

XXXI. OTDK Biológia Szekció

Rosa Márta Erzsébet

DEBRECEN

2012

Gazda-szimbionta koevolúció kísérletes vizsgálata zöld hidráknál

TÉMAVEZETŐ

Dr. Tökölyi Jácint

Egyetemi tanársegéd

KÉSZÍTETTE

Rosa Márta Erzsébet

Biológus MSc

1. évfolyamos hallgató

DEBRECEN

2012

Tartalom

Bevezetés	1
Szimbionta kapcsolatok.....	3
A szimbiózissal járó koevolúciós folyamatok	3
Hydra-Chlorella kapcsolat	6
Anyagok és módszerek.....	9
Minták és tartási körülmények.....	9
Aposzimbiotikus hidrák létrehozása	9
Fertőzés.....	10
Bimbózási ráta vizsgálata	11
Statisztikai analízisek	12
Eredmények	13
Következtetések és későbbi tervek	19
Összefoglalás.....	20
Köszönetnyilvánítás.....	21
Irodalomjegyzék	21

Bevezetés

A fajok közti mutualisztikus kooperáció magyarázata a mai napig az evolúcióbiológia egyik nagy kérdése. Maga a kapcsolat viszonylag egyszerűen magyarázható. Lényege, hogy az interakció minden részvevőnek kedvező azáltal, hogy a partnerek a költségeket meghaladó előnyökhöz jutnak. A természetben számos ehhez hasonló kölcsönhatással találkozhatunk. A recens vizsgálatok azonban arra engednek következtetni, hogy a partnerek kooperációja az esetek többségében nem tisztán mutualista jellegeket mutat, vagyis ez a fajta interakció is alapvetően önző kapcsolat, mely során mindkét fél a saját fitneszt igyekszik növelni, akár a másik fél rovására is. Ha mutáció útján kialakulnak önző egyedek, akkor azok könnyedén felülmúlhatják fajtársaikat mivel több forráshoz jutnak hozzá és nagyobb mértékben vesznek részt az új utódnemzedék kialakításában. Az önző, ám sikeres tulajdonság így képes fennmaradni és egy idő után a populáció nagy része ilyen egyedekből fog állni, ami beindítja a védekezési és kihasználási stratégiák koevolúcióját. E hipotézis predikciója, hogy az egymástól izoláltan evolválódó populációkban más-más egyensúlyi szintre áll be a rendszer, egyrészt a véletlen következtében, másrészt a partnerváltás lehetőségében meglevő különbségek miatt. Ebben a munkában a zöld hidrák (*Hydra viridis*) és *Chlorella* endoszimbionta algáik esetében vizsgálok egy ilyen szimbiotikus kapcsolatot.

A dolgozat célja a mutualista kapcsolat vizsgálata eltérő környezetből származó hidrák és *Chlorelláik* között. A gazda-szimbionta koevolúciós elmélet szerint a partnerek közötti folyamatos egymáshoz alakulásnak köszönhető, hogy a rendszer képes megőrizni mutualista jellegét. Ennek megfelelően abból az alap hipotézisből indulunk ki, hogy az adaptáció különböző törzsekben más-más képpen alakulhat az eltérő környezeti hatásoknak köszönhetően. Ennek predikciójaként eltéréseket várunk a saját illetve a más törzsből izolált algákkal történő keresztfertőzések során a hidrák bimbózási sikerességében. Az így kapott adatokat felhasználva képet kapunk arról, hogy az egyes törzsek és szimbiontaik között lezajlott-e olyan koevolúciós folyamat, ami következtében a saját algákat felismerik és könnyebben alakítanak ki vele mutualista kapcsolatot.

Dolgozatom első részében ismertetem magát a gazda-szimbionta kapcsolatot, vagyis, hogy milyen előnyökkel jár a szimbiózisban való részvétel illetve, hogy egyáltalán milyen szabályozó mechanizmusok útján valósulhat meg az együttélés. Röviden kitérek pár recens vizsgálati eredményre is. Ezután bemutatom a kísérleti módszereket, köztük az aposzimbiotikus hidrák létrehozását és a keresztfertőzés folyamatát. A kapott eredmények kiértékelése mellett szeretnék ismertetni néhány további tervezett kutatási témát is.

Szimbionta kapcsolatok

A szimbiózissal járó koevolúciós folyamatok

Koevolúció alatt két faj egymással kölcsönhatásban történő fejlődését értjük, mely olyan genetikai változásokat idéz elő, ami evolúciós időskálán együttes fajkeletkezéshez vezethet (Ehrlich és Raven, 1964). Ez a fajta reciprok kapcsolat csak tisztán antagonista (herbivoria, predáció, parazitizmus) vagy mutualista rendszerekben működhet, ahol erős a felek egymástól való függése. A koevolúciós folyamatok bizonyos esetekben „kofilogenetikusak” is lehetnek, így a kölcsönhatásban részt vevő partnerek törzsfái egymás tükörképeiként alakulnak. Ez a szintű egymáshoz alakulás azonban ritka, főleg parazita kapcsolatokra jellemző (Klassen, 1992).

A szimbiózissal járó koevolúciós folyamatokat az utóbbi években kezdték alaposabban vizsgálni. Felismerték, hogy a préda-predátor illetve parazita kapcsolatok mellett a mutualista kapcsolatok mozgató rugója is lehet a „fegyverkezési verseny”, mely lépések és ellenlépések sorozatából álló egymáshoz alakulást jelent, ami megkérdőjelezi a szimbionta rendszerekről eddig kialakított képet. Elsősorban mikorrhiza és nitrogénfixáló baktériumok esetében figyelték meg a mutualista kapcsolatokban jelenlévő kihasználási stratégiák működését (Kiers és mtsai, 2011). A mikorrhiza kapcsolatok szárazföldi növények és arbuszkuláris mikorrhizát alkotó gombák közötti szimbiózis eredményei (Hata és mtsai, 2010). Az így létrejövő komplex földalatti hálózatokhoz több partner is csatlakozhat, így mind a gomba mind pedig a növény több szimbionta partnerrel áll összeköttetésben. A kapcsolat során a növények szénhidrátokat biztosítanak a gombák számára, melyek cserébe amellet, hogy ásványi anyagokkal látják el gazdanövényüket, védelmet is nyújtanak számukra bizonyos biotikus (patogének és herbivorok) és abiotikus (pl.: szárazság) hatások ellen. Az egyes szimbionták kooperativitásának mértékében azonban lehetnek különbségek, ebben az esetben pedig fontos a hatékony együttműködés érdekében valamilyen módon megakadályozni az önző tulajdonságokkal rendelkező felek előre törését és elszaporodását. A növények ezért feltételezhetően képesek felismerni a számukra hasznosabb partnereket, akiket ennek megfelelően több tápanyaggal látnak el, mint a kevésbé kooperatívakat (Kiers és mtsai, 2011). Ez úgy valósulhat meg, hogy azokba a gyökerekbe juttatnak több szénhidrátot, amelyek a nagyobb hasznot jelentő gombaegyeddel vannak összeköttetésben. Ez a fajta visszacsatolás a

gomba részéről is megvan, tehát akkor látja el növény partnerét elegendő ásványi anyaggal, ha cserébe ő maga is megfelelő mennyiségű tápanyagot kap. A mutualista partnerek fontos tulajdonsága tehát, hogy képesek jutalmazni vagy büntetni egymást (Kiers és mtsai, 2011). Ennek köszönhetően lesz a mutualizmus evolúciósan stabil állapot, mely nem engedi meg a csalók jelenlétét és mindkét fél számára előnyös marad. Kiers (2003) hasonló jelenséget írt le rhizobiumot alkotó nitrogénfixáló baktériumoknál is. Ebben az esetben a nem kooperatív (csalóként felfogható) partner reprodukciós sikerében 50%-os csökkenést tapasztaltak, aminek oka itt is az, hogy gazdanövény kevesebb tápanyagot és oxigént juttatott ezekbe a gyökérgümőkbe. Ha nem így lenne, akkor a természetes szelekció során azok a baktériumok maradnának fenn, amelyek csak kevés nitrogént kötnek meg, mivel kevesebb plusz energiát kell befektetniük a növény táplálásába. A szimbiózisból azonban így egy idő után parazita kapcsolat alakulna ki.

A fenti példákból kiderül, hogy több szimbionta esetén a gazdának lehetősége nyílik válogatni, így a szimbionták nem képesek érvényesülni a gazda szabályozó mechanizmusai miatt. Az önzést megengedő rendszerek vagy kiszelektálódnak az evolúció során, vagy átalakulnak egyoldalú, parazita interakcióvá. Akkor hogyan maradhatnak fent mégis kölcsönösen előnyös kapcsolatok? A mutualista partnerek nagy részénél megállapítható, hogy legalább az egyik fél szabályozó szerepet tölt be, aminek köszönhetően gyakorlatilag rákényszeríti a másikat a kooperációban való részvételre. Ez jutalmazás vagy büntetés révén (források biztosítása vagy megvonása) történhet (Kiers, 2006; Rand és mtsai, 2006; Heath & Tiffin, 2007). Ebben az esetben a kapcsolat egyirányúnak tekinthető, mivel a gazda irányítása alatt áll (szemben a mikorrhizáknál tapasztalt kölcsönös szabályozással). Ennek oka, hogy a legtöbb esetben a gazda képes egy olyan szelektív környezetet teremteni a szimbiontái számára, amely a kooperatív egyedeket preferálja, kiszűrve ezzel a csalókat. Azonban sok esetben kölcsönös jutalmazásra van szükség, mely útján stabil szintre tud beállni az állapot, vagyis egyikük sem nyomja el a másikat, a kapcsolat kölcsönösen előnyös marad és képes évmilliókig is fennállni. Különösen igaz ez, ha a szimbionták vertikálisan, vagyis szülőből utódba terjednek (Kiers és mtsai, 2003). Ilyenkor mindkét fél fokozottan érdekelt a gazda jólétének biztosításában, hogy létrejöhessen az új utódnemzedék. A vertikális transzmisszió hatására továbbá genetikailag homogén szimbionta állomány jön létre mivel nincs, vagy korlátozott a lehetőség új genotípusok beáramlásának. Ebből következik, hogy nagyobb az esélye bizonyos allélok kiesésének palacknyak-hatás vagy genetikai drift miatt. A szelekció

pedig ezekben a rendszerekben is a kevésbé kooperatívakra hat leginkább, így azok fognak nagyobb valószínűséggel kiesni a populációból. Ha a szimbionták genetikailag homogének, akkor az egyedek közti kompetíció kisebb mértékű, mintha több különböző törzsből származó szimbionta osztozkodna egy gazdán, ami szintén hozzájárul mindkét mutualista partner jólétéhez és reprodukciós sikeréhez. Ez lehet az egyik oka annak is, hogy azokban a mutualista közösségekben, amelyekben a gazda mind ivaros, mind pedig ivartalanul képes utódokat létrehozni, az egyensúly általában az aszexuális szaporodás felé tolódik el a szimbionták nem tartalmazó rokonaihoz képest. Ennek egy másik magyarázata lehet, hogy a szimbiózis következtében a résztvevők kevésbé vannak kitéve a környezeti változások okozta veszélyeknek, így mivel nincs szükség a szexualitás útján megvalósuló genetikai változékonyságra, nem éri meg vállalni az ivaros szaporodás költségeit (Law & Lewis, 1983). Ez figyelhető meg például zuzmóknál vagy bizonyos dinoflagellátákkal (*Symbiodinium*) együtt élő tengeri gerincteleneknél, elsősorban koralloknál, melyek szabadon élő szimbiontái feltehetően képesek szexuális reprodukcióra, habár gazdán belül csak ivartalan szaporodást figyeltek meg (Herre és mtsai, 1999).

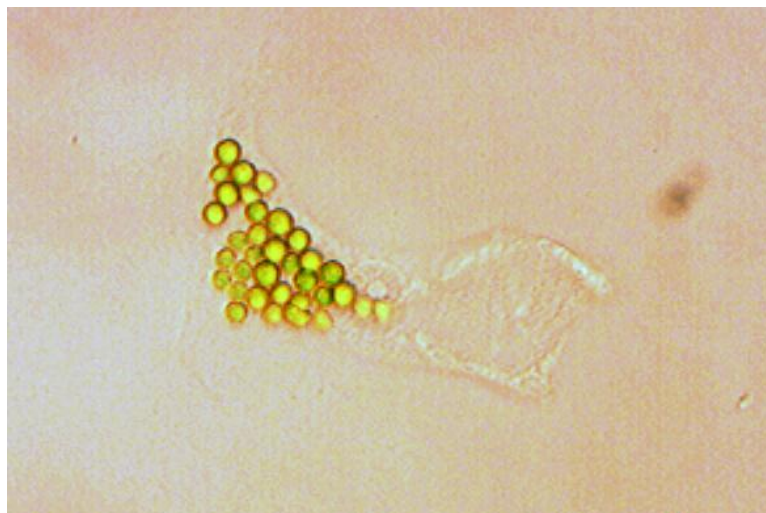
Gyakori jelenség a gazda-szimbionta kapcsolatokban, hogy bizonyos tulajdonságok eltűnnek vagy megváltoznak a szabadon élő rokonokhoz képest. Hasonló jelenséget ír le kísérletében Jeon (1983), melyben amőbákat (*Amoeba proteus*) fertőzött meg egy gram-negatív baktérium törzssel. A baktériumok nem emésztődtek meg, viszont negatívan hatottak az amőbákra. Néhány egyed mégis képes volt túlélni a fertőzést és évek múltával a kapcsolatból egy stabil, obligát mutualizmus jött létre. Az eredeti, szabadon élő és a szimbionta életmódot folytató baktériumok között számos morfológiai és életmódbeli változást írtak le hasonlóan a gazdákhoz. Ezt bizonyítja, hogy a szimbiontáktól megszabadított amőbák sejtmagját nem szimbionta egyedek citoplazmájába helyezve az állat csak akkor maradt életképes, ha baktériumokat is juttattak a sejtbe. Az amőbában tehát az évek során olyan alkalmazkodási mechanizmusok játszódhattak le, mely révén nélkülözhetetlenné váltak számára a baktériumok. Ezzel szemben a baktériumok képesek voltak más amőba törzsekben is megmaradni, tehát az ő szemszögükből nem beszélhetünk ilyen nagyfokú specifikusságról. Ugyanakkor a fertőzött amőbákból izolált baktériumokat nem fertőzött amőbákba juttatva a mutualista állapot gond nélkül létrejött szemben az először 1967-ben leírt szabadon élő baktériumokkal való fertőzéssel (Jeon & Ahn, 1978; Lorch és mtsai, 1985). A kapcsolat során tehát olyan koevolúciós folyamatoknak kellett lejátszódniuk, amiknek köszönhetően a

szabadon élő társaikhoz képest jelentős változásokon esnek át a partnerek. Ennek pontos módja azonban még nem ismert.

Hydra-Chlorella kapcsolat

Az alga-gazda kapcsolatok nem ritkák az állatvilágban. A zoochlorellák mellett bizonyos dinoflagellata zooxanthellák is gyakori endoszimbionták. Ilyen például a *Symbiodinium microadriaticum* (Taylor, 1974). Cianella algákkal is alakulhat ki szimbiózis, mint ahogy a protozoa *Paulinella chromatophora* esetében. Chlorellákkal is több faj él együtt, ilyen például az egysejtű *Paramecium bursaria* (Weis, 1977). A csalánozóknak is több csoportjánál figyelhető meg ez a jelenség, ez azonban elsősorban trópusi fajokra jellemző tulajdonság (Nybakken, 2004). Számos zátonyépítő korallnál találkozhatunk zooxanthellákkal, de még a medúzák között is akadnak algákkal együtt élő fajok, mint például a Florida partjainál élő *Cassiopeia frondosa*, mely sekély vizekben fejfelé lebeg, hogy a fotoszintetizáló algákat tartalmazó karjai nézzenek a fény felé. Európában az egyetlen csalánozó, amely zöld algákkal él szimbiózisban, a zöld hidra (Krisa, 2008). A zöld hidrák endoszimbionta zöld algákkal, zoochlorellákkal (*Chlorella vulgaris*) és bizonyos, főleg gram-negatív ostoros baktériumokkal élnek mutualizmusban (Thorington és mtsai, 1979). A szimbiotikus kapcsolat során az algák CO₂-ot, foszfátot és nitrogén vegyületeket kapnak a hidrától, cserébe oxigént, maltózt és glükóz-6-foszfátot termelnek fotoszintézisük során (Muscatine, 1965; Huss és mtsai, 1993/94). Mivel fotoautotróf szervezetek (Kratz & Myers, 1955), számukra nélkülözhetetlen a fény. Ez az oka, hogy a zöld hidrák csak tiszta vizekben fordulnak elő.

Az algák a hidrák endodermális gasztrális (emésztő) sejtjeiben találhatók (1. ábra). Mindegyik zoochlorella önálló vakuólumban helyezkedik a gazda sejtjén belül (Muscatine, 1974; Jolley & Smith, 1980). Sejtenként átlagosan 10-30 db fordul elő (az érték törzsenként eltérő lehet). Mivel egy hidrának nagyjából 10,000 emésztősejtje van, állatonként akár több mint 200,000 alga jelen lehet. Az endodermán kívül sehol máshol nem figyelhető meg szimbionta.



1. ábra: zöld hidra egy gastrális sejtje macerálás után fáziskontraszt mikroszkóp alatt. A kép OPTICA digitális mikroszkóp kamerával készült.

A hidra-szimbiota kapcsolat szorosságát illetően sok kérdés felmerül. Habár a természetben kizárólag zöld formában találkozhatunk *Hydra viridis*-sel, laboratóriumi körülmények között előállíthatók algákat nem tartalmazó, úgynevezett aposzimbiotikus hidrák, melyek ugyan úgy életképesek, mint zöld társaik. Elmondható tehát, hogy a hidra részéről nem beszélhetünk teljesen obligát mutualizmusról. Az algák természetes környezetükben is megtalálhatók szabadon, viszont növekedésük a gazdán belül kedvezőbb, ami a szimbiózis előnyeiről tanúskodik. Ugyanakkor a közvetlenül hidrából izolált algák nem tarthatók huzamosabb ideig életben, ami pedig arra utal, hogy valószínűleg hiányzik belőlük egy olyan gén, ami a kinti léthez szükséges.

Az aposzimbiotikus, vagyis alga-mentes zöld hidrák fehér színűek, morfológiailag azonban a zöldekkel teljesen megegyeznek és megfelelő etetés mellett hosszú ideig életképesek maradhatnak, habár anyagcseréjük sokkal hatékonyabb algák jelenlétében és a normális zöld hidrákhoz képest rosszabbul viselik az éhezést, így lassabban duplázódik meg a számuk és hamarabb is pusztulnak el. Ilyenek lehetnek a frissen kikelt, vagy a laboratóriumban mesterségesen algátlanított egyedek. Algákat vonhatunk ki a hidrákból fényelvonással, erős megvilágítással (fotobleaching), glicerines kezeléssel vagy olyan fotoszintézis gátló szerekkel, mint a DCMU vagy a linuron. A kifehéredett állapot azonban sokszor nem tart sokáig, pár hét alatt gyakran visszazöldülnek.

Az aposzimbiotikus hidrák újrafertőzhetőek. Erről először Goetsch (1924) majd Park (1967) tett említést, az első részletes leírás azonban Pardy és Muscatine (1973) nevéhez fűződik. A fertőzés után pár napig (ez változó 2-6 nap lehet) csökken a sejtek fertőzéskor mérhető algaszáma, majd ugrásszerű növekedésnek indul egészen addig, amíg az állatra jellemző mennyiséget el nem éri az egyes sejtekben. A teljes bezöldülés 1-4 hetet vesz igénybe, ez törzsenként eltérő lehet.

Az általam végzett kísérletben aposzimbiotikus hidrák újrafertőzése útján vizsgáltam a hidra és algái közötti interakciót. Mivel a koevolúciós elmélet szerint az egymással mutualizmusban élő partnerek az idő előrehaladtával egyre jobban alkalmazkodnak egymáshoz, felvethető az a hipotézis, hogy a különböző törzsekben környezeti és egyéb hatásokra más-más módon zajlottak le az adaptációs folyamatok. Az alábbiakban ismertetett kísérletben ezt a hipotézist próbáltam tesztelni úgy, hogy az aposzimbiotikus hidra törzseket saját és eltérő alगतörzsekkel is visszafertőztem, majd ezt követően mértem az állatok szaporodási sikerét. A feltételezésem az, hogy ha ez a hipotézis helyes, akkor a hidrák eltérő bimbózási rátát fognak mutatni attól függően, hogy saját vagy idegen algák vannak-e jelen.

Anyagok és módszerek

Minták és tartási körülmények

A kísérlet során 3, különböző helyről gyűjtött hidra törzzsel dolgoztam, melyek az M7, M8 és M9 elnevezést kapták.

Gyűjtési adatok:

- M7: 2010, Pocsaj
- M8: 2012, Tiszafüred
- M9: 2012, Berettyóújfalu

A hidrákat Hans Bode receptje alapján készített tenyésztőoldatban (Bode, 1974) tartjuk, mely CaCl_2 , MgCl_2 , KNO_3 , NaHCO_3 és MgSO_4 tartalmú sóoldat. Az oldat szobahőmérsékleten tartható, előnye, hogy a szódabikarbónának köszönhetően pH beállítást nem igényel. Az állatokat klímaszekrényben tartjuk, ahol biztosított az állandó hőmérséklet ($20\text{ }^\circ\text{C}$) és fotoperiódus (12/12h fény/sötétség). Etetésüket és tisztításukat a kísérlet alatt hetente háromszor végeztük pasteur pipettával. Az etetéshez frissen kikelt sórák (*Artemia*) naupliákat használtunk.

Aposzimbiotikus hidrák létrehozása

Az aposzimbiotikus hidrák olyan zöld hidrák (*Hydra viridis*), melyekből az alga szimbiotákat (*Chlorella*) mesterséges módszerekkel kivonták, így azok fehér színűek, fotoszintetizáló szervezeteket nem tartalmaznak. Természetes körülmények között aposzimbiotikus állatokkal nem lehet találkozni. Az algák kivonásának több módszere ismert, ezek közül a DCMU (diklórfenil-dimetil urea vagy diuron) a legnépszerűbb, azonban nekünk nem volt alkalmunk kipróbálni, mivel kivonták a kereskedelmi forgalomból. Az aposzimbiotikus hidrák létrehozását a gyomirtó + erős fénnel történő megvilágítás kombinációjával értük el. Ehhez linuront (3-(3,4-dichlorophenyl)-1-methoxy-1-methylurea) használtunk 10 mikroliter/literes koncentrációban. A linuron a DCMU-hoz nagyon hasonló elven működik. Hatóanyaga a Metoxi-metil-karbamidok hatóanyagcsoportjába tartozik, hatásmechanizmusát tekintve a Hill-reakciót gátlásával fotoszintézis inhibitor.

Megvilágításra 160W-os égőt használtunk, amit az üvegektől egyenlő, kis magasságra helyeztünk el. A standard körülmények melletti fehéritésnél fontos tényező az azonos koncentráció és fényforrástól való távolság mellett az azonos hőmérséklet, oldatmennyiség és a párolgás elkerülése. Hidegben tartva a fehéredés rövidebb idő alatt bekövetkezik, ezért hideg klímakamrában végeztem az aposzimbiotikus egyedek létrehozását. Szobahőmérsékleten is eredményes volt a fehérités, azonban több időt vett igénybe és nehezebb volt a standard körülmények biztosítása. Az egyes törzsek fehéredési sebessége eltérő lehet, ennek megfelelően eltérhet az optimális linuronkoncentráció is. Kísérletem során a 10 mikroliter/literes koncentrációt találtam a leghatékonyabbnak, ami mellett a fehéredés 5 °C-on 4-5 nap alatt, szobahőmérsékleten megközelítőleg 10 nap alatt ment végbe (ez törzsenként jelentősen eltérhet).

A kezelés meglehetősen megviseli az állatokat. Méretük lecsökken, karjaikat gyakran elvesztik és sok egyed el is pusztulhat. A megmaradt, fehér hidrákat tenyésztőoldatba tesszük, majd miután regenerálódtak, naponta etetjük és tisztítjuk őket. Gyakori a visszazöldülés. Ez 1-2 héten belül, de volt, hogy csak egy hónap elteltével következett be. A megfelelő koncentráció és időtartam kikísérletezésével azonban sikerült maradandóan fehér törzseket létrehozni. Az aposzimbiotikus egyedek ugyan úgy szaporodtak, mint a zöldek, viselkedésükben sincs különbség. Ezek már alkalmasak további kísérletekre, így például keresztfertőzés anyai lehetnek.

Fertőzés

A kísérletek során mindhárom törzsből sikerült algákat izolálnom és ezzel visszafertőznöm a aposzimbiotikus hidrákat.

Algák izolálásához 3-szor 5 percig centrifugáltam 0,1 ml zöld hidrát 8000 fordulaton. Az állatokat a kísérlet megkezdése előtt 24 órával megettettem. A homogenizáció és 0,3 ml víz hozzáadása után felrázva friss algaoldatot kaptam, amit láng felett elvékonyított üvegkapilláris segítségével (amit egy pasteur pipettával dolgoztunk össze) a hidrák ürbelébe fecskendeztem sztereomikroszkóp alatt.

Az előző nap megettetett, fertőzni kívánt aposzimbiotikus hidrákat a kezelés előtt petricsészébe tettem, hogy az állatok a csésze aljára tapadjanak, ami azért fontos mert a lebegőket nem lehet szájon át etetni. Fontos továbbá, hogy az állatokat összehúzódnásra kell

kényszeríteni, amihez talpkorongjukhoz közel ingerelni kell őket. A csésze aljára letapadt, összehúzódott állat „felfelé néz”, szájnyílását egészen nagyra kitátja, karjait rövidre behúzza, így azok sincsenek útban a fertőzésnél. A kapillárisba felszívott algát óvatosan a hidra ürbelébe fecskendezve az állat láthatóan megdagad és enyhe zöldes elszíneződést mutat. A fertőzés sikerességét jelzi, hogy az algák egy részét visszaöklendezik.

Keresztfertőzés során eltérő törzsekből származó algával fertőzzük a hidrákat. A kísérletben összesen 9 fertőzést hajtottam végre (1. táblázat), így a lehető összes kombináció vizsgálható volt.

M7axM7	M7axM8	M7axM9
M8axM7	M8axM8	M8axM9
M9axM7	M9axM8	M9axM9

1. táblázat: Az M7, M8 és M9 hidra törzsek és algáik kilenc kombinációja. Az „a” betű az aposzimbiotikus hidrákat jelöli.

A fertőzött egyedek tenyésztóedénybe kerültek és klímakamrában állandó körülmények között voltak tartva. Minden kísérleti csoportban 12 egyed volt. A fertőzés után az állatok azonos időben, hetente háromszor kaptak táplálékot. Egy hét elteltével már minden törzsnél láthatóan megindult a bezöldülés főleg a karok és a talpkoron közelében. A fertőzéseket különböző időpontokban hajtottam végre. Az első és utolsó fertőzés között összesen egy hónap telt el.

Bimbózási ráta vizsgálata

A fertőzést követően már az első etetési alkalommal megtörtént a bimbók megszámlálása, majd a továbbiakban rendszeres időközönként, hetente háromszor végeztük a felmérést. Minden esetben csak a már levált, önálló egyednek tekinthető fiatal állatokat számoltuk, melyeket utána el is távolítottunk. Az első fertőzés óta eddig 12 hét telt el, így jelenleg 36 alkalommal határoztuk meg a bimbózási aktivitást a legkorábban fertőzött (M7axM7) törzsnél és 21 esetben a legutoljára kezelténél (M9axM8). A fertőzött állatok mellett azonos módon minden törzsből kezeletlen zöld és aposzimbiotikus hidrák bimbózását is vizsgáltuk, szintén 12-12 egyedet csoportonként.

A bimbózási ráta vizsgálata mellett folyamatosan figyelemmel követtük az ivarosszervek megjelenését is. A fertőzés kezdetekor jelentek meg ivaros szaporodó egyedek először az aposzimbiotikus hidrák között, majd később minden törzsnél előfordultak. A bimbókhoz

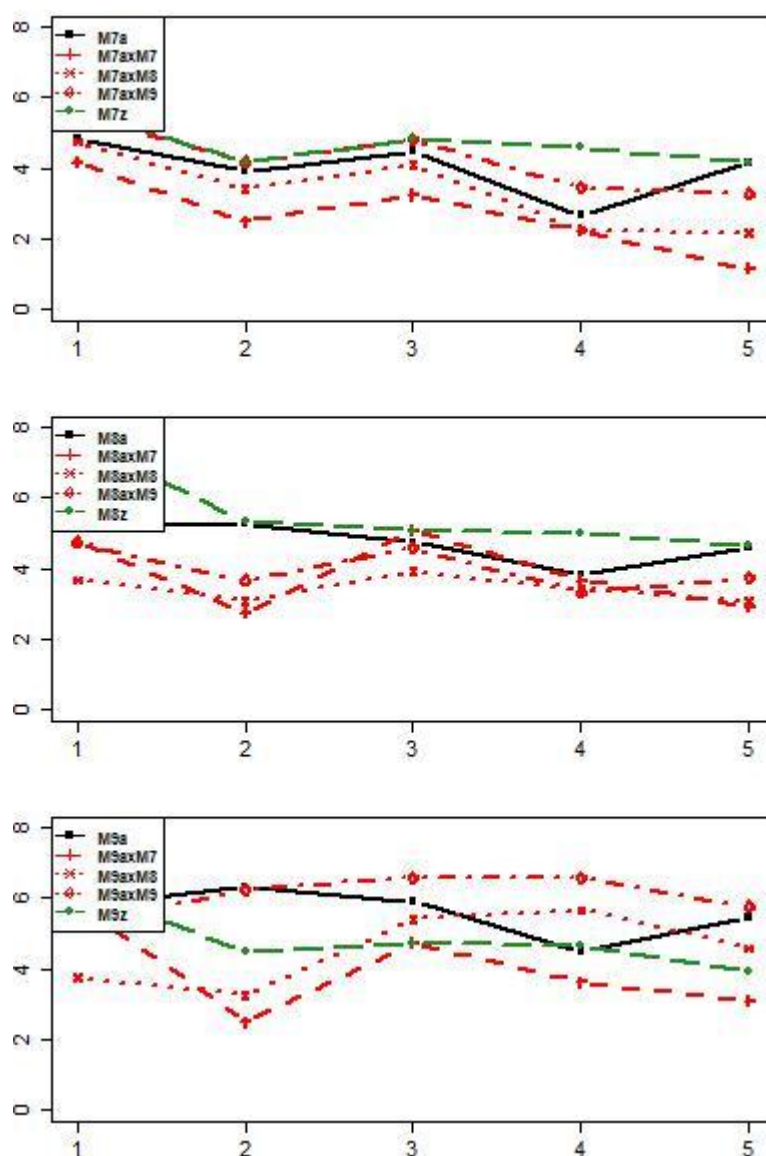
hasnolán az ivaros egyedeket is feljegyeztük heti három alkalommal. Az ivarszervek jelenlétét sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk. Külön figyeltünk arra is, hogy hímek vagy hímnősek-e az egyedek. Az ivaros alakok figyelemmel követése azért volt szükséges, mert befolyásolhatják az egyedek bimbózását.

Statisztikai analízisek

Az eredmények kiértékelésére az R statisztikai programot használtam (R Development Core Team, 2010). A törzsek összehasonlításához először ANOVA és Post-Hoc teszteket használtunk, az egyedek szaporodási sikerének összehasonlítására (utolsó négy hétben leszámolt össz-bimbószám). Ezt követően elvégeztük az elemzéseket a nyers adatokra is, hogy kontrollálhassunk az ivaros szaporodás jelenlétére. Mivel a kísérlet során ugyan azokat az egyedeket mértük le több alkalommal, szükséges volt a pszeudoreplikáció következtében fellépő hibák kiszűrése, ami a minta Poisson-eloszlásából adódóan általánosított kevert lineáris modell segítségével történt: lme4 csomag (Bates, 2012), glmer függvény. A modellekbe fix hatásként a kísérleti csoportot (aposzimbiotikus, M7, M8 vagy M9 algával fertőzött illetve zöld), az ivaros állapotot (0-nincsenek ivarszervek, H – csak hím ivarszervek vannak; HN – hím és női ivarszervek egyaránt; csak női ivarszerveket hordozó egyedet nem láttunk a kísérlet során) illetve a mérések között eltelt időt vittük be. Ez utóbbira azért volt szükség, mert a vizsgálatot hetente háromszor végeztük hétfőn, szerdán és pénteken, vagyis két alkalommal 2, hétfőn viszont 3 nap telt el az előző számolás óta, ami miatt ezen a napon jelentősen több bimbót számoltunk le. Random hatásként az állatok egyedi azonosítóját vittük be.

Eredmények

A kísérlet során összesen 180 hidra bimbózását követtem nyomon 12 héten keresztül heti három alkalommal. A három vizsgált hidratörzset (M7, M8 és M9) különböző kombinációkban hasonlítottam össze. Az 1. táblázatban feltüntetett 9 féle fertőzés egyedei mellett mindhárom törzsből vizsgáltam kezeletlen zöld és aposzimbiotikus hidrák bimbózását is, így törzsenként összesen 5 csoportot hasonlítottam össze. Minden csoportból 12 állattal végeztem a felmérést. A bimbók számának heti átlagait mutatja a 2. ábra.

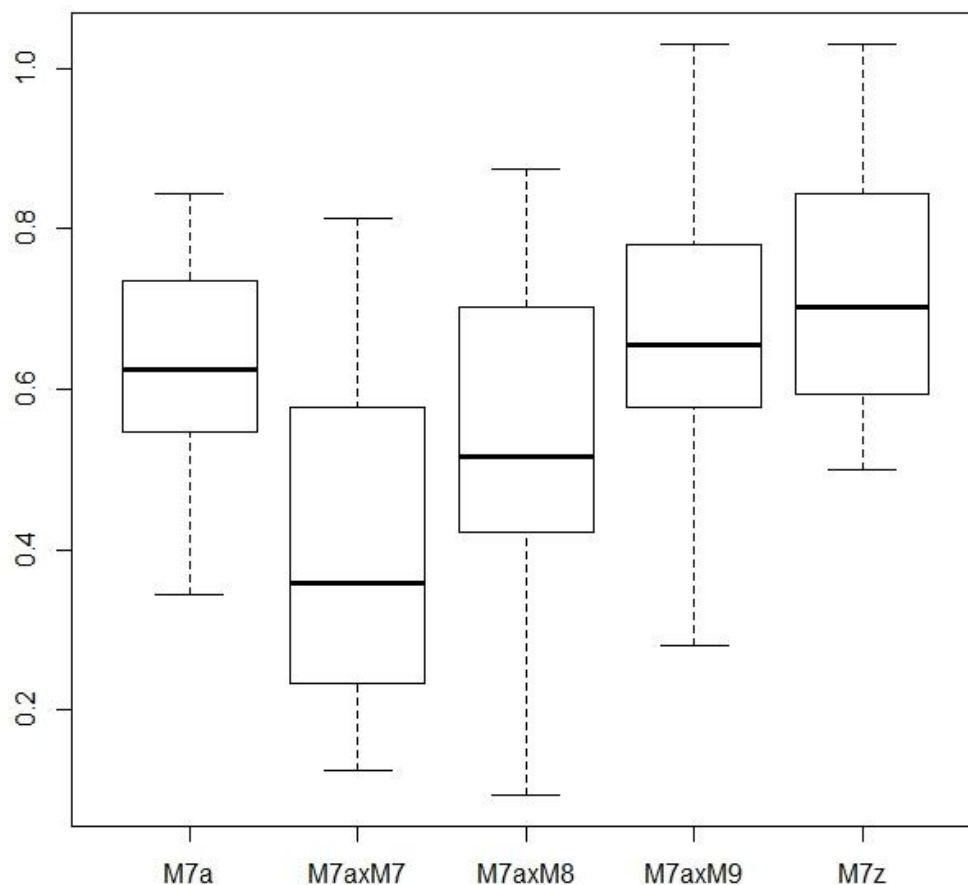


2. ábra: a bimbók heti átlagának felrajzolása törzsenként. Az „a” betű az aposzimbiotikus hidrákat jelöli.

Mivel a bimbózási ráta beállításához idő kell, a statisztikai kiértékelések során csak az utolsó 5 hét eredményeit vettem figyelembe. A különböző csoportok összehasonlítását ANOVA és Post-Hoc tesztekkel végeztük és törzsenként külön-külön ábráztuk.

1.) M7-es törzs

Az M7-es törzs esetében az utolsó 5 hét bimbózási adatai szerint a saját algával visszafertőzött (M7axM7) egyedek mutattak egyedül szignifikáns eltérést a kezeletlen egyedekhez (M7z) képest ($F_{4,54}=4.4899$, $p>0.001$). A tesztek eredményeit mutatja a 3. ábra és a 2. táblázat. Az ivarosán szaporodó egyedek és a mérések között eltelt napok számára általánosított kevert lineáris modellel kontrolláltunk (3. táblázat). Ebből kiderült, hogy a hím ivarszervek nincsenek szignifikáns hatással a bimbózási rátára, ezzel szemben a női ivarszervek igen. A lineáris modell is megerősíti a Post-Hoc teszt eredményeit, vagyis egyedül az M7axM7-es csoportnál mutat ki szignifikáns eltérést a zöldekhez képest.



3. ábra: Az utolsó 5 hét bimbózási rátája (bimbó/nap) a M7-es törzs vizsgált csoportjainál

	M7a	M7axM7	M7axM8	M7axM9
M7axM7	0.1070	-	-	-
M7axM8	1.0000	1.0000	-	-
M7axM9	1.0000	0.0474.	0.6004	-
M7z	1.0000	0.0035	0.1070	1.0000

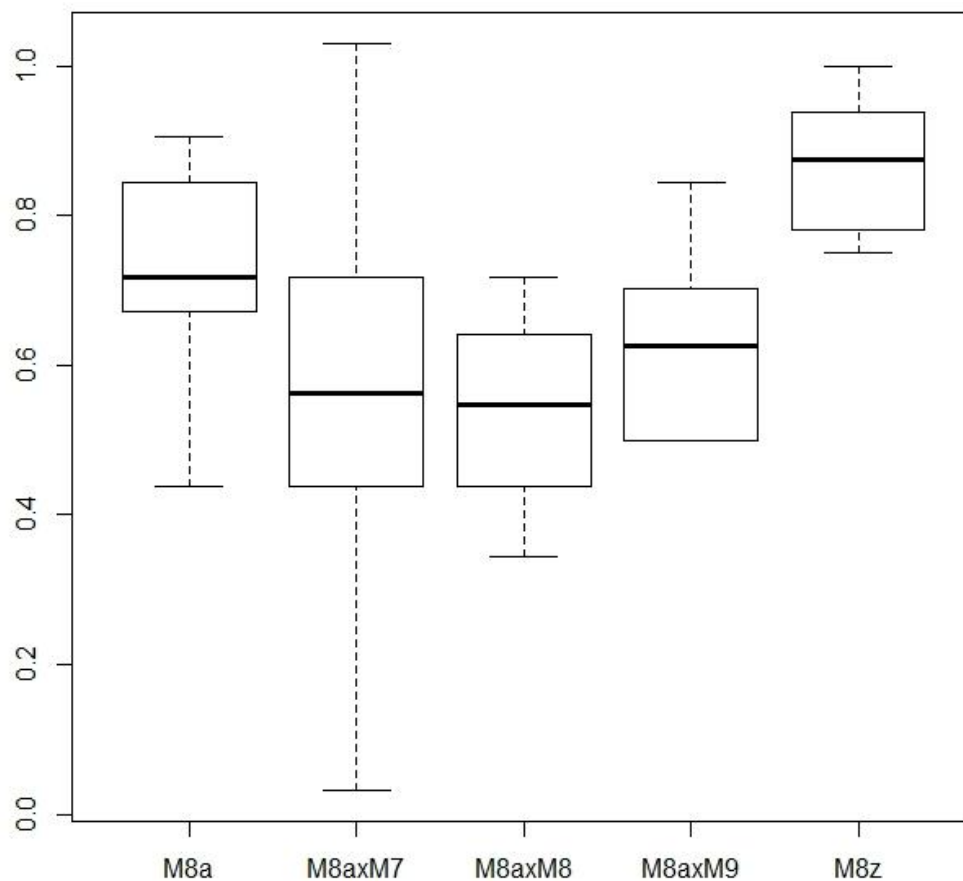
2. táblázat: Post-hoc teszt utolsó 5 hétre vonatkozó eredményei az M7-es törzsre

	Paraméterbecslés (SE)	Z (P)
(Intercept)	-1.01 (0.20)	-5.01 (<0.001)
M7a	-0.25 (0.14)	-1.82 (0.07)
M7axM7	-0.60 (0.15)	-3.95 (<0.001)
M7axM8	-0.43 (0.14)	-3.01 (0.003)
M7axM9	-0.07 (0.14)	-0.52 (0.60)
Hím egyedek	0.355 (0.08)	4.25 (<0.001)
Hímnős egyedek	-1.13 (1.01)	-1.11 (0.27)
Napok	0.51 (0.07)	7.32 (<0.001)

3. táblázat: Az M7-es törzsre vonatkozó általánosított kevert lineáris modell az ivaros szaporodásra kontrollálva

2.) M8-as törzs

Az M8-as törzs esetében mindegyik keresztfertőzött bimbózási rátája kisebbnek bizonyult a kezeletlen (M8z) törzsnél ($F_{4,56} = 7.6368$, $p < 0.001$). Egyedül az aposzimbiotikus (M8a) bimbózási rátája nem volt szignifikánsan alacsonyabb. A tesztek eredményeit mutatja a 4. ábra és a 3. táblázat. Az ivaros szaporodó egyedek és a mérések között eltelt napok számára általánosított kevert lineáris modellel kontrolláltunk. Ennek eredményét mutatja az 5. táblázat. Az M7-es törzshöz hasonlóan, itt is csak a női ivarszervek jelenléte befolyásolhatja a bimbózási rátát. A Post-Hoc teszthez hasonlóan itt is mindegyik keresztfertőzött törzs bimbózási rátája szignifikánsan kisebb ($p < 0.001$), mint a zöldeké.



2. ábra: Az utolsó 5 hét bimbozási rátája a M8-as törzs vizsgált csoportjainál

	M8a	M8axM7	M8axM8	M8axM9
M8axM7	0.07326	-	-	-
M8axM8	0.04001	0.73431	-	-
M8axM9	0.47485	0.66834	0.60736	-
M8z	0.38179	0.000040	0.00019	0.01029

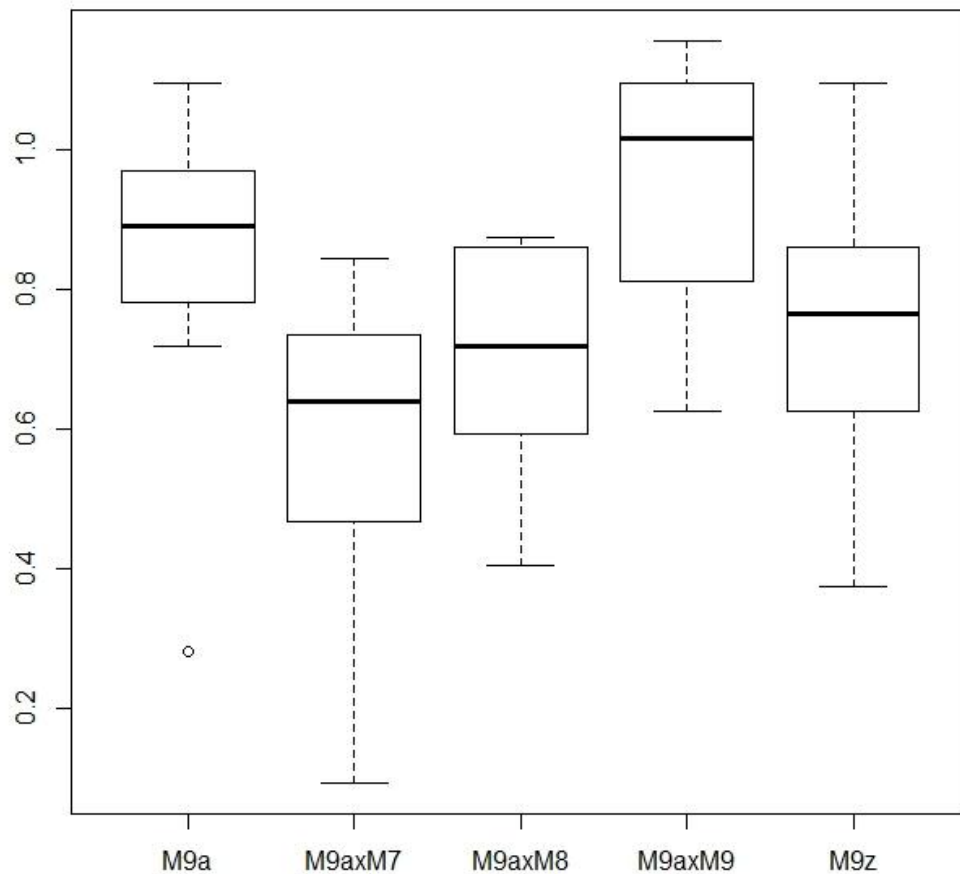
4. táblázat: Post-hoc teszt utolsó 5 hétre vonatkozó eredményei az M7-es törzsre

	Paraméterbecslés (SE)	Z (P)
(Intercept)	-0.53 (0.20)	-2.71(0.007)
M8a	-0.19 (0.09)	-1.98(0.05)
M8axM7	-0.37(0.11)	-3.47(<0.001)
M8axM8	-0.48(0.10)	-4.56(<0.001)
M8axM9	-0.31(0.10)	-3.19(0.001)
Hím egyedek	0.13(0.10)	1.27(0.21)
Hímnős egyedek	-0.82(0.23)	-3.56(<0.001)
Napok	0.43(0.06)	-6.70(<0.001)

5. táblázat: Az M8-as törzsre vonatkozó általánosított kevert lineáris modell az ivaros szaporodásra kontrollálva

3.) M9-es törzs

Az M9-es törzsnél egyértelműen látszik, hogy a keresztfertőzöttek nem térnek el szignifikánsan a kezeletlen (M9z) törzs bimbózási rátájától ($F_{4,55} = 6,4233$, $p < 0,001$). A tesztek eredményeit mutatja az 5. ábra és a 4. táblázat. Az ivaros szaporodó egyedek és a mérések között eltelt napok számára általánosított kevert lineáris modellel kontrolláltunk. Ennek eredményét mutatja a 7. táblázat. A bimbózási ráta ebben az esetben is független a hím ivarszervektől, a női ivarszerveket hozó egyedek bimbózási rátája azonban szignifikánsan alacsonyabb. A Post-Hoc tesztekhez képest itt sem mutat eltérést a lineáris modell, az M9axM9 bimbózási rátája szignifikánsan nagyobb, mint a zöld egyedeké, a többi keresztfertőzött esetében nincs eltérés.



3. ábra: Az utolsó 5 hét bimbozási rátája a M9-es törzs vizsgált csoportjainál

	M9a	M9axM7	M9axM8	M9axM9
M9axM7	0.01363	-	-	-
M9axM8	0.40993	0.49116	-	-
M9axM9	0.50416	0.00016	0.02001	-
M9z	0.50416	0.21757	0.56482	0.08596

6. táblázat: Post-hoc teszt utolsó 5 hétre vonatkozó eredményei az M7-es törzsre

	Paraméterbecslés (SE)	Z (P)
(Intercept)	-0.81(0.17)	-4.67(<0.001)
M9a	0.23(0.09)	2.51(0.01)
M9axM7	-0.24(0.11)	-2.29(0.02)
M9axM8	0.07(0.10)	0.71(0.48)
M9axM9	0.34(0.09)	3.85(<0.001)
Hím egyedek	0.09(0.08)	1.14(0.26)
Hímnős egyedek	-0.65(0.25)	-2.61(0.001)
Napok	0.48(0.06)	-8.19(<0.001)

7. táblázat: Az M9-es törzsre vonatkozó általánosított kevert lineáris modell az ivaros szaporodásra kontrollálva

Következtetések és későbbi tervek

A vizsgált három törzs (M7, M8 és M9) keresztfertőzése során az M9-es törzsnél jól látszik, hogy bimbózási sikerük nem függ attól, hogy milyen algájuk van (5. ábra). Az M8-as törzsnél már kevésbé egyértelmű a helyzet, itt mindhárom keresztfertőzött csoport bimbózási rátája alacsonyabb volt a kezeletlen törzs bimbózási rátájánál, beleértve az M8xM8 csoportot is, ahol az aposzimbiotikus hidrákat a saját törzsükből származó algával fertőztük vissza (4. ábra). Az M7-es törzsnél pedig egyedül az M7xM7-es csoport mutatott szignifikáns eltérést a kezeletlen egyedekhez képest (3. ábra). Az ellentmondás oka valószínűleg az lehet, hogy nem telt még el elég idő ahhoz, hogy a csoportok bimbózási rátája beálljon a maximális értékre.

A kísérlet eddigi eredményeiből arra lehet következtetni, hogy a hidrák gond nélkül képesek elfogadni és szimbiózist kialakítani más, tőlük izoláltan fejlődő törzsek endoszimbionta algáival is. Ezt korábbi vizsgálatok már kimutatták. Jelen vizsgálat kiterjeszti ennek a munkának az eredményeit, és kimutatja, hogy nem csak beépíteni képesek az algákat, hanem legalábbis az egyik törzs (M9) esetében a hidrák szaporodási sikere is ugyanolyan magas, mintha a saját algáikat hordoznák. Ez az eredmény azért érdekes, mert több korábbi vizsgálatban is kimutatták, hogy az idegen szimbiontákkal való fertőzés következtében a gazda szaporodási sikere lecsökken, ami arra utal, hogy ezekben a rendszerekben koevolúció zajlott le. Az, hogy a Hydra-Chlorella szimbiózis esetében ez nem volt megfigyelhető, két dologgal magyarázható. Egyrészt elképzelhető, hogy az általunk alkalmazott heti háromszoros etetés mellett a hidrák elegendő tápanyaghoz jutottak és nem függtek a szimbionták által nyújtott tápanyagoktól. Erre utal az a megfigyelés, hogy az M9-es törzs esetében az aposzimbiotikus hidrák bimbózási rátája nem volt kisebb a zöldekénél, ami arra utal, hogy az algák jelenléte ebben az esetben nem növelte a bimbózási rátát. Másrészt elképzelhető, hogy a Hydra-Chlorella szimbiózis esetében nincsenek kölcsönös kihasználási stratégiák, például mert a gazda tökéletesen szabályozni tudja a szimbiontákat. Ez utóbbi kérdés megválaszolására további vizsgálatok szükségesek. A kísérlet során folyamatosan figyelemmel követtük az hím- és női ivarszervek megjelenését. Az eddigi vizsgálataink alapján úgy tűnik, hogy a hím ivarszervek jelenléte nincs hatással a bimbózási rátára, a női ivarszervet képző egyedeknél azonban szignifikánsan kevesebb a bimbók száma. Erre, illetve a mérések között eltelt napok számára általánosított kevert lineáris modell segítségével kontrolláltunk.

A későbbiekben a kísérlet folytatásával párhuzamosan tervezzük a bimbózási ráta vizsgálatát ritkább etetés mellett is, ezzel jobban ráutalva a hidrákat az algák nyújtotta forrásokra. Másik terv az algák szaporodási sikerének meghatározását a hidra sejtek átlagos algaszámának megállapításával, ami az algák szemszögéből vizsgálná a fertőzések sikerességét. Emellett fontos feladat a későbbiekben az algák genetikai vizsgálata, amiből kiderülne, hogy valójában mekkora különbség van az egyes törzsek algái között.

Összefoglalás

A zöld hidrák és endoszimbionta algáik jó alanyai a mutualista kapcsolatokkal járó koevolúciós folyamatok tanulmányozásának. A gazda-szimbionta koevolúció vizsgálatát arra a hipotézisre alapoztam, hogy más-más környezetből származó hidra törzsek és algáik között eltérő módon játszódhatott le a kölcsönös egymáshoz alakulás. Ennek tesztelésére algákat nem tartalmazó, aposzimbiotikus hidrákat hoztam létre, és ezeket fertőztem saját, illetve más törzsből izolált algákkal. Az alap hipotézis predikciója ebben az esetben az, hogy a saját algákkal történő fertőzés után a gazda magasabb bimbózási rátát mutat, mint az idegen törzseket tartalmazó állatok, mivel esetükben nem volt még elég idő a koevolúciós folyamatok lejátszódásához.

A kísérlet során három, különböző helyről származó zöld hidra törzsszel (M7, M8 és M9) dolgoztam, melyekből algákat nem tartalmazó, aposzimbiotikus állatokat is létrehoztam. Sikerült mindegyik törzsből algát izolálni, amivel utána az összes lehetséges kombinációban keresztfertőztem az aposzimbiotikus állatokat. Kezeletlen zöld és aposzimbiotikus hidrákkal együtt 12 héten át heti 3 alkalommal vizsgáltam minden csoportból 12 egyed esetében a bimbózási ráta alakulását. Az előzetes eredményekből egyértelműen látszik, hogy a hidrák más törzsből származó algákat is képesek elfogadni. Az M9-es törzsnél egyik keresztfertőzött csoport bimbózási rátája sem mutat jelentős eltérést a kezeletlen, zöld egyedekhez képest. A másik két törzs esetében még nem vonhatók le egyértelmű következtetések, valószínűleg több időre van szükség a bimbózási ráta beállításához. A közeljövőben a kísérlet folytatása mellett tervezzük a zöld hidrák és chlorella algáik közötti gazda-szimbionta koevolúció vizsgálatának egyéb megközelítéseit is.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Tökölyi Jácintnak, hogy lehetővé tette és segítette a tanszéken végzett munkámat!

A hidrákon végzett kísérleteinket a TÁMOP 4.2.1./B-09/1/KONV-2010-0007 projekt támogatta. A projekt az Európai Szociális Alap és az Európai Regionális Fejlesztési Alap által finanszírozott Új Magyarország Fejlesztési Terv része.

Irodalomjegyzék

Bates, D., Maechler M., Bolker, B. (2012): lme4: Linear mixed-effects models using S4 classes. R package version 0.999999-0. <http://CRAN.R-project.org/package=lme4>

Bode, H.R. (1974): Activity of Hydra Cells in vitro and in Regenerating Cell Reaggregates. *Am. Zool.* 14:543–550.

Hata, S., Kobae, Y. and Banba, M. (2010): Interactions between plants and arbuscular mycorrhizal fungi. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2010;281:1-48.

Heath KD, Tiffin P. (2007): Context dependence in the coevolution of plant and rhizobial mutualists. *Proc. R. Soc. London Ser. B* 274:1905–12

Herre E.S., Knowlton N., Mueller U.G., Rechner SA. (1999): The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends in Ecology and Evolution* 14:49–53.

Jeon, K.W. (1983): Integration of bacterial endosymbionts in amoeba. In *Intracellular Symbiosis*, suppl. 14, *Int. Rev. Cyt.* New York, London: Academic Press.

Kiers, E.T. et al. (2011): Reciprocal rewards stabilize in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333, 880.

Kiers, E.T., Rousseau, R.A., West, S.A. and Denison, R.F. (2003): Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. *Nature* 425, 78-81.

Kratz, W. A. and Myers, J. (1955): Nutrition and growth of several blue-green algae. *Am. J. Bot.* 42 :282 .

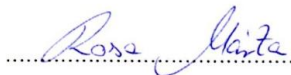
- Law, R. and Lewis, D.H. (1983): Biotic environments and the maintenance of sex – some evidence from mutualistic symbioses. *Biol. J. Linn. Soc.* 20, 249–276
- Lenhoff, H.M. (1982): *Hydra: Research Methods*. Plenum Press, New York and London. ISBN: 0-306-41086-9
- Nybakken, J.W. (2004). *Marine biology: an ecological approach*. 6th ed. Harper & Row: New York. ISBN 0-06-044835-0. XIV, 514 pp.
- Muscantine, L. and Lenhoff, H.M. (1965) Symbiosis of hydra and algae II. Effects of limited food and starvation on growth of symbiotic and aposymbiotic hydra. *Biol. Bull.* 129:316-328.
- Pardy, R.L., and Muscatine, L. (1973): Recognition of symbiotic algae by *Hydra viridis*. A quantitative study of the uptake of living algae by aposymbiotic *H. viridis*. *Biol. Bull.* 145:565-579.
- R Development Core Team (2010) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Australia <http://www.R-project.org/>
- Taylor, D. L. (1974): Symbiotic marine algae: taxonomy and biological fitness. In Vernberg, W. B. [Ed.] *Symbiosis in the Sea*. University of South Carolina, Columbia, pp. 245-62.
- Thorington, G., B. Berger, and L. Margulis (1979): Transmission of symbionts through the sexual cycle of *Hydra viridis*. I. Observations on living organisms. *Transactions of the American Microscopical Society*, Vol. 98, No. 3, pp. 401-413.
- Weis, D.S. (1977): Synchronous development of symbiotic chlorellae within *Paramecium bursaria*. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, 96(1): 82-86.

**Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben
leírt eredményekhez**

Alulírott Rosa Márta Erzsébet a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- hidrák rendszeres etetése és tisztítása
- aposzimbiotikus hidrák létrehozása
- fertőzések elvégzése
- ivaros egyedek felmérése
- bimbózási ráta megállapítása

folyamatokat végeztem el.


.....
aláírás

Debrecen, 2013. január 09.