintaszám miatt az előfordulási gyakoriság pontosabb becslését tette lehetővé. Ugyanakkor, a minták túlnyomó többsége erdős területekről származott, így a nyílt élőhelyekre jellemző fajok gyakoriságát nyilván alábecsülte. Ez elsősorban a *H. bacteriophora*-ra vonatkozik, hiszen ez a faj a korábbi adatok alapján elsősorban gyepek és rétek talajából került elő (Hominick, 2002).

A rovarpatogén fonálférgek előfordulási gyakorisága a mintavételi helyekre vonatkozóan meghaladta a 30%-ot (lásd Függelék). Ezt az értéket magasnak vagy alacsonynak tekinteni a különböző vizsgálatok eltérő módszertana miatt igen nehéz lenne, de általánosságban elmondható, hogy a rendelkezésre álló adatok alapján a saját munkámban tapasztalt gyakoriság nem maradt el más, hasonló vizsgálatok során tapasztalt értékektől (Hominick, 2002). Ezzel szemben egyértelműen állítható, hogy a Heterorhabditisekre vonatkozóan a vizsgálataim kiemelkedő gyakoriságot igazoltak két szempontból is. Egyrészt, egyetlen

európai országban sem igazolták eddig három *Heterorhabditis* faj jelenlétét (Nguyen és Hunt, 2007). Másrészt, a Heterorhabditisek a rovarpatogén fonálférgesek között viszonylag ritkának számítanak. A részletes faunisztikai vizsgálatokkal jellemezhető területek közül a Magyarországhoz legközelebb eső Csehországban a vizsgált talajminták kevesebb mint 2%-ában találták meg valamelyik *Heterorhabditis* fonálférget (Mracek és mtsai, 2005).

A munkám eredményeként felrajzolható, Magyarországi elterjedési adatokat tartalmazó térképek egyik konklúziója, hogy egyik faj sem jellemezhető rendkívül jól körülhatárolható elterjedési területtel az országhatáron belül. Az Északi-középhegységéből származó talajmintákból egyáltalán nem tudtam fonálférget izolálni, igaz ugyanakkor, hogy ezeken a területeken kivétel nélkül agyagos, nehéz talajokból származtak a minták (vesd össze Függelék), márpedig az ilyen típusú talajok nem kedveznek a rovarpatogén fonálférgeseknek (Lewis, 2002).

Az értekezésben bemutatott eredmények faunisztikai vonatkozásai közül még ki kell emelni a *H. downesi* gyakoriságát. Ennek a fajnak 83 izolátuma került elő az ország különböző területeiről (5.3. ábra) és ezzel a leggyakoribb fajnak bizonyult. Jelenléte Magyarországon 1999 óta ismert volt (Griffin és mtsai, 1999). Ezen kívül kizárólag Írországból, Nagy-Britanniából és Dániából vannak előfordulási adatai (Nguyen és Hunt, 2007), a faj leírásához használt típusörzs is írországi. A felsorolt országokban elsősorban vízparti élőhelyeken, igen gyakran tengerpartokon található meg (Rolston és mtsai, 2005). Dominánsan észak-európai elterjedése és hűvösebb mikroklímájú helyeken való előfordulása miatt hidegkedvelő, ill. hidegtoleráns fajnak tekintik (Nguyen és Hunt, 2007). Magyarországon nedvesebb mikroklímához, ill. vízpartokhoz kötött előfordulását nem lehetett igazolni. Gyakorisága (és egyáltalán: jelenléte) Magyarországon nehezen magyarázható az elterjedési területére vonatkozó jelenlegi adatokkal. Véleményem szerint az európai országok területére vonatkozó részletesebb faunisztikai felmérések jelentősen átrajzolnák az erre a fajra vonatkozó képet.

6.2. A rovarpatogén fonálféreg szimbionta baktériumai

A faunisztikai jellegű rovarpatogén fonálféreg izolációs vizsgálatok egyik leglátványosabb eleme a fertőzött rovarlárvák rendkívül változatos, a fonálféreg szimbionta baktériumainak pigmenttermelése miatt kialakuló színe volt. Ugyanakkor, a fonálféreg faji szintű identifikálása nem igazolta vissza ezt a sokféleséget, hiszen a minták túlnyomó többségéből két fonálféregfaj, a *Heterorhabditis megidis*, ill. a *H. downesi* került elő. Ez a megfigyelés egyértelműen arra utalt, hogy egy-egy fonálféreg több különféle szimbionta baktériummal élhet együtt egy adott területen. Hasonló jelenségre utaló adatot a szakirodalomban nem lehetett találni. Ennek oka két tényre vezethető vissza. Egyrészt, *Heterorhabditis* fajok viszonylag kis gyakorisággal kerültek elő a különféle faunisztikai vizsgálatok során (lásd pl. Mracek és mtsai, 2005). Másrészt, sokáig alig volt példa olyan munkákra, ahol egy-egy terület fonálféreg faunájának felmérésekor következetesen meghatározták volna a szimbionta baktériumokat is. Ilyeneket csak a legutóbbi években találhatunk (Emelianoff és mtsai 2008, Stock és mtsai, 2008).

A bakteriális szimbionta változatosságának ökológiai és esetlegesen a biológiai növényvédelmi gyakorlat számára is nagy jelentőségének felmérését célzó vizsgálataim során kézenfekvő volt, hogy a munka során valamilyen könnyen kezelhető csoportosítás alapján vizsgáljam a különféle baktérium izolátumokat. A telep színe alapján történő csoportosítás azonban már a fiziológiai paraméterek segítségével kialakított csoportokkal sem volt teljes összhangban.

A baktériumok taxonómiája ugyan egyre inkább a molekuláris biológiai adatokra épül, de a különféle fiziológiai tulajdonságokat még mindig olyan, a baktérium adaptációs képességét meghatározó bélyegként kezelhetjük, amelynek taxonómiai jelentősége is van. Ennek ellenére a fiziológiai reakciók alapján kialakított csoportok sem feleltek meg a taxonómiai besorolásnak (5.5. ábra). Igaz ugyanakkor, hogy az elemzés során nem súlyoztam az egyes paramétereket, azaz, a *Photorhabdus* génusz fajainak elkülönítésében is jelentős szerepet játszó reakciók (pl. indolprodukción, triptofán-deamináz aktivitás, Fischer-Le Saux és mtsai, 1999) ugyanolyan súllyal szerepeltek az izolátumok hasonlóságának becslésénél, mint egyes, a *Photorhabdus* baktériumok esetén korábban nem vizsgált, így ismeretlen jelentőségű vegyület, pl. a gentiobióz hasznosításának képessége. Teljesen nyilvánvaló, hogy az adataim további feldolgozásának egyik reális iránya lehet ennek figyelembe vétele.

A baktériumokkal végzett munkámnak hangsúlyos eleme volt az antibakteriális hatóanyag termelő aktivitás, ill. a citotoxicitás vizsgálata.

Ez a két tulajdonság feltételezések szerint jelentős a fonálféreg-baktérium komplex sikeressége szempontjából, hiszen a baktérium toxintermelése révén elpusztítja a megfertőzött rovarlávát, míg antibiotikumtermelése révén axenikus környezetet biztosít a rovar tetemen belül. Ezen túlmenően, az antibakteriális hatóanyagok, ill. az entomotoxinok hasznosítására a fonálférgektől függetlenül is lehetőség és igény mutatkozik.

Az antibakteriális hatás teszteléséhez használt két baktériummal (*Staphylococcus aureus*, ill. *Bacillus subtilis*) szembeni aktivitás jelentősen eltérő volt. Míg a *Staphylococcus aureus* baktériummal szemben a legtöbb izolátum fermentleve hatékonyabb volt, mint 100 ppm streptomycin, addig *Bacillus subtilis* tesztbaktériummal szemben mindössze egy izolátumra volt jellemző ez, a Nyíracsad környékéről izolált *P. luminescens subsp. kayaii* 3209 jelzésű törzsére. Általánosságban elmondható, hogy sem a morfológiai alapon képzett csoportok, sem a taxonómiai csoportok nem voltak homogének ebből a szempontból, a csoportokon belüli variabilitás az egyes izolátumok között nagyobb volt, mint a csoportok közötti. Talán a leginkább egyértelmű a *P. temperata subsp. cinerea* (szürke) izolátumcsoport gyenge antibakteriális hatóanyagtermelése volt.

A rovarpatogén baktériumok lényeges tulajdonsága a rovarokkal szembeni toxintermelő képesség, azaz a rovarok minél hatékonyabb elpusztításának képessége. A baktériumok ezen tulajdonságának teszteléséhez elterjedten használják a baktériumsejtek rovarokba történő injektálásának módszerét (French-Constant és mtsai, 2007). Ez a módszer azonban rendkívül munka- és tesztállatigényes, különösen nagy mintasorozatok esetén. Éppen ezért igyekeztem egyszerűbb és költségtakarékosabb módszert választani a toxintermelő képesség méréséhez. A rovarsejtvonalakon történő toxicitásmérésnek az adott baktériumok esetén két korlátja van. Egyrészt, a vizsgálataim szempontjából (figyelembe véve, hogy a munkámnak keretet biztosító projektek egyik legfontosabb célja a *Melolontha melolontha* ellen hatékony fonálféreg-baktérium komplexek kiválasztása) előnyös lett volna, ha Coleoptera sejtvonalal tudok dolgozni, ami viszont nem állt rendelkezésre. Másrészt, a *Photorehabdus* baktériumok által termelt toxinok túlnyomó része elsősorban a rovar bélhámsejtjeit, ill. hemolimfájának sejtjeit támadják meg, a többi típusú sejtre csak mérsékelten toxikusak. Kivételt jelent a Txp40 toxin, hiszen az jól mérhetően aktív az én vizsgálataimnál alkalmazott Sf9 (Lepidoptera) és S2 (Diptera) sejtekre is (Brown és mtsai, 2006). Összességében az Sf9 (Lepidoptera) sejtek érzékenyebbnak bizonyultak, de sem a morfológiai

csoportok, sem a taxonómiai hovatartozás alapján kialakított csoportok nem voltak homogének ezen tulajdonság tekintetében sem.

A *gyrB* gén RFLP analízise egyértelművé tette, hogy a választott morfológiai bélyeg (a telep színe) nem jellemzi jól a baktériumok taxonómiai csoportjait. A sárga, narancs és vörös izolátumok azonosnak bizonyultak, míg a fehér izolátumokat ezzel éppen ellentétesen, két csoportra lehetett bontani. A *gyrB* gén csaknem teljes DNS szekvenciájának elemzése segítségével az új izolátumcsoportok zöme egyértelműen beazonosítható volt, kivéve a fiziológiai paraméterek alapján is jól elkülöníthető szürke színű izolátumokat. A 16S rDNS szekvencia alapján azonban két faji szinten nem azonosított izolátum, egy hollandiai *H. megidis* törzsből származó JUN jelzésű (az *Amphimallon solstitialis* angol elnevezéséből, a June beetle-ből származik a jelölés, Gerritsen és mtsai, 1998), és a Griffin és mtsai (1999) által Magyarországról izolált, HIT jelű (a Hungarian Irish Type rövidítéséből származó jelölés, utalva a szimbionta partnerre, a később *H. downesi* néven leírt, de a cikk megjelenésekor még *H. megidis* 'Irish type' elnevezéssel illetett fonálféregre) azonosnak bizonyult az általam szürke néven jelölt csoporttal. A HIT és JUN izolátumok alapján már Marokházi és mtsai (2003) is egy önálló taxon kialakításának lehetőségére utaltak, amikor 35 *Photorhabdus* izolátum filogenetikai kapcsolatait írták le 10 gén szekvenciájának elemzése alapján. Ebbe a taxonba sorolható izolátum azonban a saját vizsgálataimból származókon kívül a mai napig nem került elő (ez egyúttal azt is jelenti, hogy a JUN izolátum az egyetlen, ami a taxon Magyarországon kívüli előfordulására utal), így az alfaj leírására korábban nem volt lehetőség. A csoport alfaji szintű, önálló taxonként való leírását (Tóth és Lakatos, 2008) azóta két elemzés is megerősítette (Tailliez és mtsai, 2010; An és Grewal, 2010).

A *Steinernema* génuszba tartozó rovarpatogén fonálféreg és a *Xenorhabdus* nemzetségbe tartozó szimbionta baktériumaik párhuzamos evolúciós fejlődését számos tény támasztja alá (Adams és mtsai, 2006). A *Xenorhabdus* génusz fajszáma ugyan nem éri el a *Steinernema*-két, azonban egy fonálféreg faj mindig egy konkrét baktériumfajjal alkot szimbiotikus kapcsolatot úgy, hogy esetenként több közeli rokon fonálféreg közös szimbiontával rendelkezik (Tailliez és mtsai, 2006). A *Heterorhabdus-Photorhabdus* kapcsolatra az eddigi ismeretek szerint nem jellemző a koevolúciós fejlődés. Bár a *Heterorhabdus* génusz jóval fajszegényebb, mint a *Steinernema*, de a *Photorhabdus*ok közé mindössze három faj 9 alfaja (beleértve a *P. temperata subsp. cinerea*-t is) tartozik, és ezek közül öt (a *Photorhabdus luminescens* alfajai) kizárólag a *H. bacteriophora*-val létesít szimbiotikus kapcsolatot (Adams és mtsai, 2006). Továbbá, a *P. asymbiotica* fajt Gerrard és mtsai (2006)

közleményéig nem tudták szimbionta fonálféreghez kapcsolni. Azaz, a fennmaradó 13 *Heterorhabdits* faj mindegyikének a *P. temperata* két alfaja lenne a szimbiontája. Nyilvánvaló, hogy részletesebb faunisztikai elemzések eredményeként, több *Heterorhabdits* törzsből előkerülő nagyobb számú *Photorhabdus* izolátum vizsgálatával a *Photorhabdus* génusz ma még kialakulatlanak tűnő rendszerét is pontosabbá lehetne tenni. Tailliez és mtsai (2010) megjelenés előtt álló közleményükben erre tesznek kísérletet, de nem több izolátum vizsgálatával, hanem a már törzsgyűjteményben megtalálható izolátumok részletesebb, több gén szekvenciájának meghatározására kiterjedő elemzésével. Munkájuk eredményeként négy további alfaji szintű taxon bevezetésére tesznek javaslatot.

Saját munkám tapasztalatai szerint a Magyarországról származó mindhárom *Heterorhabdits* faj legalább kétféle bakteriális szimbiontával fordult elő, s igazolható volt, hogy különböző bakteriális szimbiontájú fonálféreg egy adott élőhelyen együtt is előfordulhatnak. Ez egyrészt ellentmond annak, hogy egy adott fonálféregfaj egy bakteriális szimbiontával él együtt, ill. ha több különböző szimbiontája van, akkor azok földrajzilag izoláltak (Adams és mtsai, 2006). Másrészt, a többféle szimbionta valamilyen adaptációs előnyt feltételez. Hogy létezik-e, és ha igen, akkor milyen előnye származik a fonálféregnek abból, hogy különböző bakteriális szimbionták közül „választhat”, azt kizárólag a baktériumok vizsgálatával nem lehet tisztázni. Annál is inkább, mert pl. a gyenge antibiotikum-termelő képességű és mérsékelt citotoxicitású *P. temperata subsp. cinerea* kifejezetten gyakorinak bizonyult, annak ellenére, hogy e két tulajdonság a feltételezések szerint nem előnyös a fonálféreg-baktérium komplex számára. Az esetleges adaptációs előnyre vonatkozó kérdés megválaszolásához igyekeztem közelebb kerülni a kompetíciós vizsgálatokkal.

6.3. A kompetíciós kísérletek

A rovarpatogén fonálféreggel foglalkozó ökológiai és viselkedésökológiai vizsgálatok zöme a *Steinernema* génusz fajaira korlátozódik (Lewis, 2002). Ennek egyik nyilvánvaló oka a *Steinernema* génusz fajgazdagsága, ill. a *Steinernema* fajok relatív gyakorisága. Ugyanakkor, több *Heterorhabdits* faj is kapható kereskedelmi forgalomban, így az ezekre a fajokra vonatkozó ismereteknek nem csak elméleti, hanem a gyakorlati alkalmazást segítő, ill. annak esetleges kockázatait leíró szerepük is lenne.

Az értekezésben bemutatott vizsgálatok eredményeit három szempontból érdemes értékelni: (i) a bakteriális szimbiontacseré, (ii) a különböző fonálféreg-baktérium komplexek hatékonysága az eltérő rovarokkal szemben, (iii) a szigorú értelemben vett inter- és intraspecifikus kompetíciós helyzetek megítélése.

A *Heterorhabditis-Photorhabdus* kapcsolatot valamennyi, a témával foglalkozó összefoglaló munka izolátum szinten rögzítettnek tekinti (Griffin és mtsai, 2005; Adams és mtsai 2006; Clarke, 2008). Ugyanakkor kizárólag Gerritsen és mtsai (1998) dokumentáltak erre vonatkozó adatokat. Ez utóbbi közleményben aposzimbiotikus (szimbionta baktériumot nem hordozó) fonálféregket állítottak elő, és ezeket injektálták különböző baktériumokkal mesterségesen fertőzött rovarlárvába. A vizsgálatokhoz *H. bacteriophora* és *H. megidis* különböző helyről származó izolátumait és azok szimbionta baktériumait használták. Eredményeik szerint más fonálféregizolátum bakteriális szimbiontájának jelenlétében a fonálféreg reprodukciós sikere kisebb volt, mint a saját szimbionta jelenlétében. Saját vizsgálataimmal egyértelműen igazoltam, hogy két *Heterorhabditis* faj, a *H. downesi* és a *H. megidis* azonos élőhelyen két bakteriális szimbiontával is előfordulhat, úgy, hogy a másik fonálféregfaj ugyanúgy két szimbiontával van jelen. Az ezekkel végzett kevert fertőzések során kétséget kizárólag igazolható volt, hogy mindkét fonálféregfaj kifutott olyan rovartetemből is, amelyet nem a saját eredeti szimbiontája kolonizált, sőt, a baktériumot az infektív lárva továbbvitték és képesek voltak új tesztállatot fertőzni velük. Ez azt jelenti, hogy az adott fonálféreg funkcionálisan két szimbiontát használtak, és azt képesek voltak a körülményeknek megfelelően lecserélni. Az általam alkalmazott kísérleti szituációhoz hasonló, kevert fertőzést eredményező helyzet természetes körülmények között is előfordulhat.

Eredményeim *Heterorhabditis megidis* és *H. downesi* fajok esetén egyértelműen cáfolják azt, hogy egy fonálféreghez kizárólag egy bakteriális szimbionta tartozhat. Továbbá, a faunisztikai adatok alapján feltételezhető, hogy *H. bacteriophora* esetén is hasonló jelenség figyelhető meg, hiszen Bugacról, az erdészeti csemetekertből a fajt két különböző baktériummal (*P. luminescens subsp. laumondii*, ill. *P. luminescens subsp. kayaii*) izoláltam, miként Nyíracsád és Nyírlugos közötti erdős területeken egymástól néhány száz méterre megtaláltam *P. luminescens subsp. kayaii* és *P. luminescens subsp. thracensis* baktériummal.

A kompetíciós célú vizsgálatok egyik leglátványosabb eredményét egy adott fonálféreg-baktérium kombinációval végzett, „homogén” kísérleti beállítások adták. Ez alapján egyértelmű volt, hogy mindkét

fonálféregfaj nagyobb reprodukciós sikert ért el *P. temperata subsp. temperata* baktériummal *Galleria mellonella* (Lepidoptera) lárvákban, míg *P. temperata subsp. cinerea* baktériummal *Tenebrio molitor* (Coleoptera) lárvákban. A jelenség magyarázatát feltételezésem szerint a kétféle baktérium általam is dokumentált eltérő szénforrás-hasznosítási profilja, és a kétféle rovarlárva vélhetően eltérő tápanyag-összetétele adhatja. Amennyiben ez a feltételezés igaz, úgy ez magyarázatot adhat a *P. temperata subsp. cinerea* relatív gyakoriságára, annál is inkább, mert az adott területen a fonálféregek számára potenciálisan rendelkezésre álló gazdaszervezetek közül a leggyakoribb nem más, mint a *Melolontha melolontha* pajorja, amely gyakorisága a mintavételek helyszínét is adó erdőrészekben elérheti a 100 egyed/m² értéket is, Janik G. (ERTI) szóbeli közlése szerint. A másik tömeges gazdaszervezet az *Agrotis sp.* (Lepidoptera) lehet, amely elsősorban az új erdősitések talajában gyakori. Azaz, a *P. temperata subsp. cinerea* a Coleoptera lárvák tápanyagainak hasznosításához adaptálódhatott. A rovarlárva tápanyag-összetétele és a fonálféreg szaporodási sikere közötti összefüggést Shapiro-Ilan és mtsai (2008) vizsgálták. Ők eltérő fehérje és lipidtartalmú táplálékon nevelt *Tenebrio molitor* lárvákba fertőzött *Steinernema feltiae* és *H. bacteriophora* fonálféregnél eltérő reprodukciós rátát tapasztaltak.

A két fonálféregfaj közül a *H. downesi* esetében tűnt a szimbionta baktérium tápanyag-hasznosítási képességétől való függés nagyobbak (vesd össze 5.15. és 5.16. táblázattal), így nem meglepő, hogy a két fonálféregfajjal végzett kompetíciós kísérlet egyik legfeltűnőbb eredményét azon kísérleti beállítások összevetése adja, amikor *Tenebrio molitor* lárváiba mindkét fonálféregfajt azonos baktériummal kombinálva fertőztem be, és a *P. temperata subsp. temperata* mellett a *H. megidis* egyértelműen sikeresebb volt, míg (a feltételezésem szerint Coleoptera lárvákhoz adaptálódott) *P. temperata subsp. cinerea* jelenlétében a két fonálféregfaj azonos reprodukciós eredményt ért el.

A kísérleteim egyik érdekes eredménye, hogy egy adott fonálféregfaj különböző bakteriális szimbiontájú elegyével végzett fertőzés kimenete intraspecifikus kompetícióra utal, hiszen az elegyben végzett fertőzést követően mindkét fonálféregfaj reprodukciós rátája jelentősen kisebb volt, mintha csak az egyik típusú izolátummal végeztem volna a fertőzést. Fonálféregnél intraspecifikus kompetíció előfordulását eddig *Steinernema carpocapsae* esetén igazoltak Vigneux és mtsai (2008), akik többgenerációs laboratóriumi tenyésztési kísérletekkel kimutatták, hogy olyan fonálféregvonalak között, amelyeket generációkon keresztül különféle rovarlárvaiba fertőztek be jelentős volt a fonálféregvonalak közötti kompetíció, és ezzel párhuzamosan, a fonálféregek bakteriális szimbionta partnerei olyan bakteriocineket kezdtek

termelni, amelyek egymással szemben is aktívak voltak. Ettől eltérően, ha a fonálférgeket generációkon keresztül egy adott tesztállatba fertőzték be, akkor az így kialakított vonalak között intrapsecifikus kompetíciót alig tapasztaltak, és a szimbionta baktériumok sem termeltek egymással szemben aktív bakteriocineket. Ezzel a kísérleti eredménnyel az eltérő fajok és a különböző kísérleti rendszer miatt nyilván nem lehet közvetlenül magyarázni a saját megfigyeléseimet, ugyanakkor feltételezhető, hogy a *P. temperata* két alfaja közötti, az antibakteriális aktivitás tekintetében megnyilvánuló különbség szerepet játszhat a saját kísérleteim kimenetelében is. Továbbá, én közvetlenül szabadföldről izolált fonálféregvonalakkal dolgoztam, amelyekről aligha feltételezhető, hogy kizárólag egy gazdaszervezettel találkoztak.

6.4. Az értekezésben bemutatott eredmények gyakorlati hasznosításának lehetőségei

A jelen értekezésben bemutatott vizsgálatokat kivétel nélkül alkalmazott kutatási programok részeként végeztem. Ezek alapvetően három téma köré rendeződnek: a cserebogár pajorok elleni védekezési technológia kidolgozása, a bakteriális anyagcseretermékek hasznosítása, ill. a fonálféreg törzsgyűjteményi tételek vizsgálata különböző kártevőkkel szembeni biológiai növényvédelmi eljárás kifejlesztése céljából.

A cserebogár lárváinak kártételét, annak gazdasági vonatkozásait az értekezés több pontján említettem. A probléma rovarpatogén fonálférgek segítségével történő megoldásához hatékony izolátumokat sikerült találnunk (Lakatos és Tóth, 2006). A fonálférgek előállításának technológiájának kidolgozása (Sisak és mtsai, 2008), ill. megfelelő alkalmazástechnológia kifejlesztése (Somogyi és mtsai, 2008) megtörtént. Az eredmények hasznosításának jelenleg pénzügyi akadályai vannak.

A rovarpatogén baktériumok antibakteriális anyagcseretermékeinek egyik lehetséges hasznosítási iránya az almatermésű gyümölcsfajok *Erwinia amylovora* baktérium által okozott megbetegedésével kapcsolatos. A probléma hatékony, a humángyógyászatban nem alkalmazott antibakteriális hatású hatóanyagok nélkül nehézkes. Az értekezésben bemutatott baktérium-törzsgyűjtemény egyes tételeinek nyers fermentlével végzett laboratóriumi és üvegházi kísérletek eredményei biztatóak (Kormány, 2007).

Az Újfehértói Gyümölcstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft. laboratóriumaiban fenntartott, hazai rovarpatogén fonálféreg törzsgyűjtemény az elmúlt években a környező

országokból származó izolátumokkal is bővült (Laznik és mtsai, 2009). Ezen új, és a törzsgyűjteményben korábbról meglévő izolátumok hatékonyságát számos mezőgazdasági rovarkártevő ellen vizsgáltuk, mint pl. a raktári kártevőként ismert *Sitophilus oryzae* (Laznik és mtsai, 2010a), a gabonafélék levelét károsító *Oulema melanopus* (Laznik és mtsai, 2010b), valamint a burgonya legjelentősebb rovarkártevőjének tekinthető *Leptinotarsa decemlineata* (Laznik és mtsai, 2010c).

7. Összefoglalás

7.1. Bevezetés, célkitűzések

A Steinernematidae és a Heterorhabditidae családba tartozó fonálféreg 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 táplálékul szolgálnak a fonálféreg számára. A fertőzött rovarból kijutó infektív fonálféreglárvák a szimbióta baktériumot továbbviszik újabb rovar gazdaszervezetet keresve. A *Xenorhabdus* és *Photorhabdus* baktériumok kizárólag a fertőzött rovarokban, ill. a fonálféreg infektív lárvaiban találhatók meg, a talajban szabadon nem fordulnak elő (Boemare, 2002).

Az elmúlt két évtizedben a rovarpatogén fonálféreggel és szimbióta baktériumaikkal foglalkozó kutatási projektek száma jelentősen emelkedett, ezzel egyidejűleg a leírt fajok száma is jelentősen nőtt. Ezt az érdeklődést egyértelműen motiválták ezen fonálféreg biológiai növényvédelmi célú alkalmazásának lehetőségei. Ma világszerte csaknem 20 cég gyárt kereskedelmi léptékben rovarpatogén fonálféreg tartalmú terméket.

A rovarpatogén fonálféreggel 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* fonálféreg *Photorhabdus* bakteriális szimbiontáinak jellemzése, az előforduló taxonok gyakoriságának meghatározása.
3. Azonos mintavételi helyről begyűjtött *Heterorhabditis megidis* és *H. downesi* fonálféregek bakteriális szimbionta által befolyásolt kompetíciós viszonyainak leírása laboratóriumi kísérletek segítségével.

7.2. 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 elegendő lomboserdőkből, erdőszegélyekből gyűjtöttünk mintákat. A mintavételek során egy-egy mintavételi pontról 5-5 talajmintát gyűjtöttünk be. A mintákból az EPN törzsek izolálását tesztállat-csapda módszerrel végeztük, azaz a talajba a fonálféreg fertőzésre fogékony, a laboratóriumban könnyen tenyészthető nagy viaszmony (*Galleria mellonella*), ill. lisztbogár (*Tenebrio molitor*) lárváit helyeztük. Az elpusztuló lárvákból a fonálféregket vizes csapdára helyezve futtattuk ki, majd a mosott tenyészettel újra viaszmony, 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 fonálféregek molekuláris biológiai taxonómiája elsősorban a riboszómális RNS-t kódoló gének közé ékelődött, nem kódoló ún. ITS régió vizsgálatán alapul. Jelen munka során az ITS régiót PCR-RFLP módszerrel vizsgáltam.

Az EPN szimbionta baktériumokat a fonálféreg fertív juvenilis stádiumú egyedeiből 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 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 toluidinkék indikátort tartalmazó DNase agaron vizsgáltam. A fiziológiai paraméterek vizsgálatát API 20E (bioMérieux) tesztsíkok, ill. GN2 mikroplatek (Biolog) segítségével végeztem el.

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.

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 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 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 egyed helyezettünk. Az összes beállítást 5 ismétlésben végeztük el. 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, és meghatároztuk a kifutó fonálféreg számát. Amennyiben a rovarlárvákat két különböző fonálféregfaj elegyével kezeltük (I., II., V. és VI. beállítás), úgy a kifutó fonálféregket morfometriai bélyegek alapján identifikáltuk, ill. ha ez alapján a faji hovatartozás kétes volt, úgy PCR-RFLP vizsgálatot végeztünk.

7.3. Eredmények

7.3.1. A magyarországi *Heterorhabditis* fauna felmérése

A mintavételeket követően a laboratóriumba beszállított 1000 db talajmintába helyezett 5000 db tesztállatból (3000 viaszmolylárva ill. 2000 lisztbogárlárva) 465 mintában összesen 981 db állat pusztult el (716 viaszmolylárva ill. 265 lisztbogárlárva). A 981 elpusztult tesztállatból vizes csapdán 329 esetben sikerült fonálféregket kifuttatni, ezek közül 244 bizonyult az ellenőrző fertőzést követően rovarpatogénnak. 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. downesi* és 17 pedig *H. bacteriophora*.

7.3.2. A rovarpatogén fonálféreg szimbionta baktériumai

A vizsgált baktérium izolátumok telep morfológiájuk 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 telep morfológia 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, Európában előforduló 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*-

ból, 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 szimbionttal 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 szimbionttal is élhet együtt, azonban a különböző baktériummal együtt élő fonálférgek 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 szimbionttal 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

7.3.3. A kompetíciós kísérletek

A Dány környékéről begyűjtött 20 talajmintából 17 volt pozitív *Heterorhabditis* fonálférgekre, és összesen 47 tesztállat pusztult el. Ezek közül 44 rovarlárvából sikerült fonálférgeket kifuttatni. A fonálférgek 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 fonálférgek reprodukciós sikere (kifutó infektív lárvák/rovarlárva) mindkét fajnál statisztikailag is igazolhatóan nagyobb volt a *P. t. cinerea* bakteriális szimbionta esetén (75 900 ill. 42 300 *H. downesi*-nél, 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 rovarlárva (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* szimbiotáival (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 fonálféreg eltérő kompetíciós képességűek, és ezt a sajátosságukat a bakteriális szimbionta befolyásolja.

8. Summary

8.1. 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.

8.2. 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. 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).

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. 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).

The systematics of entomopathogenic bacteria based on the analysis of 16S rDNA, however, the *gyrB* gene provides more useful data for investigating intrageneric 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).

20 soil samples 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.

8.3. Results

8.3.1. The Hungarian *Heterorhabditis* fauna

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. downsi*, while the remaining 17 were *H. bacteriophora*.

8.3.2. Symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes

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 European 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).

8.3.3. Results of competition experiments

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.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt köszönet illeti meg két szegedi konzulensemét, Dr. Dorgai Lászlót és Dr. Kovács Kornélt, akik a Szegedi Tudományegyetem Biológia Doktori Iskola, Biotechnológia doktori programjának keretein belül felügyelték és irányították munkámat, és Dr. Horváth Rolandot, aki a Debreceni Egyetem Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola, Teresztris és kvantitatív ökológia programjának keretein belül tette ugyanezt.

Köszönet illeti meg Dr. Inánsy Ferencet, az Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Nonprofit Közhasznú Kft igazgatóját, aki lehetővé tette, és mindenben támogatta munkámat, illetve a Kutató Állomás minden dolgozóját, akik bármilyen módon is hozzájárultak, hogy ez a munka a végére érjen.

Különös köszönettel és hálával tartozom munkahelyi vezetőmnek, Dr. Lakatos Tamásnak. Nélküle most nem tarthatná a kezében ezt az értekezést az Olvasó.

Köszönöm Ziga Lazniknak, a Ljubljana-i Egyetem munkatársának a közösen végzett munkát, és az inspirációt a gyakorlati alkalmazási célú kísérletek folytatásához. (Thanks, Ziga.)

Ezen a helyen kell köszönetet mondanom közvetlen kollégáimnak, Somogyi Istvánnak, a sok segítségért az együtt töltött terepi munkák során, Kaskötő Zoltánnak a sok aprólékos laboratóriumi munkáért és az értekezésben szereplő fényképekért, és Somogyi Enikőnek, akire bármiben számíthattam.

Köszönöm Dr. Bubán Tamásnak, a Kutató Állomás nyugalmazott tudományos tanácsadójának, hogy hosszú beszélgetéseink alatt megtanulhattam, mi az: „kutatónak lenni”.

Köszönöm minden kutatóhely dolgozójának, akikkel valaha munkakapcsolatban álltam a sok-sok adatot, mintát és munkát, amit a közös projektek során kaptam tőlük: Kormány Arankának és Dr. Budai Csabának a Csongrád Megyei Növény- és Talajvédelmi Igazgatóság dolgozóinak, Dr. Csóka Györgynek és Janik Gergelynek, az ERTI munkatársainak, és Dr. Sisak Csabának, a Pannon Egyetem Műszaki Kémiai Kutatóintézet néhai tudományos főmunkatársának.

Hálás köszönettel tartozom Szabó Lászlónak, aki sohase hagyta, hogy feladjam, és édesanyámnak, aki sokévnnyi áldozatos munkával támogattott. És külön köszönet minden barátomnak, akik tartották bennem a lelket, és végtelen türelemmel elviselték ezt az időszakot.

Köszönöm.

10. Irodalomjegyzék

- Adams BJ, Burnell AM, and Powers TO. 1998. A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nemata: Rhabditidae) based on Internal Transcribed Spacer 1 DNA sequence data. *J. Nematol.* 30: 22-39.
- Adams BJ, Fodor A, Koppenhöfer HS, Stackebrandt E, Stock SP, and Klein MG. 2006. Biodiversity and systematics of nematode-bacterium entomopathogens. *Biol. Cont.* 37: 32-49.
- Akhurst RJ. 1980. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121: 303-309.
- Akhurst RJ, and Boemare NE. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R, and Kaya HK (Eds.). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, pp. 75-90.
- Akhurst RJ. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. *J. Gen. Microbiol.* 128: 3061-3065.
- 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: 1301-1310.
- An R, and Grewal P. 2010. *Photorhabdus temperata* subsp. *stackebrandtii* subsp. nov. (Enterobacteriales: Enterobacteriaceae). *Curr. Microbiol.* DOI 10.1007/s00284-010-9610-9
- Bennett HP, and Clarke DJ. 2005. The pbgPE operon in *Photorhabdus luminescens* is required for pathogenicity and symbiosis. *J. Bacteriol.* 187: 77-84.
- Blaxter ML, de Ley P, Garey JR, Liu LX, Scheldman P, Vierstraete A, Vanfleteren JR, Mackey LY, Dorris M, Frisse LM, Vida JT, and Thomas WK. 1998. A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392: 71-75.
- Boemare NE, and Akhurst RJ. 1988. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *J. Gen. Microbiol.* 134: 751-761.
- Boemare NE, Boyer-Giglio MH, Thaler JO, Akhurst RJ, and Brehelin M. 1992. Lysogeny and bacteriocinogeny in *Xenorhabdus nematophilus* and other *Xenorhabdus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3032-3037.

- Boemare NE, Akhurst RJ, and Mourant RG. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 249-255
- Boemare N. 2002. Biology, taxonomy and systematics of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*. In: Gaugler R (Ed.): *Entomopathogenic nematology*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 35-56.
- Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, Andreev O, Golubeva E, Bhartia R, and ffrench-Constant RH. 1998. Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280: 2129-2132.
- Bowen DJ, and Ensign JC. 1998. Purification and characterization of a high-molecular-weight insecticidal protein complex produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3029-3035.
- Brenner DJ. 1999. Additional genera of Enterobacteriaceae. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K.-H, and Stackebrandt E. (Eds.). *The prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community*. Release 3.0. New York, NY, USA, Springer-Verlag, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>
- Brenner DJ, and Farmer III JL. 2005. Family I. Enterobacteriaceae. In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, and Staley JT (Eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology, volume 2: The Proteobacteria, part B: The Gammaproteobacteria*, 2nd edition. New York, USA, Springer, pp. 587-607.
- Brown SE, Cao AT, Dobson P, Hines ER, Akhurst RJ, and East PD. 2006. Txp40, a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1653-1662.
- Chapuis E, Emelianoff V, Paulmier V, Le Brun N, Pages S, Sicard M, and Ferdy JB. 2009. Manifold aspects of specificity in a nematode-bacterium mutualism. *J. Evol. Biol.* 22: 2104-2117.
- Chen G, Dunphy GB, and Webster JM. 1994. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photorhabdus luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Heterorhabditis megidis*. *Biol. Cont.* 4: 157-162.
- Clarke DJ. 2008. *Photorhabdus*: a model for the analysis of pathogenicity and mutualism. *Cell Microbiol.* 10: 2159-2167.
- Crosland RD, Hsiao TH, and McClure WO. 1984. Purification and characterization of beta-leptinotarsin-h an activator of presynaptic calcium channels. *Biochemistry* 23: 734-741.
- Crosland RD, Fitch RW, and Hines HB. 2005. Characterization of beta-leptinotarsin-h and the effects of calcium flux antagonists on its activity. *Toxicon* 45: 829-841.
- Daborn PJ, Waterfield N, Silva CP, Au CP, Sharma S, and ffrench-Constant RH. 2002. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf),

- allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99: 10742-10747.
- Dix I, Burnell AM, Griffin CT, Joyce SA, Nugent MJ, and Downes MJ. 1992. The identification of biological species in genus *Heterorhabditis* (Nematoda: Hererorhabditidae) by cross-breeding second-generation amphimictic adults. *Parasitology* 104: 509-518.
- Dowds BCA, and Peters A. 2002. Virulence mechanisms. In: Gaugler R (Ed.): *Entomopathogenic nematology*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 79-98.
- Duchaud E, Rusniok C, Frangeul L, Buchrieser C, Givaudan A, Taourit S, Bocs S, Boursaux-Eude C, Chandler M, Charles JF, Dassa E, Derose R, Derzelle S, Freyssinet G, Gaudriault S, Medigue C, Lanois A, Powell K, Siguier P, Vincent R, Wingate V, Zouine M, Glaser P, Boemare N, Danchin A, and Kunst F. 2003. The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Nat. Biotechnol.* 21: 1307-1313.
- Ehlers R.-U, Stoessel S, and Wyss U. 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. *Rev. Nematol.* 13: 417-424.
- Ehlers R.-U, Shapiro-Ilan DI. 2005. Mass production. In: Grewal PS, Ehlers R.-U, Shapiro-Ilan DI (Eds.). *Nematodes as biocontrol agents*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 65-78.
- Emelianoff V, Sicard M, Le Brun N, Moulia C, and Ferdy JB. 2007. Effect of bacterial symbionts *Xenorhabdus* on mortality of infective juveniles of two *Steinernema* species. *Parasitol. Res.* 100: 657-659.
- Emelianoff V, Chapuis E, Le Brun N, Chiral M, Moulia C, and Ferdy JB. 2008. A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts. *Evolution* 62: 932-942.
- Emelianoff V, Le BN, Pages S, Stock SP, Tailliez P, Moulia C, and Sicard M. 2008. Isolation and identification of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from Herault and Gard (Southern France). *J. Invertebr. Pathol.* 98: 211-217.
- Ensign JC, Bowen DJ, and Bintrim SB. 1990. Cryatalline inclusion proteins and an insecticidal toxin of *Xenorhabdus luminescens* stain NC-19. *Proceedings and Abstracts of the Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control*. Society for Invertebrate Pathology, Adelaide, Australia, p. 218.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- ffrench-Constant RH, Waterfield NR, Daborn P, Joyce S, Bennett H, Au C, Dowling A, Boundy S, Reynolds S, and Clarke D. 2003. *Photorhabdus*: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 433-456.

- ffrench-Constant RH, Dowling A, and Waterfield NR. 2007. Insecticidal toxins from *Photorhabdus* bacteria and their potential use in agriculture. *Toxicon* 49: 436-451.
- Fischer-Le Saux M, Vaillard V, Brunel B, Normand P, and Boemare NE. 1999. Polyphasic classification of the genus *Photorhabdus* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 1645-1656.
- Forst S, and Neelson K. 1996. Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. *Microbiol. Rev.* 60: 21-43.
- Forst S, Dowds B, Boemare N, and Stackebrandt E. 1997. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 47-72.
- Földes L, and Lakatos T. 2004. A rovarpatogén fonálférgek cserebogárpajorok elleni alkalmazása. In: Inántszy F, and Lakatos T (Eds.). *Biológiai növényvédelem – A rovarpatogén fonálférgek gyakorlati alkalmazása.* Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht, Újfehértó, Hungary.
- Gaudriault S, Duchaud E, Lanois A, Canoy AS, Bourot S, Derosé R, Kunst F, Boemare N, and Givaudan A. 2006. Whole-genome comparison between *Photorhabdus* strains to identify genomic regions involved in the specificity of nematode interaction. *J. Bacteriol.* 188: 809-814.
- Gerrard JG, Joyce SA, Clarke DJ, ffrench-Constant RH, Nimmo GR, Looke DF, Feil EJ, Pearce L, and Waterfield NR. 2006. Nematode symbiont for *Photorhabdus asymbiotica*. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1562-1564.
- Gerritsen LJM, Wiegiers GL, and Smith PH. 1998. Pathogenicity of new combinations of *Heterorhabditis* spp. and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* and *Tipula oleracea*. *Biol. Cont.* 13: 9-15.
- Givaudan A, Baghdiguian S, Lanois A, and Boemare N. 1995. Swarming and Swimming Changes Concomitant with Phase Variation in *Xenorhabdus nematophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1408-1413.
- Griffin C.T., Dix I., Joyce S.A., Burnell A.M., Downes M.J. 1999. Isolation and characterisation of *Heterorhabditis* spp. (Nematoda: Heterorhabditidae) from Hungary, Estonia and Denmark. *Nematology* 1: 321-332
- Han R, and Ehlers RU. 2000. Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *J. Invertebr. Pathol.* 75: 55-58.
- Hazir S, Stackebrandt E, Lang E, Schumann P, Ehlers RU, and Keskin N. 2004. Two new subspecies of *Photorhabdus luminescens*, isolated from *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Heterorhabditidae): *Photorhabdus luminescens* subsp. *kayaii* subsp. nov. and *Photorhabdus luminescens* subsp. *thracensis* subsp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 36-42.

- Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, and Williams ST. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edition. Baltimore, MD, USA, Williams and Wilkins, pp. 188-189.
- Hominick WM, Briscoe BR, del Pino FG, Heng JA, Hunt DJ, Kozodoy E, Mracek Z, Nguyen KB, Reid AP, Spiridonov S, Stock P, Sturhan D, Wuturu C, and Yoshida M. 1997. Biosystematics of entomopathogenic nematodes current status, protocols and definitions. *J. Helminthol.* 71: 271-298
- Hominick WM. 2002. Biogeography. In: R. Gaugler (Ed.), *Entomopathogenic nematology*. CABI Publishing, Oxon, New York, pp. 115-144.
- Hunt DJ. 2007. Overview of taxonomy and systematics. In: Nguyen KB, and Hunt DJ (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. Brill Academic Publishers, Leiden, pp. 25-57.
- Hurst MR, Glare TR, Jackson TA, and Ronson CW. 2000. Plasmid-located pathogenicity determinants of *Serratia entomophila*, the causal agent of amber disease of grass grub, show similarity to the insecticidal toxins of *Photorhabdus luminescens*. *J. Bacteriol.* 182: 5127-5138.
- Hurst MR, Glare TR, and Jackson TA. 2004. Cloning *Serratia entomophila* antifeeding genes - a putative defective prophage active against the grass grub *Costelytra zealandica*. *J. Bacteriol.* 186: 5116-5128.
- Johnigk S-A, and Ehlers R-U. 1999. *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology* 1: 717-726.
- Kaya HK, Aguilera MM, Alumai A, Choo HY, de la Torre M, Fodor A, Ganguly S, Hazir S, Lakatos T, Pye A, Wilson M, Yamanaka S, Yang H, and Ehlers R.-U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. *Biol. Cont.* 38: 134-155.
- Khan A, Brooks WM, and Hirschmann H. 1976. *Chromonema heliothidis* n. gen., n. sp. (Steinernematidae, Nematoda), a parasite of *Heliothis zea* (Noctuidae, Lepidoptera), and other insects. *J. Nematol.* 8: 159-168.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evolution* 16: 111-120.
- Kormány A. 2007. Rovarpatogén baktériumok antibakteriális hatású termékeinek tesztelése izolált virágokon, ill. konténeres almanövényeken *Erwinia amylovora* ellen. Kutatói Nap, Újfehértó, 2007. január 25. (összefoglaló)
- Lakatos T, and Tóth T. 2006. Biological control of European cockchafer larvae (*Melolontha melolontha* L.) – preliminary results. *J. Fruit Orn. Plant Res.* 14: 73-79.
- Laznik Ž, Tóth T, Lakatos T, Vidrih M, and Trdan S. 2009. First record of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Rhabditida: Steinernematidae) in Slovenia. *Helminthologia* 46: 135-138.

- Laznik Ž, Tóth T, Lakatos T, Vidrih M, and Trdan S. 2010a. The activity of three new strains of *Steinernema feltiae* against adults of *Sitophilus oryzae* under laboratory conditions. *J. Food, Agr. Env.* 8: 150-154.
- Laznik Ž, Tóth T, Lakatos T, Vidrih M, and Trdan S. 2010b. *Oulema melanopus* (L.) (Coleoptera: Chrysomelidae) adults are susceptible to entomopathogenic nematodes (Rhabditida) attack: results from a laboratory study. *J. Plant Dis. Prot.* 117: 30-32.
- Laznik Ž, Tóth T, Lakatos T, Vidrih M, and Trdan S. 2010c. Control of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* [Say], Coleoptera, Chrysomelidae) on potato under field conditions: a comparison of the efficacy of foliar application of two strains of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) and spraying with thiametoxam. *J. Plant Dis. Prot.* 117: 129-135.
- Lewis E. 2002. Behavioural Ecology. In: Gaugler R, and Kaya HK (Eds). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, pp. 205-224.
- Li J, Chen G, and Webster JM. 1997. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Can. J. Microbiol.* 43: 770-773.
- Li J, Hu K, and Webster JM. 1998. Antibiotics from *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *Chem. Het. Comp.* 34: 1561-1570.
- Liu D, Burton S, Glancy T, Li Z.S, Hampton R, Meade T, and Merlo DJ. 2003. Insect resistance conferred by 283-kDa *Photorhabdus luminescens* protein TcdA in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* 21: 1307-1313.
- Lucskai A, and Tóth T. 2004. A hazai rovarpatogén fonálféreg törzsek taxonómiai vizsgálatának eredményei. In: Inántszy F, and Lakatos T (Eds.). *Biológiai növényvédelem – A rovarpatogén fonálféreg gyakorlati alkalmazása*. Újfehértói Gyümölcsstermesztési Kutató és Szaktanácsadó Kht, Újfehértó, Hungary.
- Madeddu L, Pozzan T, Robello M, Rolandi R, Hsiao TH, and Meldolesi J. 1985. Leptinotoxin-h action in synaptosomes, neurosecretory cells, and artificial membranes: stimulation of ion fluxes. *J. Neurochem.* 45: 1708-1718.
- Miljanich GP, Yeager RE, and Hsiao TH. 1998. Leptinotarsin-D, a neurotoxic protein, evokes neurotransmitter release from, and calcium flux into, isolated electric organ nerve terminals. *J. Neurobiol.* 19: 373-386.
- Marokházi J, Waterfield N, LeGoff G, Feil E, Stabler R, Hinds J, Fodor A, and French-Constant RH. 2003. Using a DNA microarray to investigate the distribution of insect virulence factors in strains of *Photorhabdus* bacteria. *J. Bacteriol.* 185: 4648-4656.
- McInerney BV, Gregson RP, Lacey MJ, Akhurst RJ, Lyons GR, Rhodes SH, Smith DR, Engelhardt LM, and White AH. 1991a. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity. *J. Nat. Prod.* 54: 774-784.

- McInerney BV, Taylor WC, Lacey MJ, Akhurst RJ, and Gregson RP. 1991b. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity. *J. Nat. Prod.* 54: 785-795.
- Mracek Z, and Jenser G. 1988. First report of entomogenous nematodes of the families Steinernematidae and Heterorhabditidae from Hungary. *Acta Phytopath. Entomol. Hun.* 23:153-156.
- Mracek Z, Becvar S, Kindlmann P, and Jersakova J. 2005. Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biol. Cont.* 34: 27-37.
- Nguyen KB, and Smart GC. 1994. *Neosteinerinema longicurvicauda* n. gen., n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae), a Parasite of the Termite *Reticulitermes flavipes* (Koller). *J. Nematol.* 26: 162-174.
- Nguyen KB, and Hunt DJ (Eds). 2007. *Entomopathogenic Nematodes: Systematics, Phylogeny and Bacterial Symbionts*. Brill Academic Publishers, Leiden.
- Paul VJ, Frautschy S, Fenical W, and Neilson KH. 1981. Antibiotics in microbial ecology, isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds from the insect-symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *J. Chem. Ecol.* 7: 589-597.
- Plichta KL, Joyce SA, Clarke D, Waterfield N, and Stock SP. 2009. *Heterorhabditis gerrardi* n. sp. (Nematoda: Heterorhabditidae): the hidden host of *Photorhabdus asymbiotica* (Enterobacteriaceae: gamma-Proteobacteria). *J. Helminthol.* 83: 309-320.
- Poinar JR GO, and Thomas GM. 1965. A new bacterium, *Achromobacter nematophilus* sp. Nov. (Achromobacteriaceae: Eubacteriales), associated with a nematode. *Int. Bull. Bacteriol. Nom. Tax.* 15: 249-252.
- Poinar JR GO. 1976. Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. N. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.). *Nematologica* 21: 463-470.
- Poinar JR GO. 1990. Taxonomy and biology of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In: Gaugler R, and Kaya HK (Eds). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, pp. 23-61.
- Poinar JR GO. 1993. Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinerinema*. *Fund. Appl. Nematol.* 16: 333-338.
- Ramia S, Neter E, and Brenner DJ. 1982. Production of enterobacterial common antigen as an aid to classification of newly identified species of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 395-398.
- Rolston AN, Griffin CT, and Downes MJ. 2005. Distribution of entomopathogenic nematodes in an Irish sand dune system. *Nematology* 7: 259-266.
- Rosselló-Mora R, and Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25: 39-67.

- Saitou N, and Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evolution* 4: 406-425.
- Shapiro-Ilan D, Rojas MG, Morales-Ramos JA, Lewis EE, and Tedders WL. 2008. Effects of host nutrition on virulence and fitness of entomopathogenic nematodes: Lipid- and protein-based supplements in *Tenebrio molitor* diets. *J. Nematol.* 40: 13-19.
- Sicard M, Le Brun N, Pages S, Godelle B, Boemare N, and Moulia C. 2003. Effect of native *Xenorhabdus* on the fitness of their *Steinernema* hosts: contrasting types of interaction. *Parasitol. Res.* 91: 520-524.
- Sicard M, Ferdy JB, Pages S, Le Brun N, 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: 985-993.
- Sicard M, Tabart J, Boemare NE, Thaler O, and Moulia C. 2005. Effect of phenotypic variation in *Xenorhabdus nematophila* on its mutualistic relationship with the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *Parasitology* 131: 687-694.
- Sicard M, Hinsinger J, Le Brun N, Pages S, Boemare NE, and Moulia C. 2006. Interspecific competition between entomopathogenic nematodes (*Steinernema*) is modified by their bacterial symbionts (*Xenorhabdus*). *BMC Evol. Biol.* 6: 68.
- Sisak Cs, Kaskötő Z, Tóth T, and Lakatos T. 2008. Cultivation conditions of biocomplexes applicable to control *Melolontha melolontha*. *IOBC wprs Bulletin* 31: 297-301.
- Smigielski AJ, Akhurst RJ, and Boemare NE. 1994. Phase Variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: Differences in Respiratory Activity and Membrane Energization. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 120-125.
- Somogyi I, Tóth T, Fodor I, and Lakatos T. 2008. Üzemi kijuttatási kísérletek rovarpatogén fonálféreg tartalmú biológiai növényvédelmi készítményhez. *Kertgazdaság* 40: 67-73.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kampfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, and Whitman WB. 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52: 1043-1047.
- Stock SP, Griffin CT, and Burnell AM. 2002. Morphological characterisation of three isolates of *Heterorhabditis* Poinar, 1976 from the 'Irish group' (Nematoda: Rhabditida: Heterorhabditidae) and additional evidence supporting their recognition as a distinct species, *H. downesi* n. sp. *Sys Parasit.* 51: 95-106.
- Stock SP, Al BL, Darwish R, and Katbeh A. 2008. Diversity and distribution of entomopathogenic nematodes (Nematoda: Steinernematidae, Heterorhabditidae) and their bacterial symbionts (gamma-Proteobacteria: Enterobacteriaceae) in Jordan. *J. Invertebr. Pathol.* 98: 228-234.

- Suhadolkin RJ. 1970. *Nucleoside Antibiotics*. John Wiley, New York, 442 pp.
- Szállás E, Koch C, Fodor A, Burghardt J, Buss O, Szentirmai A, Nealon KH, and Stackebrandt E. 1997. Phylogenetic evidence for the taxonomic heterogeneity of *Photorhabdus luminescens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 402-407.
- Tailliez P, Pages S, Ginibre N, and Boemare N. 2006. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 2805-2818.
- Tailliez P, Laroui C, Ginibre N, Paule A, Pages S, and Boemare N. 2010. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov., *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *khanii* subsp. nov., *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov., and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijs.0.014308-0
- Tamura K, Dudley J, and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599
- Tavares F, Lawson JP, and Meyers AI. 1996. Total synthesis of Streptogramin antibiotics-Madumycin II. *J. Am. Chem. Soc.* 118: 3303-3304.
- Thomas GM, and Poinar JR GO. 1979. *Xenorhabdus* gen. nov, a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29: 352-360.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmoguin F, and Higgins DG. 1997. The clustalx windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res.* 24: 4876-4882.
- Tóth T, and Lakatos T. 2008. *Photorhabdus temperata* subsp. *cinerea* subsp. nov., isolated from *Heterorhabditis* nematodes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 2579-2581.
- Vigneux F, Bashey F, Sicard M, and Lively CM. 2008. Low migration decreases interference competition among parasites and increases virulence. *J. Evol. Biol.* 21: 1245-1251.
- Waterfield N, Dowling A, Sharma S, Daborn PJ, Potter U, and ffrench-Constant RH. 2001a. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5017-5024.
- Waterfield NR, Bowen DJ, Fetherston JD, Perry RD, and ffrench-Constant RH. 2001b. The tc genes of *Photorhabdus*: a growing family. *Trends Microbiol.* 9: 185-191.
- Waterfield N, Kamita SG, Hammock BD, and ffrench-Constant R. 2005. The *Photorhabdus* Pir toxins are similar to a developmentally regulated insect protein but show no juvenile hormone esterase activity. *FEMS Microbiol. Lett.* 245: 47-52.

- Webster JM, Chen G, and Li J. 1998. Parasitic worms: an ally in the war against the superbugs. *Par. Today*. 14: 161-163.
- Webster JM, Li J, Chen G. 2000. Anticancer property of dithiopyrrolones. *US patent*. No. 6,020,360.
- Webster JM, Chen G, Hu K, Li J. 2002. Bacterial Metabolites. In: Gaugler R, and Kaya HK (Eds). *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL, USA, CRC Press, pp. 99-114.
- Yamamoto S, and Harayama S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1104-1109.

Képek, Függelék



1. kép: Talajminták a bennük elhelyezett tesztállatokkal



2. kép: *Galleria mellonella* lárvából vizes csapdán kifutó rovarpatogén fonálférgek tömege



3. kép: A baktériumizolátumok 6 morfológiai csoportja



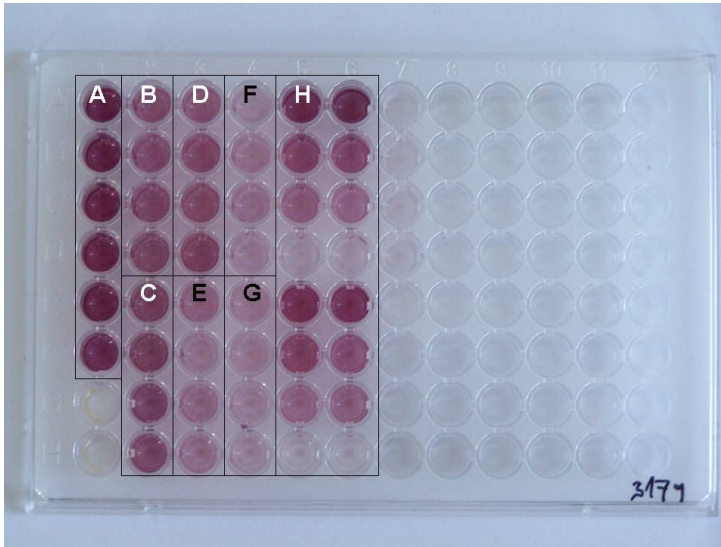
4. kép: *Photorhabdus* izolátum erős hemolitikus aktivitása birkavéres agaron



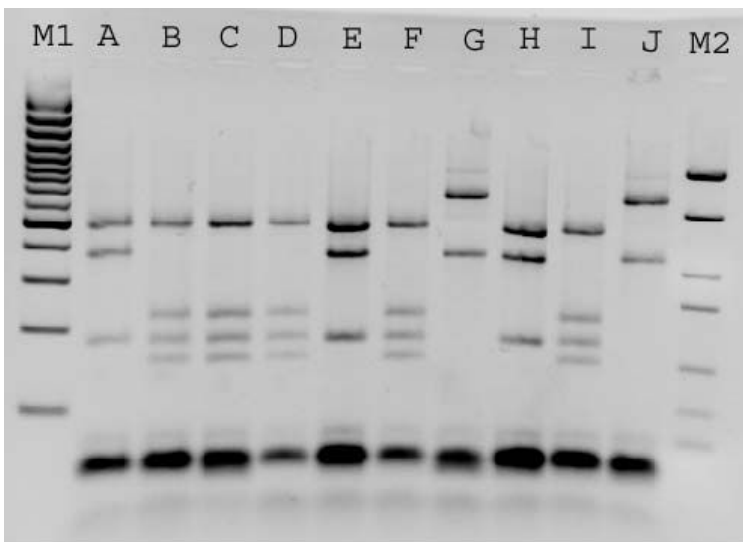
5. kép: *Photorhabdus* izolátum API 20E képe



6. kép: A 3210 izolátum lyuktesztjének eredménye *B. subtilis* lemezen. A kioltási gyűrű koncentrikus körei jelzik, hogy az antimikrobiális hatóanyag többkomponensű. Kontroll: 100 ppm streptomycin



7. kép: A *Photorhabdus temperata subsp. temperata* 3179 izolátum fermentációja során különböző időpontban vett sejtmentes fermentlé mintákkal végzett MTT sejt-proliferációs teszt. A – kontroll, B- a fermentáció 8. órájában vett minta, C – 16 h, D – 24 h, E – 32 h, F – 40 h, G – 48 h, H – kalibrációs kezelés



8. kép: *Photorhabdus* izolátumok gyrB génjének RFLP mintázata, MetaPhor agaróz gélen, *AluI* hasítással. A, E, H – sárga izolátumok, B, C, D, F, I – szürke izolátumok, G, J – fehér izolátumok, M1, M2 – molekulaméret marker



9. kép: Az intakt és a különböző baktériumok által elpusztított *Galleria mellonella*, ill. *Tenebrio molitor* lárva színe. Balról jobbra: Intakt egyed, *P. t. subsp. temperata* által elpusztult egyed, *P. t. subsp. cinerea* által elpusztult egyed

Függelék: A rovarpatogén fonálférgek izolálása céljából, 2005-ben begyűjtött talajminták legfontosabb adatai a területileg illetékes erdőgazdaság adatbázisa szerint, ill. az előkerült fonálféreg izolátumok száma.

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izolátum
Borszőrcsök	36D	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S.
Doba	6A	Kocsányos tölgy/Cser/Feketedió	Rozsdabarna erdőtalaj	1 H.m.
Doba	4F	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Doba	23D	Kocsányos tölgy/Cser/Gyertyán	Rozsdabarna erdőtalaj	2 S.
Doba	11D	Erdeifenyő/Kislevelű hárs	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S.
Káptalanfa	18B	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Káptalanfa	16B	Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Devecser	9C	Kocsányos tölgy/Cser/Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	2 S.
Récutó	8B	Kocsányos tölgy/Magas kőris/Feketedió	Rozsdabarna erdőtalaj	2 S./1 H.m.
Récutó	8A	Kocsányos tölgy/Kislevelű hárs	Rozsdabarna erdőtalaj	2 S./1 H.m.
Devecser	11A	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Káptalanfa	2A	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Káptalanfa	32C	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	3 S.
Nyírad	33A	Cser/Kocsányos tölgy	Pszudoglejjes barna erdőtalaj	0
Nyírad	23C	Kocsányos tölgy/Cser	Pszudoglejjes barna erdőtalaj	0
Nyírad	7B	Kocsányos tölgy/Cser	Pszudoglejjes barna erdőtalaj	1 H.m.
Kolontár	3A	Cser/Kocsányos tölgy/Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	6 H.megidős
Kolontár	4A	Vörös tölgy/Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	10 H.m./2 S.
Kolontár	12C	Kocsányos tölgy	Pszudoglejjes barna erdőtalaj	2 H.m.
Kolontár	16G	Kocsányos tölgy/Cser	Pszudoglejjes barna erdőtalaj	0
Isaszeg	20A	Cser/Kocsányos tölgy	Humuszos homok	3 H.m./2 H.b./1 S.
Isaszeg	27A	Akác	Humuszos homok	7 H.m./1 H.d.
Isaszeg	18A	Erdeifenyő	Humuszos homok	3 H.m.
Isaszeg	81D	Kocsánytalan tölgy/Cser/egyéb kemény lomb	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Dány	13E	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	2 H.d.
Dány	15B	Cser/Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	0

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izrolátum
Dány	15C	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	1 H.d.
Dány	11C	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	6 H.m./1 H.d.
Dány	11D	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	5 H.d./2 S.
Isaszeg	59B	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Dány	2D/1	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	2 H.m./2 H.d.
Dány	2D/2	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	1 H.d.
Dány	3A	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Dány	3C	Kocsánytalan tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	3 H.d.
Dány	8A	Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Dány	20A	Cser	Humuszos homok	1 H.d.
Isaszeg	44C	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Isaszeg	12B	Cser/Kocsánytalan tölgy	Humuszos homok	4 H.d.
Isaszeg	4C	Cser/Akác/Pusztaszil	Rozsdabarna erdőtalaj	3 H.d.
Isaszeg	8B	Cser/Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	2 H.d.
Kaszó	21G	Cser/Mézgás éger/Gyertyán	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kaszó	17H	Cser/Kocsányos tölgy/Gyertyán/Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S.
Kaszó	21G	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Somogyzob	22E	Kocsányos tölgy/Mézgás éger/Cser/Gyertyán	Rozsdabarna erdőtalaj	3 S.
Szenta	5F	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	2 S.
Szenta	5E	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S.
Szenta	5D	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S.
Szenta	24G	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Szenta	27K	Kocsányos tölgy/Cser/Hegyi juhar	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Szenta	27A	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Szenta	28J	Kocsányos tölgy/Cser/Mézgás éger	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Szenta	37F	Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	5 S.
Szenta	52A	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	5 S.
Szenta	62N	Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	0

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izrolátum
Szenta	60J	Erdeifenyő/Feketefenyő/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Bolhás	6J	Kocsányos tölgy/Magas kőris/Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Szenta	81F	Erdeifenyő/Mézgás éger	Humuszos homok	3 H.d.
Szenta	90L	Kocsányos tölgy/Gyertyán	Réti erdőtalaj	0
Szenta	90Q	Vörös tölgy/Gyertyán/Magas kőris/Erdeifenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Csicsó	4K	Kocsányos tölgy/Szürke nyár/Mézgás éger	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Ásotthalom	89B	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	92I	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	98J	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	98A	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	98G	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	97E	Szürke nyár/Erdeifenyő/Feketefenyő/Akác	Humuszos homok	2 S.
Ásotthalom	101D	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	101F	Szürke nyár/Akác	Humuszos homok	0
Ásotthalom	95D	Akác	Humuszos homok	1 H.d.
Ásotthalom	77	Szürkenyár	Humuszos homok	0
Ásotthalom	Telepítés	Szürkenyár	Humuszos homok	12 H.d./1 S.
Ásotthalom	121A	Erdeifenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	120G	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	120D	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Ásotthalom	89A	Szürke nyár/Akác	Humuszos homok	0
Ásotthalom	305C	Cser/Kocsányos tölgy	Humuszos homok	0
Ásotthalom	304/U,X	Fekete dió/Platán/Mocsártölgy	Humuszos homok	0
Ásotthalom	301I	Cser/Gyertyán/Turkesziáni szil	Humuszos homok	0
Ásotthalom	301M	Fekete dió/Hegyi juhar/Platán/egyéb kemény lomb	Humuszos homok	0
Ásotthalom	301R	Feketefenyő/egyéb kemény lomb	Humuszos homok	0
Mesztegnő	5I	Kocsányos tölgy/Vörös tölgy/Cser/Akác	Kov. barna erdőtalaj	0
Mesztegnő	6C	Fekete dió	Kov. barna erdőtalaj	0

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izrolátum
Mesztegnyő	6M	Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S.
Mesztegnyő	7N	Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S./1 H.m.
Bőhőnye	19G	Kocsányos tölgy/Magas kóris/Cser/Vörös tölgy	Réti erdőtalaj	0
Bőhőnye	18H	Szlavón tölgy/Mézgás éger/Erdeifenyő/Gyertyán	Rozsdabarna erdőtalaj	1 S.
Bőhőnye	22G	Erdeifenyő/Kocsányos tölgy/Gyertyán/Mézgás éger	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Bőhőnye	24B	Kocsányos tölgy/Vörös tölgy/Lucfenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	3 S.
Bőhőnye	24H	Kocsányos tölgy/Vörös tölgy/Lucfenyő	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Bőhőnye	24J	Vörös tölgy/Cser/Akác	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	15A	Cser/Fekete dió/Gyertyán	Réti erdőtalaj	4 H.m.
Kúp	8A	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	8B	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	7 S.
Kúp	7B	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	9A	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	3 S.
Kúp	11A	Cser/Fekete dió/Királydió	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	20B	Cser/Sajmegg/Vadkörte	Rozsdabarna erdőtalaj	7 S.
Kúp	25A	Cser/Fekete dió/Kocsányos tölgy/Gyertyán	Humuszos homok	4 S./1 H.m.
Kúp	26B	Vörös tölgy/Cser/Fekete dió	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	27B	Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	28B	Kocsányos tölgy/Cser/Fekete dió	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	24C	Cser/Gyertyán/Kislevelű hárs	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	31B	Cser/Kislevelű hárs/Vadkörte	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	31C	Kocsányos tölgy/Kocsánytalan tölgy/Vörös tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	30C	Kocsányos tölgy/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	47A	Vörös tölgy/Kocsánytalan tölgy/Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	32D	Kocsányos tölgy/Fekete dió/Kislevelű hárs	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	33E	Vörös tölgy/Fekete dió	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	33G	Kocsányos tölgy/Fekete dió/Királydió	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Kúp	44B	Kocsányos tölgy/Gyertyán/Kislevelű hárs	Rozsdabarna erdőtalaj	0

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izrolátum
Mátraverebély	30A	Cser/Kocsánytalan tölgy/Kocsányos tölgy	Barnaföld	3 S.
Mátraverebély	29B	Kocsánytalan tölgy/Cser/Hegyi juhar	Barnaföld	2 S.
Mátraverebély	29A	Cser/Kocsánytalan tölgy/Turkesztáni szil	Barnaföld	0
Mátraverebély	30B	Kocsányos tölgy/egyéb kemény lomb	Barnaföld	0
Mátraverebély	2J	Cser	Barnaföld	0
Mátraverebély	3A	Cser/Kocsánytalan tölgy/Lucfenyő	Barnaföld	0
Mátraverebély	3C	Cser/Kocsánytalan tölgy	Barnaföld	0
Mátraverebély	6A	Cser/Kocsánytalan tölgy	Barnaföld	0
Mátraverebély	6C	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rendzina	0
Mátraverebély	7A	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rendzina	0
Csiftár	10D	Akác	Barnaföld	0
Nógrádmartal	4B	Cser	Barnaföld	0
Nógrádmartal	7C	Kocsánytalan tölgy/Cser/Bükk/Gyertyán	Barnaföld	0
Nógrádmartal	7F	Cser	Barnaföld	0
Iliny	1E	Cser	Barnaföld	0
Iliny	1B	Akác	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Iliny	5F	Kocsánytalan tölgy/Cser	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Iliny	4E	Cser	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Iliny	4F	Cser	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Iliny	5C	Cser/Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Nagykanizsa	46F	Feketefenyő/Magas kőrís	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Nagykanizsa	44A	Kocsányos tölgy/Magyar kőrís/Mézgás éger/Nyír	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Nagykanizsa	45J	Kocsányos tölgy/Mézgás éger/Erdeifenyő/Gyertyán	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Fityeház	2F	Kocsányos tölgy/Vörös tölgy/Magas kőrís	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Belezna	8A1	üres vágástertület	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Belezna	1E	Kocsányos tölgy/Szurke nyár	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Belezna	6D	Kocsányos tölgy/Szurke nyár	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Belezna	6A1	üres vágástertület	Rozsdabarna erdőtalaj	0

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izrolátum
Belezna	9I	Kocsányos tölgy/Cser/Fekete fenyő/Mézőgás éger	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Miklósfá	24A	Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Homokkomárom	17F	Kocsányos tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	1 H.m.
Homokkomárom	14I	Bükk	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Homokkomárom	13E	Kocsányos tölgy/Magas kőris/Fekete dió	Rendzina	0
Homokkomárom	8B	Kocsányos tölgy/Szürke nyár/egyéb kemény lomb	Rozsdabarna erdőtalaj	4 H.m.
Homokkomárom	7A	üres vágástertület	Rozsdabarna erdőtalaj	5 H.m.
Homokkomárom	19I	Kocsányos tölgy/Magyar kőris/Cser	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Galambok	12K	Kocsányos tölgy/Gyertyán/Akác/Magyar kőris	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Galambok	8C	Kocsányos tölgy	Réti erdőtalaj	1 S.
Zalacomár	12H	Kocsányos tölgy/Magyar kőris/Erdeifenyő	Réti erdőtalaj	0
Zalacomár	13F	Kocsányos tölgy/Cser/Gyertyán/Kislevelű hárs	Réti erdőtalaj	0
Bugac	-	Csemetekert	humuszos homok	2 H.b.
Bugac	90 C	Szürke nyár/Akác/Fekete nyár/Juhar	Humuszos homok	0
Alsómonostor	CSK	Csemetekert	Humuszos homok	2 S./2 H.b.
Jakabszállás	34F	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Jakabszállás	34D	Feketefenyő	Humuszos homok	1 S./1 H.d.
Jakabszállás	27E	Feketefenyő/Erdeifenyő	Humuszos homok	9 H.d.
Jakabszállás	27Q	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Jakabszállás	34B	üres vágástertület	Humuszos homok	1 H.d.
Jakabszállás	28L	Szürke nyár	Humuszos homok	7 H.d.
Jakabszállás	28C	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Jakabszállás	26G	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Jakabszállás	25I	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Jakabszállás	26B	Erdeifenyő/Feketefenyő/Szürke nyár	Humuszos homok	0
Jakabszállás	19C	Feketefenyő	Humuszos homok	0
Jakabszállás	19B	Erdeifenyő/Szürke nyár/Feketefenyő	Humuszos homok	1 H.d.
Jakabszállás	26C	Feketefenyő/ Erdeifenyő/Szürke nyár	Humuszos homok	3 S./8 H.d.

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izolat
Jakabszállás	18B	Erdeifenyő/Feketefenyő/Szurke nyár	Humuszos homok	10 H.d.
Jakabszállás	18A	Feketefenyő/ Erdeifenyő	Humuszos homok	0
Jakabszállás	17Q	Feketefenyő	Humuszos homok	4 H.d.
Jakabszállás	17C	Feketefenyő/ Erdeifenyő	Humuszos homok	0
Szendrő	17E	Cser/Kocsánytalan tölgy/Gyertyán	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Abod	39A	(TSZ tulajdon)	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Szendrő	14J	Cser/Kocsánytalan tölgy	Rozsdabarna erdőtalaj	0
Szendrő	31D	Cser/ Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Szendrő	31F	Kocsánytalan tölgy/Cser	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Edelény	9A	Cser/ Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Edelény	9E	Cser/ Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Edelény	9C	Cser/ Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Edelény	13F	Cser/ Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Edelény	13D	Cser/ Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Varbóc	12I	Kocsánytalan tölgy/Cser	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Szögliget	14 Ti	Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Szin	1B	Kocsánytalan tölgy	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Szögliget	13E	Kocsánytalan tölgy/Erdeifenyő/ Lucfenyő	Rendzina	0
Szin	5C	Kocsánytalan tölgy	Barnaföld	0
Szin	11T/4	(nincs üzemtervi nyilvántartásban!)	Barnaföld	0
Szögliget	25D	Lucfenyő/Erdeifenyő	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Ménésvölgy	-	Csemetekert	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Martonyi	15G	Bükk	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Martonyi	Tii0	Bükk	Agygbemosódásos barna erdőtalaj	0
Nyírlugos	-	Akác	Homok	0
Nyírlugos	-	Nádas	Réti öntéstalaj	2 S.
Nyírlugos	-	Nyár	Homok	9 H.b.
Nyírlugos	-	Erdei fenyő	Kov. barna erdőtalaj	1 H.b.

Település neve	Erdőtag	Jellemző fajok	Talajtípus	Új izolátum
Nyírcsád	-	Kocsányos tölgy	Kov. barna erdőtalaj	0
Nyírcsád	-	Nyár	Kov. barna erdőtalaj	2 H.m./1 S.
Nyírábrány	-	Nagyláprét/Kaszáló	Tőzeges homok	0
Nyírábrány	-	Akác	Kov. barna erdőtalaj	1 S./1 H.b.
Nyírábrány	-	Gyep	Homok	0
Nyírábrány	-	Akác	Homok	0

rövidítések: S.=*Steinernema sp.*, H.b.=*Heterorhabditis bacteriophora*, H.d.=*Heterorhabditis downesi*, H.m.=*Heterorhabditis megidis*