

JAŚMINA PATRYCJA MACKIEWICZ

*Instytut Nauk o Środowisku
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
E-mail: jasmina.mackiewicz@uj.edu.pl*

NICIENIE ENTOMOPATOGENICZNE – MODELOWE ORGANIZMY W BADANIACH ODDZIAŁYWAŃ SYMBIONT–GOSPODARZ ORAZ PASOŻYT- ŻYWCIEL*

WPROWADZENIE

Nicienie (Nematoda) są jedną z najliczniejszych i najbardziej różnorodnych grup organizmów na świecie. Szacowana liczba gatunków wynosi od 400 000 do 10 000 000 (HAMMOND i współaut. 1995) lub nawet do 100 000 000 (LAMBSHEAD 1993). Występują na wszystkich poziomach troficznych, zajmują różnorodne nisze ekologiczne, również bardzo nietypowe; są znajdowane nawet 1 km pod powierzchnią Ziemi (DE LEY 2006, MURFIN i współaut. 2013, PARK i współaut. 2014). Ich stosunkowo prosta budowa ciała, wysokie zróżnicowanie oraz występowanie wielu konserwatywnych genów sprawiły, że są chętnie wykorzystywane w badaniach naukowych jako organizmy modelowe (FERRIS i współaut. 2012, MURFIN i współaut. 2013). W samej tylko glebie nicienie są uznawane za kluczowe organizmy regulujące funkcjonowanie łańcucha pokarmowego: oddziałują na tempo dekompozycji i mineralizacji martwej materii organicznej poprzez transport mikroorganizmów, drapieżnictwo i pasożytnictwo (FERRIS i współaut. 2001). Ze względu na potencjał do praktycznego zastosowania grupą bardzo interesującą są nicienie entomopatogeniczne (ang. entomopathogenic nematodes, EPN). Terminem EPN określa się dwa rodzaje, *Steinernema* oraz *Heterorhabditis*, które są obligatoryjnymi parazytoidami owadów. Zostały spopularyzowane jako biopreparat - zamiennik lub uzupełnienie dla tradycyjnych metod ochrony roślin przed szkodnikami. Dotychczas przeprowadzone

badania wykazały zmienną skuteczność EPN w kontroli biologicznej szkodników zależną od typu i lokalizacji uprawy, co zmobilizowało naukowców do badań nad ich biologią i ekologią (CAMPOS-HERRERA i współaut. 2012).

Są stosowane również jako organizm modelowy w badaniach biologicznych, ekologicznych i ewolucyjnych szczególnie w układach parazytoid-żywiciel oraz symbiont-gospodarz. Parazytoidy EPN są zawsze zakażone tylko jednym gatunkiem symbiotycznych bakterii. Symbiontem dla nicieni *Heterorhabditis* są bakterie rodzaju *Photorhabdus*, a dla nicieni *Steinernema* bakterie rodzaju *Xenorhabdus*. Wysoka patogenność nicieni wobec ofiary jest wynikiem kooperacji z bakteriami symbiotycznymi. Drugą ogromną zaletą EPN w badaniach oddziaływań symbiont-gospodarz jest możliwość uzyskania nicieni pozbawionych symbiontów, zdolnych do zakażenia ofiary i rozmnażania się. W badaniu oddziaływań parazytoid-żywiciel atutem nicieni jest łatwość hodowli, krótki cykl życiowy, wysoka wirulencja oraz strategia parazytoidea zapobiegająca, aby jego ofiara była zasiedlona przez inne organizmy, saprofity i pasożyty (EHLERS 2001, DILLMAN i współaut. 2012).

CYKL ŻYCIOWY NICIENI

EPN posiadają cztery stadia młodociane oznaczane jako J1-J4, stadium dorosłe oraz larwy inwazyjne (ang. infective juvenile, IJ), jedyne stadium pozażywicielskie, aktywnie się poruszające i wyszukujące ofiary w gle-

Słowa kluczowe: bakterie entomopatogeniczne, mutualizm, nicienie entomopatogeniczne

*Artykuł powstał w ramach projektu badawczego nr 2013/09/N/NZ8/03220 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki oraz Dotacji Statutowej UJ nr DS/WBINOZ/INOS/756.

bie. W tym czasie larwa IJ nie odżywia się ani nie wydalą, a jej rozwój jest zahamowany.

Cykl życiowy nicieni entomopatogenicznych dzieli się na dwie fazy: fazę wolnożyjącą, gdy larwy inwazyjne poszukują żywiciela w glebie, oraz fazę pasożytniczą, rozpoczynającą się po przedostaniu się nicienia do jamy ciała żywiciela. Podczas fazy wolnożyjącej cyklu IJ poszukują żywiciela przemieszczając się w ściółce i metabolizując w tym czasie substancje zapasowe. Stan taki może trwać od kilku do kilkudziesięciu dni, zależnie od kondycji larwy. Jeżeli w tym czasie IJ odnajdzie żywiciela, przedostaje się do jego jamy ciała przez naturalne otwory lub przez przerwy w kutykuli. Nicienie najczęściej polują na larwy owadów, wewnątrz których pasożytozytoidy łatwo się rozmnażają, a rzadziej na osobniki dorosłe lub inne bezkręgowce, np. stonogi, wewnątrz których prawidłowy rozwój nicieni może być utrudniony lub niemożliwy (EHLERS 2001, CICHE i współaut. 2006, SICARD i współaut. 2008).

Po wnikięciu do ciała żywiciela rozpoczyna się etap pasożytniczy. Larwy inwazyjne uwalniają do wnętrza ciała żywiciela symbiotyczne bakterie. Intensywnie dzielące się bakterie w pierwszej fazie infekcji powodują śmierć owada-żywiciela, a później dostarczają substancji odżywczych dla nicieni. Przyjmuje się, że symbiotyczne EPN odżywiają się bakteriami oraz substancjami przez nie wydzielanymi (EHLERS 2001, 2007; CICHE i współaut. 2006). Nicienie rozmnażają się w ciele ofiary przez kilka pokoleń aż do momentu, gdy zasoby pokarmu kończą się, co jest sygnałem do rozwijania się larw inwazyjnych. Jedna lub dwie komórki bakterii symbiotycznych zostają zatrzymane w specjalnej torebce znajdującej się poniżej gardzieli (*Steinernema*) lub w przewodzie pokarmowym (*Heterorhabdus*) larwy, gdzie odbywają się dalsze podziały aż do wypełnienia dostępnego miejsca. W międzyczasie gardziel i odbyty larwy nicienia zostają zacopowane. Dojrzałe larwy inwazyjne, wydzielające kutykulę zapobiegającą wysychaniu, opuszczają ciało owada w poszukiwaniu kolejnego żywiciela (GREWAL i współaut. 2002).

Bakterie powstrzymują kolonizację ciała ofiary przez saprofity. Udowodniono, że zarażona ofiara nie jest atrakcyjnym pokarmem dla innych zwierząt żyjących w ściółce. Ofiary nicieni są bardzo często omijane przez mrówki, ślimaki oraz drapieżne i padlinożerne owady (NIELSEN-LEROUX i współaut. 2012). Zaobserwowano, że padlinożercy częściej omijają ofiary współzakażone przez *Heterorhabdus*/*Photorhabdus* niż *Steinernema*/*Xenorhabdus*. Przypuszcza się, że nicienie rodzaju *Heterorhabdus* wydzielają spe-

cialny czynnik odstrasżający padlinożerców (ang. scavenger deterrent factor). BAUR i współaut. (1998) badali zależność pomiędzy rodzajem zarażających nicieni a atrakcyjnością martwych larw owadów dla mrówek. Mrówki znacznie częściej wygrzebywały larwy owadów zarażone przez rodzaj *Steinernema* (60–85% wybieranych larw) niż przez rodzaj *Heterorhabdus* (10–20% wybieranych larw). Badacze wysnuli przypuszczenie o istnieniu czynnika odstrasżającego mrówki (ang. ant-repellent factor). W kolejnych badaniach GULCU i współaut. (2012) wykazali odstrasżające działanie czynnika wobec innych zwierząt: os, świerszczy, much określając go właśnie jako czynnik odstrasżający padlinożerców (BAUR i współaut. 1998, GULCU i współaut. 2012).

RÓŻNORODNOŚĆ MIĘDZY- I WEWNĄTRZGATUNKOWA NICIENI I BAKTERII ENTOMOPATOGENICZNYCH

Dotychczas rozpoznano ponad 70 gatunków nicieni należących do rodzaju *Steinernema*, 1 gatunek *Neosteinernema* oraz ok. 20 gatunków należących do rodzaju *Heterorhabdus*. (ADAMS i współaut. 2006, MURFIN i współaut. 2013, SAN BLAS 2013). Wśród symbiotycznych bakterii zidentyfikowano ok. 21 gatunków należących do rodzaju *Xenorhabdus* (TAILLIEZ i współaut. 2006, 2010) oraz 12 gatunków należących do rodzaju *Photorhabdus* (CAMPOS-HERRERA i współaut. 2012, MURFIN i współaut. 2013). W związku z rozwojem metod molekularnych oraz zainteresowaniem badaczy z różnych stron świata, co roku opisywane są kolejne gatunki nicieni entomopatogenicznych i ich symbiotyczne bakterie. Jest też coraz więcej informacji dotyczących rozmieszczenia geograficznego i zajmowanych przez nie siedlisk (CAMPOS-HERRERA i współaut. 2012). Gatunki *Steinernema carpocapsae* i *S. feltiae* są uznawane za kosmopolityczne, stwierdzane na wszystkich kontynentach z wyjątkiem Afryki i Antarktydy. Kolejnymi szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie gatunkami są: występujący w Europie i obu Amerykach *Heterorhabdus bacteriophora* oraz znany z Indii *H. indica*. Pozostałe gatunki mają węższy zakres występowania, a dla niektórych z nich określono preferowane siedliska. Obecnie przyjmuje się, że rodzaj *Heterorhabdus* wybiera gleby piaszczyste, przy czym gatunek *H. bacteriophora* preferuje gleby wapienne, a gatunek *H. megidis* gleby kwaśne. *Steinernema feltiae* jest częściej izolowana z łąk i terenów leśnych, natomiast gatunek *S. affine* był do tej pory zidentyfikowany jedynie w glebach uprawnych w Niemczech. Doniesienia o identyfikacji kolejnych gatun-

ków sugerują adaptacje EPN do lokalnych warunków (CAMPOS-HERRERA i współaut. 2012). Wykazano, że do zwalczania szkodników najlepiej nadają się nicienie rodzime dla danego terenu (SHAPIRO-ILIAN i współaut. 2003, SALAME i współaut. 2010). Ponadto poszczególne gatunki są bardzo zróżnicowane pod względem wirulencji wobec różnych gatunków owadów (SALAME i współaut. 2010, SEENIVANSAN i SIVAKUMAR 2013), tolerancji termicznej (GRIFFIN i DOWNES 1991, WRIGHT 1992, HAZIR i współaut. 2001), odporności na wysychanie, tolerancji na UV czy zdolności wyszukiwania ofiar (GAUGLER i współaut. 1989). HAZIR i współaut. (2001) przebadali 5 szczepów *S. feltiae* izolowanych z różnych stref klimatycznych; śródziemnomorskiej, subtropikalnej, tropikalnej. Badacze testowali inwazyjność wybranych szczepów wobec larw barciaka większego (*Galleria mellonella*), w wybranych temperaturach w zakresie 5–30°C. Wykazano różnice pomiędzy wirulencją szczepów izolowanych z różnych stref klimatycznych oraz podobieństwa szczepów izolowanych z tych samych stref klimatycznych (HAZIR i współaut. 2001). CAMPOS-HERRERA i GUTIÉRREZ (2014) badali różnice pomiędzy nicieniami *S. feltiae* izolowanymi z regionu La Rioja w północnej Hiszpanii. Nicienie pochodzące z niewielkiego arealu różniły się jednak typem siedliska, z którego je izolowano: las, łąka, skraj upraw, obszar uprawny. Badacze analizowali dynamikę inwazji wobec larw barciaka większego oraz proporcje płci larw IJ wnikających do ciała ofiar. Dla wszystkich badanych zmiennych uzyskano statystycznie istotne różnice pomiędzy populacjami z różnych typów siedlisk. Badania te dowodzą wewnątrzgatunkowego zróżnicowania EPN (CAMPOS-HERRERA i GUTIÉRREZ 2014).

HISTORIA EWOLUCYJNA NICIENI ENTOMOPATOGENICZNYCH ORAZ ICH SYMBIOTYCZNYCH BAKTERII

Rodzaje nicieni *Heterorhabditis* i *Steinernema* reprezentują przykład konwergencji dostosowania; odmienne mechanizmy biochemiczne i genetyczne prowadzą do bardzo zbliżonych fenotypów (CICHE i współaut. 2006). Prawdopodobnie przodkami nicieni entomopatogenicznych były wolnożyjące nicienie żywiące się bakteriami. Ich strategia odżywiania ewoluowała poprzez forezę, czyli bierny transport bakterii przez nicienie, do saprofagii, a następnie do pasożytnictwa, czyli zarażania i odżywiania się żywymi owadami, lub entomopatogeniczności. Entomopatogeniczność wyróżnia bardzo szybkie zabijanie gospodarza oraz selekcja zwiększająca wirulencję (DILLMAN i współaut. 2012).

BLAXTER i współaut. (1998) wykazali, że rodzina Heterorhabditae jest najbliższej spokrewniona z rodziną Strongylida grupującą pasożyty kręgowców. Obie rodziny posiadają wspólnego wolnożyjącego, odżywiającego się bakteriami przodka należącego do rodziny Pellioditis. Z kolei rodzina Sterinematidae jest najbliższej spokrewniona z rodziną Pannagloramidae, reprezentowaną przez gatunki wolnożyjące i związane z owadami, oraz z rodziną Strongyloididae, reprezentowaną przez pasożyty kręgowców (ADAMS i współaut. 2006, BAI i współaut. 2013).

Zupełnie inaczej wyglądała ewolucja bakterii symbiotycznych. Początkowo wszystkie bakterie żyjące w symbiozie z EPN były zaliczane do jednego rodzaju *Xenorhabdus*. W 1993 r. BOEMARE i współaut. wykonali analizy genetyczne i fenotypowe kilku gatunków rodzaju *Xenorhabdus*. Porównując gatunek *X. luminescens* z innymi gatunkami rodzaju *Xenorhabdus* wykazano mniej niż 20% homologii, co dało podstawy do wyodrębnienia nowego rodzaju *Photorhabdus* (BOEMARE i współaut. 1993). Badania przeprowadzone przez CHASTONA i współaut. (2011) potwierdziły wcześniejsze przypuszczenia, dowiodły również, że rodzaje *Xenorhabdus* oraz *Photorhabdus* pochodzą od wspólnego przodka. Analizy fragmentów 16S rRNA wykazały 94% podobieństwa pomiędzy dwoma rodzajami oraz podobieństwo do pałeczek jelitowych (Enterobacteriaceae). Prawdopodobnie wspólny przodek mógł kolonizować zarówno nicienie rodzaju *Steinernema*, jak i *Heterorhabditis*. Dywergencja na dwa gatunki bakterii nastąpiła później. Bakterie entomopatogeniczne rodzajów *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* mają podobne strategie życiowe, jednak na poziomie molekularnym są one realizowane w odmienny sposób (GOODRICH-BLAIRE i CLARKE 2007). W obronie przed układem odpornościowym owada (opisane poniżej) wydzielają różne antybiotyki: *Xenorhabdus* – ksenorabdycynę (ang. xenorhabdins), a *Photorhabdus* – hydroxystilbenesynę (ang. hydroxystilbenes) (FORST i NEALSON 1996). Mechanizmy genetyczne i biochemiczne umożliwiające kooperację bakterii z nicieniami różnią się znacząco i mogą być efektem dostosowania się bakterii do nicieni-gospodarzy (CHASTON i współaut. 2011).

KOEwolucja NICIENI I BAKTERII

Dotychczasowe badania dowodzą, że jeden gatunek nicienia *Steinernema* może się wiązać tylko z jednym gatunkiem bakterii *Xenorhabdus*, ale ten sam gatunek *Xenorhabdus* może się wiązać z kilkoma gatunkami *Steinernema*. Analizy sekwencji nukleotydów pozwalają na badanie historii interakcji

między nicieniami a bakteriami (CAMPOS-HERRERA i współaut. 2012). Pierwsze publikacje dotyczące wzajemnych interakcji nicieni i ich symbiotycznych bakterii odnosiły się do analizy pojedynczych loci jądrowych lub/i rybosomalnego RNA (NGUYEN i współaut. 2001, STOCK i współaut. 2001, SPIRDONOV i współaut. 2004, ADAMS i współaut. 2007). W kolejnych badaniach wykonano analizy wielogenowe dla kompleksu *Steinernema/Xenorhabdus* (LEE i STOCK 2010, NADLER i współaut. 2006). LEE i STOCK (2010) przeanalizowały historię koewolucji pomiędzy gatunkami *Steinernema* oraz *Xenorhabdus* i odkryły, że w przeszłości dochodziło do wymiany symbionta między gatunkami nicieni. Badaczki ustaliły, że w 12. przypadkach na 30 analizowanych par nicienie-bakterie doszło do kospecjacji. Szczególnym przypadkiem jest para *Steinernema carpocapsae/Xenorhabdus nematophila*, dla której odkryto geny pozwalające na wzajemną identyfikację. W przypadku, gdy gatunek bakterii entomopatogenicznych nie zostanie rozpoznany na poziomie biochemicznym, obumrze (LEE i STOCK 2010). Podobne analizy zostały wykonane dla par *Heterorhabditis/Photorhabdus* (EASOM i współaut. 2010, MANEESAKRON i współaut. 2011).

MANEESAKRON i współaut. (2011) ustalili, że nicienie i bakterie ewoluowały równocześnie. W innych badaniach EASOM i współaut. (2010) szukali genów odpowiedzialnych za kolonizację nicieni *Heterorhabditis bacteriophora* przez bakterie gatunku *Photorhabdus luminescens*. W tym celu przetestowali ok. 3000 zmutowanych szczepów bakteryjnych, każdy z uszkodzonym jednym genem, oraz dodatkowo znakowane genem *gfp*. Dzięki zielonemu zabarwieniu można było obserwować bakterie podczas procesu kolonizacji przewodu pokarmowego gospodarza i ocenić wpływ mutacji na sukces kolonizacji. Zidentyfikowano pięć loci, w których mutacje powodują znaczne osłabienie kolonizacji przewodu pokarmowego gospodarza (EASOM i współaut. 2010).

OBRONNE MECHANIZMY IMMUNOLOGICZNE OWADÓW

W celu ochrony przed patogenami owady wykształciły mechanizmy obronne na poziomie morfologicznym, behawioralnym, fizjologicznym i molekularnym. Pierwszą ważną barierą ochronną jest pokryte kutykulą ciało owada. Jeżeli ta bariera zostanie sforsowana przez patogen, uruchamiają się kolejne mechanizmy. W literaturze ustalili się podział odpowiedzi immunologicznej na humoralną i komórkową, zależną od specjalnych komórek odpornościowych, hemocytów. Oba mechanizmy odpornościowe działają łącznie w celu

wykrycia oraz neutralizacji potencjalnych patogenów. Ponadto, istnieją dodatkowe ścieżki obronne powodujące koagulację i melaniczację hemolimfy, produkcję reaktywnych związków tlenu i azotu oraz odpowiedź nabłonka w jelicie (CASTILLO i współaut. 2011, NIELSEN-LEROUX i współaut. 2012). Przejawem odpowiedzi humoralnej jest wydzielanie tzw. peptydów antybakteryjnych (ang. antimicrobial peptides, AMP) do hemolimfy. W obecności patogenu ich stężenie znacząco wzrasta i może się utrzymywać nawet długo po jego wyeliminowaniu. Na poziomie komórkowym istotna jest aktywność krążących w hemolimfie hemocytów. Istnieje wiele rodzajów hemocytów wyróżnianych na podstawie morfologii, właściwości antygenowych oraz funkcji. Ich liczba znacząco wzrasta podczas infekcji. Mają zdolność do otaczania patogenu, agregacji, inkapsulacji oraz fagocytozy. Hemocyty i cząsteczki AMP odpowiadają również za aktywację fenoloksydazy (PO), enzymu umożliwiającego uruchomienie szlaków metabolicznych prowadzących do unieszkodliwienia patogenu. Wytwarzanie fenoloksydazy indukuje wydzielanie toksyn i innych produktów, takich jak melanina, które uczestniczą w inkapsulacji oraz zabijaniu patogenów. Wydzielanie fenoloksydazy jest połączone z koagulacją hemolimfy, co zapobiega wnikięciu niepożądanych organizmów do wnętrza ciała owada (LAVINE i STRAND 2002, GOODRICH-BLAIR i CLARKE 2007, CASTILLO i współaut. 2011).

SPOSOBY INWAZJI

Nicienie wykształciły szereg mechanizmów pozwalających na ominięcie lub neutralizację barier ochronnych owada. Proces inwazji rozpoczyna się, gdy IJ odnajdują żywiciela i podejmują próbę przedostania się do jego jam ciała. Niektóre gatunki nicieni rodzaju *Heterorhabditis* mają specjalny narząd, pazur, ułatwiający przedostanie się przez kutykulę żywiciela. Po znalezieniu się wewnątrz ciała żywiciela, ale jeszcze zanim wydzieli symbiotyczne bakterie i zacznie się rozmnażać, parazytoid musi zmierzyć się z barierami biochemicznymi. Opisano kilka strategii obieranych przez nicienie po wtargnięciu do ciała żywiciela. Pierwszą strategią jest jak najszybsza ucieczka z hemolimfy i próba ulokowania się w tkankach żywiciela, gdzie mogą uniknąć wychwycenia przez hemocyty. Kolejną strategią jest kamuflaż. Nicienie mają szczególne właściwości biochemiczne pozwalające na ukrycie się przed układem odpornościowym żywiciela. Biochemiczne mechanizmy blokowania odpowiedzi immunologicznej żywiciela są różne dla różnych gatunków nicieni i są wybiórcze. Moż-

na jednak określić kilka wspólnych cech: (i) blokada układu odpornościowego, (ii) hamowanie procesów inkapsulacji i melanizacji, (iii) podtrzymywanie rozwoju bakterii symbiotycznych (CASTILLO i współaut. 2011).

Badania prowadzone przy zastosowaniu nicieni symbiotycznych oraz aksenicznych (pozbawionych symbiontów) na larwach *Manduca sexta* wykazały, że nicienie akseniczne rodzaju *Heterorhabditis* nie są rozpoznawane przez PRP-zależne mechanizmy (ang. pattern recognition proteins; wzór białek bakterii rozpoznawany przez receptory owadów), w przeciwieństwie do nicieni symbiotycznych, które wywołują odpowiedź immunologiczną w oparciu o mechanizm PRP (ELEFATHERIANOS i współaut. 2010).

Na powierzchni ciała nicieni gatunku *Heterorhabditis bacteriophora* występują białka zapobiegające przyczepianiu się cząsteczek AMP, natomiast rodzaj *Steinernema* posiada na powierzchni kutykuli cząsteczki, które blokują ścieżkę immunologiczną prowadzącą do sekrecji AMP. Redukcja liczby hemocytów prowadzi do osłabienia fagocytozy, co umożliwia bakteriom symbiotycznym namnażanie. Nicienie mają na powierzchni kutykuli (*Heterorhabditis*) lub mogą wydzielać do otoczenia (*Steinernema*) substancje dezaktywujące, a następnie zabijające hemocyty. Następnym, ważnym czynnikiem osłabiającym układ odpornościowy żywiciela jest redukcja lub blokada aktywacji fenoloksydazy (PO). *Steinernema feltiae* ma w kutykuli substancje lipidowe blokujące PO, dzięki którym nie jest możliwa inkapsulacja nicienia wewnątrz ciała owada. Substancje te hamują ścieżkę sygnałową powodującą przekształcenie proenzymu proPO w PO. Mechanizm ten jest obserwowany tylko w przypadku gatunku *S. feltiae* (BRIVIO i współaut. 2004). Gdy nicienie uwolnią do wnętrza ciała żywiciela bakterie, one również inaktywują jego mechanizmy obronne (CASTILLO i współaut. 2011).

INFEKCJE OWADÓW BAKTERIAMI SYMBIOTYCZNYMI

Bakterie spełniają trzy funkcje w mutualistycznym związku z nicieniami: (i) szybko zabijają owada, (ii) dostarczają nicieniom substancji odżywczych, (iii) kolonizują i namnażają się w larwach przetrwalnych (IJ), co pozwala na transmisję bakterii do ciała żywiciela. Dodatkowo, bakterie zabezpieczają ciało żywiciela przed konkurencyjnymi saprofitami (GOODRICH-BLAIR i CLARKE 2007). Bakterie entomopatogeniczne cechują się bardzo wysoką patogennością względem larw owadów, ponieważ już niewielka ich liczba może doprowadzić do śmierci żywiciela. Wystarczy mniej niż 5 jednostek

CFU¹ (ang. colony forming unit) wstrzykniętych wprost do hemolimfy żywiciela, aby go zabić w przeciągu 48–72h. Aby uzmysłowić sobie skalę tego zjawiska można wspomnieć, że po wstrzyknięciu ponad 10⁶ CFU *Escherichia coli*, układ odpornościowy larwy owada może całkowicie zneutralizować infekcję (LEUIER i współaut. 2003). Wysoka wirulencja bakterii entomopatogenicznych jest rezultatem wydzielania szeregu substancji, głównie enzymów i toksyn. Najlepiej opisanymi toksynami wydzielanymi przez bakterie entomopatogeniczne są toksyny Tc (ang. toxic compleces) wydzielane przez bakterie należące do rodzajów *Xenorhabdus* i *Photorhabdus* oraz toksyny Pir (ang. Photorhabdus insect related), wydzielane wyłącznie przez rodzaj *Photorhabdus*. Wymienione cząsteczki mogą wykazywać toksyczność w przewodzie pokarmowym oraz po bezpośredniej iniekcji do hemolimfy.

Toksyny Tc to duże cząsteczki białkowe składające się z kilku podjednostek. Są wytwarzane też przez wolnożyjące bakterie entomopatogeniczne *Yersinia entomophaga* i *Bacillus thuringensis*. Ich działanie polega m.in. na zapobieganiu fagocytozie bakterii w hemolimfie oraz modyfikacji aktywności Rho GTP-azy. BUSBY i współaut. (2012) dowiedli, że jedną z podjednostek toksyny Tc jest chitynaza, która trawi chitynę obecną w błonie perytroficznej w przewodzie pokarmowym żywiciela, co otwiera dostęp do komórek nabłonka jelita. Ten sposób działania jest ważniejszy dla bakterii wolnożyjących, jednak może też mieć znaczenie dla bakterii entomopatogenicznych, które są umieszczane przez nicienie bezpośrednio w hemolimfie i dlatego nie pokonują bariery przewodu pokarmowego ofiary podczas zakażenia. Jest kilka hipotez tłumaczących dlaczego toksyny Tc bakterii entomopatogenicznych zawierają chitynazę. Aktywność chitynazы ujawnia się później, podczas trawienia egzoszkieletu ofiary. Chitynaza może też być konieczna do utrzymania struktury toksyny (BUSBY i współaut. 2012, NIELSEN-LEROUX i współaut. 2012). Toksyny Pir, mniejsze niż toksyny Tc, są binarnymi białkami wydzielanymi tylko przez rodzaj *Photorhabdus*. Działają destrukcyjnie na tkankę nerwową żywiciela (NIELSEN-LEROUX i współaut. 2012, CASTAGNOLA i STOCK 2014).

Bakterie entomopatogeniczne mają różne, zależnie od rodzaju i gatunku strategie pozwalające na pokonanie barier immunologicznych żywiciela, przy czym pokonanie barier mechanicznych ułatwia im gospodarz – nicienie. Bakterie gatunku *Xenorhabdus*

¹CFU, jednostka określająca liczbę mikroorganizmów w badanym materiale po posiewie na płytkę agarową żywych, zdolnych do podziału bakterii).

nematophila blokują wydzielanie cząsteczek AMP, natomiast bakterie rodzaju *Photorhabdus* wydzielają substancje aktywnie je niszczące. Oba mechanizmy zmniejszają stężenie AMP w hemolimfie utrudniając aktywną obronę przed patogenem (NIELSEN-LEROUX i współaut. 2012). Dowiedziono, że metaloproteaza PrtA, wydzielana przez bakterie rodzaju *Photorhabdus*, degraduje cekropiny AMP typu A i B w testach *in vitro* (CABRAL i współaut. 2004). Bakterie entomopatogeniczne wydzielają enzymy i toksyny niszczące hemocyty. *Photorhabdus luminescens* i *X. nematophila* inaktywują elementy układu odpornościowego żywiciela dzięki komponentom wbudowanym w błonę komórkową. W kolejnych etapach infekcji bakterie wydzielają szereg enzymów: proteaz, lipaz, chitynaz oraz hemolizyn, trawiących tkanki żywiciela do postaci łatwo przyswajalnej przez parazytoidy. Bakterie wydzielają antybiotyki, które zabijają naturalną mikroflorę żywiciela mogącą konkurować z nicieniami o zasoby pokarmowe (GOODRICH-BLAIR i CLARKE 2007, NIELSEN-LEROUX i współaut. 2012, CASTAGNOLA i STOCK 2014).

NICIENIE POZBAWIONE SYMBIONTÓW

Pożądaną cechą nicieni z punktu widzenia badań nad interakcjami pomiędzy symbiontem a gospodarzem jest możliwość utrzymania w warunkach laboratoryjnych organizmów pozbawionych symbiontów. Można otrzymać dwa typy takich nicieni: (i) aposymbiotyczne – mogą się rozwijać w obecności innych organizmów, jednak ich formy przetrwalne nie posiadają w swoim przewodzie pokarmowym bakterii symbiotycznych, (ii) akseniczne – hodowane w środowisku całkowicie pozbawionym innych organizmów. Nicienie aposymbiotyczne mogą być izolowane również z prób środowiskowych. Dziko żyjące nicienie aposymbiotyczne pojawiają się, gdy podczas wykształcania się larwy inwazyjnej bakterie symbiotyczne obumarły i kolonizacja nie powiodła się. Nicienie aposymbiotyczne niektórych gatunków entomopatogenicznych można łatwo otrzymać w warunkach laboratoryjnych. Formy aposymbiotyczne różnych gatunków nicieni entomopatogenicznych mają cechy zmienione w porównaniu do organizmów symbiotycznych. Podczas fazy wolnożyjącej nicienie aposymbiotyczne gatunku *Steinernema carpocapsae* pozostają przy życiu dłużej niż nicienie symbiotyczne, natomiast w przypadku innego gatunku (*S. scapterisci*) nie wykazano istotnych różnic w przeżywalności w fazie wolnożyjącej pomiędzy nicieniami symbiotycznymi a aposymbiotycznymi (EMELIANOFF i współaut. 2007). Nicienie aposymbiotyczne

zachowują się inaczej również podczas fazy pasożytniczej. Aposymbiotyczne nicienie gatunków *S. carpocapsae*, *S. riobrave* oraz *S. scapterisci* osiągały statystycznie znacząco niższe wskaźniki sukcesu reprodukcyjnego i inwazyjności w porównaniu do nicieni symbiotycznych (SICARD i współaut. 2003). Niektóre gatunki nicieni, w formie aposymbiotycznej mogą zabić żywiciela i rozwinąć się wewnątrz ciała ofiary, jednak nie wytwarzają larw przetrwalnych (CICHE i współaut. 2006). W innych przypadkach nie dochodzi do zapłodnienia wewnątrz organizmu żywicielskiego lub wyklucia się osobników młodocianych. Larwy przetrwalne gatunku *H. bacteriophora* mogą zarazić owada, jednak po skutecznej inwazji parazytoidy bardzo słabo się rozmnażają, a potomstwo nie osiąga dojrzałości płciowej. Takie zjawisko zaobserwowano również podczas hodowli *H. bacteriophora* na bogatym w tłuszcze i aminokwasy podłożu agarowym (HAN i EHLERS 2000). Nicienie rodzaju *Steinernema* nie wykazują specyficzności w stosunku do symbiotycznych bakterii, rozmnażają się bez ich obecności oraz przy obecności innych, niezwiązanych z danym gatunkiem *Steinernema* bakterii entomopatogenicznych (CICHE i współaut. 2006).

WZAJEMNE ODDZIAŁYWANIA POMIĘDZY SYMBIONTEM A GOSPODARZEM

Relacje pomiędzy symbiontem a gospodarzem można zbadać porównując ten sam gatunek/szczep w stanie symbiotycznym oraz aposymbiotycznym. Inną metodą poznawania relacji symbiont-gospodarz może być wymiana organizmów symbiotycznych pomiędzy gospodarzami lub utworzenie metodami inżynierii genetycznej symbionta wyposażonego w unikatowe cechy i zakażenie nim gospodarza. Dzięki zastosowaniu wymienionych metod badawczych odkryto szereg interesujących zależności pomiędzy nicieniami a ich symbiotycznymi bakteriami.

Porównując organizmy symbiotyczne z aposymbiotycznymi można określić oddziaływanie symbionta podczas kolejnych etapów cyklu życiowego gospodarza.

Inne cechy są korzystne podczas fazy wolnożyjącej, a inne podczas fazy pasożytniczej. Dzieje się tak dlatego, że podczas fazy wolnożyjącej bakterie są wciąż aktywne. Nicienie nie pobierają pokarmu, w tym czasie jednak bakterie cały czas pobierają substancje odżywcze oraz wydzielają metabolity. Można zauważyć, że im bardziej aktywne metaboliczne są bakterie, tym długość życia larwy przetrwalnej w środowisku się skraca (SICARD i współaut. 2003, 2004a). Jed-

nocześnie, w przypadku znalezienia żywiciela, wysoka aktywność metaboliczna bakterii jest korzystna. Podziały bakterii wewnątrz ciała gospodarza przebiegają dynamiczniej, co sprawia, że nicienie szybciej zaczynają pobierać pełnowartościowy pokarm wydzielany przez symbioty. Bakterie silnie wirulentne szybko powodują śmierć żywiciela, szybko też zużywają wspólne zasoby podczas fazy wolnożyjącej (pozażywicielskiej). Pomiedzy nicieniami i ich symbiontami dochodzi do kompromisu. Bakterie powinny być na tyle wirulentne, aby szybko doprowadzić do śmierci larwy owada, ale też nie doprowadzić do przedwczesnej śmierci swojego gospodarza-nicienia. Gatunki bakterii różnią się między sobą np. stopniem wirulencji czy dynamiką wzrostu. Właściwości bakterii mają wpływ na interakcję z nicieniami oraz żywicielami (EMELIANOFF i współaut. 2007, CHAPUIS i współaut. 2012).

Specyficzność doboru gatunków symbionta i gospodarza może różnić się zakresem od szerokiej, gdy poszczególne gatunki mogą infekować różne gatunki gospodarzy, do wąskiej, tylko pomiędzy konkretnymi gatunkami symbionta i gospodarza. W związku wybiórczym może dojść do naturalnej wymiany symbionta, np. podczas koinfekcji, kiedy jeden żywiciel zostaje zainfekowany przez dwa różne kompleksy symbiont-gospodarz. Podczas wykształcania się IJ nicienie zostają z sukcesem zasiedlone tylko przez jeden gatunek bakterii. Przykładem takiego związku są bakterie rodzajów *X. bovenii* lub *X. innexi* izolowane z różnych gatunków nicieni *Steinernema* spp. (TAILLIEZ i współaut. 2006, 2010). Przykładem ścisłego związku jest kompleks *S. carpocapsae/X. nematophila*. Gospodarz i symbiont wzajemnie się rozpoznają, a w przypadku, gdy bakterie innego gatunku rozpoczynają zasiedlanie układu pokarmowego nicieni, ich rozwój zostaje zahamowany, a nicien rozwija się dalej bez bakterii (CICHE i współaut. 2006, GOODRICH-BLAIR i CLARKE 2007). U bakterii gatunku *X. nematophila* zidentyfikowano klastery genów *SR1* (ang. symbiosis region 1), kodujący białka *nil* (ang. nematode intestine localization) typu A, B i C, który odpowiada za dopasowanie pomiędzy nicieniami a bakteriami. Nicienie rozpoznają bakterie wydzielające białka kodowane przez gen *nil*, obecność których jest niezbędna do rozwoju wewnątrz ciała. Nierozpoznane bakterie obumierają w przewodzie pokarmowym nicienia (MARTENS i współaut. 2005, CHASTON i współaut. 2013). Opisaną zależność przetestowano metodami inżynierii genetycznej. CHASTON i współaut. (2013) porównali aktywność nicieni z prawidłowo działającym oraz z uszkodzonym klastrem *SR1*. Mutanty *X. nematophi-*

la Δ SR1 nie przeżywały wewnątrz przewodu pokarmowego gospodarza: infekcja rozpoczęła się od prawidłowego zagnieżdżenia się, jednak w późniejszych etapach ich rozwój został zahamowany, co w konsekwencji doprowadziło do śmierci bakterii. System ten został zidentyfikowany tylko dla kompleksu *S. carpocapsae/X. nematophila*. Inne gatunki rodzaju *Steinernema* nie posiadają aż tak rozwiniętego systemu rozpoznawania symbiontów. Dzięki temu jest możliwe zakażenie gospodarza innym niż naturalnie, współwystępującym symbiontem. Możliwa jest także infekcja symbiontem zmutowanym w celu badania zależności symbiont-gospodarz (CHASTON i współaut. 2013). Zjawisko wzajemnego rozpoznawania się jest istotne, gdy rozpoczyna się kolonizacja przewodu pokarmowego stadium młodocianego nicieni przez symbiotyczne bakterie. (SICARD i współaut. 2005, SNYDER i współaut. 2007, CHAPUIS i współaut. 2012).

KOSZTY SYMBIOZY Z BAKTERIAMI DLA STADIÓW POZAŻYWICIELSKICH NICIENI

Obecność symbionta przynosi gospodarzowi korzyści, np. dostęp do pokarmu lepszej jakości, ale jest też kosztowna, np. podczas etapu wolnożyjącego symbiont korzysta z zasobów zgromadzonych w ciele gospodarza (CHASTON i współaut. 2013). Aby zbadać wpływ bakterii na nicienie można określić liczbę bakterii znajdującą się w ciele gospodarza. Poszczególne gatunki nicieni różnią się liczbą bakterii przenoszonych w swoim przewodzie pokarmowym. SICARD i współaut. (2004b) określili dostosowanie nicieni *S. carpocapsae* zasiedlonych przez naturalnego symbionta *X. nematophila* oraz kilkoma innymi gatunkami bakterii entomopatogenicznych. Nicienie akseniczne zostały zainfekowane różnymi gatunkami bakterii entomopatogenicznych w warunkach laboratoryjnych. Badano tempo reprodukcji oraz inwazyjność względem larw barciaka większego (*G. mellonella*). Zbadano również stabilność nowo otrzymanych kompleksów symbiont-gospodarz. Wykazano, że najlepiej funkcjonują kompleksy dzikie, natomiast wraz ze zwiększaniem się dystansu genetycznego pomiędzy symbiontem dzikim a eksperymentalnie wprowadzonym, spada tempo reprodukcji oraz zdolność do skutecznej inwazji. Stwierdzono również, że obecność niektórych gatunków bakterii powoduje spadek wybranych parametrów poniżej progu obserwowanego dla nicieni aposymbiotycznych, co oznaczało, że bakterie te są wręcz szkodliwe dla gospodarza. Praca ta stała się wstępem do kolejnych badań zależności pomiędzy nicieniami a bakteriami (EMELIANOFF i

współaut. 2007, LEE i STOCK 2010, CHAPUIS i współaut. 2012). W przypadku innych gatunków *Steinernema* nie wykazano wpływu liczby przenoszonych bakterii na dostosowanie. CHAPUIS i współaut. (2009), w serii eksperymentów wykorzystujących infekowanie nicieni z obcymi symbiontami, występującymi w stanie dzikim oraz szczepami otrzymanymi w wyniku ewolucji eksperymentalnej określili, że sukces pasożytniczy nicieni zwiększa się wraz z wirulencją bakterii oraz że przeżywalność nicieni w fazie wolnożyjącej spada wraz z liczbą przenoszonych bakterii (EMELIANOFF i współaut. 2008; CHAPUIS i współaut. 2009, 2011, 2012).

ZALETY ZWIĄZKU NICIENI Z BAKTERIAMI PODCZAS ETAPU PASOŻYTNICZEGO

Bakterie metabolizują tkanki ofiary a wytworzone w tym procesie produkty stanowią łatwo przyswajalny pokarm dla parazytoidów. Obecność bakterii sprawia, że powstaje więcej IJ niż w analogicznym przypadku dotyczącym nicieni aposymbiotycznych, IJ posiadają też więcej materiałów zapasowych, dzięki którym mogą przetrwać poza organizmem żywicielskim (EHLERS 2001, SICARD i współaut. 2003, CHAPUIS i współaut. 2012). W 2004 r. MITANI i współaut. porównali wpływ szczepu dzikiego i zmutowanego szczepu *rpoS X. nematophila* na dostosowanie parazytoidów. Mutanty *rpoS* nie są zatrzymywane w przewodzie pokarmowym nicieni. Nicienie zostały zainfekowane swoim naturalnym szczepem lub mutantem. Dla potomstwa tak skonstruowanych połączeń symbiont-gospodarz określono tempo reprodukcji, proporcję płci, długość życia, zbadało morfologię larw inwazyjnych. Jako kontroli użyto nicieni aposymbiotycznych. Już na początku zaobserwowano, że uśmiercenie owada zajmuje mutantom statystycznie więcej czasu niż szczepom dzikim. Dodatkowo zaobserwowano, że nicienie aposymbiotyczne żyją statystycznie dłużej od symbiotycznych, natomiast larwy owada zarażone przez nicienie aposymbiotyczne były częściej narażone na infekcje grzybowe. Larwy inwazyjne mogą być zasiedlone przez symbionta noszącego mutację i z powodzeniem zarazić kolejnego gospodarza. Gospodarz umierał w przeciągu 48h, jednak w trakcie takiej inwazji nie pojawiły się IJ (MITANI i współaut. 2004).

PODSUMOWANIE

Nicienie entomopatogeniczne wraz z ich bakteriami symbiotycznymi tworzą skomplikowany i bardzo czuły układ pozwalający na niezwykle efektywne zasiedlanie kolejnych

żywicieli. Mechanizm ten jest wykorzystywany w ochronie biologicznej upraw oraz w badaniach zależności pomiędzy symbiontami a gospodarzami. Technika pozwalająca na hodowanie nicieni symbiotycznych, aposymbiotycznych oraz bakterii *in vitro* pozwala na badania zależności pomiędzy tymi parazytoidami a ich symbiotycznymi bakteriami. Dzięki prowadzonym badaniom dowiedziano, że związek nicieni z bakteriami jest bardzo złożony, obejmuje nie tylko oddziaływania synergistyczne, ale i antagonistyczne. Role nicieni i bakterii zmieniają się w zależności od fazy cyklu życiowego, zasobów pokarmowych czy warunków środowiska. Dodatkowo, duże zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe, różnorodność strategii nawet blisko spokrewnionych gatunków, stanowi podstawę do interesujących badań nad zależnościami pomiędzy symbiontami a gospodarzami.

PODZIĘKOWANIA

Chciałabym złożyć serdeczne podziękowania dr hab. Annie Rożen i dr Karolinie Kuszewskiej za udzielone uwagi i sugestie oraz mgr Terézii Horváthovej za sugestie w związku z anglojęzyczną wersją abstraktu. Dziękuję również anonimowemu recenzentowi za trud włożony w korektę artykułu i cenne rady.

STRESZCZENIE

Interesującym przykładem zależności mutualistycznej są nicienie entomopatogeniczne (EPN). Nicienie rodzajów *Steinernema* i *Heterorhabditis* wraz z ich symbiotycznymi bakteriami charakteryzują się bardzo wysoką wirulencją w stosunku do larw owadów. Ta cecha sprawiła, że są stosowane w rolnictwie jako biopreparat, alternatywa lub uzupełnienie dla tradycyjnych metod ochrony roślin. Próby wykorzystywania EPN w walce ze szkodnikami stały się impulsem dla szerszych badań nad ich biologią i ekologią. EPN mają szczególną cechę, ponieważ są zakażone tylko jednym gatunkiem bakterii symbiotycznych tworząc pary *Steinernema/Xenorhabdus* i *Heterorhabditis/Photorhabdus*. Nicienie oraz ich symbionty mogą być również hodowane osobno w warunkach laboratoryjnych na sztucznych pożywkach. Taki układ pozwala na badanie wzajemnych relacji, umożliwia pogłębienie wiedzy na temat biologii układu symbiont-gospodarz oraz pozwala na wykorzystanie tej wiedzy w praktyce. W prezentowanej pracy opisuję biologię EPN i ich symbiontów podczas inwazji żywiciela, przedstawiam wybrane mechanizmy pozwalające na efektywną kooperację pomiędzy symbiontem a gospodarzem oraz przykłady badań prowadzonych na nicieniach pozbawionych symbiontów. Nicienie entomopatogeniczne wraz z ich bakteriami symbiotycznymi tworzą skomplikowany i bardzo czuły układ pozwalający na niezwykle efektywne zasiedlanie kolejnych żywicieli. Możliwości hodowania nicieni symbiotycznych, nicieni pozbawionych symbiontów oraz bakterii symbiotycznych w warunkach laboratoryjnych, a dodatkowo krótki cykl życiowy, wysoka płodność oraz łatwość modyfikacji genetycznych bakterii i nicieni pozwala na stosowanie ich jako organizmu modelowego w badaniach m.in. mutualizmu i pasożytnictwa.

LITERATURA

- ADAMS B. J., FODOR A., KOPPENHOFER H. S., STACKENBRANDT E., STOCK S. P., KLEIN M. G., 2006. *Biodiversity and systematic of nematode-bacterium entomopathogens*. Biol. Contr. 38, 4-21.
- ADAMS B. J., PEAT S. M., DILLMAN A. R., 2007. *Phylogeny and evolution*. [W:] *Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts*. NGUYEN K. B., HUNT D. J. (red.). *Nematology Monographs and Perspectives* 5, Koninklijke Brill NV, Leiden, 693-733.
- BAI X., ADAMS B. J., CICHE T., CLIFTON S., GAUGLER R., KIM K. S., SPIETH J., STERNBERG P. W., WILSON R. K., GREWAL P. S., 2013. *A lover and a fighter: the genome sequence of an entomopathogenic nematode Heterorhabditis bacteriophora*. PLoS One 8, 1-13.
- BAUR M. E., KAYA H. K., STRONG D. R., 1998. *Foraging ants as scavengers on entomopathogenic nematode-killed insects*. Biol. Contr. 12, 231-236.
- BLAXTER M. L., DE LEY P., GAREY J. R., LIU L. X., SCHELDAMAN P. i współaut., 1998. *A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda*. Nature 392, 71-75.
- BOEMARE N. E., AKHUST R. J., MOURANT R. G., 1993. *DNA relatedness between Xenorhabdus spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and proposal to transfer Xenorhabdus luminescens to a new genus, Photorhabdus gen. nov.* Int. J. Syst. Bacteriol. 43, 249-255.
- BRIVIO M. F., MASTORE M., MORO M., 2004. *The role of Steinernema feltiae body-surface lipids in host-parasite immunological interactions*. Mol. Biochem. Parasitol. 135, 111-121.
- BUSBY J. N., LANDSBERG M. J., SIMPSON R. M., JONES S. A., HANKAMER B., HURST M. R. H., LOTT J. S., 2012. *Structural analysis of Chil chitinase from Yen-Tc: The multisubunit insecticidal ABC toxin complex of Yersinia entomophaga*. J. Mol. Biol. 415, 359-371.
- CABRAL C. M., CHERQUI A., PEREIRA A., SIMÕES N., 2004. *Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium Photorhabdus sp. strain Az29*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 3831-3838.
- CAMPOS-HERRERA R., BARBERCHECK M., HOY C. W., STOCK S. P., 2012. *Entomopathogenic nematodes as a model system for advancing the frontiers of ecology*. J. Nematol. 44, 162-176.
- CAMPOS-HERRERA R., GUTIÉRREZ C., 2014. *Steinernema feltiae intraspecific variability: infection dynamics and sex-ratio*. J. Nematol. 46, 35-43.
- CASTAGNOLA A., STOCK S. P., 2014. *Common virulence factors and tissue targets of Entomopathogenic bacteria for biological control of Lepidopteran pests*. Insects 5, 139-166.
- CASTILLO J. C., REYNOLDS S. E., ELEFATHERIANOS I., 2011. *Insect immune responses to nematode parasites*. Trends Parasitol. 27, 537-547.
- CHAPUIS E., EMELIANOFF V., PAULMIER V., LE BRUN N., PAGÈS S., SICARD M., FERDY J.-B., 2009. *Manifold aspects of specificity in a nematode-bacterium mutualism*. J. Evolut. Biol. 22, 2104-2117.
- CHAPUIS E., PAGÈS S., EMELIANOFF V., GIVAUDAN A., FERDY J.-B., 2011. *Virulence and pathogen multiplication: a serial passage experiment in the hypervirulent bacterial insect-pathogen Xenorhabdus nematophila*. PLoS One 6, 1-11.
- CHAPUIS E., ARNAL A., FERDY J.-B., 2012. *Trade-offs shape the evolution of the vector-borne insect pathogen Xenorhabdus nematophila*. Proc. Royal Soc. B, Biol. Sci. 279, 2672-2680.
- CHASTON J. M., SUEN G., TUCKER S. L., ANDERSEN A. W., BHASIN A., BODE E., BODE H. B., BRACHMANN A. O., COWLES C. E., COWLES K. N., DARBY C., DE LÉON L. i współaut., 2011. *The entomopathogenic bacterial endosymbionts Xenorhabdus and Photorhabdus: convergent lifestyles from divergent genomes*. PLoS One 6, e27909.
- CHASTON J. M., MURFIN K. E., HEATH-HECKMAN E. A., GOODRICH-BLAIR H., 2013. *Previously unrecognized stages of species-specific colonization in the mutualism between Xenorhabdus bacteria and Steinernema nematodes*. Cell. Microbiol. 15, 1545-1559.
- CICHE T. A., DARBY C., EHLERS R.-U., FORST S., GOODRICH-BLAIR H., 2006. *Dangerous liaisons: The symbiosis of entomopathogenic nematodes and bacteria*. Biol. Contr. 38, 22-46.
- DE LEY P. A., 2006. *A quick tour of nematode diversity and the backbone of nematode phylogeny*. WormBook (<http://www.wormbook.org>).
- DILLMAN A. R., CHASTON J. M., ADAMS B. J., CICHE T., GOODRICH-BLAIR H., STOCK S. P., STERNBERG P. W., 2012. *An entomopathogenic nematode by any other name*. PLoS Pathogens 8, e1002527.
- EASOM C., JOYCE S., CLARKE D., 2010. *Identification of genes involved in the mutualistic colonization of the nematode Heterorhabditis bacteriophora by the bacterium Photorhabdus luminescens*. BMC Microbiol. 10, 45.
- EHLERS R.-U., 2001. *Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56, 623-633.
- EHLERS R.-U., 2007. *Entomopathogenic Nematodes: from science to commercial use*. [W:] *Biological Control: a Global Perspective*. VINCENT C., GOETTEL M., LAZAROVITS G. (red.). CAB International, 136-151.
- ELEFATHERIANOS I., FRENCH-CONSTANT R. H., CLARKE D. J., DOWLING A. J., REYNOLDS S. E., 2010. *Dissecting the immune response to the entomopathogen Photorhabdus*. Trends Microbiol. 18, 552-560.
- EMELIANOFF V., CHAPUIS E., LE BRUN N., CHIRAL M., MOULIA C., FERDY J.-B., 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., FERDY J.-B., 2008. *A survival-reproduction trade-off in entomopathogenic nematodes mediated by their bacterial symbionts*. Evol. Int. J. Org. Evol. 62, 932-942.
- FERRIS H., BONGERS T., DE GOEDE R. G. M., 2001. *A framework for soil food web diagnostics: Extension of the nematode faunal analysis concept*. Appl. Soil Ecol. 18, 13-29.
- FERRIS H., GRIFFITHS B. S., PORAZINSKA D. L., POWERS T. O., WANG K.-H., TENUTA M., 2012. *Reflections on plant and soil nematode ecology: past, present and future*. J. Nematol. 44, 115-126.
- FORST S., NEALSON K., 1996. *Molecular biology of the symbiotic-pathogenic bacteria Xenorhabdus spp. and Photorhabdus spp.* Microbiol. Rev. 60, 21-43.
- GAUGLER R., MCGUIRE T., CAMPBELL J., 1989. *Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematode Steinernema feltiae*. J. Nematol. 21, 247-253.

- GOODRICH-BLAIR H., CLARKE D. J., 2007. *Mutualism and pathogenesis in Xenorhabdus and Photorhabdus: two roads to the same destination*. Mol. Microbiol. 64, 260-268.
- GREWAL P. S., WANG X., TAYLOR R. A. J., 2002. *Dauer juvenile longevity and stress tolerance in natural populations of entomopathogenic nematodes: is there a relationship?* Int. J. Parasitol. 32, 717-725.
- GRIFFIN C. T., DOWNES M. J., 1991. *Low temperature activity in Heterorhabditis sp. (Nematoda: Heterorhabditidae)*. Nematologica 37, 83-91.
- GULCU B., HAZIR S., KAYA H., 2012. *Scavenger deterrent factor (SDF) from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes*. J. Invertebr. Pathol. 110, 326-333.
- HAMMOND P. M., HAWKSWORTH D. L., KALIN-ARROYO M. T., 1995. *Magnitude and distribution of biodiversity: 3.1. The current magnitude of biodiversity*. [W:] *Global Biodiversity Assessment*. HEYWOOD V. H. (red.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 113-138.
- HAN R., EHLERS R.-U., 1999. *Pathogenicity, Development, and reproduction of Heterorhabditis bacteriophora and Steinernema carpocapsae under A xenix in vivo conditions*. J. Invertebr. Pathol. 75, 55-58.
- HAZIR S., STOCK S. P., KAYA H. K., KOPPENHÖFER M., KESKIN N., 2001. *Developmental temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode Steinernema feltiae (Nematoda: Steinernematidae)*. J. Invertebr. Pathol. 77, 243-250.
- LAMBSHEAD P. J. D., 1993. *Recent developments in marine benthic biodiversity research*. Oceanis 19, 5-24.
- LAVINE M. D., STRAND M. R., 2002. *Insect hemocytes and their role in immunity*. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 1295-309.
- LEE M.-M., STOCK S. P., 2010. *A multilocus approach to assessing co-evolutionary relationships between Steinernema spp. (Nematoda: Steinernematidae) and their bacterial symbionts Xenorhabdus spp. (γ-Proteobacteria: Enterobacteriaceae)*. Syst. Parasitol. 77, 1-12.
- LEULIER F., PARQUET C., PILI-FLOURY S., RYU J. H., CAROFF M., LEE W. J., 2003. *The Drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition*. Nat. Immunol. 4, 478-484.
- MANEESAKORN P., AN R., DANESHVAR H., TAYLOR K., BAI X., ADAMS B. J., GREWAL P. S., CHANDRAPATYA A., 2011. *Phylogenetic and co-phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditis: Rhabditida) and their symbiotic bacteria (Photorhabdus: Enterobacteriaceae)*. Mol. Phylogenet. Evol. 59, 271-280.
- MARTENS E. C., RUSSELL F. M., GOODRICH-BLAIR H., 2005. *Analysis of Xenorhabdus nematophila metabolic mutants yields insight into stages of Steinernema carpocapsae nematode intestinal colonization*. Mol. Microbiol. 58, 28-45.
- MITANI D., KAYA H., GOODRICH-BLAIR H., 2004. *Comparative study of the entomopathogenic nematode, Steinernema carpocapsae, reared on mutant and wild-type Xenorhabdus nematophila*. Biol. Cont. 29, 382-391.
- MURFIN K. E., DILLMAN A. R., FOSTER J. M., BULGHERESI S. S., BARTON E., STERNBERG P. W., GOODRICH-BLAIR H., 2013. *Nematode-bacterium symbioses - cooperation and conflict revealed in the 'Omics' age*. Biol. Bull. 223, 85-102.
- NADLER S. A., BOLOTIN E., STOCK S. P., 2006. *Phylogenetic relationships of Steinernema (Cephalobina, Steinernematidae) based on nuclear, mitochondrial, and morphological data*. Syst. Parasitol. 63, 159-179.
- NIELSEN-LEROUX C., GAUDRIault S., RAMARAO N., LERECLUS D., GIVAUDAN A., 2012. *How the insect pathogen bacteria Bacillus thuringiensis and Xenorhabdus/Photorhabdus occupy their hosts*. Curr. Opin. Microbiol. 15, 220-231.
- NGUYEN K. B., MARUNIAK J., ADAMS B. J., 2001. *Diagnostic and phylogenetic utility of the rDNA internal transcribed spacer sequences of Steinernema*. J. Nematol. 33, 73-82.
- PARK J.-J., JAGDALE G. B., CHO K., GREWAL P. S., HOY C. W., 2014. *Spatial association between entomopathogenic and other free-living nematodes and the influence of habitat*. Appl. Soil Ecol. 76, 1-6.
- SAN BLAS E., 2013. *Progress on entomopathogenic nematology research: A bibliometric study of the last three decades: 1980-2010*. Biol. Contr. 66, 102-124.
- SALAME L., GLAZER I., MIQIAIA N., CHKHUBIANISHVILI T., 2010. *Characterization of populations of entomopathogenic nematodes isolated at diverse sites across Israel*. Phytoparasitica 38, 39-52.
- SEENIVANSAN N., SIVAKUMAR M., 2013. *Screening for environmental stress-tolerant entomopathogenic nematodes virulent against cotton bollworms*. Phytoparasitica 42, 165-177.
- SHAPIRO-ILIAN D. I., STUART R. J., MCCOY C. W., 2003. *Comparison of beneficial traits among strains of the entomopathogenic nematode, Steinernema carpocapsae, for control of Curculio caryae (Coleoptera: Curculionidae)*. Biol. Contr. 28, 129-136.
- SICARD M., LE BRUN N., PAGES S., GODELLE B., BOEMARE N., 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., BRUGIRARD-RICAUD K., LANOIS A., BOEMARE N. E., PAGES S., BREHE M., GIVAUDAN A., 2004. *Stages of infection during the tripartite interaction between Xenorhabdus nematophila, its nematode vector, and insect hosts*. Appl. Environ. Microbiol. 70, 6473-6480.
- SICARD M., FERDY J.-B., PAGES S., LE BRUN N., GODELLE B., BOEMARE N., MOULIA C., 2004. *When mutualists are pathogens: an experimental study of the symbioses between Steinernema (entomopathogenic nematodes) and Xenorhabdus (bacteria)*. J. Evol. Biol. 17, 9885-9893.
- SICARD M., RAMONE H., LE BRUN N., MOULIA C., 2005. *Specialization of the entomopathogenic nematode Steinernema scapterisci with its mutualistic Xenorhabdus symbiont*. Die Naturwissenschaften 92, 472-476.
- SICARD M., RAIMOND M., PRATS O., LAFITTE A., BRAQUART-VARNIER C., 2008. *Pathogenic effect of entomopathogenic nematode-bacterium complexes on terrestrial isopods*. J. Invertebr. Pathol. 99, 20-27.
- SNYDER H., STOCK S. P., KIM S.-K., FLORES-LARA Y., FORST S., 2007. *New insights into the colonization and release processes of Xenorhabdus nematophila and the morphology and ultrastructure of the bacterial receptacle of its nematode host, Steinernema carpocapsae*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 5338-5346.
- SPIRIDONOV S. E., REID A. P., PODRUNKA K., SUBBOTIN S. A., MOENS M., 2004. *Phylogenetic relationships within the genus Steinernema (Nematoda: Rhabditida) as inferred from analyses of sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 re-*

- gion of rDNA and morphological features. *Nematology* 6, 547-566.
- STOCK S. P., CAMPBELL J. F., NADLER S. A., 2001. *Phylogeny of Steinernema Travassos, 1927 (Cephalobina: Steinernematidae) inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characteristics*. *J. Parasitol.* 87, 877-889.
- TAILLIEZ P., PAGÈS S., GINIBRE N., BOEMARE N., 2006. *New insight into diversity in the genus Xenorhabdus, including the description of ten novel species*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 56, 2805-2818.
- TAILLIEZ P., LAROUÏ C., GINIBRE N., PAULE A., PAGÈS S., 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. l.* *Int. J. System. Evol. Microbiol.* 60, 1921-1937.
- WRIGHT P. J., 1992. *Cool temperature reproduction of steinerne-matid and heterorhabditid nematodes*. *J. Invertebr. Pathol.* 60, 148-151.

KOSMOS Vol. 65, 3, 433-443, 2016

ENTOMOPATHOGENIC NEMATODES AS MODEL ORGANISM IN RESEARCH OF HOST-SYMBIONT AND HOST-PARASITE INTERACTIONS

JASMINA PATRYCJA MACKIEWICZ

Institute of Environmental Science, Jagiellonian University, Gronostajowa 7, 30-387, Kraków, e-mail: jasmina.mackiewicz@uj.edu.pl

Summary

This work presents a short description of host-symbiont relation in entomopathogenic nematodes (EPN) from genus *Steinernema* and *Heterorhabditis* and their symbiotic bacteria from genus *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*, respectively. EPN are highly virulent to insects, so that they are used as a biocontrol agent. EPN are also used as model organisms in studies on host-parasite and host – symbiont interactions. Bacteria are the only symbiont of EPN. Nematodes and their symbionts can be cultivated in laboratory conditions on artificial media. This feature is very useful for examining relations between a host and its symbiont.