

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BUDAPEST

BIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA
Iskolavezető: **PROF. DR. ERDEI ANNA**
MTA rendes tagja

SZERKEZETI BIOKÉMIA PROGRAM
Programvezető: **PROF. EMERITUS DR. GRÁF LÁSZLÓ**
MTA rendes tagja

**ROVARPATOGÉN BAKTÉRIUMOK ANTIBIOTIKUM
TERMELÉSE ÉS SZIMBIOTIKUS PARTNER-SPECIFITÁSÁNAK
GNOTOBIOLÓGIAI ANALÍZISE**

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KÉSZÍTETTE:
BURGETTINÉ BÖSZÖRMÉNYI ERZSÉBET
Okleveles mikrobiológus

TÉMAVEZETŐ:
DR. HABIL FODOR ANDRÁS
Kutató professzor (PE), ny. habil. egyetemi docens (ELTE)

BUDAPEST

2010

I. Bevezetés

Különböző taxonómiai helyzetű élőlények között kialakuló stabil kölcsönös kapcsolatok neve mutualizmus. *Kétkomponensű* mutualisztikus rendszerekben a kapcsolat leggyakrabban csak az egyik fél számára előnyös. Ilyen a kapcsolat, amikor két organizmus egyike a táplálék-fogyasztó (*predátor*), a másik az elfogyasztandó táplálék. Egyoldalú a gazda – *patogén* és a gazda - parazita (*parazitizmus*) kapcsolat is. Alapkutatás szempontjából különösen izgalmas rendszerek azok, amelyekben a mutualizmusból származó előnyök kölcsönösek, hiszen ilyenkor kölcsönös a felismerés a kapcsolat kialakulásának kulcseleme, s ebben meghatározó szerepet kell tulajdonítanunk speciális interaktív jelrendszereknek. Az ilyen kapcsolatok gyűjtőneve: *szimbiózis*. A szimbiotikus partner-kapcsolatok részleteinek feltárása nemcsak klasszikus, hanem molekuláris biológiai szempontból is izgalmas, hiszen a kölcsönös felismerés mechanizmus aligha lehet más, mint valamiféle jel-átvitel, szignál-transzdukció.

A természetben egyedülálló az a fajta szimbiózis, amely entomopatogén baktériumok és nematodák között kialakult az evolúció során. A rovar- entomopatogén fonalféreg (nematoda a továbbiakban: EPN) kapcsolat értékelhető zsákmány-predátor vagy gazda-parazita kapcsolatként egyaránt. Ugyanakkor a rovarpatogén nematodák kapcsolata a bélcsövükben élő, majd onnan a fertőzött rovar testüregében kiszabaduló entomopatogén baktériumokkal (továbbiakban EPB): *szimbiózis*. Az esetek döntő többségében *obligát* és nem fakultatív szimbiózisról van szó, mert a baktérium a patogén.

Ennek az intenzíven kutatott területnek egyik viszonylag „szabadon” hagyott „mezsgyéje” annak feltárása, hogy valóban beszélhetünk-e kospeciációról EPN/EPB relációban, s ha igen, akkor milyen mechanizmus szerint megy végbe. A munkám hangsúlyos része a szimbiotikus rendszer gnotobiológiai feltárása révén definiáljam a “taxon-specifitás” határait, és eldöntsem, hogy a ma létező komplexek tényleg kospeciáció eredményei-e? Az axenikus *Heterorhabditis* egyáltalában nem nő (Fodor és Vanfleteren, nem-közölt adatok), idegen szimbiontán pedig ivaréretté sem fejlődnek az állatok. Ezen kívül a laboratóriumunkban kifejlesztett ENGM médium, amelyet évek óta használunk, de csak az idén került közlésre (Fodor et al, 2010a) lehetővé tette, hogy reprodukálható eredményeket produkáljunk. Az antibiotikumokkal kapcsolatos kutatásaim jelentős részét nem a *Photorhabdus*, hanem a két *Xenorhabdus* fajjal kapcsolatban végeztem, mert

kísérleteimben meggyőződtem arról, hogy ezek lényegesen perspektivikusabbak. Disszertációm tárgya a fentiekben bemutatott háromkomponensű mutualisztikus biológia rendszer.

II. CÉLKITŰZÉSEIM

II. 1. Az EPN-EPB kospeciáció hipotézis tesztelése *Heterorhabditis* – *Photorhabdus* relációkban gnotobiológiai analízissel

Választ kerestem arra a kérdésre, hogy vajon kicserélhetőek-e kölcsönösen és korlátlanul az egyes EPN fajok bakteriális szimbiontái egymással, vagy sem? Célul tűztem ki a szimbiotikus partner-specifitás határainak meghatározását. Módszerem abból állt, hogy axenikus (J1) vagy kevészámú saját baktérium-szimbiontát hordozó (IJ) EPN lárvákat egy másik EPN taxon természetes szimbiontáját tartalmazó táplemezen növesztetem. Ezek F1 IJ utódlárváiból baktériumokat nyertem s ki, s morfológiai illetve molekuláris biológiai módszerekkel megállapítottam, hogy azok az eredeti, vagy az új, felajánlott szimbiontáival azonosak-e. A részleteket illető megválaszolendő kérdések:

- A.) A kozmopolita *H. bacteriophora* EPN faj különböző földrajzi eredetű törzseinek szimbiontái konspecifikusak- e vagy sem, és kölcsönösen kicserélhetőek-e, vagy sem?
- B.) Az Európa és Észak-Amerika hűvösebb északi részein honos *H. megidis* EPN faj taxonómiaiilag bizonyítottan különböző szimbiontái kicserélhetőek-e, vagy sem?
- C.) Más, nem-kozmpolita EPN fajok eltérő földrajzi eredetű törzseinek szimbiontái kölcsönösen felcserélhetőek-e egymással vagy sem?
- D.) Eredményeimből levonhatóak-e a *Heterorhabditis/Photorhabdus* kospeciáció elméletét alátámasztó, vagy annak ellentmondó következtetések?

II. 2. A fázis-variánsok problematikája:

A primer-szekunder átalakulás irreverzibilis és szorosan összefügg a szimbiotikus képességgel és az antibiotikum termeléssel is. Különlegesen szabályozott, de a

mechanizmus nem egyértelműen tisztázott. A fázis-variánsokon belül vizsgáltam 19 *Photorhabdus* baktérium törzs fenotípusos jellemvonásait és felmértem a Wisconsini baktériumtörzsek (Wx1-15) antibiotikum érzékenységét. A *Xenorhabdus nematophila* fázisvariánsaival kapcsolatban laboratóriumunkban végzett fontos kísérleteket Völgyi Antónia (Völgyi et al., 1998; 2000).

II.3. EPB törzsek antimikrobiális potenciáljának összehasonlítása, a leghatékonyabb antibiotikum-termelő törzsek jellemzése:

Laboratóriumunk törzsgyűjteményének összehasonlítása alapján kiválasztottam a leghatékonyabbnak bizonyult törzseket, s ezekkel végeztem további vizsgálatokat, elsősorban az ipari és mezőgazdasági alkalmazási lehetőségek szem előtt tartásával (Brachmann, et al., 2006; Furgani et al., 2008; Böszörményi et al., 2009)..

II. 4. *Xenorhabdus* - *Xenorhabdus* interakciók

A *Xenorhabdus* törzsek antibiotikum termelő képességének vizsgálatát követően, arra voltunk kíváncsiak, hogyan viselkednek egymással szemben a *Xenorhabdus* törzsek (Fodor et al., 2010b).

III. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A munkám során felhasznált *Photorhabdus* és *Xenorhabdus* törzsek jelentős része a Genetika Tanszék laboratóriumi törzsgyűjteményéből származott a tesztelésben résztvevő patogén és kontroll törzsek nagy része különböző kutatóhelyek törzsgyűjteményéből. Az antibiotikum vizsgálatokat Lengyel Katalin és munkatársai (2005) által izolált négy új *Xenorhabdus* faj típus-törzseire is kiterjesztettem. A baktériumok visszaizolálását, izolálását Lucskai Attila (1999) módszere alapján végeztem. Az új szimbiotikus komplexek azonosítása mikrobiológiai módszerekkel a fenotípus alapján ill. a molekuláris biológiából kölcsönzött technikákkal történt.

Az entomopatogén baktériumok fenotípusait standard módszerekkel (Boemare et al. 1997) hasonlítottam össze a következő tulajdonságokat a telepek színét, festék megkötő képességét, NBTA illetve MacConkey táptalajokon (biolumineszcenciáját,

mozgóképességét, hemolitikus aktivitását, exoenzim aktivitásukat és antibiotikum termelésüket).

A vizsgálatok egy része rutin mikrobiológiai technikák egy részét is képviselte. Differenciáló táptalajokat használtunk LB, LBTA, MacConkey, véres agart, Tween 80, zselatin agart és a *mozgás* vizsgálatához 2%-os agar tartalmú LBTA lemezt. A *biolumineszenciát* sötét szobában teszteltük szabad szemmel.

Antibiotikum aktivitást Akhurst (1982) illetve Dunphy (1997) módszerével teszteltük. Wisconsin törzsek *antibiotikum érzékenységet* korongdiffúziós módszerrel vizsgáltuk 27 antibiotikummal szemben.

Antibiotikum termelés meghatározásának módszeréhez Boemare felülrétegzéses technikáját alkalmaztuk. Maximális hatékonyság alsó határértékének (MID) meghatározása kémcsőben és microtiter lemezekben zajlottak. *Xenorhabdus budapestensis DSM 16342* törzsének növesztése New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA) 19 Model bioreaktorban történt a stationer fázis eléréséig.

A hatóanyagok kinyerésére a különböző, iparilag alkalmazható adszorpciós műgyanta közül is *Amberlite^R XAD 1180* polimer adszorbens (ACROS Organics, Geel, Belgium) volt a legalkalmasabb, melyet 1:20 arányban adtunk a fermentléhez. Ez a fermentlé térfogatához viszonyított kb.10%-os gyanta néhány óras, szobahőmérsékleten történő kevertetése képes volt a hatóanyag megkötésére.

Gnotobiológiai vizsgálatok módszertana

A szimbiózis vizsgálatokban a *Photorhabdus* baktérium saját szimbiontáján *H. bacteriophora* kívül, 5 nematoda fajnak *H. megidis*, *H. marelata*, *H. downesii* (korábbi nevén *H. Irish Type*), *H. zealandica*, *H. indicus* 30 különböző törzsét alkalmazva próbáltunk új szimbiontákat létrehozni.

IV. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK:

IV. 1. Szimbiózis vizsgálatok eredményei:

Az EPN – EPB szimbiózisra vonatkozó alapismereteket ld. Akhurst and Boemare, 1990; Forst and Clarke (2002). A *Photorhabdus* csoporton belül 13 taxon összesen 29 törzsének taxonómiai pozícióját határoztuk meg laboratóriumunkban (Szállás et al., 1997; 2001). Erre alapozva terveztem meg a gnotobiológiai

kísérleteimet.. Noha időközben a *Photorhabdus* nemzetségnek (Fisher-Le Sue et al., 1999; Peat et al., 2010) új rendszertana született, ezeket már nem vehettem figyelembe, hiszen gnotobiológiai kísérleteim zöme 2003-ban lezárult. A legfontosabb eredményeket az alábbi 6 pontba foglaltam össze:

Tizennyolc *H. bacteriophora*, hat *H. megidis*, négy *H. indicus*, két *H. downesii*, két *H. marelatus* és egy *H. zealandica* EPN törzs lárváit egymás szimbiontaín tesztelve megállapítottuk, hogy:

(1) A *H. bacteriophora* különböző földrajzi eredetű törzsei különféle *Photorhabdus* törzsekkel létesítettek szimbiotikus kapcsolatot, és a szimbionták csaknem kivétel nélkül kölcsönösen kicserélhetőek. E *Photorhabdus* törzsek zömmel a *P. luminescens* ssp. *laumondii*, kisebb hányaduk a *P. luminescens* ssp. *boemarii* (újabb nevükön: *trachensis*) csoportba soroltattak. Egyikük sem tartozik a *P. luminescens* ssp. *luminescens* vagy *P. luminescens* ssp. *akhurstii* csoporthoz.. Ezek az adatok inkább alátámasztják, mint cáfolják a kospeciáció tendenciáját, akkor is, ha egyetlen nematoda taxonhoz két baktérium taxon rendelhető, mint obligát szimbionta partner. Figyelemreméltó, hogy földrajzilag egészen távoli eredetű *H. bacteriophora* törzsek (Argentína, Azori szigetek, Magyarország, USA) között is korlátlanul lehetséges a szimbionták kölcsönös cseréje. Az a tény, hogy nem egy, hanem több *P. luminescens* taxon törzsei is szimbiózist tudnak létrehozni a *H. bacteriophora* különböző törzseivel, arra utal, hogy a baktérium-faj szimbiontájának evolúciója gyorsabb, mint az eukariota partneré, de a szétváló új taxonok is megőrizték szimbiotikus partner-specifitásukat kivétel nélkül.

(2) A *H. megidis* Észak-Amerikai izolátumainak a szimbiontája a *P. temperata*, az európai törzseké a *P. temperata* ssp. *temperata* a természetes szimbiontája. A *H. megidis* európai és amerikai törzsei között a szimbionták szempontjából inkompatibilitás van, igen korlátozott mértékben cserélhetőek a szimbionták. Noha keresztezés kísérleteket ezzel kapcsolatban senki nem végzett, az amerikai és amerikai *H. megidis* izolátumokat egyértelműen kongenikusnak tekinti. A két szimbionta a korábbi és legújabb taxonómiai adatok szerint is külön csoportot alkot. A *H. megidis* eredmények indirekt módon igazolják a ko-speciáció hipotézisét. Ehhez fel kell

tételeznünk, hogy *Photorhabdus* evolúció sebessége nagyobb, mint a nematoda (*H. megidis*) szimbionta partneré, ami abban nyilvánul meg, hogy a földrajzi izoláció új (*P. temperata* ssp *temperata*) alfaj kialakulásához vezetett. Ellentétben azonban a *P. luminescens* fajjal, a *P. temperata* fajból kialakult új taxon (*P. temperata* ssp *temperata*) szimbiotikus partner-specifitásban is történt változás.

(3) Nehéz megmagyarázni a ko-speciáció elméletével azt az eredményt, hogy a *H. megidis* amerikai törzsei és az amerikai *H. marelatus* törzsei között a szimbionták kölcsönös cseréje akadálytalanul lehetséges.

(4) A ko-speciációs „papírfomat” teljesen felborítják azok az eredményeim, amelyek, azt példázzák, hogy geográfiai távolság „felülírhatja” a ko-speciáció szabályait. Ezek az eredmények az alábbiak:

4.1. Az európai *H. bacteriophora* törzsek néhány esetben elfogadják szimbiontaként az európai *H. megidis* szimbiontákat;

4.2. A *H. megidis* észak-nyugat Európai csoportjába sorolt törzsek és a *H. downesii* fajhoz tartozó K122 szimbiontái kongenikusak (*P. temperata* ssp. *temperata*), ám nem cserélhetőek.

4.3. *H. downesii* magyarországi (HIT) és írországi (K122) törzseinek szimbiontái más *Photorhabdus* fajokhoz (*P. stackebrandtii* illetve (*P. temperata* ssp *temperata*) tartoznak és egymással nem cserélhetőek. Ugyanakkor a Nyugat-európai *H. megidis* és *H. downesii* (K122) szimbiontái kongenikusak, ám azok sem cserélhetőek.

4.4. Hasonlóképpen: a *H. indicus* földrajzilag távoli izolátumainak szimbiontái kongenikusak, de nem cserélhetőek.

A filogenetikai analíziseknek talán közös potenciális tévedése az, hogy egyértelműnek tekintik, hogy az evolúciós marker gének (16S rRNS, *gyrB*, *gln* Peat et al., 2010) kvázi „linkage-ben” evolválnak a vizsgált szervezet valamennyi génjével.

Tapasztalataim arra utalnak, hogy ez az „evolúciós linkage” nem „teljes”, és ezért csak fenntartásokkal vonhatunk le következtetéseket pl. a *Photorhabdus* nemzetség szimbiotikus kapcsolatait meghatározó gének evolúciójára a filogenetikai törzsfák adataiból, ami mindkét oldalról módosítja a kospeciációs lehetőségeket. Ilyen „Kospeciációs rekombinánsnak” tekinthetjük a *H. downesii* faj közép-európai elterjedése során kialakult (HIT) szimbiózis megjelenése). A dolgot még áttekinthetlenebbé teszi, hogy a *H. megidis* JUN törzs szimbiontájával és a HIT baktérium kongenikus.

A gnotobiológiai analízis eredményeiből arra következtetek, hogy az EPB-EPN szimbiózisok általánosan elfogadott kospeciáció elméletét árnyaltan kell kezelnünk. Az egymással közel-rokon *Xenorhabdus* és *Photorhabdus* csoportok egyaránt rendelkeznek entomopatogén nematodákkal való szimbiózis kialakításának a képességével, de *Xenorhabdus* csak *Steinernema*, *Photorhabdus* csak *Heterorhabditis* fajjal tud szimbiotikus kapcsolatot kialakítani. A két nematoda-nemzetség nem túl közeli rokonok. A szimbiózis feltétele, hogy a baktérium ne legyen toxikus potenciális nematoda partnerére. Genetikai események, mutációk húzódnak meg annak hátterében, hogy a szimbionta partnerek elfogadják e- egymást.

A „választékot” a földrajzi környezet határozhatja meg elsődlegesen: erre utal, hogy az Észak-amerikai *H. megidis* és *H. marelatus* elfogadják egymás szimbiontáit konspecifikusak és kölcsönösen cserélhetőek, míg az európai és Észak-amerikai *H. megidis* törzsek nem. Valószínű, hogy génmutációk teszik lehetővé vagy akadályozzák meg egy szimbiotikus kapcsolat létrejöttét. Ha viszont kialakult egy ilyen kapcsolat, annak sorsát a földrajzi pozíció és ebből adódó izolációs-szelekciós mechanizmusok alakítják így az evolúció iránya a kospeciáció. *További kísérletek szükségesek ahhoz, hogy eldönthessük: milyen mértékben javítható az EPN/EPB törzsek hatékonysága szimbiotikus partner-cserével.*

IV.2.1. *Photorhabdus* baktériumtörzsek fenotípusos vizsgálatainak eredményei, amelyek a visszaigazolt baktérium identifikálásához szükségesek

Az EPB fajok fő morfológiai ismereteit illetően hivatkoznék Akhurst és Boemare (1996) cikkére. Az entomopatogén nematoda - szimbionta baktériumoknak

két (primer, szekunder) fázis-variánsa van. Közülük csupán a primer termel antibiotikumot és létesít a nematoda-partnerrel szimbiotikus kapcsolatot. A primer-szekunder átmenet egyetlen ismert eset kivételével irreverzibilis, és számos fenotípusos változással is jár. A lehetséges mechanizmust illetően ld. Dunphy et al., 1997; Völgyi 2000). Tizenkilenc *Photorhabdus* törzs primer és szekunder variánsának festékkötését, pigment termelését, biolumineszcenciáját, mozgóképességét, hemolitikus aktivitását, exoenzim - (lipázok, proteázok, nukleázok) termelését, valamint, rajzását és intracelluláris protein-kristály termelését vizsgáltam. Ez utóbbi munkát Janette Stenroos-Ek közösen végeztük. Az exoenzim termelés, motilitás nem bizonyult kizárólagosan primer specifikusnak. *H. bacteriophora* baktérium-szimbiotái közül az *Rh1* sejtjeiben *log* és *stacioner* fázisban erős kristályképződés mutatható ki, a *Hb1* törzsnél ez csak a *stacioner* fázisban jelentkezett.

A szekunder sejtekben, ahogy várható is volt, nem tapasztaltunk a gélen kimutatható kristály-proteint. Ugyancsak kimutatható volt a *Hm1* referencia-törzs primer sejtjeiben, stacioner fázisban és az *NC19* primer fázisú sejtjeiben is. Sem a szekunder, sem a két kristályprotein-lókuszának mutánsában nem tudtunk SDS gél-elektroforézissel kristályfehérjéket kimutatni. *H. megidis* szimbioták (*P. temperata* spp. *temperata*) primer és szekunder törzseinek SDS gél-elektroforézisének eredménye alapján nem találtunk kristályproteint.

IV.2.2. *Wisconsini Photorhabdus* törzsek (Wx1-15) antibiotikum érzékenységeinek eredményei

Kenneth H. Nealson professzor által izolált 15 *Photorhabdus* törzs (*Wx1-15*) antibiotikum érzékenységét vizsgáltam 35 antibiotikumon korong módszerrel. Összehasonlítási alapul *DSM 3368* referencia-törzset és a *Hm* referencia-törzset (*P. luminescens* spp. *luminescens*) használtuk. A primer és szekunder sejtek antibiotikum érzékenységét azonosnak találtuk.

IV.3.1. Antibiotikum vizsgálatok eredmények mastitis patogéneken

Az EPB fajok antibiotikum-termelésének felfedezése Paul et al (1981) és Akhurst (1982) nevéhez fűződik. Mastitis tüneteket mutató tejelő tehenekből származó feltételezhetően a kór kiváltásáért felelős patogéneken (*E. coli*, *Kle. pneumoniae*, *S. aureus*) vizsgáltuk az EPB által termelt antimikrobiális anyagok hatását. Az érzékenység nem volt egységes. Különösen a fentiekben izolált négy új faj *X. innexi*, *X. ehlersii*, *X. budapestensis* és *X. szentirmaii* erősebb antibiotikumos hatással rendelkezett, mint a korábban ismert *X. nematophila*, *X. cabanillassii* és *X. bovienii* törzsek.

A törzsek antibiotikum termelésük maximumát 5-6 nap alatt érték el és hosszabb laboratóriumi fenntartás során sem veszítették el antibiotikus hatásukat. A MID értéke jellemző volt fajokra, törzsekre és nem csak a típus törzsekre, hanem a nemrégiben izolált *X. szentirmaii* AMF20, AMF25 típusára is. Meglepő volt, hogy a mérsékelt antibiotikum termelő *X. innexi* volt a legrezisztensebb a hét *Xenorhabdus* törzs közül. *X. szentirmaii* sejt-mentes kultúrája a *Kle. pneumoniae* #696-ra citotoxikus volt. *X. bovienii* DSM4467T törzse szegényes antibiotikum termelést mutatott, míg a Finnországból, Norvégiából, Izraelből és USA-ból származóak egyáltalán nem termeltek antibiotikumot. (Brachman et al., 2006; Fodor et al., 2007; Furgani et al., 2008).

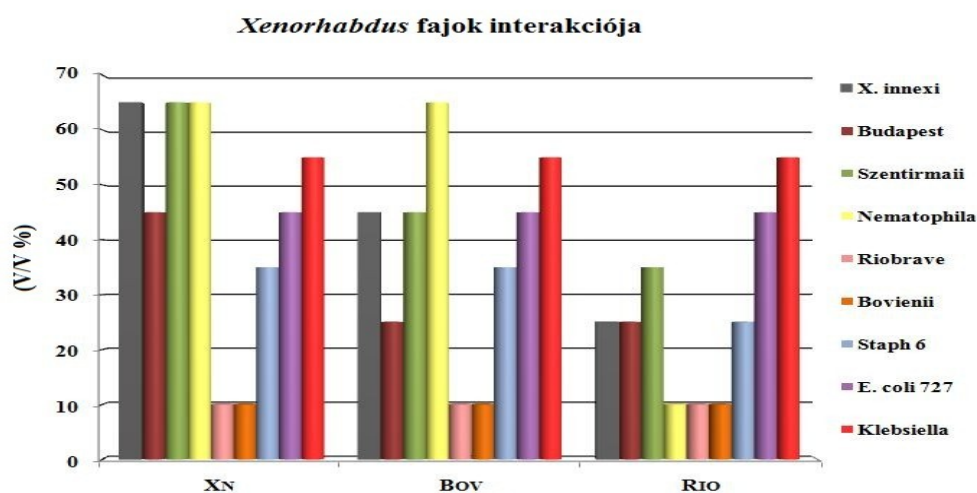
IV.3.2 Antibiotikum vizsgálatok eredményei növény patogén szervezeteken

X. szentirmaii és *X. budapestensis* antimikrobiális komponenseinek hatása a *P. nicotianae* és *E. amylovora* esetében citotoxikusnak bizonyultak. Antimikrobiális hatást fejtett ki zoospórákra, valamint a micéliumok növekedésére, ezért eredményesek lehetnek megelőző és terápiás használatra a *Phytophthora* által okozott növényi megbetegedésekben. *Photorhabdus luminescens ssp. laumondii* (Arg, HP88, Brecon, Az36) *ssp. trachensis* (Az29) *ssp. akhurstii* (LN2, EG2, IS5). *P. temperata* (HO-10, WX6) *ssp. temperata* (K122) *P. stackebrandtii* (HIT, Jun) *P. zealandica* He86 törzseivel is történtek érzékenységi vizsgálatok *Erwinia amylovora* több típusával szemben. Felülrétegzéses módszerrel kapott érzékenységi adatok meglehetősen

biztatóak. A következő *Photorhabdus* törzsek (Az29, LN2, HO-10, WX6, K122, Jun, He86) komolyabb antibiotikum termelésről adtak bizonyosságot, mint az előzetesen vizsgált *Xenorhabdus* törzsek. *Erwinia amylovora* Ea01, Ea110 strS, rifS és az Ea88, Ca11, rifS strR törzsei jól reagáltak a *Photorhabdus* törzsek által termelt antimikrobiális anyagokra. A vizsgálatok alapján a legjobb EPB törzsek antimikrobiális anyagának hatása megegyezett 200 ppm sztreptomycin szulfát hatásával. (Böszörményi et al., 2009)

IV. 4. *Xenorhabdus-Xenorhabdus* interakciók

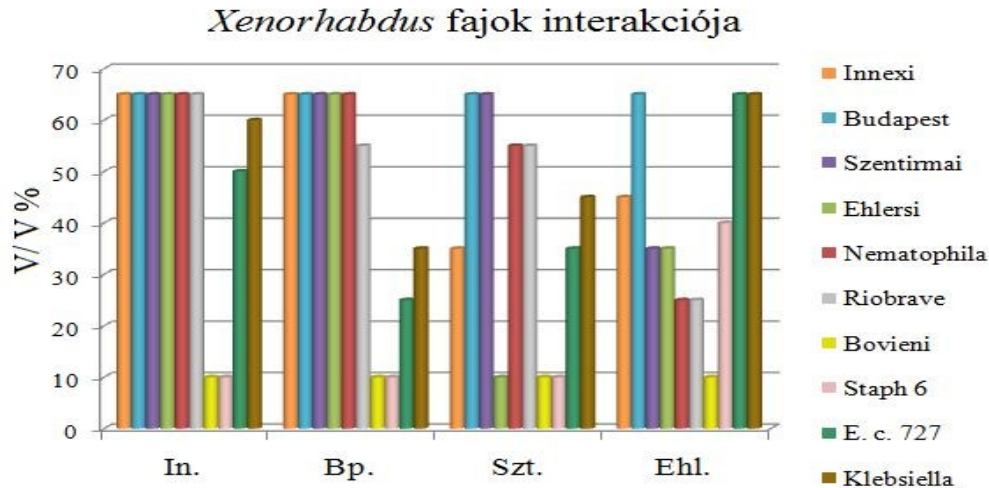
Miután sikerült felmérni a *Xenorhabdus* törzsek antibiotikum termelő képességét és hatásukat patogén törzsekre, arra voltunk kíváncsiak, hogyan viselkednek egymással szemben. Meglepő eredményeket kaptunk, melyeket a **1.** és **2. ábra** szemléltet.



1. ábra: *Xenorhabdus* fajok interakciója.

Az **1. ábrán** a *X. nematophila*, a *X. bovienii* és a *X. cabanillasii* fajok képviselőinek aktivitása látható más *Xenorhabdus* fajokkal szemben. Kontrollként *S. aureus*, *E. coli* és *Kle. pneumoniae* törzsek is szerepelnek (Fodor et al.; 2010)

Az *X. bovienii* NYH bizonyult legérzékenyebbnek a többi rokon-faj anti-*Xenorhabdus* anyagaira, addig ugyanez a törzs mutatta a legerősebb anti-*Xenorhabdus* aktivitást is.



2. ábra: *Xenorhabdus* fajok interakciója

A **2. ábrán** a *X. budapestensis*, *X. ehlersii*, *X. szentirmaii*, *X. innexi* fajok képviselőinek aktivitása látható más *Xenorhabdus* fajokkal szemben. Kontrollként *S. aureus*, *E. coli* és *Kle. pneumoniae* törzsek is szerepelnek (Fodor et al.; 2010). Az újabban azonosított 4 *Xenorhabdus* faj esetén az anti-*Xenorhabdus* aktivitás nem korrelált az általános antibiotikus aktivitással. Közülük a *X. innexi* mutatta a leggyengébb anti-*Xenorhabdus* aktivitást, addig mások anti-*Xenorhabdus* komponenseire meglehetősen rezisztens volt. Általánosságban elmondható, hogy az anti-*Xenorhabdus* aktivitás és az antibiotikus aktivitás egymástól függetlenek (Fodor et al, 2010b).

V. Összefoglalás

Heterorhabditis /*Photorhabdus* szimbiotikus komplexek partner-specifitásának vizsgálata alapján a *ko-speciáció* hipotézisét alátámasztó eredmények egyike, hogy a szimbiotikus partner-specifitást két dolog, szigorúan meghatározza az egyik, hogy a *Heterorhabditis* csak *Photorhabdus*-szal, *Steinernema* csak *Xenorhabdus*-szal létesít szimbiotikus kapcsolatot és a szekunder forma nem képes szimbiontaként viselkedni. *Heterorhabditis* fajok esetén a szimbiózis specifitása nem faj, hanem törzs szinten meghatározott. A *kospeciáció elmélet* működése nem igazolódik, mert a szimbiotikus partner-specifitás fajok között is működhet.

A baktériumok fenotípusos azonosításának eredménye alapján elmondható, hogy a vizsgált tulajdonságok elsősorban a primer variánsokat jellemzik és az eredmények főként mennyiségi eltéréseket mutatnak és nem minőségi különbségeket.

X. budapestensis erős citotoxikus hatást fejtett ki *Phytophthora nicotianae* zoospórájára és telepképzésére. *X. budapestensis* hatékonyan csökkentette *E. amylovora*-val fertőzött almafa növények necrotikus tüneteit. Az alacsonyabb koncentrációval történő kezelés eredményesebb volt. Gram-pozitív patogének (*S. aureus*) érzékenyebbek voltak a *Xenorhabdusok* antimikrobiális anyagára, mint a Gram-negatívak (*Kle. pneumoniae* és *E. coli*).

Az anti-*Xenorhabdus* vizsgálatok eredményei nincsenek összefüggésben az érzékenységi vizsgálatok korábbi eredményeivel. *X. budapestensis* anti-*Xenorhabdus* aktivitása mérsékelt volt, holott a legerősebb antibiotikus hatást fejtett ki a vizsgálatokban. Ezzel szemben az *X. bovienii* (NYH) mutatta a legerősebb anti-*Xenorhabdus* aktivitást és a legnagyobb érzékenységet mások anti-*Xenorhabdus* aktivitására, holott ez a törzs nem mutatott kiemelkedő antibiotikus hatást a patogénekre a korábbi vizsgálatokban

Irodalomjegyzék

- 1. Akhurst, R. J., (1982)** Antibiotic activity of *Xenorhabdus* ssp. bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families *Heterorhabditidae* and *Steinernematidae* J. Gen. Microbiol. **128**:3061–3065
- 2. Akhurst, R.J., and Boemare, N.E., (1990)** Biology and taxonomy of *Xenorhabdus* p.79-90. In R. Gaugler and H. Kaya (Ed.) Entomopathogenic nematodes in biological control CRC Press, Inc., Boca Raton, FL.
- 3. Akhurst, R.J., Boemare, N.E., Janssen, P.H., Peel, M.M., Alfredson, D. A., Beard, C. E., (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
- 4. Akhurst, R.J., Mourant, R.G., Baud, L., & Boemare, N.E., (1996)** Phenotypic and DNA relatedness study between nematode symbionts and clinical strains of the genus *Photorhabdus* (*Enterobacteriaceae*) *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**: 1034-1041
- 5. Andrassy I., (1976)** Evolution as a Basis for the Systematization of Nematodes Akadémiai Kiadó, Budapest, 1-287 pp. Idézve: pp. 7-22, 41-44; 45-64; 89-94.

6. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D.D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K (Eds.), (1999) Short protocols in Molecular Biology (4th Ed., Wiley & Sons, New York); 1.1 – 1.4; 15.1 – 1.15
7. Boemare, N.E., A. Givaudan, M. Brehelin, M., and Laumond, C., (1997) Symbiosis and pathogenicity of nematode-bacterium complexes, p. 21-45. *In* Nematode symbiosis, vol. 22, no. 1/2. International Science Services, Zeist, The Netherlands.
8. Böszörményi, E., Érsek, T., Fodor, A., Fodor, A. M., Földes, L. Sz., Hevesi, M., Hogan, J. S., Katona, Z., Klein, M. G., Kormány, A., Pekár, S., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., and Taylor, R. A. J., (2009) Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia* compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae* Journal of Applied Microbiology **107**: 746-759.
9. Brachmann A. O., Forst, S., Furgani, G.M., Fodor, A., and Bode H. B., (2006) Xenofuranones A and B: phenylpyruvate dimers from *Xenorhabdus szentirmaii*. J Nat Prod **69**: 1830-1832.
10. Duchaud, E., Rusniok, C., Frangeul, L., Buchrieser, C., Givaudan, A., Taourit, S., Bocs, S., Boursaux-Eude, C., Chandler, M., Charles, J.F., Dassa, E., Derosé, 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., Dan chin, A., Knut, F. (2003) The genome sequence of the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Nat Biotechnol **21**:1307-1311.
11. Dunphy G., C. Miyamoto and E. Meighen (1997) A homoserine lactone autoinducer regulates virulence of an insect-pathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophilus* (*Enterobacteriaceae*) J. Bacteriol **179**:5288-5291
12. Fisher-Le Saux, M., Mauleon H., Constant P., Brunel B., Boemare N.E., (1998) PCR Ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* Isolates from the Caribbean Region in Relation to the Taxonomy and Geographic Distribution of Their Nematode Hosts. Appl. Environ. Microbiol **64**: 4246-4254.
13. Fodor, A., Érsek, T., Fodor, A. M., Forst, S., Hogan, J., Hevesi, M., Klein, M.G., Stackebrandt, E., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., and Zeller, M., (2008) New aspects on *Xenorhabdus* antibiotics research. *Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes IOBC/wars Bulletin Vol. 31*, pp. 157-164
14. Fodor, A., Fodor, A.M., Forst, S., Hogan, J. S., Klein, M.G., Lengyel, K., Sáringer, Gy., Stackebrandt, E., Taylor, R. A. Y. and Lehoczky, É. (2010a) Comparative analysis of antibacterial activities of *Xenorhabdus* species on related and non-related bacteria *in vivo*. J. Microbiol. Antimicrobials **2**: 30-35.
15. Fodor, A., Fodor, A.M., Lehoczky, É, Jagdale, G., Grewal P.S. Klein, M. G. (2010b) ENGM: an NGM-like solid media suitable for doing genetics on the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* The Worm breeders Gazette **18** Number 2.

- 16. Forst, S., & Clarke, D., (2002).** Bacteria-nematode symbiosis In: R. Gaugler (Ed.) Entomopathogenic Nematology *CABI Publishing*. pp.57-771.
- 17. Furgani, H. M., Böszörményi, E., Fodor, A., Fodor, A. M., Forst, S., Hogan, J.S., Katona, Z., Klein, M.G., Stackebrandt, E., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., and Wolf, S. L., (2008)** *Xenorhabdus antibiotics*: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria *Journal of Applied Microbiology* **104**:745-758.
- 18. Gualtieri, M., Aumelas, A., and Thaler, J.-O., (2009)** Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. *J. Antibiotics* **62**: 295–302.
- 19. Hazir, S., Stackebrandt, E., Lang, E., Schumann, P., Ehlers, R.U., 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**:36-44.
- 20. Hominick W. M., Hunt, D. J., Reid, A. P., Briscoe B. R., and Bohan, D. A., (1998)** Biosystematics, phylogeny and population genetics of entomopathogenic nematodes in.: Taxonomy, phylogeny and gnotobiological studies of entomopathogenic nematode bacterium complexes Proceedings of the workshop held at Horticulture Research International, Wellesbourne, Warwick, United Kingdom, pp. 45-55.
- 21. Lengyel, K., Lang, E., Fodor, A., Szállás, E., Schumann, P., and Stackebrandt, E., (2005)** Description of four novel species of *Xenorhabdus* family *Enterobacteriaceae*: *Xenorhabdus budapestensis* sp. Nov. *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov. *Xenorhabdus innexi* sp. Nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. Nov. *Syst Appl Microbiol* **28(2)**: 115-122.
- 22. Lucskai A. (1999)** Az entomopatogén fonalférgek és alkalmazásuk a kártevők elleni védekezésben PhD Thesis.
- 23. Marokházi, J., G. Kóczán, F. Hudecz, L. Gráf, A. Fodor, and I. Venekei. (2004).** Enzymic characterization with progress curve analysis of a collagen peptidase from an entomopathogenic bacterium, *Photorhabdus luminescens* *Biochem J.* **379**:633-640
- 24. Pamjay, Horolma (2000)** Phast System PAGE PCR-RFLP Analysis of Entomopathogenic Nematode Bacterium Complexes Ph. D. Theses, Eötvös University, Budapest, pp. 1-70.
- 25. Paul, W. J., Frautschy, S., Fenical, W. and Neilson K. H. (1981)** Antibiotics in microbial ecology: isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds for the insect symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* spp. *J. Chem Ecol.* **7**: 589-597.
- 26. Peat, S. M., ffrench-Constant, R. H., Waterfield, N.R., Marokházi, J., Fodor, A., and Adams, B. (2010)** A robust phylogenetic framework for the bacterial genus *Photorhabdus* and its use in studying the evolution and maintenance of bioluminescence? A case for 16S, *gyrB* and *gln A* *Molecular Phylogenetics and Evolution* **57**: 728-740.

27. Szállás, E., C. Koch, A. Fodor, A Burghardt, O. Buss, A. Szentirmai, K. H. Neilson and E. Stackebrandt (1997) Phylogenic evidence for the heterogeneity *Photorhabdus luminescens* Int. J. Syst. Bacteriol **47**:402-407.
28. Szállás E., Pukall, R., Pamjav, H., Kovács G., Buzás Zs., Fodor A., Stackebrandt E., (2001) Passengers who missed the train: comparative sequence analysis PhastSystem page RFLP and automated RiboPrint phenotypes of *Photorhabdus strains* pp. 36-53.in COST section 819- Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research, edited by Griffin, C. T. Burnell, A. M. Downes, M.J. C. Mulder R. Office for Publications of the EC EUR 19696.
29. Völgyi, A., (2000) Genetic analysis of the related pleiotropic phenotypes to the symbiotic behavior in the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus* Ph. D. Thesis, Eötvös University, Budapest pp 1-116.
30. Völgyi A., Fodor A., Forst S., (2000) Inactivation of a novel gene produces a phenotypic variant cell and affects the symbiotic behavior of *Xenorhabdus nematophilus* Appl. Environ Microbiol **66** (4):1622-1628.
31. Völgyi, A., Fodor, A., Szentirmai, A., and Frost, S., (1998). Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus*. Appl. Environ. Microbiol. **64**: 1188-1193.

Publikációs lista

Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények:

- 1, Böszörményi, E., Érsek, T., Fodor, A., Fodor, A. M., Földes, L. Sz., Hevesi, M., Hogan, J. S., Katona, Z., Klein, M. G., Kormány, A., Pekár, S., Szentirmai, A., Sztaricskai, F., and Taylor, R. A. J., Isolation and activity of *Xenorhabdus* antimicrobial compounds against the plant pathogens *Erwinia* compounds against the plant pathogens *Erwinia amylovora* and *Phytophthora nicotianae* Journal of Applied Microbiology **107**(2009):746-759.
2. Furgani, H. M., Böszörményi, E., Fodor, A. Fodor, A. M., Forst, S. Hogan, J.S., Katona, Z., Klein, M.G., Stackebrandt, E. , Szentirmai, A. Sztaricskai, F. and Wolf, S.L. *Xenorhabdus antibiotics*: a comparative analysis and potential utility for controlling mastitis caused by bacteria Journal of Applied Microbiology **104**(2008):745-758.

Konferencia kötetekben megjelent közlemények, összefoglalók:

- 1, Böszörményi E., Lengyel K., Pamjav H., Szállás E., Fodor A., Gnotobiological analysis of *Heterorhabditis/Photorhabdus* complexes. 13th International Congress of Hungarian Society for Microbiology (1999) Budapest. Book of Abstracts p:14.

- 2. Böszörményi E.,** Fodor A., Vellai T., Szállás E., Völgyi A., Kiss Zs., Búzás Zs., Pamzsav H., Triga D., Ortutay Cs., Oravecz O., Lucskai A., Sáringer Gy., Rovarpatogén fonálféreg/baktérium szimbiotikus komplexek genetikai és filogenetikai analízise. *In* Program összefoglalók, IV. Magyar Genetikai Kongresszus, (1999)p.190-191.
- 3. Böszörményi E.,** Lengyel K., Oravecz O., Szállás E., Furgani G., Fodor A., Gnotobiological analysis of entomopathogenic nematode/bacterium complexes. *Developments in nematode bacteria research.* (2000) Cost Action 819. Agriculture and biotechnology, EUR. entomopathogenic 19696, p:312.
- 4. Böszörményi E.,** Lengyel K., Steenroos-Ek J., Vancsó V., Völgyi A., Fodor A. and Forst S. Primary/secondary phenotypes of and gnotobiological analysis in *Photorhabdus*. Third international symposium on entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria, (2003), Wooster, Abstracts p:37.
- 5. Böszörményi E.,** Lengyel K., Vancsó V., Steenroos-Ek,J.,Fodor A.,Genetikai szabályozás rovarpatogén (*Photorhabdus*) baktériumokban: a primer/szekunder variánsok fenotípusos leírása és a genetikai analízis első lépései. V. Magyar Genetikai Kongresszus, Program összefoglalók, (2003) 142-144.
- 6. Böszörményi E.,** Ghazala M. Furgani., Fodor A., Entomopatogén fonálféreg-baktérium szimbiotikus asszociációk molekuláris filogenetikai és gnotobiológiai analízise XX. Keszthelyi Növényvédelmi Fórum Konferencia Összefoglalója (2010) 46-50.

Magyar nyelvű szaklapban megjelenő a témához kapcsolódó közlemény:

- 1.Böszörményi E.,** Bán É., Nagy E., Pásztor M., Árr M., A cefepim, egy negyedik generációs cefalosporin mikrobiológiai aktivitása a hazai in vitro vizsgálatok tükrében *Gyógyszereink* (1999) (49) 15-21.