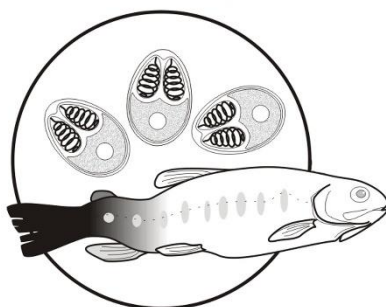


MTA doktori értekezés

Nyálkaspórák halélősködők gazdafajlagossága és a gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai

Dr. Eszterbauer Edit



dc_1729_20

Budapest

2020

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke.....	4
Bevezetés	5
1. Irodalmi áttekintés	7
1.1. Nyálkaspórák kutatás története	7
1.2. Nyálkaspórák jellemzése, fejlődése és evolúciója.....	12
1.3. Nyálkaspórák rendszerezése, taxonómiája.....	17
1.4. Nyálkaspórák fertőzések kórtana, gazdasági jelentősége.....	21
1.5. Kísérleti modell fajok	23
2. Anyagok és módszerek	26
2.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vonatkozásai	26
2.1.1. Minták eredete, mintagyűjtés	26
2.1.2. Morfológiai és szövettani vizsgálatok.....	28
2.1.3. Molekuláris módszerek	28
2.1.4. Filogenetika	32
2.2. Gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai	32
2.2.1. <i>In vivo</i> parazita rendszerek.....	32
2.2.2. Kísérleti rendszerek.....	34
2.2.3. Kísérletek értékelése	37
2.2.4. Molekuláris módszerek	37
3. Eredmények	40
3.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vonatkozásai	40
3.1.1. <i>Myxobolus</i> fajok és közeli rokonságai.....	40
3.1.2. <i>Sphaerospora</i> fajok	44
3.2. Gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai	50
3.2.1. Parazita gazdaspektrum vizsgálata	50
3.2.2. Nyálkaspórák szövet- és szervspecifitása	55
3.2.3. Gazdafelismerés megnyilvánulásai	58
3.2.4. Parazitára való fogékonyság jellegzetességei	65
3.3. Fertőzés elleni védekezés; gyakorlati alkalmazhatóság	72
4. Megbeszélés	75
4.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vizsgálatának megbeszélése.....	76
4.2. Gazda–parazita kölcsönhatás vizsgálatának megbeszélése	83
5. Új tudományos eredmények	98
6. Értekezés alapját képező közlemények.....	99
7. Értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények	101
Köszönetnyilvánítás	104
Irodalomjegyzék	106

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

18S rDNS	18S riboszomális RNS gén
as	aminosav
At	atlanti allél/vérvonat
BI	Bayesian inference
bp	bázispár
CNRQ	kalibrált, normalizált relatív mennyiségek (calibrated normalized relative quantities)
Da	dunai allél/vérvonat
ddH ₂ O	ultratiszta víz (double-distilled water)
EST	expressed sequence tag
FDA	fluoreszcein-diacetát
f_{msat}	egyedi beltenyésztettségi együttható (individual inbreeding coefficient)
gDNS	genomiális DNS
Gluc	glükokináz
H	szivárványos pisztráng, Hofer törzs
Hyb	atlanti-dunai hibrid vérvonat
IGF-I	inzulin növekedési faktor I
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
LDH-C1	laktát-dehidrogenáz C1 régió
ML	maximum likelihood
MP	maximum parszimónia
msat	mikroszatellit (lókusz)
mt 16S rDNS	mitokondriális 16S rDNS
mtDNS CR	mitokondriális DNS kontroll régió
NBF	pufferolt formalin-oldat (neutral buffered formalin)
nt	nukleotid
PCR	polimeráz láncreakció
qPCR	valós idejű kvantitatív PCR
RAPD	random felsokszorozott DNS polimorfizmus analízis (random amplified polymorphic DNA analysis)
r_{msat}	páros rokonság (pairwise relatedness) érték
<i>s. str.</i>	<i>sensu stricto</i>
SEM	standard hiba (standard error of mean)
SPF	specifikus parazitamentes
SSH	szupressziós szubtraktív hibridizáció
TAM	triactinomyxon-típusú actinospóra
TL	szivárványos pisztráng, TroutLodge törzs
TM	távolsági mátrix

BEVEZETÉS

A nyálkaspórások (Cnidaria, Myxozoa) a halak gyakori belső élősködői, melyek között olyan, jelentős gazdasági károkat előidéző fajok is előfordulnak, mint a pisztrángok kergekórját okozó *Myxobolus cerebralis*, a pisztrángfélék proliferatív vesebetegségét kiváltó *Tetracapsuloides bryosalmonae*, vagy a bélgyulladást és belső szervek akut gyulladását előidéző, sokszor masszív mortalitást kiváltó *Ceratonova shasta* és *Enteromyxum leei*. Hazánkban, az elsősorban pontyfélék tenyésztésén alapuló akvakultúra ágazatot, a *Sphaerospora dykova* (korábbi nevén *S. renicola*) által kiváltott úszóhólyag-gyulladás, és a *Sphaerospora molnari* okozta kopolyú-sphaerosporosis kártétele érinti érzékenyen.

A leegyszerűsödött testfelépítésű, néhány vagy néhány tucat sejtből álló, mikroszkopikus méretű élősködők a 19. század elejétől ismertek, és a Myxozoa mára már több ezer fajjal rendelkező taxon. Kétségtelen kórtani jelentőségük mellett a nyálkaspórások különlegességét rendkívül bonyolult, halon belüli és halon kívüli fejlődésük adja, melynek részletei a legtöbb leírt fajnál a mai napig nem tisztázottak. A fajon belüli morfológiai változatosság (két morfológiailag eltérő spóratípus megléte), és a parazitákra jellemző leegyszerűsödött testfelépítés következtében e különleges csoport rendszertani helye első képviselőjük leírását követően még 184 évig, 2009-ig bizonytalan volt. Az 1990-es évek közepéig a nyálkaspórásokat – jobb lehetőség híján – az egysejtűek közé sorolták, és az akkoriban induló molekuláris biológiai alapú kutatások mutattak rá arra, hogy ezek a paraziták a többsejtű eukarióták egy ősi csoportjának tekinthetők.

Ebben a tudományos környezetben ismerkedtem meg friss diplomásként a nyálkaspórás parazitákkal. Az időszak különlegességét adja, hogy a molekuláris biológiai technikák, különösen a PCR és Sanger szekvenálás széles körű elterjedése ekkor tette lehetővé a morfológiai alapon (nem ritkán a vizsgáló kutató szakmai felkészültsége és szubjektivitása által befolyásoltan) meghatározott fajok objektív, szekvencia alapú vizsgálatát és elkülönítését. A nyálkaspórásokkal évtizedeken át foglalkozó klasszikus taxonómusoknak, többek között Jiří Lomnak, Iva Dykovának, Jorge C. Eirasnak és mentoromnak, Molnár Kálmánnak kulcsfontosságú szerepe volt ebben az időszakban. Több évtizedes morfológiai és kórszövettani tudásukra alapozva, egy olyan DNS szekvencia referencia gyűjtemény jöhetett létre közvetett vagy közvetlen közreműködésükkel, mely a mai molekuláris taxonómia biztos alapját képezi. Molnár Kálmánnak köszönhetően doktori tanulmányaim során abban a szerencsés helyzetben voltam, hogy lehetőségem volt a klasszikus nyálkaspórás morfológia alapjait elsajátítani, és ezzel egyidejűleg Harrach Balázs és Benkő Mária révén megismerni, és megtanulni az aktuális molekuláris biológiai technikákat. Ezt követően is jó néhány évig nekem és kollégáimnak jutott az a sokszor kihívásokkal teli feladat, hogy az édesvízi

nyálkaspórák fauna tucatnyi képviselőjének (főleg a *Myxobolus*, *Henneguya*, *Thelohanellus* és *Sphaerospora* fajok) molekuláris taxonómiai és filogenetikai vizsgálatát elsőként végezzük el. A molekuláris technikák térnyerése a taxonómia mellett a fejlődéstani és kórtani vizsgálatokat is újra előtérbe helyezte. Addig ismeretlen kóroktanú betegségek váltak azonosíthatóvá (pl. *Tetracapsuloides bryosalmonae* által kiváltott proliferatív vesebetegség), és a gazdán belüli fejlődés és a gazda–parazita kölcsönhatás vizsgálatának is újabb lendületet adott.

Értekezésemben az elmúlt 15 év kutatómunkájából válogattam össze azokat a kutatási eredményeket, amelyek hozzájárultak a nyálkaspórák rokonsági viszonyainak, gazdafajlagosságának tisztázásához és a gazda–parazita kölcsönhatást meghatározó tényezők mélyebb megértéséhez. A munka első önálló kutatási projektemmel (fiatal kutatói OTKA pályázattal) indult 2004-ben. Ennek eredményei újabb célokat indukáltak, amik egy másfél éves Humboldt kutatási ösztöndíj keretében valósultak meg Münchenben, Németországban. Hazatérésem után saját kutatócsoportomban, kollégáim és hallgatóim segítségével haladtunk tovább a megismerés útján. A gazdafelismerés vizsgálatát német kollégámmal, Dennis Kallert-tel közösen kezdtük még Németországban, majd a kutatócsoportomban eltöltött 2 éves kutatási ösztöndíja alatt folytattuk Magyarországon. Az úszóhólyag-gyulladás és kopoltyú-sphaerosporosis etiológiájának és a betegséget okozó fajok filogenetikájának tanulmányozását párhuzamosan kezdtük Astrid Holzer kolléganőmmel és cseh kutatócsoportjával. Tudatosan szakítva elődeink „rivalizáló hagyományával”, évekkel ezelőtt egyesítettük erőinket, és egymás munkáját kiegészítve és erősítve, közösen haladtunk és haladunk a kórokozó *Sphaerospora* fajok, még a nyálkaspórák között is egyedinek számító halon belüli fejlődésének megismerésében.

Hazai és külföldi kollégáimmal, sok évvel ezelőtt egy járatlan úton indultunk el, felfedezve újabb és újabb jellegzetességeket, amik a nyálkaspórák parazitákat különlegessé, más állatcsoporthoz nem hasonlíthatóan egyedivé teszik. Ahogy egyre mélyebbre ástunk a nyálkaspórák evolúciójának, kórtanának és gazdához való kötődésének vizsgálatában, a felfedeznivaló ismeret köre is egyre bővült, rendre újabb aspektusok kerültek előtérbe. És a lelkesedés, a megismerés öröme azóta sem múlik...

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Nyálkaspórák kutatás története

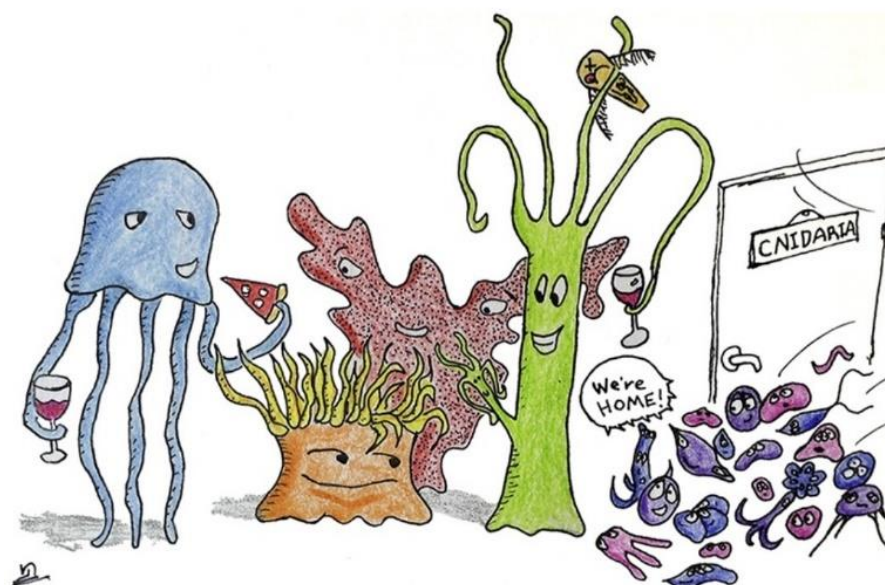
A nyálkaspórák a mikroszkopikus méretű Metazoa élősködők egy igen különleges csoportját képezik. Az első fajok megtalálása és leírása óta eltelt közel két évszázadban világszerte több száz kutató foglalkozott behatóan új fajok leírásával, életciklusuk vizsgálatával, morfológiai illetve molekuláris biológiai alapokon nyugvó taxonómiájukkal. A nyálkaspórák kutatás története a 19. századra nyúlik vissza. Jurine (1825) volt az első, aki nyálkaspórák által képzett cisztákat figyelt meg az édesvízi lazacfélé, a *Coregonus fera* izomzatában. A parazitacsoport első elnevezését Müller (1841) adta, aki Psorospermis néven írta le e spórákat képző vegetatív formákat. Lieberkühn (1854) csuka húgyhólyagjának vizsgálata közben figyelte meg a sporoplazma (amöboid csíra) kiszabadulását a spórából, majd a sporoplazma további fejlődését. A Myxosporidia nevet Bütschli (1882) adta a csoportnak. Ő írta le a trophozoita stádiumot, a vegetatív formákat, a sokmagvú pánsporoblasztokat, és a bennük lévő spórák kialakulásának folyamatát is. Thélohan (1892) készítette az első, spóraszerkezeten alapuló osztályozást a Myxosporidia csoporton belül. Az általa létrehozott nemek egy része még ma is az eredeti néven szerepel. Az élősködőcsoportról az első monográfia a 20. század elején készült el (Auerbach 1910). Egy évtizeddel később Kudo (1919) már összefoglaló közleményt jelentetett meg az addig leírt nyálkaspórákról, majd később azok spóraszerkezeten alapuló osztályozását is elvégezte (Kudo 1933). A nyálkaspórák morfológiájára, fejlődésére és rendszertanára vonatkozó legteljesebb monográfia Shulman (1966) nevéhez fűződik. Munkája a mai napig alpmű a taxonómusok számára. A nyálkaspórákat 1980-ban emelték ki az egysejtűek közül, és sorolták a Myxozoa törzsbe két különálló osztállyal (Myxosporea és Actinosporea) (Levine et al. 1980). Komolyabb taxonómiai módosítás ezután 1984-ben történt, amikor Shulman rendszerét alapul véve, a jellemző morfológiai bélyegek alapján Lom és Noble (1984) újra rendszerezte a Myxosporea osztályt. A nyálkaspórák kutatásban Wolf és Markiw (1984) mérföldkönek számító munkája hozott áttörést, melynek során kimutatták és kísérletesen bizonyították, hogy a Myxosporea és az Actinosporea osztály tagjai nem eltérő fajok, hanem egy adott faj két különböző fejlődési stádiumai. Ennek köszönhetően a 1980-as évek közepéig kevésbé tanulmányozott csoport a fejlődéstani kutatások központjába került. Amint az 1.1. Táblázat mutatja, manapság több mint 45 azoknak a nyálkaspórák fajoknak a száma, melyek fejlődési ciklusát részben vagy teljesen sikerült azonosítani (Eszterbauer et al. 2015a, Okamura et al. 2015b) (1.1. Táblázat).

A nyálkaspórák másik fejlődési stádiumáról, a csekélyebb gazdasági jelentőségűnek tartott actinospórákról először Stolc (1899) számolt be. Az 1980-tól Actinosporea osztályba sorolt élőlényeket 1994-ben átsorolták a Myxosporea osztályba, ami heves vitákat váltott ki a

nyálkaspórások kutatásával foglalkozó szakemberek körében. A 1985-ös Zoológiai Nomenklatúra szabályaira hivatkozva a már létező Actinosporea osztályt „gyűjtőcsoporttá” minősítették, elismerve a myxospóra-alapú fajleírás prioritását (Kent et al. 1994). Wolf és Markiw (1984) felismerését követően, az actinospórák gazdasági jelentősége is felértékelődött és a myxospórákéval egy szintre került. Jelentős tudományos érdeklődést váltott ki annak felismerése is, hogy a féregszerű, aktív mozgásra képes *Buddenbrockia plumatellae* valójában egy különleges nyálkaspórák faj (Monteiro et al. 2002, Okamura et al. 2002), melyet a 2000-ben létrehozott Malacosporea családba soroltak a sok szempontból hasonló testfelépítésű *Tetracapsululoides bryosalmonae* fajjal együtt.

A nyálkaspórák kutatás újabb mérföldköve volt annak bizonyítása, hogy ezek a leegyszerűsödött testfelépítésű paraziták a csalánozókkal mutatnak közeli rokonságot. Jiménez-Guri et al. (2007a) igazolta, hogy a *Buddenbrockia plumatellae* a csalánozókkal, azok közül is a Medusozoa tagjaival mutatja a legközelebbi genetikai rokonságot. Így 2009 óta a nyálkaspórákat a csalánozók törzsének (Cnidaria) önálló osztályaként tartják számon (Okamura et al. 2015a). Jelenleg több mint 2300 ismert nyálkaspórák faj létezik, többségük a Myxosporea alosztály képviselője (Okamura et al. 2015b).

Welcome home Myxozoa



Drawn by: Jonathan Ben-David

1.1. Táblázat: Az eddig megismert nyálkaspórák (Myxozoa) életciklusok összefoglalója. **h-f:** hal gazdából származó myxospóra fejlődése féregben (féreg gazdán belüli fejlődés); **f-h:** féreg gazdából származó actinospóra fejlődése halban (halon belüli fejlődés); **n.a.:** nincs adat. Eszterbauer et al. 2015 alapján (kiegészítve).

Faj	Actinospóra	Kísérlet	DNS egyezés	Biotóp	Gerinces gazda	Gerinctelen gazda	Referencia
Myxosporea							
<i>Ceratomyxa auerbachii</i>	tetractinomyxon	nincs	igen	tengeri	<i>Clupea harengus</i>	<i>Chone infundibuliformis</i>	Køie et al. 2008
<i>Ceratonova shasta</i>	tetractinomyxon	teljes h-f-h	100%	édesvízi	<i>Oncorhynchus</i> spp.	<i>Manayunkia speciosa</i>	Bartholomew et al. 1997
<i>Chloromyxum auratum</i>	antonactinomyxon	részleges h-f	igen	édesvízi	<i>Carassius auratus</i>	vegyes oligochaeták	Atkinson et al. 2007
<i>Chloromyxum schurovi</i>	neoactinomyxum	nincs	igen	édesvízi	<i>Salmo salar</i> , <i>Salmo trutta</i>	<i>Eiseniella tetraedra</i>	Holzer et al. 2006
<i>Chloromyxum truttae</i>	aurantiactinomyxon	nincs	igen	édesvízi	<i>Salmo salar</i>	<i>Stylodrilus heringianus</i>	Holzer et al. 2004
<i>Ellipsomyxa gobii</i>	tetractinomyxon	részleges f-h	igen	tengeri	<i>Pomatoschistus microps</i>	<i>Nereis</i> spp.	Køie et al. 2004
<i>Gadimyxa atlantica</i>	tetractinomyxon	részleges f-h	igen	tengeri	<i>Gadus morhua</i>	<i>Spirorbis</i> spp.	Køie et al. 2007
<i>Henneguya exilis</i>	aurantiactinomyxon	nincs	igen	édesvízi	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>Dero digitata</i>	Lin et al. 1999
<i>Henneguya ictaluri</i>	aurantiactinomyxon	részleges f-h	100%	édesvízi	<i>Ictalurus punctatus</i>	<i>Dero digitata</i>	Styer et al. 1991
<i>Henneguya nuesslini</i>	triactinomyxon	részleges f-h	100%	édesvízi	<i>Salmo trutta</i> , <i>Salvelinus fontinalis</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Kallert et al. 2005
<i>Hoferellus carassii</i> (Germany)	aurantiactinomyxon	teljes h-f-h	n.a.	édesvízi	<i>Carassius auratus</i>	mixed oligochaetes	El-Matbouli et al. 1992b; Troullier et al. 1996
<i>Hoferellus carassii</i> (Japan)	neoactinomyxum	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Carassius auratus</i>	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Yokoyama et al. 1993
<i>Hoferellus cyprini</i>	aurantiactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Nais</i> sp.	Grossheider and Körting 1992
<i>Myxidium giardi</i>	aurantiactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Anguilla anguilla</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Benajiba and Marquès 1993
<i>Myxidium truttae</i>	raabeia	nincs	igen	édesvízi	<i>Salmo trutta</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Holzer et al. 2004
<i>Myxobilatus gasterostei</i>	triactinomyxon	nincs	99,8%	édesvízi	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>Nais communis</i> , <i>Nais pseudobtusa</i>	Atkinson and Bartholomew 2009
<i>Myxobolus arcticus</i> (Canada)	triactinomyxon	részleges f-h	n.a.	édesvízi	<i>Oncorhynchus nerka</i>	<i>Stylodrilus heringianus</i>	Kent et al. 1993b
<i>Myxobolus arcticus</i> (Japan)	triactinomyxon	részleges f-h	99,9%	édesvízi	<i>Oncorhynchus masu</i> , <i>O. nerka</i>	<i>Lumbriculus variegatus</i>	Urawa 1994; Urawa et al. 2011
<i>Myxobolus bramae</i>	triactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Abramis brama</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Eszterbauer et al. 2000
<i>Myxobolus carassii</i>	triactinomyxon	részleges h-f		édesvízi	<i>Leuciscus idus</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	El-Matbouli and Hoffmann 1993
<i>Myxobolus cerebalis</i>	triactinomyxon	teljes h-f-h	100%	édesvízi	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Wolf and Markiw 1984; El-Matbouli et al. 1999 etc.

Faj	Actinospóra	Kísérlet	DNS egyezés	Biotóp	Gerinces gazda	Gerinctelen gazda	Referencia
<i>Myxobolus cotti</i>	triactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Cottus gobio</i>	vegyes oligochaeták	El-Matbouli and Hoffmann 1989
<i>Myxobolus cultus</i>	raabeia	részleges f-h	99,4%	édesvízi	<i>Carassius auratus</i>	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Yokoyama et al. 1995; Eszterbauer et al. 2006
<i>Myxobolus dispar</i>	raabeia	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Molnár et al. 1999a; Holzer et al. 2004
<i>Myxobolus diversicapsularis</i>	triactinomyxon	nincs *(Rácz et al. 2004-igen)	99,6%	édesvízi	<i>Rutilus rutilus</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	(<i>M. intimus</i> -Rácz et al. 2004) Molnár et al. 2010
<i>Myxobolus drjagini</i>	triactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	El-Mansy and Molnár 1997a
<i>Myxobolus erythrophthalmi</i>	triactinomyxon	nincs	99,9%	édesvízi	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	<i>Isochaetides michaelsoni</i>	Kelemen et al. 2009
<i>Myxobolus fundamentalis</i>	triactinomyxon	nincs	100%	édesvízi	<i>Rutilus rutilus</i>	<i>Isochaetides michaelsoni</i>	Borkhanuddin et al. 2013
<i>Myxobolus hungaricus</i>	triactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Abramis brama</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	El-Mansy and Molnár 1997b
<i>Myxobolus lentisuturalis</i>	raabeia	nincs	99,8%	édesvízi	<i>Carassius gibelio</i> , <i>Carassius auratus</i>	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Caffara et al. 2009
<i>Myxobolus macrocapsularis</i>	triactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Abramis brama</i> ; <i>Blicca bjoerkna</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Székely et al. 2002
<i>Myxobolus parviformis</i>	triactinomyxon	teljes h-f-h-f-h	99,9-100%	édesvízi	<i>Abramis brama</i>	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> , <i>Tubifex tubifex</i>	Kallert et al. 2005
<i>Myxobolus pavlovskii</i>	echinactinomyxon	részleges f-h	100%	édesvízi	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	Marton and Eszterbauer 2011
<i>Myxobolus portucalensis</i>	triactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Anguilla anguilla</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	El-Mansy et al. 1998
<i>Myxobolus pseudodispar</i> (Magyarország)	triactinomyxon	teljes h-f-h-f	100%	édesvízi	<i>Rutilus rutilus</i>	<i>Tubifex tubifex</i> , <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> , <i>Psammoryctides</i> spp.	Székely et al. 1999, 2001; Marton and Eszterbauer 2012
<i>Myxobolus pseudodispar</i> (Németország)	triactinomyxon	teljes h-f-h-f	100%	édesvízi	<i>Rutilus rutilus</i>	vegyes oligochaeták	Kallert et al. 2007
<i>Myxobolus rotundus</i>	triactinomyxon	teljes h-f-h-f	100%	édesvízi	<i>Abramis brama</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Székely et al. 2009
<i>Myxobolus shaharomae</i>	triactinomyxon	nincs	100%	édesvízi	<i>Alburnus alburnus</i>	<i>Isochaetides michaelsoni</i>	Kelemen et al. 2009
<i>Myxobolus wootteni</i>	triactinomyxon	nincs	99,9%	édesvízi	<i>Rutilus rutilus</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Eszterbauer et al. 2006; Molnár et al. 2010

Faj	Actinospóra	Kísérlet	DNS egyezés	Biotóp	Gerinces gazda	Gerinctelen gazda	Referencia
<i>Parvicapsula minibicornis</i>	tetractinomyxon	részleges f-h	100%	édesvízi	<i>Oncorhynchus</i> spp.	<i>Manayunkia speciosa</i>	Bartholomew et al. 2006
<i>Sphaerospora dykoveae</i>	neoactinomyxum	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Molnár et al. 1996b
<i>Sphaerospora truttae</i>	echinactinomyxon	részleges f-h	n.a.	édesvízi	<i>Salmo trutta</i> ; <i>Salmon salar</i>	<i>Lumbriculus variegatus</i> , <i>Tubifex tubifex</i>	Ozer and Wootten 2000
<i>Thelohanellus hovorkai</i>	aurantiactinomyxon	részleges h-f	99,8%	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Yokoyama 1997; Székely et al. 1998; Anderson et al. 2000; Eszterbauer et al. 2006
<i>Thelohanellus kitauei</i>	aurantiactinomyxon	nincs	99,4%	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Borkhanuddin et al. 2013
<i>Thelohanellus nikolskii</i>	aurantiactinomyxon	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Branchiura sowerbyi</i>	Székely et al. 1998
<i>Thelohanellus nikolskii</i>	aurantiactinomyxon	nincs	100%	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Nais</i> spp.	Borkhanuddin et al. 2013
<i>Zschokkella mugilis</i>	név nélküli típus	nincs	100%	tengeri	<i>Mugilidae</i> spp.	<i>Nereis diversicolor</i>	Rangel et al. 2009
<i>Zschokkella nova</i>	siedleckiella	részleges h-f	n.a.	édesvízi	<i>Carassius carassius</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	Uspenskaya 1995
Malacosporea							
<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>	malacospore	teljes h-f-h	99,5%	édesvízi	<i>Salmo trutta</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i>	<i>Fredericella sultana</i> , <i>Plumatella repens</i>	Feist et al. 2001; Morris and Adams 2006
<i>Tetracapsuloides vermiformis</i>	malacospore	részleges f-h	igen	édesvízi	<i>Cyprinus carpio</i>	<i>Fredericella sultana</i>	Patra et al. 2017
<i>Buddenbrockia plumatellae</i>	malacospore	teljes f-h	99,5%	édesvízi	<i>Phoxinus phoxinus</i>	<i>Plumatella repens</i>	Grabner and El-Matbouli (2010)

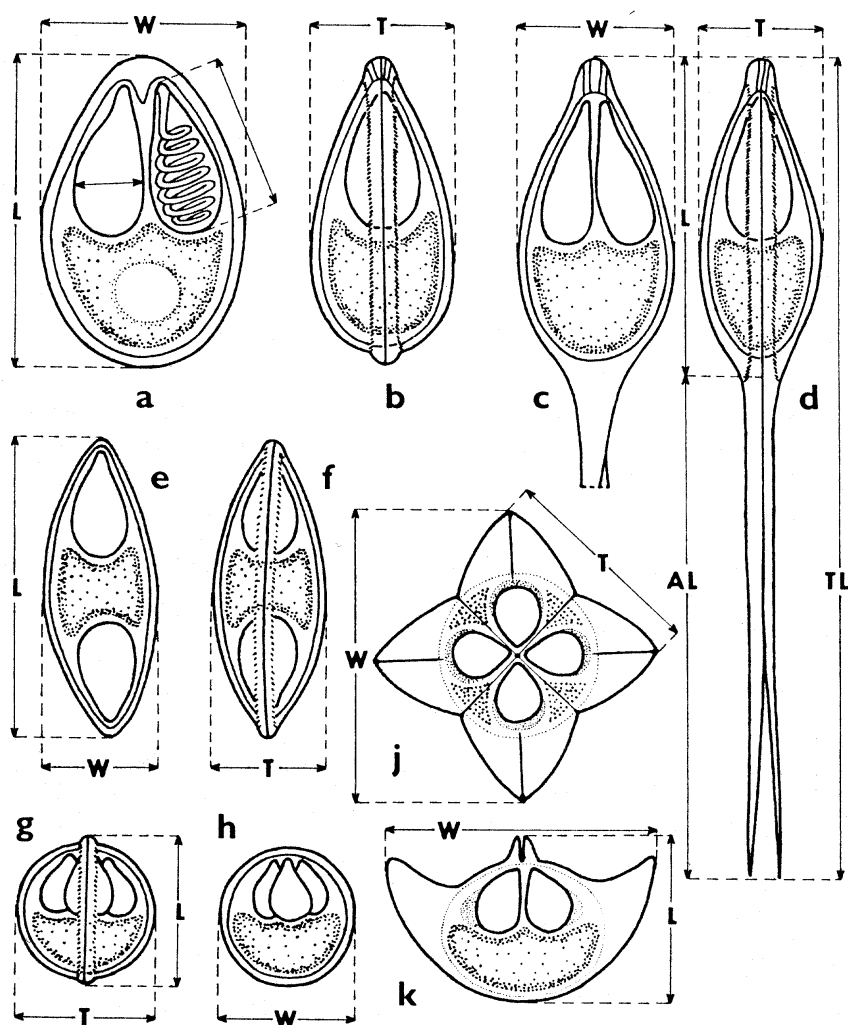
*A Rácz et al. (2004) a kimutatott triactinomyxont hibásan a *Myxobolus intimus* fejlődési alakjaként azonosították, majd a későbbiekben Molnár et al. (2010) igazolták, hogy ez a triactinomyxon típus valójában a *Myxobolus diversicapsularis* fejlődési alakja.

Megj.: A táblázatban feltüntetett referenciák nem szerepelnek az irodalomjegyzékben. Gyűjtőhivatkozás: Eszterbauer et al. (2015).

1.2. Nyálkaspórások jellemzése, fejlődése és evolúciója

Myxospóra alakok jellemzése

A myxospóra alakok többsége a gerincesek közül a halakban fejlődik, de előfordulnak kételtűekben, hüllőkben, és ritkán madarakban és emlősökben is. A tartós képlet (myxospóra) a gazda bizonyos szerveinek (epehólyag, húgyhólyag, vese stb.) üregeiben vagy a gazda szöveteiben inter- vagy intracellulárisan fordulhat elő. Előbbiek a cölizoikus, utóbbiak a hisztozoikus (szöveti) parazita fajokra jellemző. A spórák halon belüli fejlődésük végén plazmódiumokba (cisztákba) tömörülnek, amiket gazda-kötőszövet vesz/vehet körül. E plazmódiumok mérete 10 μm és 1 cm között változhat fajtól és lokációtól függően.

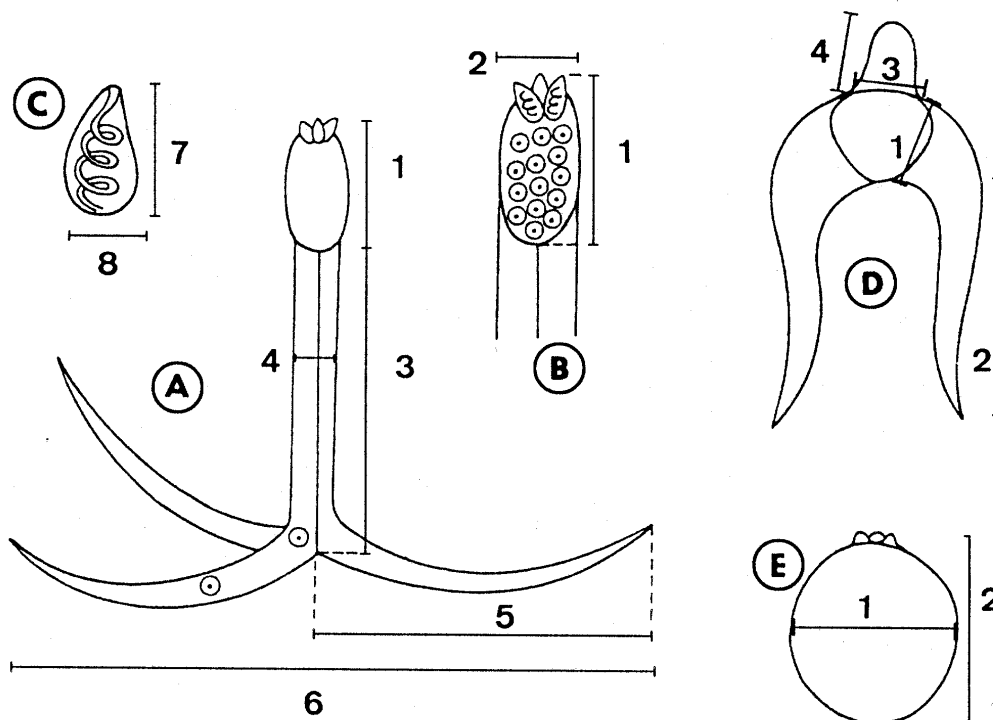


1.1. ábra: A nyálkaspórások myxospóra típusainak sematikus rajza és a morfometriai vizsgálatokhoz szükséges méretek felvételének módja. a-b/ *Myxobolus* spp. elől- és oldalnézetben; c-d/ *Henneguya* spp. elől- és oldalnézetben; e-f/ *Myxidium* spp. elől- és oldalnézetben; g-h/ *Chloromyxum* spp. oldal- és előlnézetben; j-k/ *Kudoa* spp. felül- és oldalnézetben. A poláris kapszula mérete az a/ képen látható. L: spóra hosszúság, W: spóra szélesség, T: spóra vastagság, és a *Henneguya* típus esetében AL: farki nyúlvány hossza, TL: spóra teljes hossza (Lom & Dyková 1992).

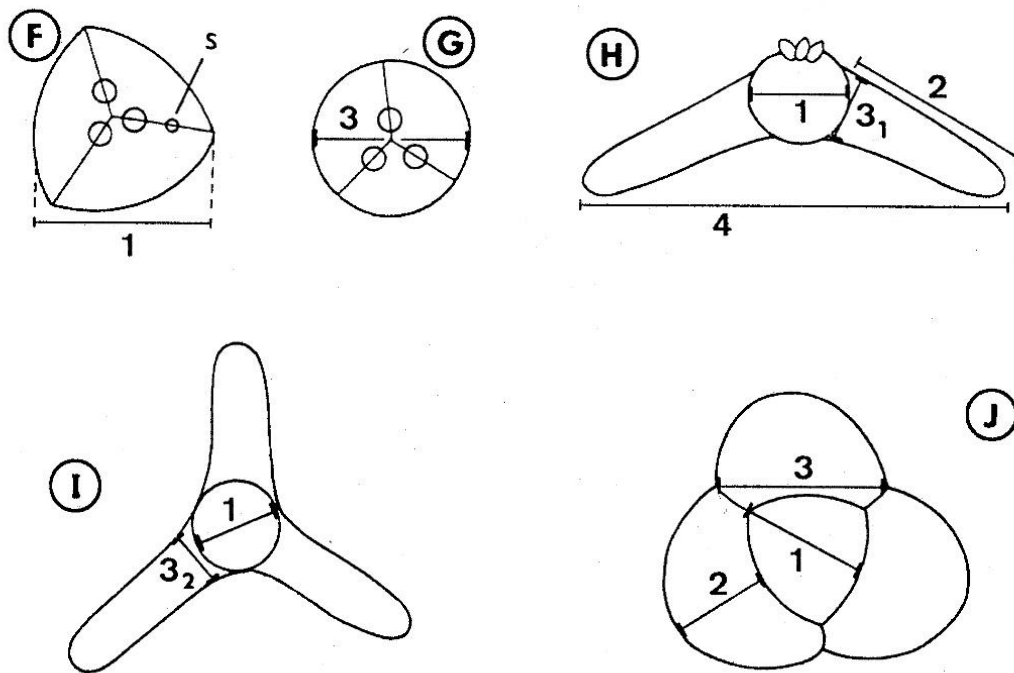
A myxospórák mérete általában 5 és 20 μm között van (1.1. ábra), bár létezik 98 μm hosszú spóra is (*Myxidium giganteum*). Nemzetségtől függően a spóra 2-7 héjsejtet, 1-7 poláris kapszulát (sarki tokot), melyben spirálisan feltekeredve helyezkedik el a poláris filamentum, és egy kétmagvú vagy két egymagvú sporoplazmát (amöboid csírákat) tartalmaz. Néhány kétmagvú sporoplazmával rendelkező fajnál (pl.: *Myxobolus*, *Henneguya*) a poliszacharidok a sporoplazmában levő jodofil vakuolumokban raktározódnak, melyek általában a spórák kiszabadulása után néhány nappal eltűnnek.

Actinospóra alakok jellemzése

Az actinospóra alakok jellemzéséhez még napjainkban is Lom & Dykova (1997) munkája szolgál támpontul. Az actinospórák mérete a nagy formagazdagságnak köszönhetően igen változatos, néhány 10 μm -tól több 100 μm -ig terjedhet. A spórák 3-4 poláris kapszulából, $2n$ másodlagos csírasejtet ($2 < n < 7$) tartalmazó sporoplazmából és 3 vagy több, különböző hosszúságú nyúlványból állnak. A szerkezet része még a poláris kapszulákat és a sporoplazmát tartó nyél, ami a triactinomyxon típuson mindig jelen van, az aurantiactinomyxon, neoactinomyxon, raabeia és tetractinomyxon típusokról azonban hiányzik. Az actinospóra leírás harmadik fontos eleme a morfometriai jellemzők meghatározása, mely a következő méretek felvételéből áll: poláris kapszula, nyél, spóratest és a nyúlványok hossza és szélessége valamint a másodlagos sejtek száma (1.2. ábra).



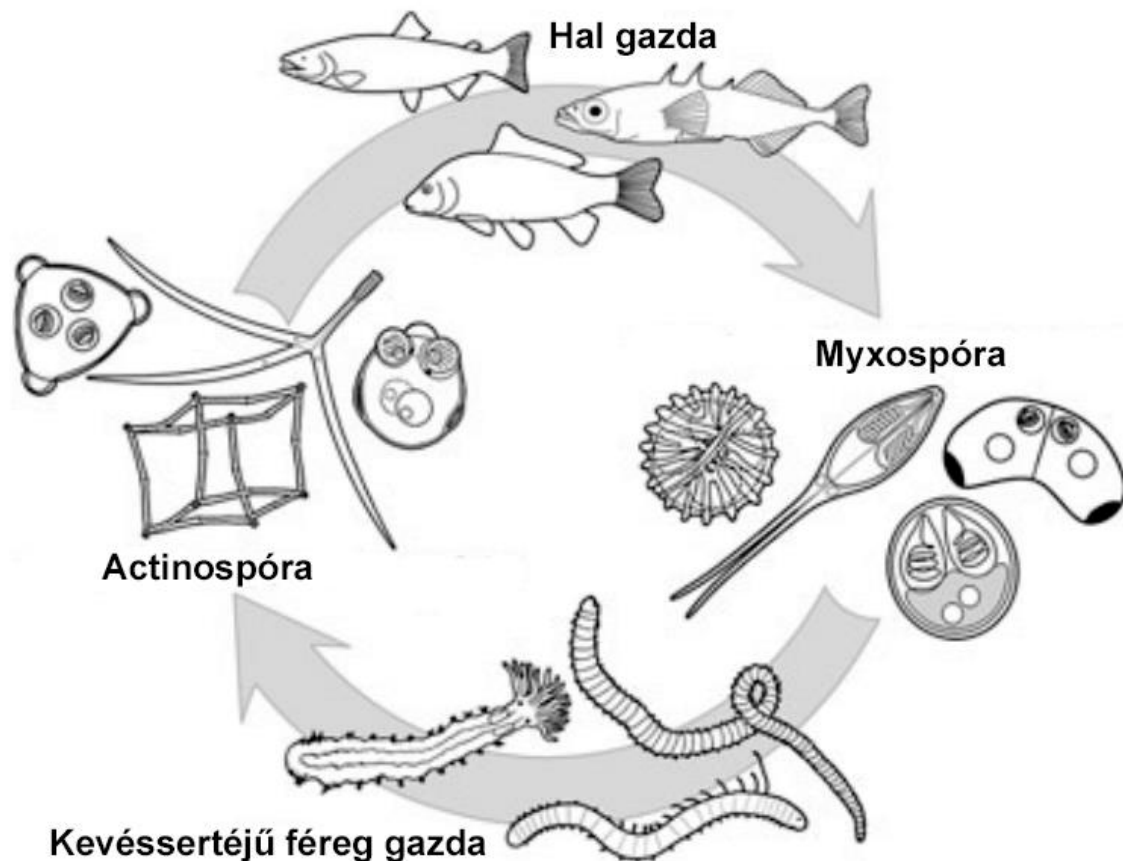
1.2. ábra (folytatás és képaláírás a következő oldalon)



1.2. ábra: A nyálkaspórások actinospóra típusainak sematikus rajza és morfometriai jellemzésük módja. **A-C: triactinomyxon** típus: (A) spóra oldalnézetben, (B) spóratest oldalnézetben, benne a másodlagos csírasejtekkel, (C) poláris kapszula; méretek: (1) spóratest hossza, (2) spóratest szélessége*, (3) nyél hossza, (4) nyél szélessége, (1+3) a spóra teljes hossza, (5) nyúlvány hossza, (6) a nyúlványok legnagyobb távolsága, (7-8) poláris kapszula hosszúsága és szélessége. **D: synactinomyxon** típus felülnézetben; méretek: (1-2) a hosszabb nyúlvány hosszúsága és szélessége (3-4) a rövidebb nyúlvány szélessége és hosszúsága. **E-G: sphaeractinomyxon** oldal- (E) és felülnézetben (F, G); méretek: (1) spóratest átmérője, (2) spóratest hossza, (3) spóratest átmérője (mint az 1. méret), s: varratvonal. **H-I: aurantiactinomyxon** típus oldal- (H) és felülnézetben (I); méretek: (1) spóratest átmérője, (2-3) nyúlvány hosszúsága és szélessége, (4) nyúlványok legnagyobb távolsága. **J: neoactinomyxon** típus felülnézetben; méretek: (1) spóratest szélessége, (2-3) nyúlványok hosszúsága és szélessége (Lom & Dykova 1997). *A szélesség 2 dimenzióban értendő, a valóságban (3 dimenzióban) átmérőnek felel meg.

Nyálkaspórások fejlődése

A nyálkaspórások fejlődési ciklusának felderítése Wolf és Markiw (1984) nevéhez fűződik. Áttörést hozó munkájuk során azonosították a pisztrángfélék kergekórját okozó *Myxobolus cerebialis* faj végleges gazdáját, a kevéssertéjű féreg *Tubifex tubifex* (Annelida: Clitellata) fajt, és kísérletesen igazolták egyrészt a parazita kétgazdás fejlődését, másrészt azt, hogy az actinospórák és a myxospórák ugyanazon parazita faj két különböző fejlődési stádiumai (1.3. ábra). Az eddig azonosított nyálkaspórás faj közül csupán néhány tucat faj esetében ismerjük a teljes fejlődési ciklust (1.1. Táblázat). Ezek közül jelenleg 5 olyan faj van, melynek teljes fejlődési ciklusa laboratóriumi körülmények között fenntartható (*Myxobolus cerebialis*, *Myxobolus pseudodispar*, *Myxobolus parviformis*, *Ceratonova shasta*, *Tetracapsuloides bryosalmonae*) (Eszterbauer et al. 2015a, Patra et al. 2017).



1.3. ábra: Nyálkaspórák kétgazdás fejlődési ciklusának általánosított és sematikus ábrája. S. Atkinson rajza alapján (Eszterbauer et al. 2015a).

A Myxozoa osztályon belül a Malacosporea és Myxosporea alosztály tagjainak fejlődése különbségeket mutat. A Malacosporea tagjainak közti gazdái édesvízi csontos halak, és a halakban kialakuló, majd kiszabaduló malacospórák édesvízi mohaállatokat (Bryozoa) fertőznek, amikben kör alakú spórazsákok vagy megnyúlt, aktív mozgásra képes „féreg-szerű” parazitaformák alakulnak ki, bennük a halakat fertőző spóra alakok (malacospórák) ezreivel. Érdekes módon, a tengeri mohaállatok széleskörű elterjedése ellenére, Malacosporea fajokat eddig nem mutattak ki tengeri környezetben.

A Myxosporea alosztály tagjainak fejlődését myxospóra és actinospóra formák kialakulása jellemzi (1.3. ábra). A myxospórák fejlődése a gerinces gazdáknak zajlik, amik elsősorban halak és kételtűek, azonban hüllőkben, madarakban, sőt emlősökben is kimutatták már nyálkaspórák parazita jelenlétét (Hallett et al. 2015). A vízi gerinces gazdafelismerése specifikus ingerek hatására történik; kémiai (nyálkás kültakaróban jelen lévő, kis molekulásúlyú inozin molekula) és mechanikai ingerek (pl. a hal úszása során keltett vibráció) együttes jelenléte szükséges hozzá (Kallert et al. 2005, 2011). A gerinces gazdát fertőző actinospóra a potenciális gazdát felismerve poláris filamentuma segítségével rögzül a gazda

testfelszínén, az actinospóra sporoplazmája kinyílik, majd sporoplazma sejtjei (a benne lévő másodlagos csírasejtekkel együtt) aktív mozgással bejutnak a bőr és/vagy kopolyú epitheliumába. A presporogóniás fejlődési szakasz során a sporoplazma sejtjei amöboid mozgással a sejt közötti térben migrálnak az epidermiszen és a kopolyúhámon belül, majd a sporoplazma sejttömeg szétesése után, a benne levő sejtek bejutnak a gazda hámsejtjeibe. A sporoplazmából kiszabadult sejtek belső (endogén) osztódással ún. másodlagos vagy leánysejteket hoznak létre, melyek az elsődleges sejtekkel vannak körülvéve. A másodlagos sejtek gyors, egyidejű mitózissal felszaporodnak. Miután a másodlagos sejtek belső osztódással újabb duplasejteket (bennük harmadlagos vagy unokasejtekkel) hoznak létre, a duplasejtek felszakítják az elsődleges sejtek sejtmembránját bejutva a gazdasejt citoplazmájába. Ez a „sejt-a-sejtben” struktúra (leánysejtek az anyasejten belül) egy különleges jellegzetessége a nyálkaspórások fejlődésének. A gazdasejt plazmalemmáját átszakítva kijutnak a sejtköztérbe, mely lehetővé teszi további hámsejtekre való áttérjedésüket és/vagy mélyebb, bőr alatti rétegekbe való bejutásukat, ahol az egész eddigi folyamat megismétlődik (El-Matbouli et al. 1995). A fejlődés további része fajonként változhat, azonban minden ismert életciklusú nyálkaspórás faj fejlődésében közös vonás, hogy ekkor jutnak el a fejlődési alakok különféle útvonalon a spóráképzés helyére, ahol a fejlődés sporogóniás szakasza történik. A cölizoikus fajok a gazda valamelyik testüregében (epehólyag, húgyhólyag, vesecsatornák, bélcsatorna stb.) képeznek spórát, míg a hisztozoikus (szöveti) élősködők a gazda különféle szerveinek (máj, lép, vese, vázizomzat, kopolyú, központi idegrendszer stb.) szöveteiben képeznek kötőszövetes burokkal körülvett plazmódiumot (benne akár több millió myxospórával). Bár kevés kísérleti bizonyíték áll rendelkezésre, az érett myxospórák gerinces gazdából való kijutása valószínűleg többféleképpen történhet. Van, hogy a spórák a kiválasztó szervrendszeren, pl. *Myxobolus pseudodispar* (Molnár et al. 2002), vagy a kopolyúon (pl. *Sphaerospora molnari*) jutnak ki az élő gazdából, viszont olyan eset is igazolt, amikor a gerinces gazda elhullása után tud csak a parazita a külvilágba kerülni, pl. *Myxobolus cerebralis* (El-Matbouli et al. 1992).

A vízbe kijutott myxospórák felépítésükből adódóan lesüllyednek az aljzatra, kövezetre vagy növényzetre, ahol elérhetővé válnak a nyálkaspórások végleges gazdái, a gyűrűsférgek vagy mohaállatok számára. A kevéssertéjű (Annelida: Clitellata) vagy soksertéjű (Annelida: Polychaeta) férgekbe feltételezhetően a bélcsatorna hámján keresztül jutnak be a myxospórák. A fejlődés 1,5 hónaptól akár 1 évig is eltarthat, közben 3 fő szakasz, proliferációs (shizogónia), gametogóniás (ekkor történik az ivaros szaporodás) és sporogóniás (spóráképző) fejlődési lépések követik egymást (El-Matbouli & Hoffmann 1998, Morris & Freeman 2010). A végeredmény egy általában 4-8 db, „összecsomagolt” actinospórát tartalmazó, ún. pánsporociszta forma, ami a fejlődés végén felszakad, és a kiszabaduló actinospórák általában a bélcsatornán keresztül ürülnek a külvilágba. A vízbe kerülve a „lágy-

héjú” actinospórák felveszik végleges alakjukat, és a vízben lebegve, a vízáramlással passzívan terjedve „keresik” gazdájukat.

A kétgazdás fejlődésmenet néhány faj esetében leegyszerűsödhet, és a parazita képes halról-halra terjedni. Ezekben az esetekben a fejlődési ciklus nem zajlik le teljesen, a donor halat a halban fejlődő és onnan kiszabaduló fejlődési alak fertőzi. Ennek legismertebb példája a mediterrán térségben, főleg intenzív rendszerekben előforduló, komoly gazdasági károkat okozó *Enteromyxum leei* és *E. scophthalmi* fajok, melyek extrasporogóniás, proliferatív stádiumai a sérült bélnyálkahártyával együtt a vízbe kijutva képesek akár tömegesen is megfertőzni a fogékony halfajokat, például az aranydurbincset (*Sparus aurata*) vagy a nagy rombuszhalat (*Scophthalmus maximus*) (Diamant 1997, Redondo et al. 2002). A parazita halról-halra való átvitele kísérletes úton is megvalósítható. Ennek jó példája a hazánkban is gyakori halkórokozókkal, a *Sphaerospora dykova* (Molnár & Kovács-Gayer 1986) és a *Sphaerospora molnari* fajokkal (Hartigan et al. 2016) végzett kísérletek, melyek során a paraziták proliferatív véralakjait izomzatba vagy hasüregbe injektálva váltották ki a fertőzést parazitamentes pontyokban.

1.3. Nyálkaspórák rendszerezése, taxonómiája

A nyálkaspórák eredete és rendszertani helye

A nyálkaspórákat a '90-es évek közepéig az egysejtűek közé tartozó taxonnak tekintették. Ez annak ellenére elfogadott nézet volt, hogy Stolc (1899) már egy századdal korábban megállapította, hogy a nyálkaspórák nem egysejtűek, sőt javaslatot tett a metazoákhoz való átsorolásukra is. Később Weill (1938) továbbfejlesztve a fenti hipotézist, rámutatott a csalánozókhöz való, főleg morfológiai hasonlóságra, különös tekintettel a poláris kapszulák (sarki tokok) csalánsejtekre emlékeztető felépítésére. További érv volt, hogy a cölizoikus nyálkaspórák okozta elváltozások patológiája hasonlóságot mutatott egyes parazitikus medúzafajok, mint például a *Polypodium hydriforme* által kiváltott fertőzés kórtanával. Habár e rendszertani helyet több kutató eredménye is igazolta (Dogiel 1965, Grasse & Lavette 1978), csak DNS szekvencia alapú megerősítése után került be a köztudatba. 18S riboszomális RNS gének (18S rDNS) szekvenciái alapján Smothers et al. (1994) eredményei azt mutatták, hogy a nyálkaspórák a metazoákkal állnak rokonságban, de nem a csalánozók, hanem a fonálférgek (Nematoda) legközelebbi rokonaiként. Nem sokkal később újabb molekuláris biológiai és filogenetikai eredmények a nyálkaspórák bilateria-rokonságát (Siddall et al. 1995, Siddall & Whiting 1999) illetve triploblast eredetét erősítették (Schlegel et al. 1996, Kim et al. 1999). Csak évekkel később igazolták, hogy az eltérő rokonság hátterében egy filogenetikai elemzési probléma áll (long-branch attraction) (Evans et al. 2010). A csalánozókkal (azon belül is a Medusozoa tagjaival) közös eredetet, mely elmélet filogenetikai

megerősítés nélkül, ultrastrukturális eredmények alapján (Lom & Dykova 1997) is sok kutató fejében tényként rögzült, végül a Malacosporea taxon tagjai révén sikerült kétséget kizáróan bizonyítani (Jimenez-Guri et al. 2007b, Holland et al. 2011, Nesnidal et al. 2013).

A nyálkaspórások rendszerezése

Shulman (1966) a nyálkaspórások közötti rokonsági kapcsolatok vizsgálata során arra a következtetésre jutott, hogy az első myxozoák cölizoikusak voltak, melyek kréta időszi, tengeri csontos halak epe- és húgyhólyagjában voltak megtalálhatóak. Nézetei szerint a későbbi evolúció során egyes fajok képessé váltak a szövetekben való megtelepedésre is, amely a szöveti (hisztozoikus) nyálkaspórások csoportjának kialakulását eredményezte. Shulman (1966) azt is feltételezte, hogy az ősi fajok a kétoldali szimmetriával rendelkező *Myxidium* és *Sphaeromyxa* fajok voltak, édesvizekben pedig a *Henneguya* és a *Myxobolus*. A másik, a Multivalvulida rend tagjait pedig, melyek közé tengeri, hisztozoikus fajok tartoznak, egy a *Ceratomyxa* fajokhoz hasonló őstől eredezteteti. Kent et al. (2001) következtetései nagyrészt megegyeznek a Shulman-féle hipotézissel. Filogenetikai eredményük alapján a tengeri és az édesvízi fajok, a *Ceratonova* (korábban *Ceratomyxa*) *shasta* kivételével, külön ágon helyezkedtek el azt sugallva, hogy a nyálkaspórások édesvizekben való elterjedése másodlagos megtelepedés eredménye. További, különféle nyálkaspórás fajokon végzett, molekuláris biológiai alapú és filogenetikai analízis több olyan taxonómiai bélyeget mutatott ki, amelyek a klasszikus taxonómiában használt spóramorfológiai jellemzők mellett igen fontos szerepet játszanak az osztályozásban. Ilyen jellegzetesség például a gazdafajlagosság és földrajzi elterjedés (Hervio et al. 1997), vagy a szöveti lokáció (Andree et al. 1999), melyekkel kapcsolatos hipotézis morfológiai alapokon már évekkel korábban létezett (Molnár 1994).

Jelenleg a nyálkaspórások (Myxozoa) a csalánozók törzsének önálló osztályaként vannak nyilvántartva. Ezen belül a Myxosporea és Malacosporea taxon alosztályként szerepel. Az eddig leírt fajok 64 nembe sorolhatóak az alábbi rendszerezés szerint (Fiala et al. 2015b):

Törzs: Cnidaria

Osztály: Myxozoa

Alosztály: Malacosporea

Rend: Malacovalvulida

Saccosporidae család: *Buddenbrockia*, *Tetracapsuloides*

Alosztály: Myxosporea

Rend: Bivalvulida

Alrend: Variisporina

Sphaeromyxidae család: *Sphaeromyxa*

Myxidiidae család: *Myxidium*, *Zschokkella*, *Enteromyxum*, *Sigmomyxa*, *Soricimyxum*, *Cystodiscus*

Ortholineidae család: *Ortholinea*, *Neomyxobolus*, *Cardimyxobolus*, *Triangula*, *Kentmoseria*

Sinuolineidae család: *Sinuolinea*, *Myxodavisia*, *Myxoproteus*, *Bipteria*, *Paramyxoproteus*, *Neobipteria*, *Schulmania*, *Noblea*, *Latyspora*

Fabesporidae család: *Fabespora*

Ceratomyxidae család: *Ceratomyxa*, *Meglitschia*, *Ellipsomyxa*, *Ceratonova*

Sphaerosporidae család: *Sphaerospora*, *Wardia*, *Palliatius*

Myxobilatidae család: *Myxobilatus*, *Acauda*, *Hoferellus*

Chloromyxidae család: *Chloromyxum*, *Caudomyxum*, *Agarella*

Coccomyxidae család: *Coccomyxa*, *Auerbachia*, *Globospora*

Alatosporidae család: *Alatospora*, *Pseudalatospora*, *Renispora*

Parvicapsulidae család: *Parvicapsula*, *Neoparvicapsula*, *Gadimyxa*

Alrend: Platysporina

Myxobolidae család: *Myxobolus*, *Spirosuturia*, *Unicauda*, *Dicauda*, *Phlogospora*, *Laterocaudata*, *Henneguya*, *Hennegoides*, *Tetrauronema*, *Thelohanellus*, *Neothelohanellus*, *Neohenneguya*, *Trigonosporus*

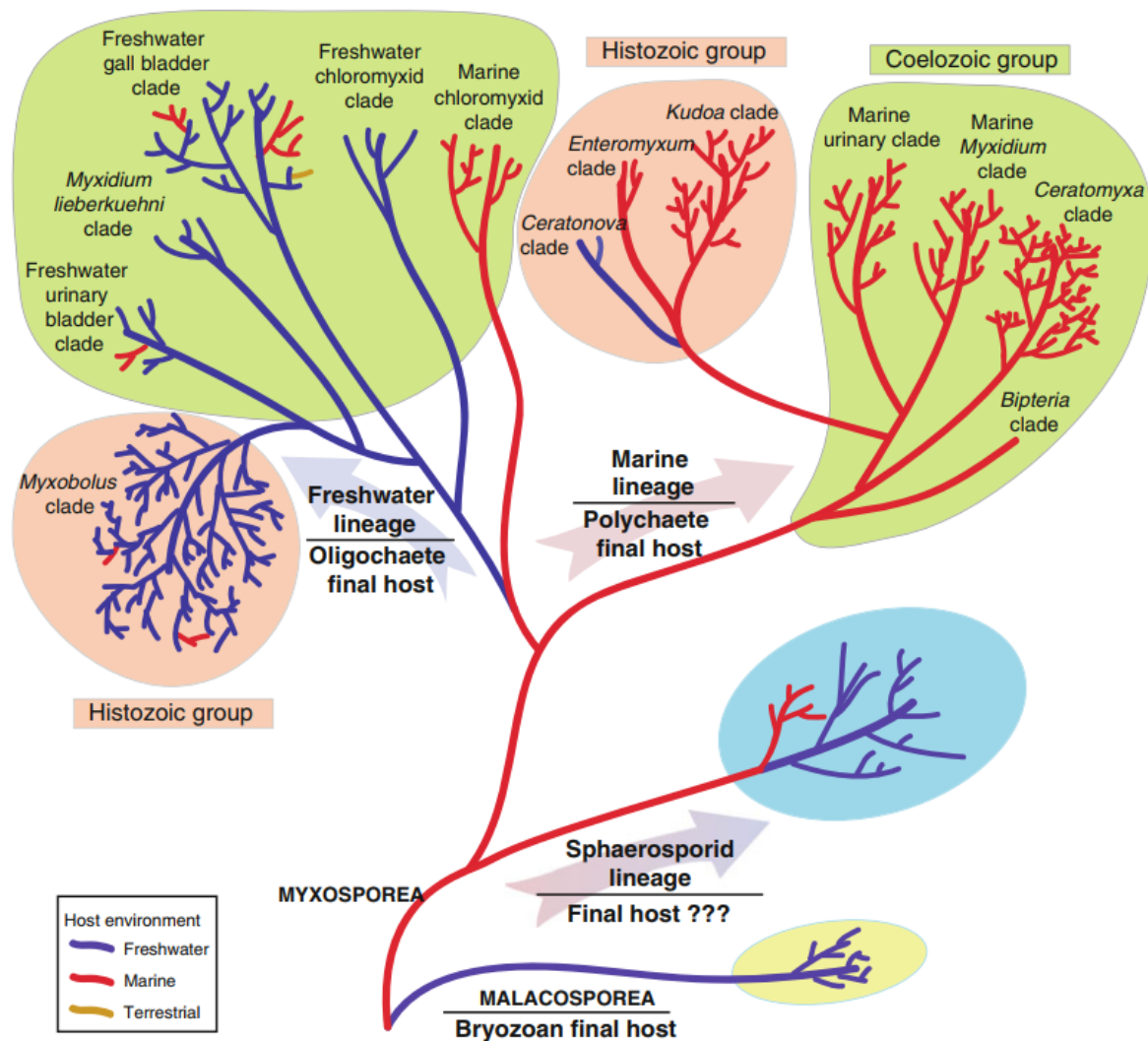
Rend: Multivalvulida

Trilosporidae család: *Trilospora*, *Unicapsula*

Kudoidae család: *Kudoa*

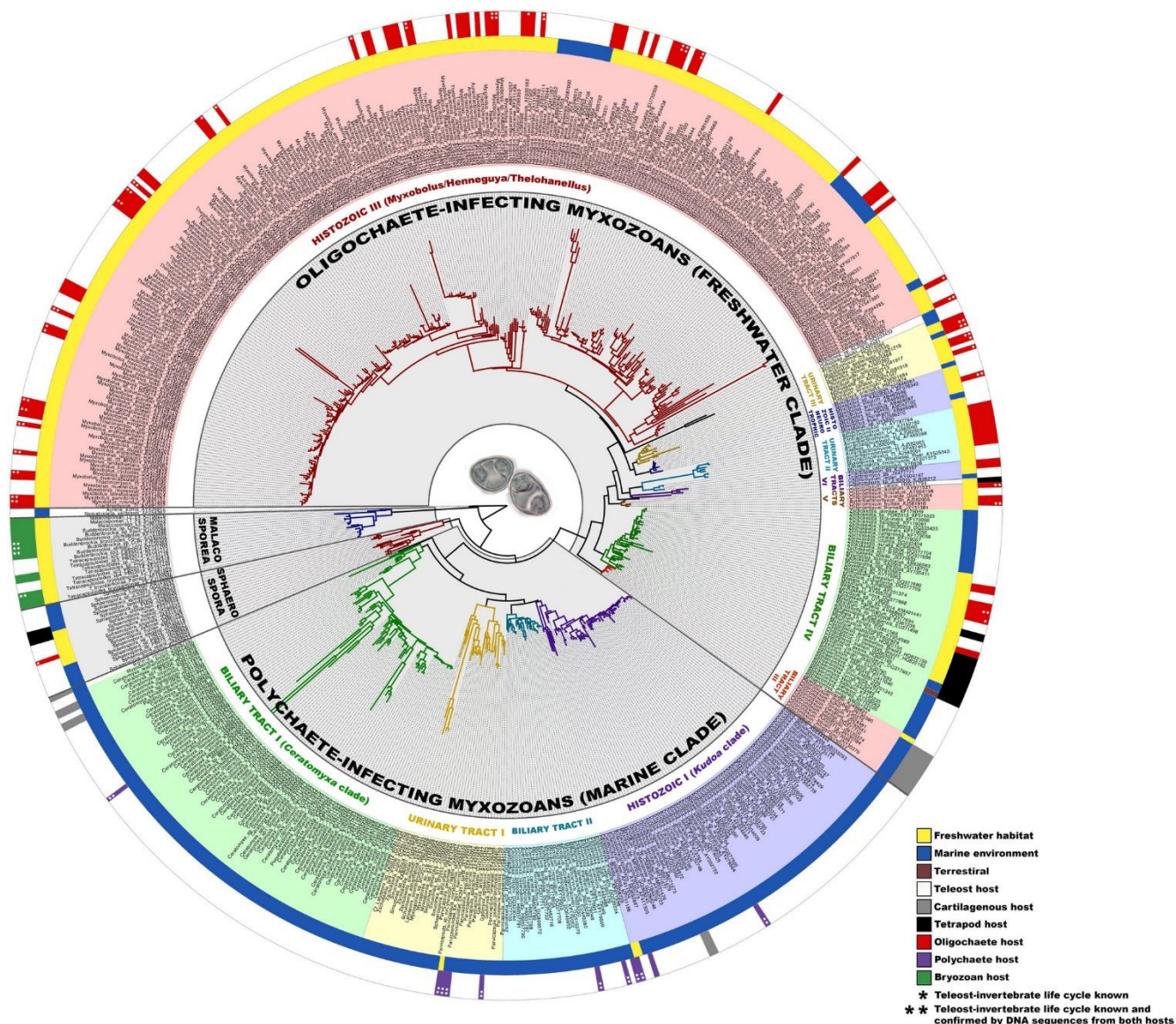
Spinavaculidae család: *Octospina*

A nyálkaspórások taxonómiai reformja új lendületet vett a DNS szekvencia alapú filogenetikai vizsgálatokkal. A 18S és 28S rDNS széles körben használt és bizonyítottan elég informatív genetikai marker rokonsági viszonyok feltérképezéséhez (Hillis & Dixon 1991, Kent et al. 2001). A variábilis és konzervatív régióknak köszönhetően sokrétű elemzéshez használható, fajon belüli és fajok közötti kapcsolatok is vizsgálhatók (Fiala 2006). Bár egyéb gének (pl. internal transcribed spacer 1 - ITS1, elongation factor 2 - EF2, heat shock protein - HSP70) alapján is vizsgálták a nyálkaspórások rokonsági viszonyait (Fiala & Bartosová 2010), egyik sem bizonyult olyan stabil markernek, mint a riboszomális gének. Nem véletlen tehát, hogy a nyálkaspórások feltételezett evolúciós fejlődését 18S rDNS alapú filogenetikai elemzések alapján rekonstruálta Fiala et al. (2015b) (1.4. ábra).



1.4. ábra: A nyálkaspórások feltételezett evolúciós fejlődése a főbb csoportok kialakulási sorrendjével és rokonsági viszonyaikkal molekuláris biológiai markerek (18S és 28S rDNS) alapján (Fiala et al. 2015a).

Egy nemrégiben – szintén 18S rDNS alapján – készült elemzés nagy részletességgel mutatja a DNS szinten vizsgált több száz faj egymáshoz való viszonyát (1.5. ábra). Holzer et al. (2018) átfogó munkájából kitűnik, hogy a tengeri és édesvízi környezet egy meghatározó tényező a nyálkaspórások filogenetikai elkülönülésében. Ezek belül a szöveti/szervi lokáció tűnik fő befolyásoló tényezőnek a rokonsági kapcsolatokat tekintve. Eredményeik azt is bizonyították, hogy a nyálkaspórások már léteztek jóval a halak kialakulása előtt, így feltételezhetően az első nyálkaspórások a gyűrűsférgek és/vagy mohaállatok élősködői voltak, a gerincesek (főleg halak) „csupán” egy alternatív terjedési módot jelentettek a paraziták számára.

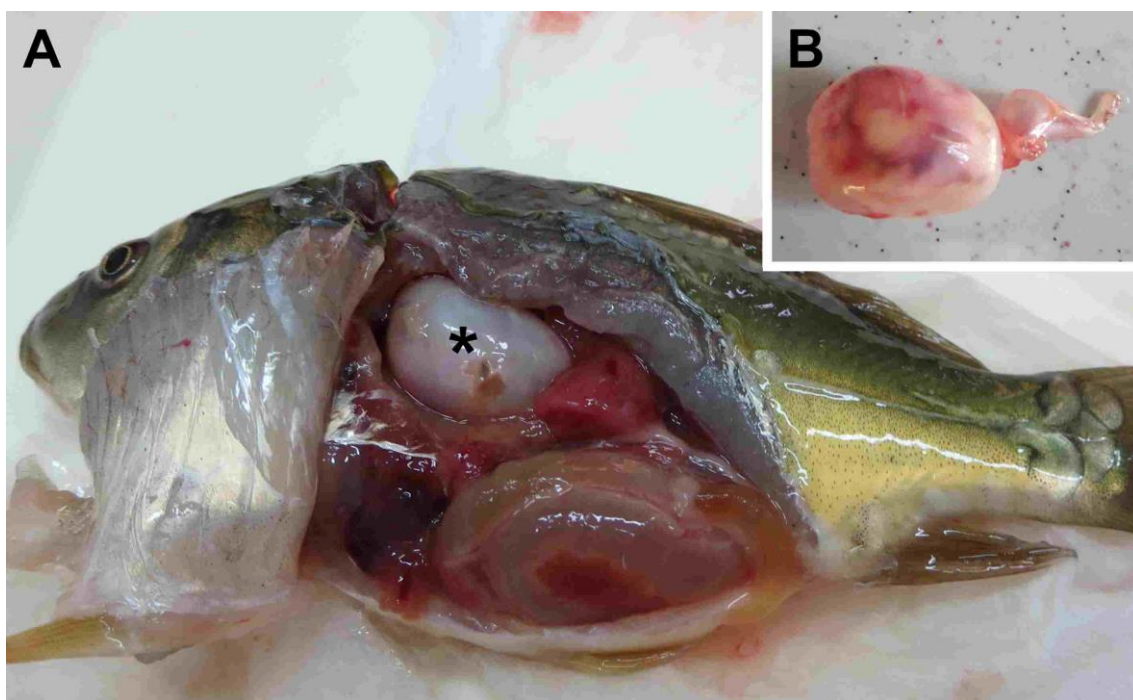


1.5. ábra: 18S rDNS alapján készült, több száz nyálkaspórák faj rokonsági viszonyait bemutató filogenetikai vizsgálat eredménye (Holzer et al. 2018).

1.4. Nyálkaspórák fertőzések kórtana, gazdasági jelentősége

Az eddig leírt nyálkaspórák fajok közül csak néhány okoz igen súlyos megbetegedést a halakban. Ennek oka valószínűleg az, hogy a nyálkaspórák és gazdáik hosszú ideje tartó, közös evolúciójának köszönhetően mindkét csoport alkalmazkodott a „közös léthez”. Vannak azonban gazdasági és ökológiai szempontból jelentős, halállományokban súlyos elhullásokat okozó nyálkaspórák fajok is. Ezek közé tartozik a pisztrángok kergekórját kiváltó, a halak koponyaporcában plazmódiumokat képező *Myxobolus cerebralis*, mely különösen az Amerikai Egyesült Államokban okoz jelentős károkat (Steinbach Elwell et al. 2009). A *Ceratomyxa shasta* szintén a pisztrángfélék kórokozója, mely több szervre kiterjedő betegséget okoz, azonban súlyosabb hatását a bélhám és a hám alatti kötőszövetben fejt ki, ahol a bélhám kóros leválásával a halak tömeges pusztulását idézi elő

(Bartholomew et al. 2004, Atkinson & Bartholomew 2010). Komoly problémát okozó faj a *Tetracapsuloides bryosalmonae* is, mely főként a pisztrángfélék fiatal egyedei között okoz sokszor magas mortalitással járó megbetegedést (Bettge et al. 2009). Ez utóbbi, proliferatív vesebetegséget előidéző parazita a Malacosporea alosztályba tartozik, és végleges gazdája nem gyűrűsféreg, hanem mohaállat (Longshaw et al. 2002). Főleg az Amerikai Egyesült Államokban és Nyugat-Európában fordul elő. A tengeri fajok közül az intenzív tenyészetekben nevelt tengeri keszegfélék tömeges elhullását okozó *Enteromyxum leei* (Diamant 1997), és a halhús *post mortem* elfolyósodását előidéző *Kudoa* fajok (legismertebb képviselőjük a széles gazdaspektrumú *Kudoa thysites*) okoznak jelentős gazdasági problémát (Yokoyama & Itoh 2005). Annak ellenére, hogy a nyálkaspórások nem humán patogének, a *Kudoa septempunctata* fajjal fertőzött nyers halhús fogyasztása hasmenéses és ételmérgezés-szerű tüneteket válthat ki (Kawai et al. 2012). Bár patogenitásban talán elmarad az előbb említett fajoktól, jelentős károkat okozhat a Magyarországon és Közép-Európában gyakori, pontyok úszóhólyag-gyulladását okozó *Sphaerospora dykova* (korábbi nevén *S. renicola*) (1.6. ábra).



1.6. ábra: *Sphaerospora dykova* okozta úszóhólyag-gyulladás pontyivadékban. Az úszóhólyag (*) falának megvastagodása (A), és vöröses-barnás elszíneződése (B) mutatja az előrehaladó gyulladás okozta egyre súlyosabb elváltozásokat (saját felvétel).

E faj kezdeti tanulmányozása főként magyar kutatók nevéhez fűződik. Csaba (1976) számolt be először a faj korai fejlődési stádiumának jelenlétéről a véráramban, majd később Molnár (1988) mutatott rá a parazita fejlődési stádiumok és az okozott betegség kapcsolatára. Az utóbbi években, a molekuláris biológiai technikák fejlődésével és gazdasági jelentősége miatt ismét a kutatások középpontjába került (Bartošová et al. 2013). A pontyivadék *Sphaerospora*

molnari okozta kopolyú-sphaerosporosis-a szintén gyakori bántalom (Molnár 1979). A fertőzés azonban sokszor feltáratlan marad, mivel az extenzív tenyésztési technológiának köszönhetően a nevelő tavakba kihelyezett ivadék ponty állategészségügyi monitorozása nehezen kivitelezhető a paraziták legfogékonyabb időszakban (Eszterbauer et al. 2013, Holzer et al. 2013).

1.5. Kísérleti modell fajok

A doktori disszertáció részét képező kísérletes vizsgálatok többségét két nyálkaspórási modell fajon végeztük, melyek életciklusát zárt, *in vivo* laboratóriumi rendszerben több mint 10 éve tartjuk fent. A két faj közül az egyik a pisztrángok kergekórját előidéző, erősen patogén *Myxobolus cerebralis*, a másik pedig az elhullást és betegséget általában nem okozó, kis mértékben patogén *Myxobolus pseudodispar*.

***Myxobolus cerebralis*, Hofer 1903**

Gazdasági és ökológiai kártétele miatt a *M. cerebralis* az egyik legtöbbet tanulmányozott nyálkaspórási faj (Lom & Dyková 1992, El-Matbouli et al. 1995, El-Matbouli & Hoffmann 1998, El-Matbouli et al. 1998, El-Matbouli et al. 1999a, El-Matbouli et al. 1999b, Granath et al. 2007, Steinbach Elwell et al. 2009). A fajt Dr. Bruno Hofer írta le németországi sebes pisztrángokból (*Salmo trutta* m. *fario*) (Hofer 1903). A parazita által okozott betegséget azután fedezték fel, hogy szivárványos pisztrángot telepítettek Észak-Amerikából Európába (Hoffman 1970, Halliday 1976). Észak-Amerikában csak 1958-ban jelent meg a betegség, azonban máig súlyos károkat okoz halgazdaságokban és természetes vizekben élő halállományokban egyaránt (Hoffman et al. 1962). A parazita széles gazdaspektrummal rendelkezik, de a gazdafajok és a különböző törzsek között jelentős a fogékonyágbeli különbség. Ismert gerinctelen gazdája a kevéssértéjű féreg *Tubifex tubifex*, melynek I-es, III-as és VI-os leszármazási vonalai fogékonyak a parazitára (Beauchamp et al. 2002). Számos pisztrángfélében előfordul, többek között szivárványos pisztrángban (*Onchorhynchus mykiss*), sebes pisztrángban (*Salmo trutta* m. *fario*), gyilkos pisztrángban (*Onchorhynchus clarkii*), bika pisztrángban (*Salvelinus confluentus*) és arany pisztrángban (*Onchorhynchus aguabonita*), valamint atlanti lazacban (*Salmo salar*), király lazacban (*Onchorhynchus tshawytscha*), vörös lazacban (*Onchorhynchus nerka*), és pataki szajblingban (*Salvelinus fontinalis*) (Hedrick et al. 1999, Thompson et al. 1999). A legfogékonyabb halfaj a szivárványos pisztráng. A 2-8 hetes ivadékok megbetegedése súlyos esetekben akár 80-90%-os elhulláshoz is vezethet (O'Grodnick 1979, Markiw 1992). Ezzel szemben eredeti gazdája, a sebes pisztráng megfertőződik ugyan, de klinikai tüneteket nem, vagy csak kis mértékben mutat, és a mortalitás is általában alacsony. A sokszor tünetmentes fertőzöttség miatt a parazita terjesztésében is nagy szerepet játszhat (Hoffman 1970, Steinbach Elwell et al. 2009). Hedrick

et al. (2003) szívárványos pisztráng törzsek összehasonlításakor fogékonyágbeli különbségeket mutattak ki, és az amerikai TroutLodge törzs sokkal fogékonyabbnak bizonyult a német Hofer törzs egyedeinél.

A kergekór a rendellenesen körkörös módon („kergén”) úszó halakról kapta a nevét. A betegség további tünete a fekete farokúszó, melyet a pigmentációt befolyásoló idegekre gyakorolt nyomás okoz, a parazita koponyaporcban és gerincoszlop porcos elemeiben történő spóráképzése során (Halliday 1976). A beteg egyedekre jellemző a rövid orr, a fej, a gerincoszlop és a kopolyúfedő deformitása, amit valószínűleg a csontképződés zavara eredményez (Wolf et al. 1986). A beteg halak nehézkesen táplálkoznak, a felszínen forgó mozgásukkal pedig ki vannak téve a ragadozók támadásának (Hoffman 1974). A fertőzéssel szembeni ellenállóképesség bizonyítottan nő az életkor előrehaladtával, azonban ez meglepő módon nem a csontosodás mértékétől, hanem valószínűsíthetően a központi idegrendszer fejlettségével van összefüggésben (Halliday 1976, Ryce et al. 2005). További fejlődésbeli eltérés az eltérő fogékonyágú fajokban, hogy míg a szívárványos pisztrángban a koponyaporcban, az agy környékén fejlődik a parazita, addig a sebes pisztráng esetében a kopolyúívekre koncentrálódik a spóráképzés (Hedrick et al. 1999, Baldwin et al. 2000, MacConnell & Vincent 2002).

***Myxobolus pseudodispar*, Gorbunova 1936**

A *M. pseudodispar* a pontyfélék gyakori nyálkaspórák parazitákja. Közép-Európában, így Magyarországon is gyakran előforduló élősködő, amely a halak izomzatában intracellulárisan képez plazmódiumokat. A faj leírása óta (Gorbunova 1936) számos vizsgálatot végeztek a parazita előfordulásával, elterjedtségével és fejlődésmenetével kapcsolatban. Baska (1987) szövettani módszerekkel vizsgálta a *M. pseudodispar* halon belüli fejlődését. Később a teljes fejlődési ciklus tisztázására fertőzési kísérletek is történtek (Székely et al. 1999, 2001). Székely et al. 1999-es munkájukban *Tubifex tubifex* és *Limnodrilus hoffmeisteri* kevésértéjű féreg egyedeket fertőztek bodorkából származó *M. pseudodispar* myxospórákkal. Mindkét féregfaj esetében sikeres volt a fertőzés, és TAM típusú actinospórák fejlődtek ki bennük. A későbbi munkájukban (Székely et al. 2001) már a teljes fejlődési ciklust sikerült kísérletesen reprodukálniuk. Bodorka izomzatából gyűjtött *M. pseudodispar* myxospórákkal fertőztek parazitamentes *T. tubifex* állományokat, majd a férgekben kifejlődő actinospórákkal sikeresen fertőztek parazitamentes bodorka ivadékokat. A nyálkaspórák fajok többségével ellentétben a *M. pseudodispar* gerinces gazdaspektruma széles. A bodorka (*Rutilus rutilus*), a karikakeszeg (*Blicca bjoerkna*), a dévérkeszeg (*Abramis brama*), a vörösszárný keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*) és a szélhajtó küsz (*Alburnus alburnus*) is fogékony a parazitára (Molnár et al. 2002). Gerinctelen gazdaként eddig a *T. tubifex* és a *L. hoffmeisteri* kevésértéjű férgek szerepe volt bizonyított (Székely et al. 1999). Hasonló alakjuk, és fejlődési helyük miatt

korábban a *M. pseudodispar*-t a *M. cyprini* szinonimájának tekintették (Dyková & Lom 1988). A többi, intracellulárisan fejlődő izomparazita nyálkaspórák fajtól való elkülönítését azonban segíti, hogy a myxospórák poláris kapszulái különböző méretűek, valamint a TAM típusú actinospórák nyúlványai is eltérő hosszúságúak (Székely et al. 1999). Molnár et al. (2002) munkájukban izomparazita nyálkaspórák fajokat vizsgáltak, köztük a *M. pseudodispar*-t és *M. cyprini*-t. Kisebb morfológiai eltérések mellett (a *M. cyprini* myxospórái a leginkább szimmetrikusak), szekvenciabeli különbségeket is találtak: 5,5-6,42% eltérés volt a 18S rDNS szekvenciájuk körülbelül 1000 bp hosszú darabjában, így a tudomány jelen állása szerint külön fajnak tekintjük őket. Eszterbauer et al. (2001) több más izomparazita nyálkaspórák mellett bodorkából és vörösszárnú keszegből gyűjtött *M. pseudodispar* mintákat vizsgáltak PCR-RFLP módszerrel. Eredményeik alapján a két halfajból származó *M. pseudodispar* izolátumok RFLP mintázata megegyezett egymással. Későbbi, DNS szekvencia alapú összehasonlítás alapján Molnár et al. (2002) a 18S rDNS megőrzöttségéhez viszonyítva nagyfokú, akár 5,1%-os eltérést találtak a különböző halfajokból származó *M. pseudodispar* minták között, a gén egy körülbelül 1500 bp hosszú szakaszának vizsgálata során.

Ezen előzetes ismeretanyagra építve folytattuk a két modell faj gazdafelismerésének, gazdakörének és gazdafajlagosságának vizsgálatát a következőkben bemutatott módszerekkel és eredményekkel.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vonatkozásai

A gazdafajlagosság kérdéskörét két nyálkaspórási csoporton vizsgáltuk. Az egyik a hazánkban és Európában gyakori, édesvízi, szöveti élősködők csoportja, melyben *Myxobolus*, *Henneguya* és *Thelohanellus* fajok dominálnak. A másik, a cölizoikus élősködők ősi csoportja a *Sphaerospora sensu stricto* (s. str.) klád tagjai.

2.1.1. Minták eredete, mintagyűjtés

A gyűjtött parazita minták többsége hazai halgazdaságból származott. A leggyakoribb mintavételi helyek az 2010-ben bezárt százhalombattai Temperált Vízű Halgazdaság (TEHAG), a Dinnyési Halgazdaság, és a Hortobágyi Halgazdaság voltak. A természetes vizek közül a Balaton, a Kis-Balaton, a Duna, a Tisza és a Benta-patak szolgált mintavételi helyül.

Actinospóra minták

A kevéssertéjű férgekben előforduló nyálkaspórási fertőzöttség felmérő vizsgálatát a TEHAG-ban és a Tisza folyó tiszafüredi szakaszán végeztük (Eszterbauer et al. 2006). Egy szezonon át (áprilistól szeptemberig) havi rendszerességgel iszapmintát gyűjtöttünk. Az iszapból kigyűjtött kevéssertéjű férgeket morfológiai bélyegek alapján Brinkhurst (1963) édesvízi oligochaeta határozója segítségével, lehetőség szerint faji szinten azonosítottuk.

A kigyűjtött férgeket 24-lyukú szövettenyésztő lemezre helyeztük 1 ml klórmentes csapvízbe egyedileg elkülönítve, Yokoyama (1991) módszerét követve, és 1 hónapon keresztül naponta vizsgáltuk a férgek actinospóra kibocsátását. A kimutatott actinospórákról mikroszkópos fotókat készítettünk, és Lom et al. (1997) útmutatásai alapján elvégeztük morфомetriai jellemzésüket.

Myxospóra minták

Az elmúlt másfél évtized alatt a hazánkban előforduló pontyfélék nyálkaspórási fertőzöttségét több tucat élőhelyen vizsgáltuk. A hazai mintavételi helyek mellett németországi és csehországi élőhelyeken is történt mintagyűjtés. A *M. cerebralis* minták, hazai élőhely hiányában, Németországból, bajor pisztrángos gazdaságokból származtak. A gazdafajlagosság, a szöveti és szervi lokalizáció tanulmányozása a 2.1. Táblázatban felsorolt nyálkaspórási fajokon történt.

2.1. Táblázat: Halból származó myxospóra minták összefoglaló táblázata. Mp: *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936. *Molekuláris vizsgálat eredményeként kapott 18S rDNS szekvencia génbanki azonosító száma. **Aufsess Halgazdaság, Németország.

Parazita faj	Halgazda	Élőhely	Génbanki azonosító*
<i>Myxobolus</i> spp. izolátumok			
<i>Myxobolus bramae</i> Reuss, 1906	dévérkeszeg (<i>Abramis brama</i>)	Balaton	AF507968
<i>Myxobolus macrocapsularis</i> Reuss, 1906	dévérkeszeg	Balaton	AF507969
<i>Myxobolus impressus</i> Miroshnichenko, 1980	dévérkeszeg	Balaton	AF507970
<i>Myxobolus basilamellaris</i> Lom et Molnár, 1983	ponty (<i>Cyprinus carpio</i>)	TEHAG	AF507971
<i>Myxobolus dispar</i> Thélohan, 1895	ponty	Balaton	AF507972
<i>Myxobolus pavlovskii</i> Akhmerov, 1954	pettyes busa (<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>)	TEHAG	AF507973
<i>Myxobolus pavlovskii</i> Akhmerov, 1954	fehér busa (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	TEHAG	AF507973
<i>Myxobolus</i> sp.	dévérkeszeg	Balaton	AY325283
<i>Myxobolus muelleri</i> , Bütschli, 1882	domolykó (<i>Squalius cephalus</i>)	Duna	AY325284
<i>Myxobolus intimus</i> Zaika, 1965	bodorka (<i>Rutilus rutilus</i>)	Balaton	AY325285
<i>Myxobolus obesus</i> Gurley, 1893	szélhajtó kűsz (<i>Alburnus alburnus</i>)	Duna	AY325286
<i>Myxobolus cerebrales</i> (Hofer 1903)	szivárványos pisztráng	Németo.	AF115255
<i>Myxobolus pseudodispar</i> izolátumok:			
Mp SE-13	vörösszárnyú keszeg (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	Balaton	KU340976
Mp SE-47	vörösszárnyú keszeg	Balaton	KU340977
Mp SE-F68	vörösszárnyú keszeg	Balaton	KU340978
Mp SE-F69	vörösszárnyú keszeg	Balaton	KU340979
Mp SE-90B	vörösszárnyú keszeg	Balaton	KU340980
Mp A-102B	szélhajtó kűsz	Balaton	KU340981
Mp A-103B	szélhajtó kűsz	Balaton	KU340982
Mp AB-1	dévérkeszeg	Balaton	KU340983
Mp AB-49	dévérkeszeg	Balaton	KU340984
Mp AB-52	dévérkeszeg	Balaton	KU340985
Mp BL-1	karikakeszeg (<i>Blicca bjoerkna</i>)	Balaton	KU340986
Mp BL-56	karikakeszeg	Balaton	KU340987
Mp R-91B	bodorka	Balaton	KU340988
Mp R-92B	bodorka	Balaton	KU340989
Mp R-93B	bodorka	TEHAG	KU340990
Mp R-T42	bodorka	Balaton	KU340991
Mp R-T50	bodorka	Németo.**	EF466088
<i>Sphaerospora</i> spp. izolátumok 1:			
<i>Sphaerospora molnari</i> Lom, Dyková, Pavlásková et Grupcheva, 1983	ponty	Hortobágy	JX431510
<i>Sphaerospora molnari</i> Lom, Dyková, Pavlásková et Grupcheva, 1983	ponty	Csehország	JQ801548
<i>Sphaerospora angulata</i> Fujita, 1912	ponty	TEHAG	JQ801530
<i>Sphaerospora angulata</i> Fujita, 1912	ponty	Csehország	JQ801525-9

(2.1. Táblázat folytatása)

<i>Sphaerospora</i> spp. izolátumok 2:			
<i>Sphaerospora dykova</i> Lom et Dyková, 1982 (syn: <i>S. renicola</i>)	ponty	Hortobágy	JQ801531
<i>Sphaerospora dykova</i> Lom et Dyková, 1982 (syn: <i>S. renicola</i>)	ponty	Csehország	JQ801532-3
<i>Sphaerospora</i> sp.	dévérkeszeg	Balaton	KY851765
<i>Sphaerospora abrami</i> Patra et al 2018	dévérkeszeg	Csehország	MG214664
<i>Sphaerospora bliccae</i> Patra et al 2018	karikakeszeg	Balaton	KY851767
<i>Sphaerospora rutili</i> Patra et al 2018	bodorka	Csehország	MF347687
<i>Sphaerospora</i> sp.	bodorka	Balaton	KY851776
<i>Sphaerospora gutta</i> Patra et al 2018	vörösszárnyú keszeg	Csehország	KY851778
<i>Sphaerospora dentata</i> Patra et al 2018	vörösszárnyú keszeg	Csehország	MG214666
<i>Sphaerospora</i> sp.	vörösszárnyú keszeg	Balaton	KY851779
<i>Sphaerospora squali</i> Patra et al 2018	domolykó	Csehország	KY851780
<i>Sphaerospora diversa</i> Patra et al 2018	nyúldomolykó (<i>Leuciscus leuciscus</i>)	Csehország	KY851772, KY863519
<i>Sphaerospora diminuta</i> Li & Desser 1985	naphal (<i>Lepomis gibbosus</i>)	Csehország	KY851771

2.1.2. Morfológiai és szövettani vizsgálatok

A myxospóra és actinospóra alakok morfometriai jellemzése során Lom & Dykova (1992) útmutatásait követtük. A morfológiai vizsgálat kiegészült a parazita spórák szervi és szöveti lokalizációjának natív mikroszkópos és szövettani vizsgálatával. A szövettani fixálás Bouin-oldatban vagy 10%-os pufferolt formalin (NBF) oldatban történt maximum 1 napon át, majd az etanolos, xilolos és acetonos víztelenítést követően Paraplast-ba (Monoject Sci. Inc., Írország) ágyasztuk be a mintákat, és 4-8 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket hematoxin-eozinnal festettünk a klasszikus szövettani protokoll szerint.

2.1.3. Molekuláris módszerek**DNS feltárás**

A mintákban levő DNS kivonására számos módszert kipróbáltunk. A következőkben azokat ismertetem, amelyeket hatékonyságuk miatt a vizsgálatok során a leggyakrabban használtunk.

A minta enzimés emésztésénél a parazita spórákhoz lízis puffert (100 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7,6; 10 mM EDTA; 0,2% SDS; 0,4 mg/ml proteináz K) adtunk, majd 55°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Egyik módszerként a tradicionális fenol–kloroformos DNS feltárási módot alkalmaztuk Sambrook et al. (1989) laboratóriumi kézikönyvét követve. A vízből gyűjtött actinospóra mintákat a fehérjebontó enzimés emésztés után Miniprep Express Matrix oldattal

(Bio101 Inc., Thermo Fisher Scientific) kezeltük a gyártó útmutatása szerint. E módszer egyszerűbbnek és legalább olyan hatékonynak bizonyult, mint a fenol–kloroformos kicsapás. A fenol–kloroformos feltárás végén kapott, beszárított genomiális DNS-t (gDNS), és a mátrix által megkötött DNS-t 35–40 µl ultratiszta vízben (ddH₂O) vagy 10 mM Tris pH 8,0 pufferben feloldottuk, és további felhasználásig –20°C-on tároltuk. A halakból nyert myxospóra mintáknál (beleértve a vérmintákat is) a gDNS feltárásához a DNeasy Mini Kit-et (Qiagen) használtuk a gyártó útmutatása szerint. A kinyert gDNS mennyiségét agaróz gélelektroforézis segítségével, ismert mennyiségű molekulasúly-marker jelenlétében becsültük meg. Eleinte NanoDrop 2000c spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific), majd a későbbiekben Qubit 3.0 fluorometer (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) segítségével is ellenőriztük a gDNS tisztaságát és becsültük koncentrációját.

Polimeráz láncreakció (PCR)

A PCR-rel felerősített DNS szakaszok mindegyike a 18S rDNS különböző hosszúságú szakaszai voltak. A felsokszorozáshoz (amplifikáció) többféle primerpárt használtunk, melyek egy részét szakirodalmi adatokból gyűjtöttük, másik részét a munka során magunk terveztük, és optimalizáltuk alkalmazhatóságukat (2.2. Táblázat). Az amplifikáció általában 25 µl végtérfogatban történt a következő összetétellel: 10–150 ng gDNS, 1× Taq DNS polimeráz puffer (Fermentas, Thermo Fisher Scientific), 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP mix (Sigma, Merck) 1 µM az egyes primerekből, 2,5 unit rekombináns Taq DNS polimeráz (Fermentas, Thermo Fisher Scientific). Különösen érzékeny, vagy kis mennyiségű parazita DNS-t tartalmazó minták esetében Titanium Taq (Clontech, TakaraBio) vagy AmpliTaq (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) DNS polimerázt használtunk a gyártó ajánlása szerint. Az általánosan alkalmazott PCR program lépései a következők voltak: kezdeti denaturációs lépés 95°C-on 5 perc, majd 35 ciklus 95°C 30 másodperc (mp) (denaturáció), 56°C 30 mp (primer tapadás; annealing), 72°C 60 mp (szálszintézis; elongation) és befejező lépésként 72°C-on 5 perc. A primer tapadás lépés hőmérsékletét a primerek olvadáspontjának és specificitásának függvényében 50–60°C között állítottuk be.

Sanger szekvenálás

A DNS szekvenálást ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) segítségével magunk végeztük a templát mennyiségétől függően 5–10 µl végtérfogatban a gyártó utasításai szerint. A DNS szekvenciák detektálását a Szegedi Biológiai Központ Szekvenáló Laboratóriumától rendeltük szolgáltatásként ABI Prism Genetic Analyzer 3100, majd a későbbiekben ABI Prism Genetic Analyzer 3500, többcsatornás kapilláris szekvenáló készüléken.

***In situ* hibridizáció**

A *M. pseudodispar* faj oligochaeta gazdában történő fejlődésének vizsgálatára *in situ* hibridizációs (ISH) módszert alkalmaztunk (Marton & Eszterbauer 2012). Az ISH-hoz a 8%-os formalinban fixált oligochaeta mintákat, a szokásos szövettani protokollt követve, paraffinba ágyaztuk, és 5 µm-es hosszanti metszeteket készítettünk belőlük. Rehidratálás után a metszet DNS tartalmának feltárásához proteináz K emésztést végeztünk, amit mosás majd a szövet utófixálása követett 0,4%-os paraformaldehidben. A hibridizáció során biotinnal jelölt, specifikus oligonukleotidokkal reagáltattuk a parazita DNS-t. A *M. pseudodispar*-specifikus PCR-hez használt MpF1 és PseudoR primerek mellett a szintén fajspecifikus MpR és PseudoF primereket is felhasználtuk az ISH vizsgálatokhoz (2.2. Táblázat). A hibridizáció egy éjszakán át zajlott 42°C-on. A specifikus mosást (stringency wash) követően 1:5000 hígítású streptavidin-alkáli-foszfátáz konjugátumot (Roche) kötöttünk a metszeten lévő parazita DNS-hez kapcsolódott biotin-jelölt próbához. Újabb mosást követően BCIP/NBT szubsztrátot (Vectorlabs) kapcsoltunk a konjugátumhoz, melynek során a parazita DNS-t tartalmazó szövetrészek sötétkékre színeződtek. Háttérfestésként Bismark Brown Y-t (Sigma; Merck) használtunk, ami sárgás-barnára színezte a gazdaszövetet. Dehidratálás után tartós preparátumot készítettünk a klasszikus szövettani protokoll szerint. A fejlődés különböző időpontjában fixált metszeteken a parazita elhelyezkedését fénymikroszkóppal (Zeiss Axiostar Plus) vizsgáltuk, és Axiovision v4.7 (Zeiss) programot használva különböző mikroszkóp kamerákkal készítettünk felvételeket.

A *Sphaerospora molnari* faj pontyban való fejlődését is *in situ* hibridizáció segítségével vizsgálatuk (Eszterbauer et al. 2013). Ebben az esetben a DIG-alkáli-foszfátáz detektálási rendszert használtuk. A DIG-jelölt, fajspecifikus SmSSU487F és SmSSU1307R oligonukleotidokat hibridizáltuk az előkészített szövetre (2.2. Táblázat). A próba-konjugátum komplexhez Vector Blue (Vectorlabs) szubsztrátot kötve kék színre festődve tettük láthatóvá a parazita alakokat. A piros színű háttérfestéshez 0,1% Fast Red festéket használtunk.

2.2. Táblázat Konvencionális polimeráz láncreakcióhoz (PCR), Sanger DNS szekvenáláshoz, és/vagy *in situ* hibridizációhoz használt oligonukleotidok listája.

Primer neve	Szekvencia 5` - 3`	Referencia
Előre irányuló (forward) primerek:		
ERI-B1	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	(Barta et al. 1997)
18e	CTGGTTGATTCTGCCAGT	(Hillis & Dixon 1991)
MX5	CTGCGGACGGCTCAGTAAATCAGT	(Andree et al. 1998)
MYX1f	GTGAGACTGCGGACGGCTCAG	(Hallett & Diamant 2001)
ACT1f	GGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAA	(Hallett & Diamant 2001)
Myxgen4f	GTGCCTTGAATAAATCAGAG	(Kent et al. 2000)
ACT3f	CATGGAACGAACAAT	(Hallett & Diamant 2001)

(2.2. Táblázat folytatása)

KUD3f	CAGATACCGTCCTAGTTC	(Whipps et al. 2003)
KUD4f	AGCGAGACCACGATCTTT	(Whipps et al. 2003)
ALL1f	GCGGCTTAATTTGACTCAACACGGG	(Hallett et al. 2002)
ACT2f	CCTGGTCCGAACATCCGAAGGATAC	(Hallett & Diamant 2001)
SphF	ACTCGTTGGTAAGGTAGTGGCT	(Eszterbauer & Szekely 2004)
MpF1	TGTGCTTCTGGTGCCTCTGC	jelen tanulmány
Myx4rF	GTTCGTGGAGTGATCTGTCAG	jelen tanulmány
Tub16SF	AACGGCCGCGGTATCCTG	(Beauchamp et al. 2002)
MB5	GGTGATGATTAACAGGAGCGGT	jelen tanulmány
MB3F	GATGATTAACAGGAGCGGTTGG	jelen tanulmány
18eK	TGGTTGATCCTGCCAGT	jelen tanulmány
18eA	CTGGTTGATYCTGCCAGT	jelen tanulmány
MC5	CCTGAGAAACGGCTACCACATCCA	jelen tanulmány
Tr3-17F	CAAATTCAGTGTTGGAGTAGTGTGCC	jelen tanulmány
Tr5-17	GCCCTATTAAGTAGTTGGTAGTATAGAAGC	(Andree et al. 1998)
Smol1200F	GCCAAGCGAGCGTCCAATCA	jelen tanulmány
Smol700F	GGAGATGGTGACGAGACATA	jelen tanulmány
Smol3130F	TGTACTGTTGCCGGTGGATT	jelen tanulmány
Smol1400F	CTCCTTCACTGTGAGCAACG	jelen tanulmány
PseudoF	CTTCAGTCGATGTTAGCCGT	jelen tanulmány
Mc_F_425	GGAGGTGGTGACGAGAAGTACTAAG	jelen tanulmány
SdykF	TGATGTGCGTGTGAGTTGTGC	jelen tanulmány
SmSSU487F	GCCTCTCCACCTGTGTATG	jelen tanulmány
MpFnested	TCACCCGCCAAAGTACGATTGT	jelen tanulmány
Mc224F	CTGATGTAGCGAGTAAGGTG	jelen tanulmány

Visszafelé irányuló (reverse) primerek:

Primer neve	Szekvencia 5' - 3'	Referencia
ACT1fr	TTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCC	(Hallett & Diamant 2001)
KUD4r	GTGCTTTATTCAAGGCAC	(Whipps et al. 2003)
Myxgen2r	CARATGCYTTGCGWYTTGTTA	(Kent et al. 2000)
ACT1r	AATTCACCTCTCGCTGCCA	(Hallett & Diamant 2001)
ALL1r	AACAAAGAACGGCCATGCACCAC	(Hallett et al. 2003)
ACT2fr	GTATCCTTCGGATGTTCCGACCAGG	(Hallett & Diamant 2001)
MYX4r	CTGACAGATCACTCCACGAAC	(Hallett & Diamant 2001)
MX3	CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA	(Andree et al. 1998)
18g	CGGTACTAGCGACGGGCGGTGTG	(Hillis & Dixon 1991)
18r	CTACGGAAACCTTGTTACG	(Whipps et al. 2003)
ERI-B10	CTTCCGCAGGTTACCTACGG	(Barta et al. 1997)
SphR	GTTACCATTGTAGCGCGCGT	(Eszterbauer & Szekely 2004)
PseudoR	AAGCACCGAAGCACAGTCAA	jelen tanulmány
Tub16SR	TAARCCAACATYGAGGTGCCA	(Beauchamp et al. 2002)
Act1Fr	TTGGGTAATTTGCGCGCCTGCTGCC	jelen tanulmány
MC3	GATTAGCCTGACAGATCACTCCACGA	jelen tanulmány
MB5R	ACCGCTCCTGTTAATCATCACC	jelen tanulmány

(2.2. Táblázat folytatása)

PKX1032	CGCTCCTCCAACTTTTCGTTTC	(Saulnier & De Kinkelin 1997)
18gK	GGTAGTAGCGACGGGCGGTGTG	(Kent et al. 2000)
18g'A	CGGTACTAGCGACGGGCGGTGTG	(Andree et al. 1998)
MB3	CCAACCGCTCCTGTTAATCATC	jelen tanulmány
Mc937R	TTGGTGCTGTATGCTGTAACGTG	jelen tanulmány
Tr3-17	GGCACACTACTCCAACACTGAATTTG	(Andree et al. 1998)
Mc811R	GCTTTGAGCACTCTGATTTATTCA	jelen tanulmány
MyxospecR	GGTTTCNCDGRGGGMCCAAC	jelen tanulmány
Smol1900R	GTACCGAAGAACGCACACGA	jelen tanulmány
Smol1200R	TTGGACGCTCGCTTGCT	jelen tanulmány
Smol800R	TGGTATTACCGCGCTGCTG	jelen tanulmány
Mc-652R	CCTACCAACTTACACTGCGT	jelen tanulmány
Mc_R_750	GTAAGACACGGCAATCGACGCACTA	jelen tanulmány
SdykR	ACGCAAAGATGCACACACTGGAC	jelen tanulmány
SmSSU1307R	ACCGTGAGCCACGCGTAATG	jelen tanulmány
MpR	AACAGCCAACTGAGATCAC	jelen tanulmány
MpRnested	CGAAACCTGCTTTTGCCTCTTA	jelen tanulmány
Mc1072R	TGCCTTCGCATTCTGTTAGTC	jelen tanulmány

Az oligonukleotidokat és a jelölt próbákat az Integrated DNA Technologies, Inc. (IDT) szintetizálta szolgáltatásként.

2.1.4. Filogenetika

A filogenetikai módszerek elméleti és technikai fejlődését követve változtak az elemzésekhez használt szoftverek és paraméterek. A 2010-es évekig a DNS szekvenciákat a Multalin program segítségével illesztettük, majd a BioEdit Sequence Alignment Editor program használatával manuálisan javítottuk. A filogenetikai számításokat általában a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) becslési módszerrel, valamint Bayesian statisztikával (Bayesian inference of phylogeny) is elvégeztük. Az előbbihez a Phylip programcsomagot, míg a Bayesian statisztikához a MrBayes programot alkalmaztuk (Huelsenbeck & Ronquist 2001). A maximum likelihood és a Bayesian inference módszer a továbbiakban is jól alkalmazható volt filogenetikai vizsgálatainkhoz, azonban a későbbiekben a Geneious programcsomagot használva, a MAFFT kiegészítő modul (plug-in) segítségével illesztett szekvenciákat már RAXML és MrBayes modulokkal elemeztük.

2.2. Gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai**2.2.1. *In vivo* parazita rendszerek**

Az *in vivo* laboratóriumi nyálkaspórási tenyészet fenntartásához folyamatosan ellenőrzött faji összetételű, parazitamentes kevéssertéjű féreg állományokat (*Tubifex* és *Limnodrilus* fajokat) neveltünk és tartottunk zárt, laboratóriumi rendszerben. A heti vízcserével mellett autoklávozott

iszappal pótoltuk az elhasználódott aljzatot és fagyasztott fejes saláta, *Spirulina* por és fagyasztott sórák (*Artemia*) vagy vörös szúnyoglárva összeturmixolt keverékével etettük a féregállományokat (Eszterbauer et al. 2015a). Az oligochaeta állományok vizét rendszeres időközönként szűrtük 20 µm-es hálószővettel a nyálkaspórák parazitától való mentesség ellenőrzése céljából. A szűrőben maradt vízből néhány cseppet fázis kontraszt mikroszkóppal (Zeiss Axiostar Plus) vizsgáltunk, vízben lebegő actinospórák esetleges előfordulásának kimutatása végett. Ezek a rendszeresen ellenőrzött oligochaeta törzsállományok szolgáltak negatív kontrollként a későbbi fertőzési kísérleteinkhez.

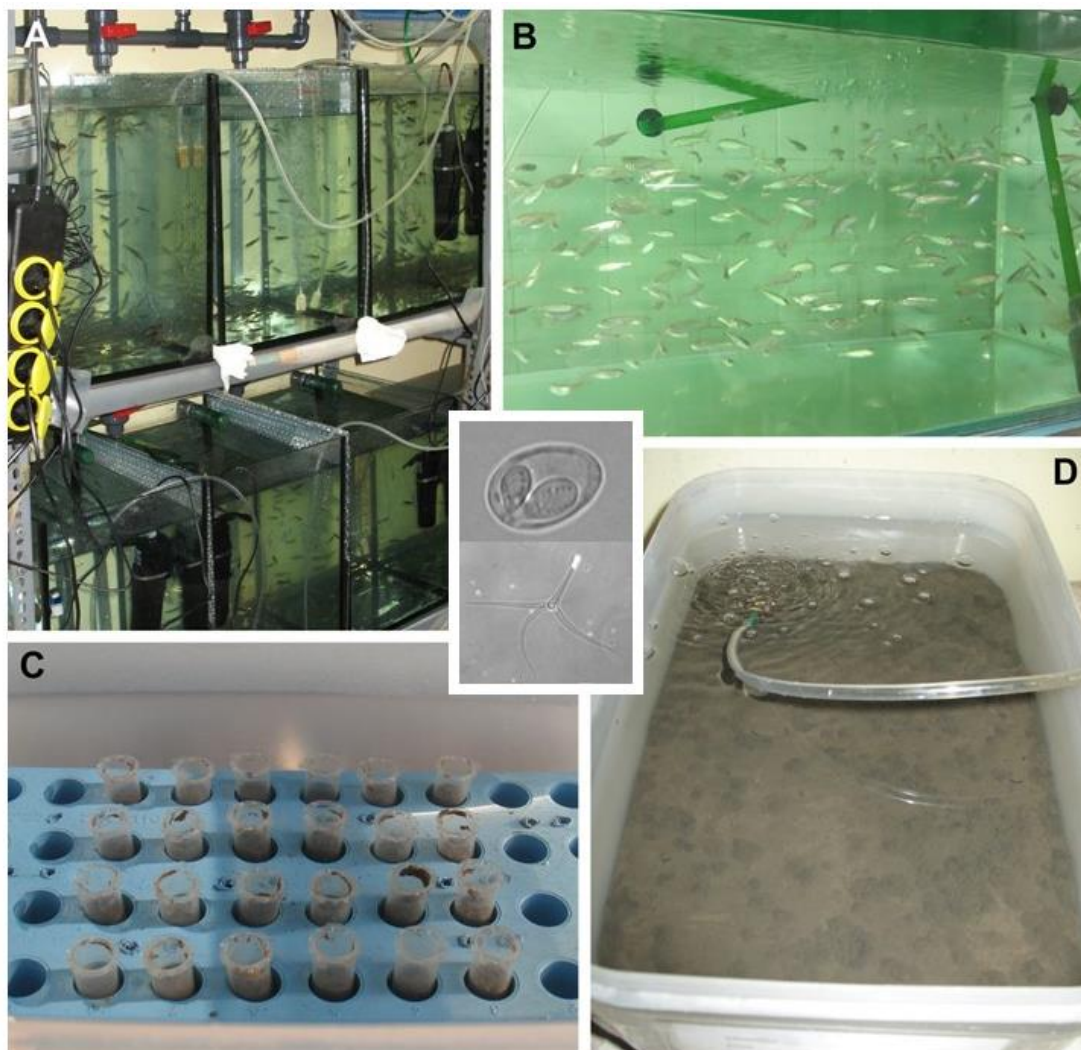
Az *in vivo* parazita tenyészet laboratóriumi fenntartásához és a kísérletekhez szükséges specifikus parazitamentes (SPF) halakat a laboratóriumi akváriumrendszerben neveltük parazitamentes körülmények között. A szempontos ikrák és a frissen kelt ivadék állomány (ún. zsengék) hazai halgazdaságokból származtak. A sebes és szivárványos pisztrángok a Lillafüredi Pisztrángtelepről, a pontyfélék (bodorka, ezüstkárász, ponty, dévérkeszeg, vörösszárnyú keszeg) főként a Dinnyési és a Hortobágyi Halgazdaságból származtak. A kikelt ivadékot, mennyiségüktől függően 30-100 literes levegőztetett akváriumokban tartottuk. Kezdetben az általunk a laborban frissen keltetett sórakkal, majd a halfaj igényeinek megfelelő összetételű nevelőtáppal (AllerAqua, Skretting) és fagyasztott sórák (VanGerven) eleséggel etettük naponta egyszer *ad libitum*.

A kísérletes munkához két nyálkaspórák faj, a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* életciklusát *in vivo* laboratóriumi rendszerben folyamatosan fenntartottuk. 5 literes, aljzatként kb. 5 cm vastag rétegben autoklávozott iszapot és homokot tartalmazó, vízzel telt műanyag dobozokba körülbelül 10 g parazitamentes kevéssertéjű férget helyeztünk az elsősorban *T. tubifex*-et, de változó arányban *Limnodrilus* spp. fajokat is tartalmazó tenyészetekből, majd halakból kigyűjtött, 10^5 - 10^6 db myxospórával megfertőztük a féreg állományt. Az actinospórák vízben való megjelenését a fertőzést követő második hónap végétől vizsgálatuk az edény vizének szűrésével. A lebegő actinospórák életképességének és fertőzőképességének ellenőrzése után, 2 napnál nem idősebb, frissen szűrt actinospórákkal egyedileg fertőztünk SPF halakat a parazita életciklus fenntartása céljából. A fertőzés a halak méretétől függően, de átlagosan 3000 TAM/ hal dózisban történt 3 órán keresztül (szintén a halak méretétől függően) 200–1000 ml vízben. Az egyedi fertőzés inkubációs idejének lejárta után, a halakat elkülönített akváriumban, életkoruknak és fajuknak megfelelő víz hőmérsékleten és körülmények között tartottuk a parazita fejlődésének teljes lezajlásáig, parazita fajtól függően 3-5 hónapig. A kifejlődött parazita myxospórákat a fertőzött halak 200 mg/l MS222 altatószerrel történő bódítása, majd a gerinc átvágása után, boncolás útján gyűjtöttük ki. A myxospórák mennyiségét Bürker vagy Sedgewick Rafter kamra segítségével becsültük. A halak

tenyésztése, tartása, kísérletes fertőzése és a kísérletek lezárása minden esetben a hatályos állatvédelmi rendelkezések betartásával, a szakhatóság állatkísérleti engedélyével történt.

2.2.2. Kísérleti rendszerek

A gazda–parazita kölcsönhatás fejlődéstani hátterét két fajon, az erősen patogén *M. cerebralis*, és az alacsony patogenitású, klinikai tüneteket és elhullást általában nem okozó *M. pseudodispar* fajon vizsgáltuk.



2.1. ábra: Két modell faj, a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* életciklusának fenntartása zárt laboratóriumi rendszerben. **A:** *M. cerebralis*-sal fertőzött sebes pisztrángok (*Salmo trutta m fario*) és szivárványos pisztrángok (*Onchorhynchus mykiss*); **B:** SPF bodorkák (*Rutilus rutilus*); **C:** *Tubifex* spp. egyedi fertőzése *M. pseudodispar* spórákkal; **D:** *M. cerebralis*-sal fertőzött kevésstérű féregállomány. Melléklet: *M. pseudodispar* myxospóra és *M. cerebralis* TAM.

A paraziták minden esetben zárt laboratóriumi rendszerben fenntartott állományból származtak (2.1. ábra). A halak fertőzése minden kísérletben egyedileg történt, és a negatív kontroll csoport egyedeit a fertőzött csoportokhoz hasonló módon kezeltük, annyi különbséggel, hogy a parazitával nem kerültek kontaktusba.

***M. pseudodispar* gazdafajlagossága kevésertéjű féreg gazdában** (Marton & Eszterbauer 2012)

Négy különböző laboratóriumi tenyészetből (T-I és T-II, AU, és WS) származó kevésertéjű férgeket egyedileg fertőztünk 10^3 - 10^4 db myxospóra/féreg dózisban 1,5 ml autoklávozott iszapot tartalmazó 2 ml-s műanyag mikrocsővekben, amik 5 literes vízzel teli és levegőztetett műanyag edénybe voltak helyezve a 2.1. C ábrán látható módon. A kísérlet kezdetétől számított 1., 4., 8. és 24. óra végén, majd az 1., 4. hét végén 5-5 féreg egyedet fixáltunk molekuláris és ISH vizsgálatokhoz. A harmadik hónap végén az összes maradék egyedet fixáltunk a parazita spóra ürítés vizsgálatára és molekuláris vizsgálatokhoz.

***M. pseudodispar* gerinces gazdaspektrumának vizsgálata** (Forró & Eszterbauer 2013)

Két kísérleti elrendezésben fertőztünk pontyféléket. Az elsőben 1 éves bodorka, 2 éves dévérkeszeg, és 3 éves vörösszárnú keszeget fertőztünk 3000 TAM/hal dózisban 3 órán keresztül (16 hal/csoport), míg a második kísérletben 1 éves bodorka és szintén 1 éves vörösszárnú keszeg egyedek fertőzöttségét hasonlítottuk össze az első kísérlettel azonos körülmények között (20 hal/csoport). A 3 órás inkubáció letelte után a halakat csoportonként külön akváriumba helyeztük a kísérlet végéig. A boncolás és a parazita spórák számolása a fertőzést követő harmadik hónap végén történt.

***M. cerebralis* gazdafelismerése és gazdába való bejutása** (Kallert et al. 2009)

A fertőzési kísérlet során 11 hónapos szivárványos pisztráng (TroutLodge, TL és Hofer, H törzsek) és ponty egyedeket fertőztünk 8000 TAM/hal dózisban 3 percen keresztül (9 db hal/csoport; 9 ismétléssel). Előzetesen a *M. cerebralis* TAM-okat 5 mg/ml fluoreszcein-diacetát (FDA) festékkel jelöltük Yokoyama & Urawa (1997) leírását követve, hogy a parazita halba való bejutása fluorescens mikroszkóp segítségével detektálható legyen. Az inkubáció lejárta után, a halak bódítását és kiirtását követően azonos méretű kopolyú, mellúszó, farokúszó darabban, és azonos mennyiségű bőrkaparékban mikroszkóppal vizsgáltuk a parazita jelenlétét. A parazita DNS mennyiségét valós idejű, kvantitatív PCR (qPCR) segítségével becsültük meg.

***M. cerebralis* gazdába való bejutásának lokalizációja** (Eszterbauer et al. 2019)

A kísérletben 7–8 hetes szivárványos és sebes pisztráng, valamint 12 hónapos ezüstkárász egyedeket fertőztünk 10000 TAM/hal dózisban 2 órán keresztül (21 db hal/csoport). Az inkubációs idő (2 óra) letelte és a halak túlaltatása után, egységnyi mennyiségű kopolyú-, farokúszó-, és a test oldaláról származó bőrmintát gyűjtöttünk a molekuláris vizsgálatokhoz.

***M. cerebralis* gazdafelismerésének molekuláris háttere** (Eszterbauer et al. 2009)

A *M. cerebralis* TAM gazdafelismerésének hal jelenléte nélküli vizsgálatára *in vitro* aktivációs módszert dolgoztunk ki. A kísérleti spóraszuszpenzió koncentrációja 10000-75000 TAM/ml volt. Ebből 400-400 µl-t pipettáztunk 24-lyukú szövettenyésztő lemezek mélyedéseibe. Szivárványos pisztráng bőrnyalika kaparékból nyálka-kivonatot készítettünk Kallert et al. (2005) leírását követve. A TAM szuszpenzió aktiválása 0,7 mg/ml végkoncentrációjú nyálka kivonat hozzáadásával (kémiai inger) és 3x2 másodperc intenzív vortexeléssel (mechanikai inger) történt. A TAM-ok aktivitását 15 perccel az aktiválást követően 3x20 µl térfogatú szuszpenzióban lévő aktív (kiszabadult sporoplazma) és aktiválatlan TAM-ok (ép, intakt spóra) mikroszkópos számolásával vizsgáltuk 10 ismételtsben. Majd statisztikailag értékeltük a módszer hatékonyságát. A későbbi molekuláris vizsgálatokhoz ezzel az aktivációs eljárással, 30 perccel az aktiválást követően gyűjtöttük az aktivált és ugyanennyi idő elteltével az ingerek hatása nélkül tartott (kontroll) TAM mintákat (800.000 TAM/minta mennyiségben), és RNAlaterben (Sigma-Aldrich; Merck) fixálva, -20°C-on tároltuk felhasználásig.

A génexpressziós vizsgálatokhoz az aktivált és a kontroll TAM mintákon kívül a parazita halban fejlődő alakjainak korai stádiumait is vizsgáltuk. Ehhez egyedileg fertőztünk 12 hetes TroutLodge (TL) szivárványos pisztrángot 30 percig, 3500 TAM/hal dózisban, és 6-6 egyed bőrnúzatát fixáltuk RNAlaterben 1, 8 és 24 órával a fertőzést követően.

Halak beltenyésztettségének hatása a *M. cerebralis* fertőzöttségre (Eszterbauer et al. 2015)

A fertőzési kísérletben 10 hetes, különböző beltenyésztettségi szintű sebes pisztráng ivadék négyféle csoportját fertőztünk. Egy genetikailag heterogén (NIB), egy beltenyésztett (IB), egy közeli rokon hím-nőstény párok utódaiból álló (REL), és egy, Európában igen gyakori, atlanti-dunai hibrid vérvonal (LBT) egyedeit magába foglaló csoportot alakítottunk ki. Pozitív kontrollként szivárványos pisztráng csoport szolgált a kísérletben. Az egyedi fertőzés 3000 TAM/hal dózisban 3 órán keresztül történt (53 db hal/csoport). A fertőzést követően a halak csoportonként külön akváriumba kerültek a kísérlet végéig. A boncolás és a parazita spórák számolása a fertőzést követő negyedik hónap végén történt.

Kevéssertéjű férgemet fertőztünk bodorkából, vörösszárnyú keszegből, dévérkeszegből és karikakeszegből származó *M. pseudodispar* myxospórákkal külön-külön. A féregtenyészetek parazita TAM ürítését a fertőzést követő második hónaptól heti rendszerességgel vizsgáltuk.

Vér szerepe a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* fertőzöttségben (Sipos et al. 2018)

Három kísérletet végeztünk, egyet *M. cerebralis* fajjal, kettőt *M. pseudodispar* fajjal. Nyolc hetes szivárványos pisztrángot és sebes pisztrángot fertőztünk *M. cerebralis*-sal. Az első

M. pseudodispar kísérletben 1 éves bodorkát, vörösszárnú keszeget és ezüstkárászt, a második kísérletben 2 éves bodorkát és 2 éves vörösszárnú keszeget, és 3 éves dévérkeszeget fertőztünk. Mindhárom kísérletben 5000 TAM/hal dózisban 3 órán keresztül egyedileg fertőztük a halakat (34 db hal/csoport). A fertőzés inkubációs idejének lejártá után halfajonként külön akváriumba helyeztük a halakat, majd a kísérlet kezdetét követően 1 nappal, 1 héttel és 1 hónappal 10-10 halból bódítást követően vért vettünk a farki vénán keresztül. A vérmintákban lévő parazita fejlődési alakok mennyiségét, fajspecifikus, valós idejű qPCR segítségével becsültük.

Nyálkaspórák fertőzés megelőzésének lehetőségei (Kallert et al 2014)

A nyálkaspórák halgazdába való bejutását akadályozó módszereket vizsgáltunk *in vitro* és *in vivo* tesztekben.

In vitro tesztek: Kurauchi et al. (2004) szabadalma alapján elkészített inozin és arginin sók keverékét (IA) teszteltük *M. cerebralis* és *M. pseudodispar* fajokon. Az érett, fertőzőképes TAM-ok gazdafelismeréskor jelentkező reakcióját (konkrétan poláris filamentumaik kilökődését és a sporoplazma aktív kijutását) vizsgáltuk két külön kísérletben 6–6 ismétléssel.

In vivo kipróbálás: Az *in vitro* kísérletekben hatékony koncentrációjú IA sóoldattal 20 percig inkubált *M. pseudodispar* TAM-mal fertőztünk bodorkát 1000 TAM/hal dózisban 3 órán keresztül. A kísérlet pozitív kontrollja nem sóoldatban, hanem vízben inkubált TAM-mal fertőzött halcsoport volt. A halakat a fertőzést követő harmadik hónap végén boncoltuk, és a kifejlődött parazita myxospórákat Bürker kamrában számoltuk.

2.2.3. Kísérletek értékelése

A kapott kísérleti eredmények értékelése a legtöbb esetben az R program segítségével történt. A megfelelő modell kiválasztása az adatsor jellegének, nagyságának megfelelően történt. A fertőzés prevalenciáját gyakran Chi-négyzet próbával hasonlítottuk össze a különböző csoportok között. A fertőzés intenzitását ANOVÁ-t követően Tukey *post hoc* teszttel, vagy Mann-Whitney U-teszttel vizsgáltuk. Amennyiben nem teljesültek az ANOVA előfeltételei, általában Kluska-Wallis tesztet és azt követő Dunn próbával (Bonferroni korrekció) elemeztük az adatsort.

2.2.4. Molekuláris módszerek

A DNS feltárás és a tradicionális PCR lépései megegyeztek a 2.1.3. alfejezetben leírtakkal.

Hal vérvonal és mikroszatellit vizsgálat (Eszterbauer et al. 2015)

A sebes pisztráng tenyészállomány vérvonalának meghatározásához a mitokondriális DNS kontroll régió (mtDNS CR) 1088 bp hosszú szakaszát és a laktát-dehidrogenáz enzim

génjének C1 régiójából 428 bp hosszú szakaszt sokszoroztuk fel Bernatchez (2001) leírása szerint. A vérvonalak elkülönítése PCR-t követő restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus (PCR-RFLP) módszerrel, S_{at}I és B_{se}I (Fermentas, Thermo Fisher Scientific) restrikciós enzimek alkalmazásával történt (Marić et al. 2010).

A sebes pisztráng tenyészállományok genetikai variabilitásának meghatározásához nyolc mikroszatellit lókuszt vizsgáltunk szakirodalmi módszertani leírásokat követve: Str-15, Str-60 (Estoup et al. 1993), Str-543 (Presa & Guyomard 1996), SsoSL-417, SsoSL-438 (Slettan et al. 1995), Ssa-85, Ssa-197 (O'Reilly et al. 1996), OKI-10 (Smith et al. 1998). A páros rokonság (pairwise relatedness, r_{msat}) és az egyedi beltenyésztettségi együttható (individual inbreeding coefficient, f_{msat}) becslése COANCESRTY szoftver TrioML moduljával történt (Wang 2011).

Szupressziós szubtraktív hibridizáció (SSH) (Eszterbauer et al. 2009)

A gazdafelismerés során aktiválódó gének kimutatásához mintánként 1-1 µg total RNS-t izoláltunk *M. cerebralis* TAM-ból, és a munka során kidolgozott, a halgazda kémiai és mechanikai stimulusait imitáló, *in vitro* módszer segítségével aktivált TAM-ból. A cDNS átírás BD SMART PCR cDNA Synthesis kit (Clontech, Takara) alkalmazásával történt a gyártó útmutatása szerint. A nem aktivált (intakt), és az aktivált (gazdát felismert) TAM-ok transzkriptóm-készletének összehasonlítását szupressziós szubtraktív hibridizációval (SSH) végeztük PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech, Takara) használatával a gyártó ajánlását követve. A DNS klónozás, és a DNS:DNS dot-blottal történő szelekció után, az aktivált TAM-ban magas abundanciával jelen lévő géneket DNS szekvenálással azonosítottuk, a teljes mRNS-t 5'/3' RACE kit (Roche) segítségével határoztuk meg.

Kevéssertéjű féreg-specifikus PCR (Marton & Eszterbauer 2012)

A *M. pseudodispar* gazdafajlagosságát a kevéssertéjű féreg gazdáikban is vizsgálatuk. Ennek során a kevéssertéjű férgeket morfológiai bélyegek mellett molekuláris biológiai módszerekkel is vizsgálatuk. A mitokondriális 16S rDNS (mt 16S rDNS) egy 370 bp hosszú szakaszát sokszoroztuk fel a szakirodalomból ismert Tub16SF-Tub16SR primer párral, Beauchamp et al. (2001) módszere szerint.

Valós idejű qPCR (Kallert et al. 2009; Eszterbauer et al. 2009, Sipos et al. 2018)

Valós idejű PCR-t alkalmaztunk gazdaszövetben lévő parazita DNS mennyiségének meghatározásához, valamint különféle parazita gének relatív expressziójának vagy abundanciájának becsléséhez.

Parazita gének relatív expresszióját mértük BioRad MyIQ Single Color Real-Time PCR készüléken iQ SYBR Green Supermix reagens (BioRad) felhasználásával, a vizsgált génekre specifikus, a kutatás részeként tervezett primerekkel és optimalizált qPCR rendszerrel. Hét

parazita gént vizsgáltunk, fejlődési stádiumonként 9 párhuzamos mintán. Referencia génként az ismert szekvenciájú 18S rDNS és béta-aktin gének közül, előzetes vizsgálatok alapján a kiegyenlített expressziójú béta-aktint választottuk.

A parazita DNS mennyiségét becsültük *M. cerebralis* gazdába való bejutásának vizsgálata során. A *M. cerebralis* 18S rDNS-re specifikus qPCR rendszerrel (Cavender et al. 2004), ismert mennyiségű TAM felhasználásával kalibrációs egyenest határoztunk meg, melynek segítségével a vizsgált gazdaszövetben a paraziták száma jó közelítéssel becsülhető volt. A qPCR BioRad MyIQ Single Color Real-Time PCR készüléken, iQ SYBR Green Supermix reagens (BioRad) felhasználásával a gyártói útmutató szerint zajlott, halfajonként 9 párhuzamos mintán.

Nyálkaspórárok vérben való előfordulását a *M. cerebralis* esetén a korábban leírt Myx18S-IGF rendszerrel (Kelley et al. 2004), a *M. pseudodispar* esetén pedig saját tervezésű, optimalizált és fajspecifikus Taqman qPCR rendszerrel vizsgáltuk (Myx18S-Gluc). A parazita-specifikus Taqman próbák FAM, a referencia génként szolgáló piztráng inzulin növekedési faktor I-hez (IGF-I) kötődő próba HEX, míg a ponty glükokinázhoz (Gluc) kapcsolódó próba Texas Red fluoreszcens festékkel volt jelölve. A qPCR Rotor-Gene 6000 real-time készüléken (Corbett), AmpliTaq Gold DNS polimeráz kit (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) felhasználásával történt a gyártó útmutatását követve. A parazita DNS mennyiségét a hal DNS mennyiségéhez normalizáltuk, és kalibrált, normalizált relatív mennyiségeket (calibrated normalized relative quantities, CNRQ) határoztunk meg a qBasePlus szoftver segítségével. Halfajonként és mintavételi időpontonként átlagosan 10 párhuzamos mintát vizsgáltunk (a mintaszám néhány, egyedi esetben eltért az átlagostól; és 6–12 között váltakozott).

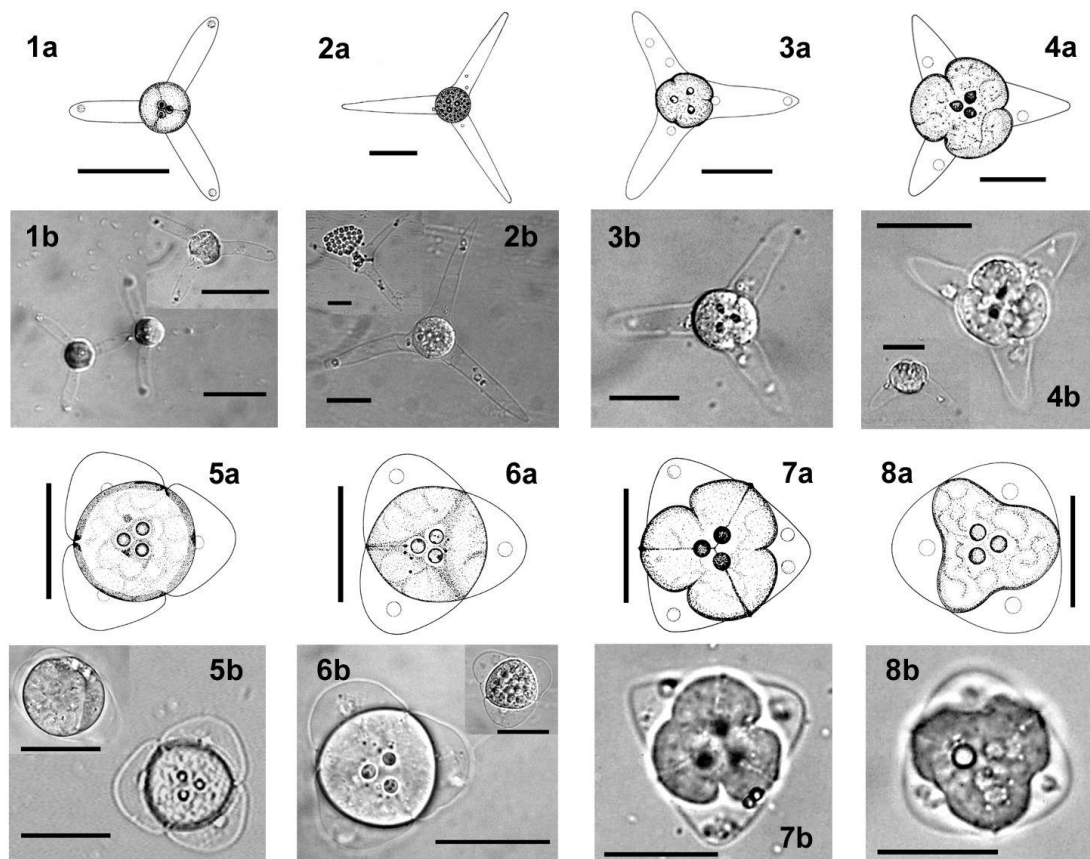
3. EREDMÉNYEK

3.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vonatkozásai

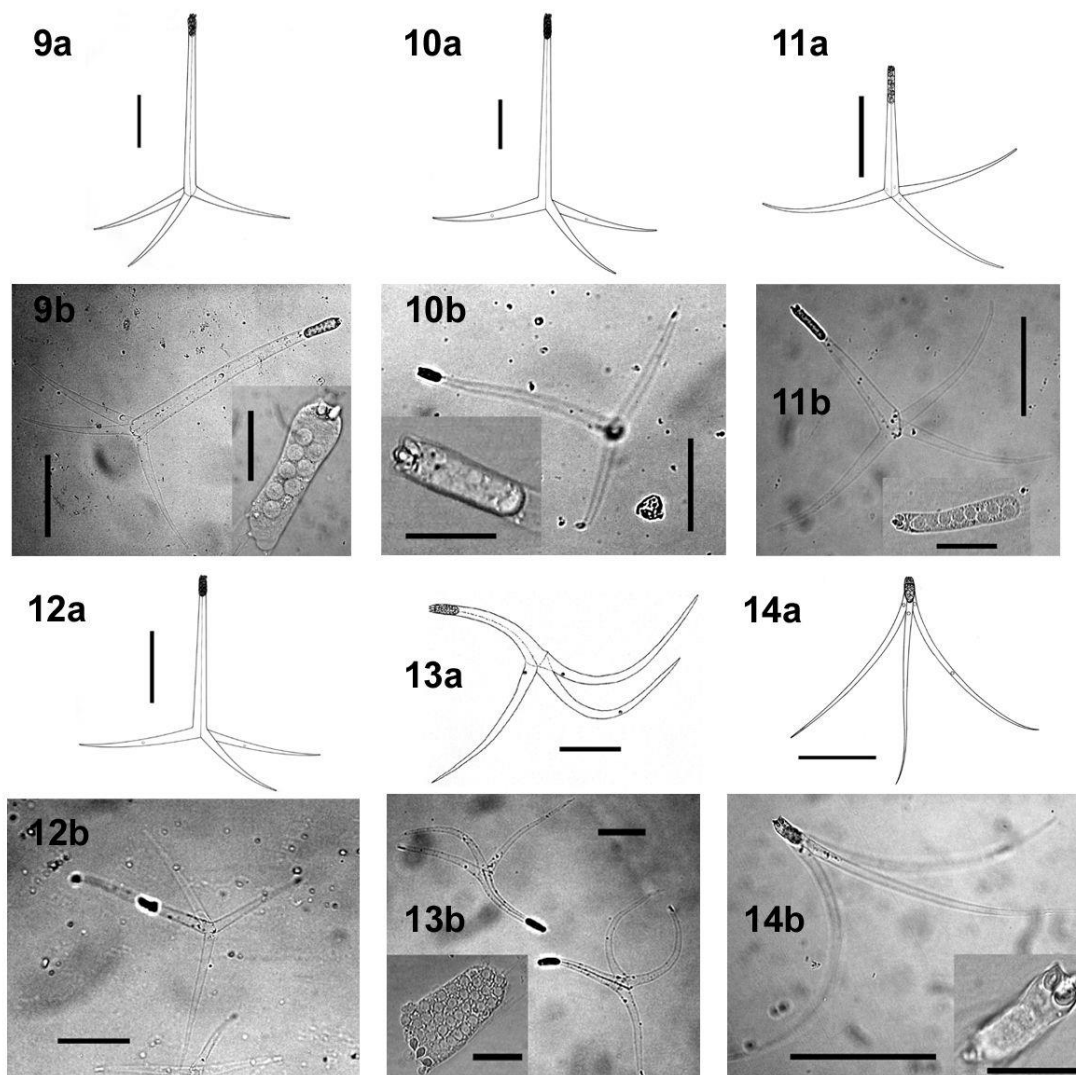
3.1.1. *Myxobolus* fajok és közeli rokonaik

Actinospóra típusok felmérő vizsgálata (Eszterbauer et al. 2006)

A felmérő vizsgálat során 14 különböző actinospóra morfortípust azonosítottunk, melyek a 18S rDNS szekvencia alapján 10 genotípusba voltak sorolhatók. A morfológiailag eltérő, de azonos genotípusokat a típust jelölő nagybetűt követő számmal különböztettük meg (pl. B1-B2) (3.1. és 3.2. ábra). Az aurantiactinomyxon 'B1' és 'B2' típusok mintái a szembetűnő morfológiai különbségek (nyúlvány hossza és szélessége, spóratest alakja és átmérője) ellenére, DNS szekvencia szinten 99,9-100%-os azonosságot mutattak (3.1. ábra 3-4).



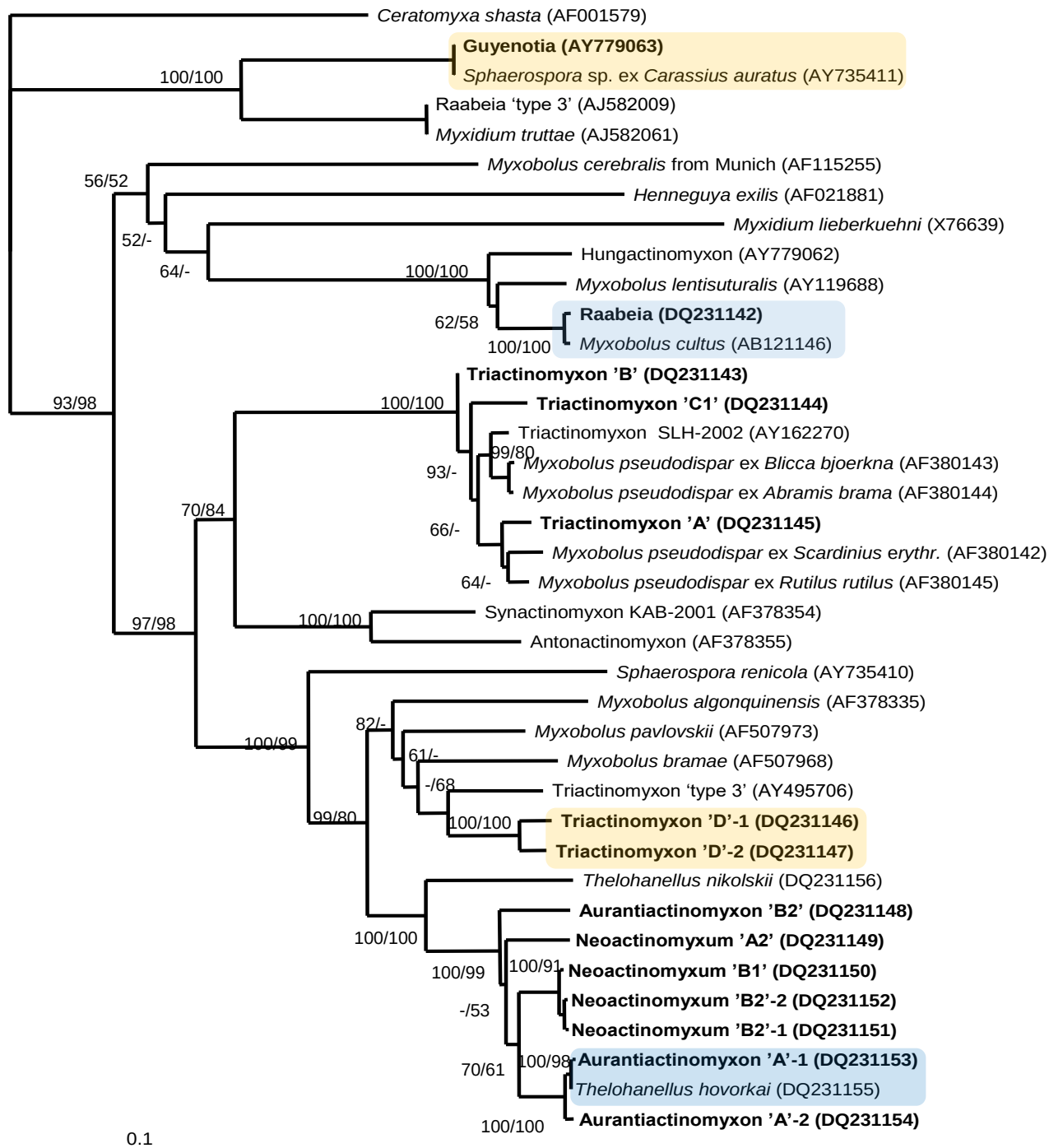
3.1. ábra: A felmérő vizsgálat során *Branchiura sowerbyi* féregből kimutatott actinospóra típusok. **1 a,b:** Halgazdaságból és a Tisza folyóból származó **guyenotia** típus; **2 a,b:** **aurantiactinomyxon 'A'** tógazdaságból. Melléklet: kiszabadult sporoplazma a másodlagos (csíra)sejtekkel; **3 a,b:** **aurantiactinomyxon 'B1'** halgazdaságból; **4 a,b:** **aurantiactinomyxon 'B2'** Tiszából. Melléklet: a spóra oldalnézetben; **5 a,b:** **neoactinomyxon 'A1'** halgazdaságból. Melléklet: spóra oldalnézetben; **6 a,b:** **neoactinomyxon 'A2'** halgazdaságból. Melléklet: spóra jól látható másodlagos sejtekkel; **7 a,b:** **neoactinomyxon 'B1'** halgazdaságból; **8 a,b:** **neoactinomyxon 'B2'** halgazdaságból. Lépték: 20 μm.



3.2. ábra: A felmérő vizsgálat során *Tubifex* fajokból kimutatott triactinomyxon típusok és *B. sowerbyi*-ből származó raabeia típus. **9 a,b:** triactinomyxon 'A' Tiszában gyűjtött *Tubifex newaensis*-ből. Melléklet: spóratest 8 másodlagos (csíra)sejttel; **10 a,b:** triactinomyxon 'B' halgazdasági *T. tubifex*-ből. Melléklet: spóratest poláris kapszulával és 8 másodlagos sejttel; **11 a,b:** triactinomyxon 'C1' halgazdasági *T. tubifex*-ből. Melléklet: spóratest 8 másodlagos sejttel; **12 a,b:** triactinomyxon 'C2' halgazdasági *T. tubifex*-ből; **13 a,b:** triactinomyxon 'D' halgazdasági *T. tubifex*-ből. Melléklet: spóratest poláris kapszulával és 32 másodlagos sejttel; **14 a,b:** raabeia halgazdaságból. Melléklet: spóratest körte alakú poláris kapszulákkal. Lépték: 100 µm.

A halgazdasági mintavétel eredményeként a nyálkaspórák fertőzöttség mértéke *Branchiura sowerbyi* fajban átlagosan 35% (38/109; fertőzött/összes vizsgált egyed), *Tubifex* és *Limnodrilus* fajoknál pedig 0,26% (6/2302) volt. A természetes vízi élőhelyen a vizsgált *B. sowerbyi* egyedek 0,9%-a, a tubificidák 1,7%-a (2/117) bizonyult fertőzöttnek. Az azonosított típusok részletes morfometriai és DNS szintű jellemzése mellett (Eszterbauer et al. 2006), az egyes típusok előfordulásának szezonálisáról is kaptunk adatokat. A májustól szeptemberig tartó vizsgálat során a legtöbb actinospóra típus a nyári hónapokban fordult elő nagyobb gyakorisággal, bár a fertőzöttség prevalenciája általában 10% alatt maradt. A halgazdaságban

a guyenotia és a neoactinomyxum 'A2' típusok fordultak elő leggyakrabban, a nyári hónapokban 7,3–18,2%-os és 7,4–27,3%-os prevalenciával. A legritkábbak a triactinomyxon és raabeia típusok voltak, átlagosan 1% alatti prevalenciával (0,03–5%).



3.3. ábra: A kimutatott actinospóra típusok (vastagon szedett) és a rokon fajok 894 bp hosszú 18S rDNS szekvenciája alapján távolsági mátrix (DM) és maximum likelihood (ML) módszerrel végzett filogenetikai elemzés eredménye. Egyes actinospóra-myxospóra párok faj szinten (kék háttér), vagy csoport szinten (sárga háttér) azonosíthatóak voltak. Az elágazásoknál feltüntetett bootstrap értékek 1000 (DM) és 100 (ML) ismétlés alapján számított százalékos értékek. Kulcsoportként a tengeri *Ceratomyxa* (új nevén *Ceratonova*) *shasta* fajt választottuk. A lépték 10% különbségnek felel meg.

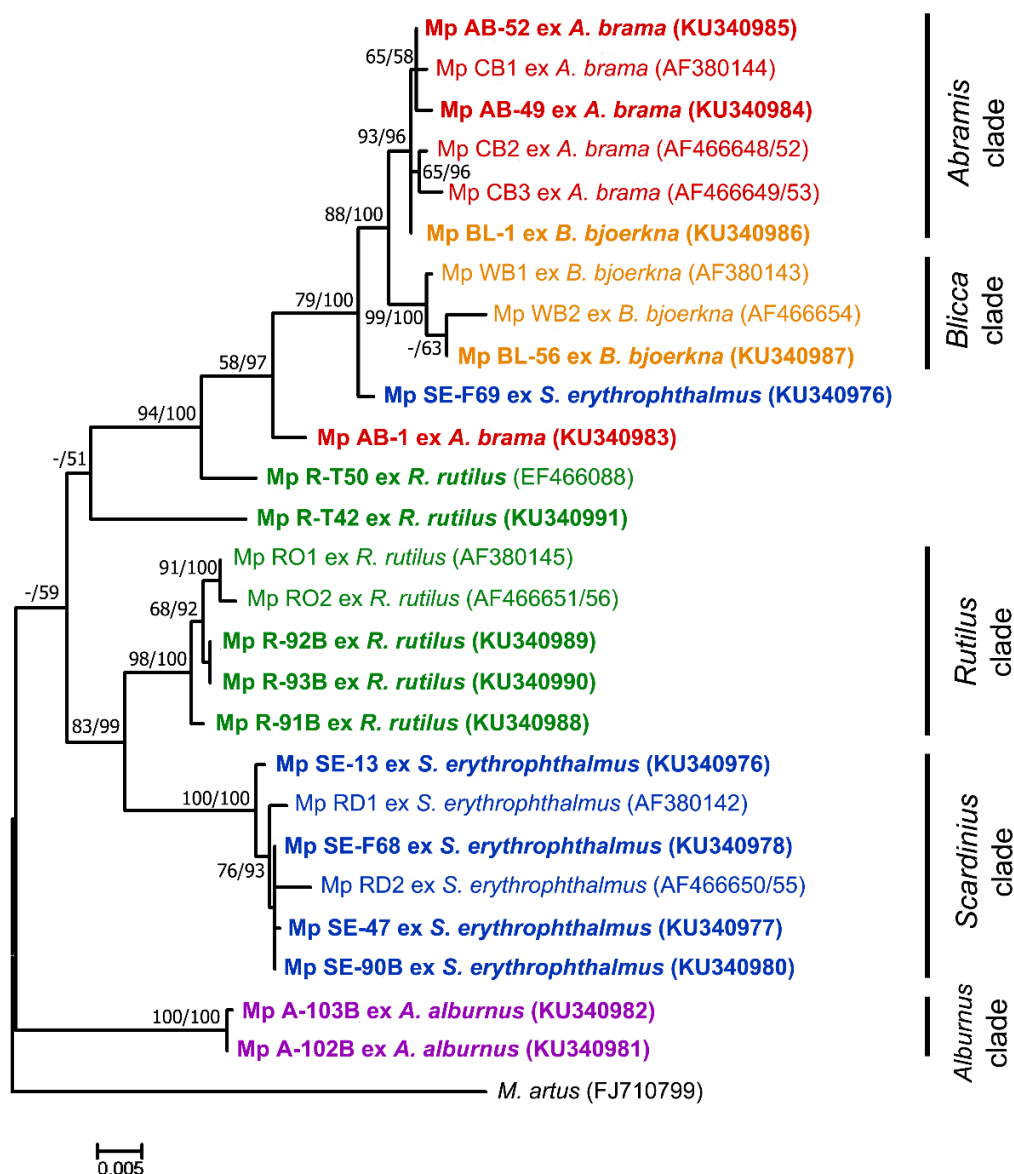
A vizsgált actinospóra izolátumok közül 43 minta részleges (kb. 850 bp hosszú) 18S rDNS szekvenciáját sikerült meghatározni (3.3. ábra). Ezek 10 különböző genotípusba voltak sorolhatók, amik közül 6 új actinospóra típusnak bizonyult. A nyilvános szekvencia adatbázisokban (pl. NCBI génbank) elérhető DNS szekvenciákkal való homológia keresés és a filogenetikai elemzés eredményeként a 18S rDNS azonosság alapján két actinospóra típust sikerült faj szinten azonosítanunk a halban fejlődő myxospóra alakjával. A talált raabeia típus az aranyhal kopolyáján fejlődő *Myxobolus cultus*-sal volt genetikailag azonos, az aurantiactinomyxon 'A' pedig a gyakori ponty parazita *Thelohanellus hovorkai* fajjal egyezett meg DNS szinten. További két esetben találtunk DNS szekvencia azonosságot, azonban ezekben az esetekben a halból származó minta faj szinten nem volt azonosítva. A guyenotia típus aranyhal epehólyagban spórát képző *Zschokkella* fajjal volt azonos, míg a triactinomyxon 'D' típus egy, a bodorka úszóján fejlődő, későbbiekben *Myxobolus wootteni* néven leírt (Molnár et al. 2010) faj fejlődési alakjának bizonyult. A triactinomyxon 'A', 'B' és 'C' típusok a *M. pseudodispar*-ral mutattak nagyfokú morfológiai és genetikai hasonlóságot, amit a filogenetikai fán való elhelyezkedésük is megerősített. Ezzel szemben a kimutatott neoactinomyxum típusok, bár egy közös kládban csoportosultak, egyik ismert DNS szekvenciájú nyálkaspórák fajjal sem mutattak közeli rokonságot (3.3. ábra).

***M. pseudodispar* gazdaspektruma és a gazdaváltás igazolása** (Forró & Eszterbauer 2016)

Öt halfajból, 17 genetikailag különböző *M. pseudodispar* izolátumot azonosítottunk (2.1. Táblázat). A ML és a BI módszerrel készült filogenetikai elemzés azonos fa topológiát eredményezett (3.4. ábra).

A kutatás során vizsgált új izolátumok a korábbi, szintén hazai pontyfélékből származó izolátumok szekvenciáival együtt (Molnár et al. 2002), halfajok szerint csoportosultak. Öt főklád volt elkülöníthető a fán, az *Abramis*, a *Blicca*, a *Rutilus*, a *Scardinius* és az *Alburnus* kládok (3.4. ábra). A szélhajtó küszből izolált minták (Mp A-102B és 103B) bazális elhelyezkedésűek voltak mindkét elemzés során. Öt parazita izolátum a halfajától eltérően helyezkedett el a fán. A karikakeszegből származó Mp BL1 a dévérkeszeg izolátumokkal került egy csoportba, míg 4 további izolátum (Mp R-T42, Mp R-T50 bodorkából, Mp AB1 dévérkeszegből, és Mp SE-F69 vörösszárnýú keszegből) külön csoportot alkotva, az 5 főcsoporton kívül helyezkedett el. Az Mp R-T42 izolátum filogenetikai helyzete az alacsony bootstrap támogatottság miatt bizonytalan maradt. Az Mp R-T50 izolátumú parazita, melynek életciklusát zárt *in vivo* rendszerben 2007 óta tartjuk fent, szintén külön ágon, a *Blicca*–*Abramis* főcsoport mellett bazálisan helyezkedett el.

A főbb csoportokon belül a genetikai azonosság 99,3-99,9% közötti volt, míg a csoportok közötti azonosság 95 és 98,8% közötti skálán mozgott.



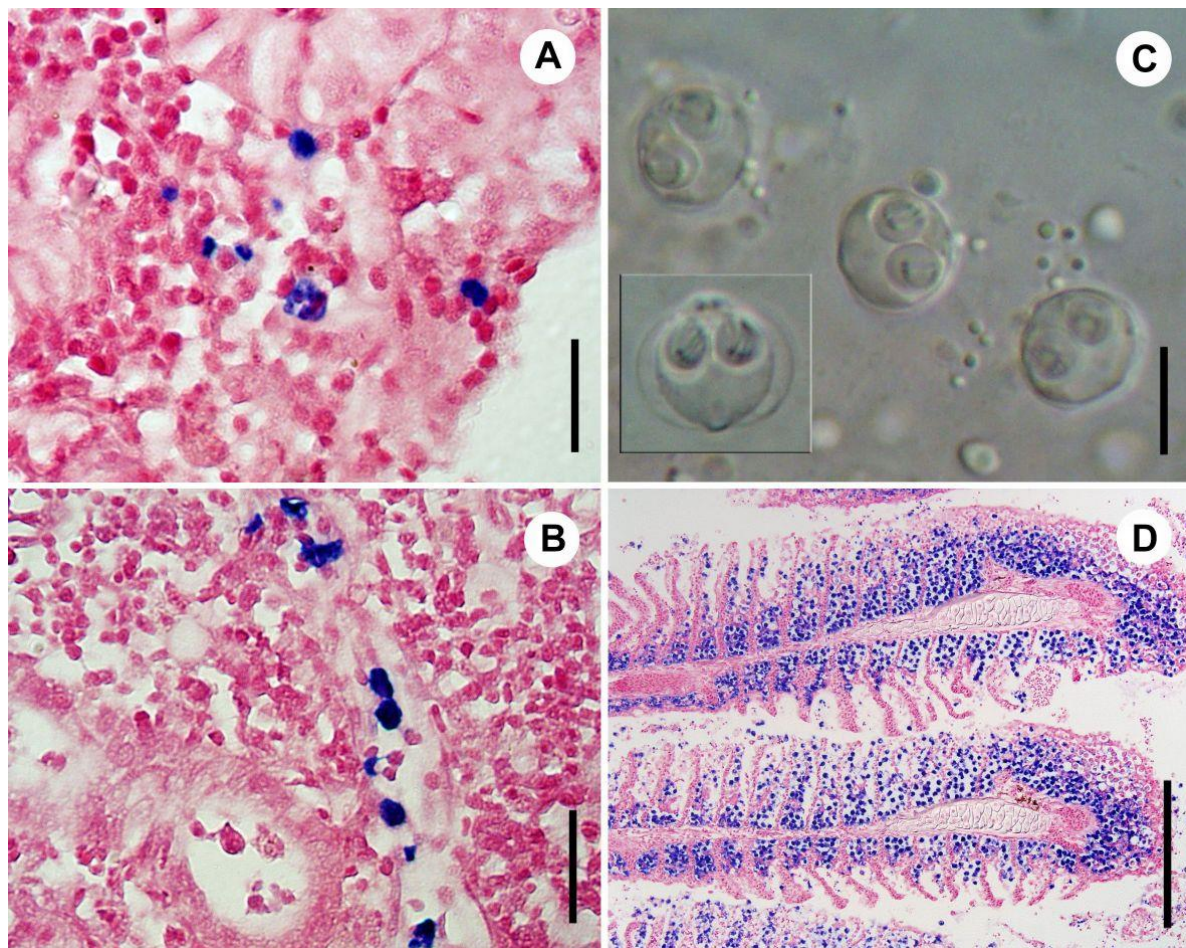
3.4. ábra: Maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) módszerrel készített filogenetikai fa a vizsgált *M. pseudodispar* izolátumok 18S rDNS szekvenciáinak 1852 bp hosszú illesztése alapján. Az elágazásokban a ML bootstrap és a BI posterior valószínűség értékek szerepelnek százalékban megadva. A lépték az adott pozícióra számított változások számát jelzi. A külcsoport a *Myxobolus artus* faj. A vizsgált izolátumok halgazda faj szerint lettek színezve: piros – *Abramis brama*, dévérkeszeg; sárga: *Blicca bjoerkna*, karikakeszeg; zöld: *Rutilus rutilus*, bodorka; kék: *Scardinius erythrophthalmus*, vörösszárnyú keszeg; lila: *Alburnus*, szélhajtó kűsz. Az új izolátumok vastagon szedettek. A génbanki azonosító számok zárójelben szerepelnek a fajnév után.

3.1.2. *Sphaerospora* fajok

Sphaerospora molnari fertőzöttség jellemzése (Eszterbauer et al. 2013)

A hazai gazdaságból származó, 50 db vizsgált ponty ivadékból 6 egyeden volt kimutatható a kopoltyú filamentum epitheliumában fejlődő kerek myxospóra (12% prevalencia). A spórák alakja, méretei és lokalizációja alapján a parazita kétséget kizáróan azonosítható volt a

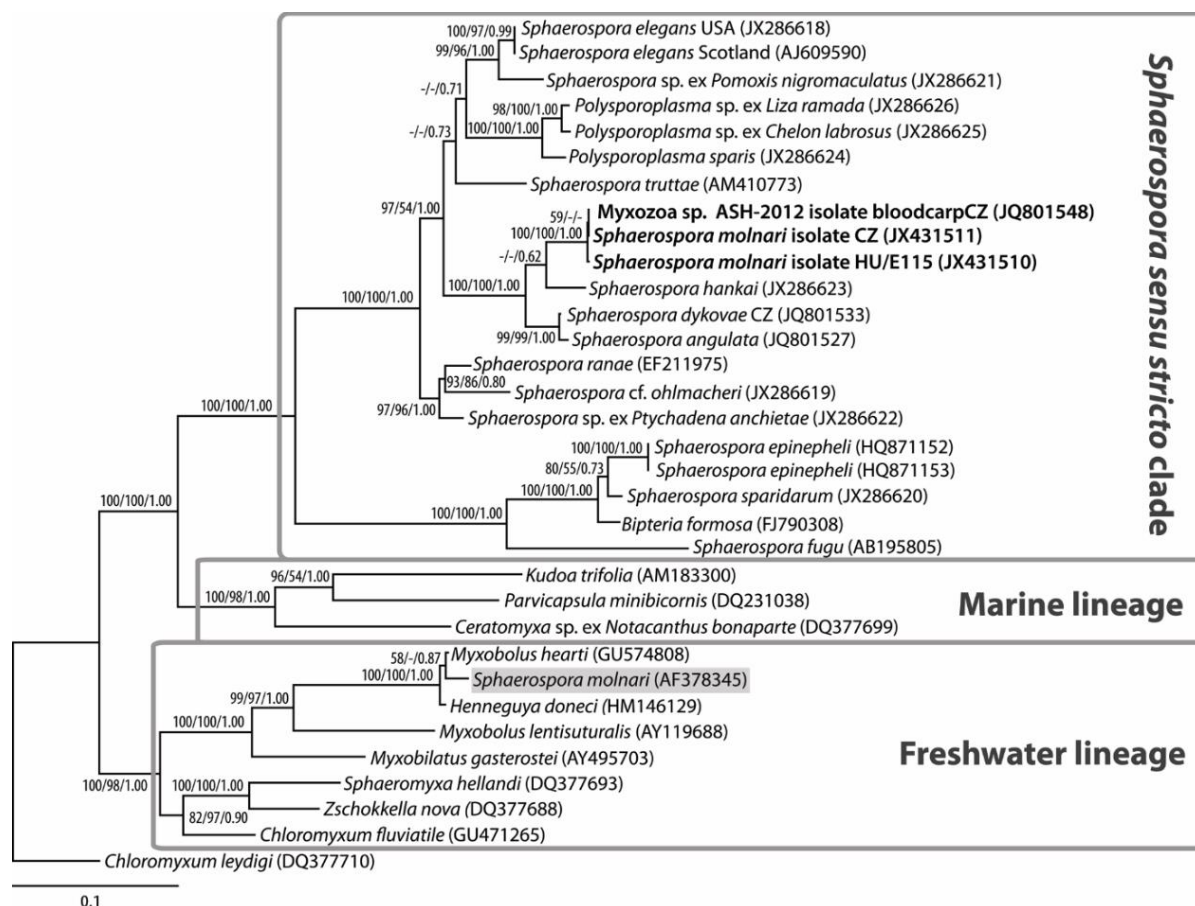
S. molnari fajjal. Két hal esetében a fertőzöttség igen intenzív volt, amit az ISH vizsgálatok is megerősítettek. Érdekes módon, ISH segítségével nagyszámú presporogóniás stádiumot detektáltunk a veseparenchimában és a vesekapillárisokban (3.5. A és B ábra).



3.5. ábra: *Sphaerospora molnari* fertőzöttség ponty ivadéokban. **A:** *S. molnari* fejlődési alak (kék festődés) veseparenchimában (*in situ* hibridizáció, ISH). Lépték: 10 μ m; **B:** *S. molnari* véralak vesekapillárisban (ISH). Lépték: 10 μ m; **C:** *S. molnari* érett myxospórák (natív elnyomat). Melléklet: myxospóra nyálkaburokkal. Lépték: 10 μ m; **D:** Intenzív *S. molnari* fertőzöttség ponty ivadék kopoltyú filamentumain (ISH). Lépték: 200 μ m.

A fertőzöttség hatására a kopoltyú filamentumok apikális végén az epithelium hyperplasiája is megfigyelhető volt, a nagy spóratömeg jelenléte mellett (3.5. C és D ábra). Két magyarországi és két csehországi *S. molnari* izolátum 18S rDNS-ének felsokszorozásával és szekvenálásával majdnem a teljes gén szekvenciáját sikerült meghatároznunk. Meglepetésre, 3693 és 3714 bp hosszú konszenzus 18S rDNS szekvenciákat kaptunk, több extrém hosszú inzerttel a variábilis V2, V4, V5 és V7 régiókban. A hazai és a csehországi izolátumok között 7 nt különbség mutatkozott. Érdekes módon a korábban Kent et al. (2001) által vizsgált *S. molnari* szekvencia (AF378345) jelentősen különbözött a vizsgált izolátumokétól. Hiányoztak a variábilis régiókban lévő hosszú inzertek, és nukleotid szinten csupán 48,5-48,6% azonosságot mutatott az általunk vizsgált izolátumokkal.

A filogenetikai elemzés kimutatta, hogy a szöveti élősködő, kopoltyún fejlődő *S. molnari* a *Sphaerospora* s. str. kládon belül helyezkedik el, és erős bootstrap támogatás mellett a cölizoikus veseparazita *S. hankai*, *S. dykova* és *S. angulata* fajokkal képez egy alcsoportot (3.6. ábra).

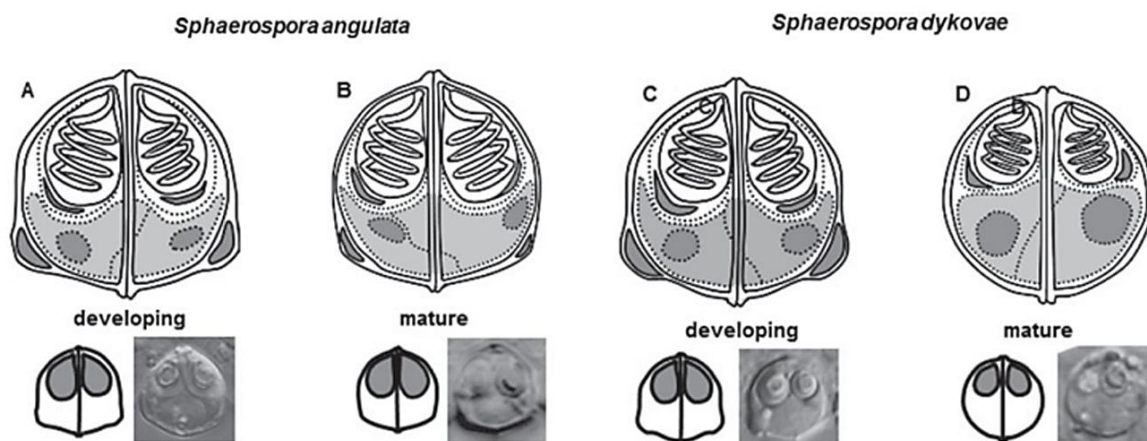


3.6. ábra: ML (GTR+gamma modell), BI és maximum parszimónia módszerekkel készült törzsfa rekonstrukció. A vizsgált *S. molnari* izolátumok (vastagon szedett) a *Sphaerospora sensu stricto* (s. str.) kládon belül helyezkednek el. *Chloromyxum leydigi*-t választottuk külcsoporthnak. Az elágazásokban lévő számok százalékos bootstrap/posterior valószínűség értékek. Kent et al. (2001) által azonosított *S. molnari* izolátumot szürkén emeltük ki.

Vese parazita *Sphaerospora* fajok jellemzése (Holzer et al. 2013)

A vizsgált halak közül 16 pontyban, 15 aranyhalban és 2 ezüstkárászban mutattunk ki *Sphaerospora* myxospórákat és plazmódiumokat a vesecsatornában. A fertőzés intenzitása a származási helytől függően, pontyban 8,3-42,8%, aranyhalban 10,7-58,3%, és ezüstkárászban 5,9-12,5% között változott. Az aranyhalban és ezüstkárászban kimutatott (későbbiekben *Sphaerospora angulata*-ként azonosított) myxospórák háromszög alakúak voltak a spórahéj hátulsó (posterior) végén, kétoldalt elhelyezkedő héjsejtek sejtmagjának köszönhetően, amik egy sarkos kidudorodásként jelentek meg a myxospóra felszínén (3.7. ábra, A és B). Míg a héjsejtek sejtmagja jól látható volt az ezüstkárász és az aranyhal

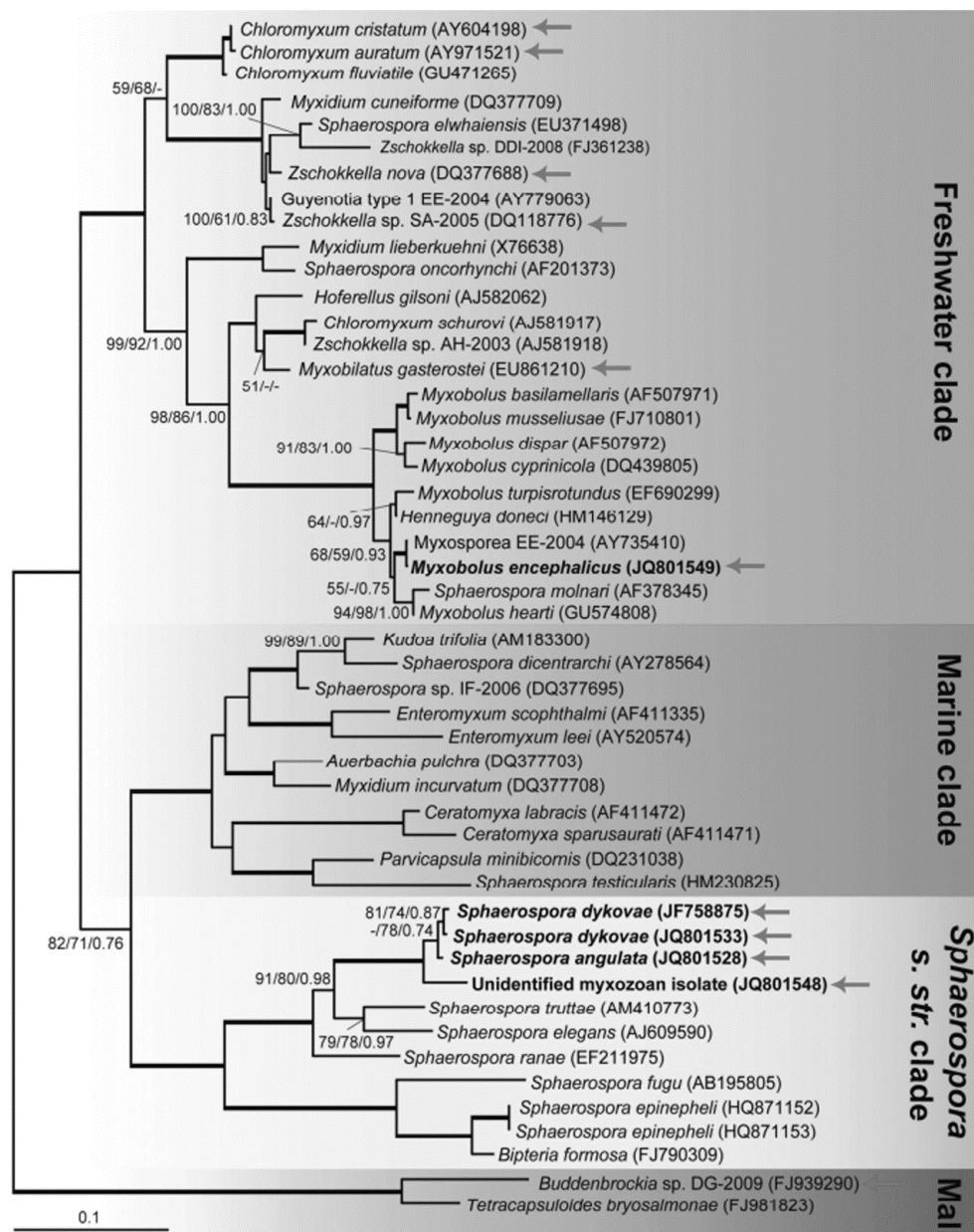
vesecsatornájából izolált érett és éretlen spórákon, a pontyban talált (*Sphaerospora dykoveae*) myxospórák esetében csak az éretlen spórákon voltak megfigyelhetők (3.7. ábra, C és D). A morfometriai adatok közül a spóra hossz, szélesség és vastagság, valamint a spóra hossz és vastagság arányának statisztikai elemzése nem mutatott szignifikáns különbséget a két *Sphaerospora* faj között. Szignifikáns különbség egyedül a poláris kapszula hosszában ($p=0,0004$), szélességében ($p=0,0003$) és a két adat arányában ($p=0,0001$) volt kimutatható.



3.7. ábra: A morfológiailag nagyon hasonló *S. angulata* (A és B) és *S. dykoveae* (C és D) myxospórák sematikus rajza. A spóra posterior végén lévő „kidudorodás” (hájsejt sejtmag) a fejlődő spórákban nagyméretű (A és C), majd amikor a spórák éretté válnak, a *S. angulata*-nál a kidudorodás mérete csökken (B), a *S. dykoveae* esetében pedig eltűnik (D).

A nagyon hasonló, gyakorlatilag nem elkülöníthető spóramorfológia ellenére, a 18S rDNS szekvenciák alapján jól elkülönült a két *Sphaerospora* faj. A *S. angulata* 18S rDNS 3469 bp hosszúnak bizonyult, a V4 és V7 variábilis régiókban extrém hosszú beékelődő DNS szakasszal, míg a *S. dykoveae* esetében 3163 bp hosszú riboszomális gént azonosítottunk. A hosszú inzerteknek köszönhetően a két faj 18S rDNS-e között csupán 78,3-82,4% azonosság mutatkozott. A két faj egymás közeli rokonaiként a *Sphaerospora* s. str. kládon belül jelent meg a filogenetikai fán (3.8. ábra).

Pontyban csak a *S. dykoveae*, aranyhalban/ezüstkárászban csak a *S. angulata* spórák és sporogóniás fejlődési alakok voltak kimutathatók. A parazita véralakok molekuláris vizsgálata során a *S. angulata* (24,6% prevalencia aranyhalban/ezüstkárászban, és 2,1% pontyban) és *S. dykoveae* (19,3%) fajok mellett, változó prevalenciával a következő nyálkaspórák fajokat is azonosítottunk: *Buddenbrockia* sp. (26,5-27,7%), *Zschokkella nova* (6,4%), *Hoferellus carassii* (4,3%), *Chloromyxum cristatum* (8,8%), *C. auratum* (4,3%), *Myxobolus encephalicus* (17,6%), *Myxobilatus gasterostei* (10,6-11,8%) (3.8. ábra). Ezen fajok spóra formái (myxospórák) a vizsgált halak boncolása során nem voltak detektálhatók egy esetben sem.

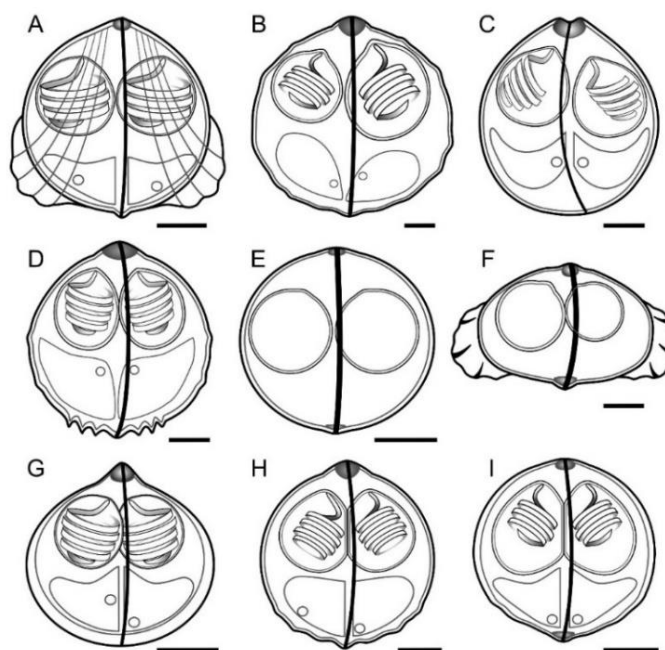


3.8. ábra: ML, MP és BI módszerekkel készült filogenetikai fa 49 nyálkaspórárs, 1466 bp hosszú, illesztett 18S rDNS szekvencia alapján. Az új szekvenciák vastagon szedettek, a vérből kimutatott fejlődési alakok nyíllal jelöltek. Az elágazásokban lévő számok százalékos bootstrap/posterior valószínűség értékek. Kulcsoport: Malacosporea (Mal.). Lépték: 0,1 szubsztitúció pozíciónként.

***Sphaerospora* s. str. biodiverzitása** (Patra et al. 2018)

Natív vese elnyomatok fénymikroszkópos vizsgálatával 101 halban mutattunk ki nyálkaspórárs presporogóniás fejlődési alakot (101/549, 18% prevalencia). Érett *Sphaerospora* myxospórák ezek közül 16 halban fordultak elő (16/549, 3%). A *Sphaerospora* s. str. csoportra specifikus PCR rendszerrel összesen 26 esetben volt igazolható *Sphaerospora* faj jelenléte (26/549, 5% prevalencia). A többi presporogóniás alak *Hoferellus* spp. vese paraziták fejlődési alakjának bizonyultak (96/549, 18%) DNS szekvencia szintű vizsgálat alapján. Dévérkeszegben, bodorkában, vörösszárnú keszegben és domolykóban esetenként több *Sphaerospora* faj egyidejű jelenléte is kimutatható volt.

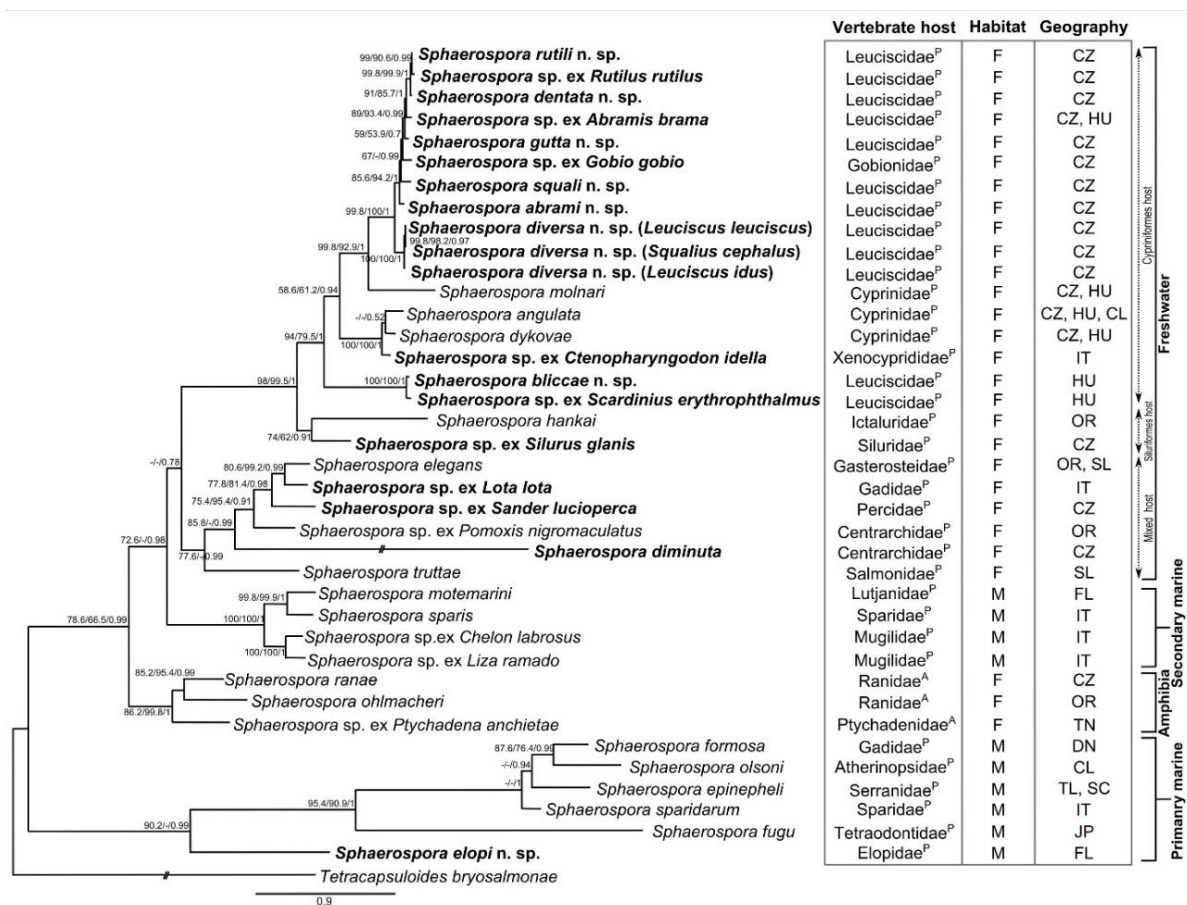
A 18S rDNS szekvencia alapján 17 új *Sphaerospora* fajt találtunk. Ebből 9 esetben állt rendelkezésre szükséges mennyiségű morfológiai adat a faj leírásához. Új falként írtuk le a *S. abrami*-t dévérkeszeggől (*Abramis brama*), a *S. bliccae*-t karikakeszeggől (*Blicca bjoerkna*); a *S. dentata*-t vörösszárnyú keszeggől (*Scardinius erythrophthalmus*), a *S. diversa*-t nyúldomolykóból (*Leuciscus leuciscus*), a *S. elopi*-t *Elops saurus*-ból; a *S. gutta*-t vörösszárnyú keszeggől, a *S. rutili*-t bodorkából (*Rutilus rutilus*), és a *S. squali*-t domolykóból (*Squalius cephalus*). A *S. diminuta* Li & Desser 1985 esetében a faj újbóli leírása történt meg (3.9. ábra) (Patra et al. 2018).



3.9. ábra: Különböző halfajok vesecsatornáiban talált, új falként leírt *Sphaerospora* spp. myxospórájának sematikus rajza. **A:** *S. diminuta* naphalból (*Lepomis gibbosus*); **B:** *S. abrami* dévérkeszeggől (*Abramis brama*); **C:** *S. bliccae* karikakeszeggől (*Blicca bjoerkna*); **D:** *S. dentata* vörösszárnyú keszeggől (*Scardinius erythrophthalmus*); **E:** *S. diversa* nyúldomolykóból (*Leuciscus leuciscus*); **F:** *S. elopi* *Elops saurus*-ból; **G:** *S. gutta* vörösszárnyú keszeggől (*Scardinius erythrophthalmus*); **H:** *S. rutili* bodorkából (*Rutilus rutilus*); **I:** *S. squali* domolykóból (*Squalius cephalus*). Lépték: 2 µm.

A mennyhalban (*Lota lota*), süllőben (*Sander lucioperca*), lesőharcsában (*Silurus glanis*), bodorkában, dévérkeszegben, vörösszárnyú keszegben további nyolc új 18S rDNS szekvenciát azonosítottunk, azonban érett spórák hiánya vagy kevert fertőzés miatt a fajleírás nem volt lehetséges. Egy faj esetében teljes (*S. diversa*), 9 fajnál majdnem teljes (V1-től a V8-s variábilis régióig), és 7 fajnál részleges 18S rDNS szekvenciát azonosítottunk. A teljes/majdnem teljes szekvenciák közül 9 hossza meghaladta a 3000 bp-t. A fajok belüli genetikai variabilitás 1% alatt maradt. A fajok közötti 18S rDNS variabilitás széles skálán mozgott. Míg az *S. rutili* és *S. dentata* között 1,87% volt a különbség, a *S. fugu* és a *S. abrami* között 59% eltérés mutatkozott a 18S rDNS-ben. A filogenetikai fán az újként szekvenált

taxonok a *Sphaerospora* s. str. kládon belül helyezkedtek el két fő klasztert alkotva: egy ősi „elsődleges tengeri” csoportot, és egy főleg édesvízi fajokat tömörítő csoportot, melyben bazálisan kételtűekben élősködő *Sphaerospora* fajok is helyet kaptak (3.10. ábra).



3.10. ábra: ML (GTR+gamma modell), MP és BI módszerrel készült törzsfa rekonstrukció *Sphaerospora* s. str. 18S rDNS szekvenciája alapján. Kulcsoport: *Tetracapsuloides bryosalmonae*. Az elágazásoknál feltüntetett számok a bootstrap/posterior valószínűség százalékos értékét mutatják. A vastagon kiemelt fajok a kutatás során vizsgált fajokat jelölik. A halgazda család, és a minta földrajzi származása táblázatban jelölt. F: édesvízi (freshwater); M: tengeri (marine).

Az édesvízi és tengeri fajok elkülönülése szembetűnő volt. Az édesvízi klád további 3 alcsoportra vált, a földrajzi származástól függetlenül, főleg halgazda taxon alapján (pontyfélék, harcsafélék, egyebek). A szöveti élősködő, a *S. molnari* a pontyfélék alcsoporton belül egy önálló ágon helyezkedett el (3.10. ábra).

3.2. Gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai

3.2.1. Parazita gazdaspektrum vizsgálata

M. pseudodispar gazdafajlagossága kevésértéjű féreg gazdában (Marton & Eszterbauer 2012)

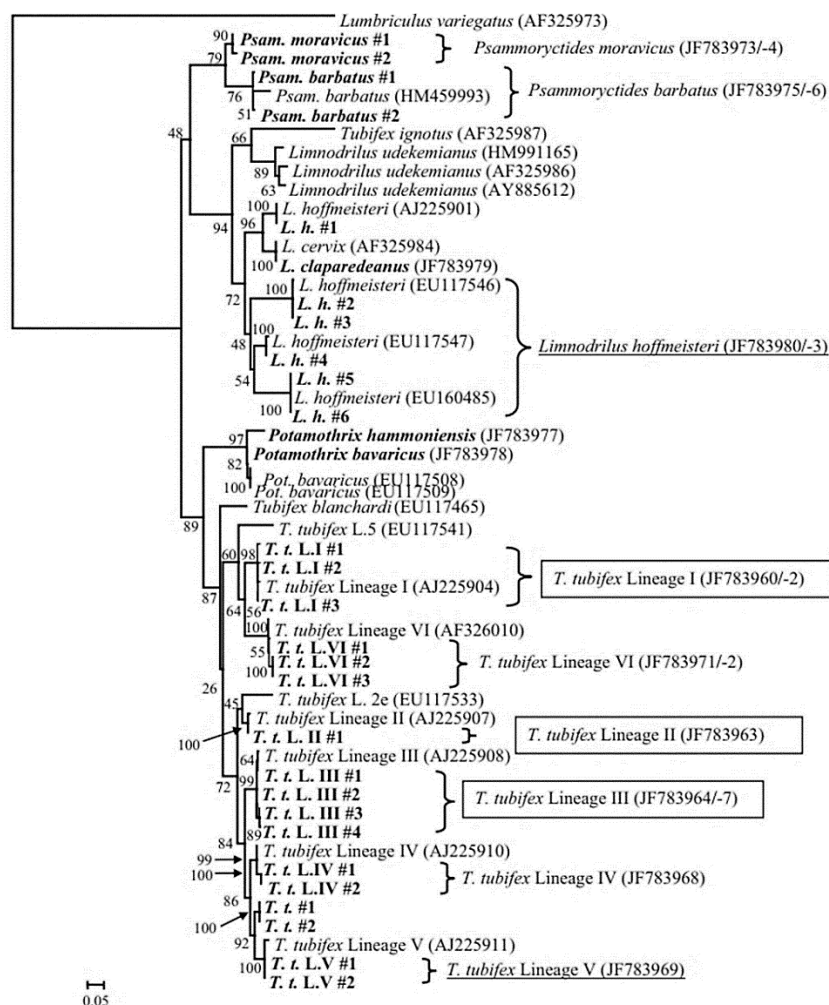
Kevéssertéjű férgek négy laboratóriumi tenyészetéből (T-I és T-II., AU, és WS) 156 egyed 16S rDNS-ét vizsgálatuk fajmeghatározás céljából. Ebből 19 egyedet határoztunk meg faj szinten morfológiai bélyegek alapján. Ezek alapján a tenyészetekben 7 faj, a *Tubifex* (n=101), a *Limnodrilus claparedeanus* (n=1), a *Limnodrilus hoffmeisteri* (n=35), a *Psammorhyctides barbatus* (n=12), a *Psammorhyctides moravicus* (n=2), a *Potamothenix bavaricus* (n=2) és a *Potamothenix hammoniensis* (n=1) jelenléte volt kimutatható. A DNS szintű homológia keresés eredményeként további két, nem ivarérett egyed faji azonosítása volt lehetséges (*P. moravicus* és *P. hammoniensis*).

A 31 vizsgált és 21 génbanki adatbázisból származó 16S rDNS szekvencián alapuló filogenetikai elemzés eredményeként két főklád elkülönülése látszott (3.11. ábra). A bazális csoportot a *Limnodrilus* és a *Psammorhyctides* fajok alkották, míg a másik főcsoport a bazálisan elhelyezkedő *Potamothenix* fajok mellett, a *T. tubifex* fajkomplex egyedeit tartalmazta. A fajkomplex korábban leírt 6 genetikai vonala (lineage) mellett (Beauchamp et al. 2001), egy újabb, VII. csoport volt kimutatható, az V. genetikai vonal testvér kládjaként. A *M. pseudodispar* fertőzésre fogékony *T. tubifex* I., II. és III. genetikai vonalak nem különültek el a nem fogékony vonalaktól. A genetikai vonalak közötti a 16S rDNS-beli variabilitás 6,6 és 15% között változott. A *T. tubifex* genetikai vonalakon belül ez a különbség 0 és 3,7% között volt. A *L. hoffmeisteri* egyedek között jelentős, akár 15,5%-os genetikai variabilitást mutattunk ki.

Az *M. pseudodispar* fajjal végzett fertőzési kísérlet során a vizsgált négy oligochaeta tenyészet faji összetétele eltérő volt. A T-I. tenyészetben a *T. tubifex* II. (52%) és V. (38%) vonal dominált, *P. moravicus* és *P. barbatus* 3-3, valamint *L. hoffmeisteri* 1 egyede volt azonosítható. A T-II. tenyészetben *L. hoffmeisteri* (47%) mellett *P. barbatus* (23%) és 1-1 egyed *T. tubifex* I., II., és III. vonal volt jelen. Az AU tenyészet *T. tubifex* I (29%) és III. (42%) vonalba tartozó és *L. hoffmeisteri* (21%) egyedekből állt, 1-2 *T. tubifex* IV, V. és VI. vonalba tartozó egyed mellett. A WS tenyészet csak *T. tubifex* egyedekből állt, azok közül is a III. vonal (57%) dominált.

A fertőzési kísérletek eredményeként a *M. pseudodispar* fertőzés prevalenciája tenyészetenként eltérő volt. A T-I tenyészetben a *T. tubifex* II. és V. vonal, a *P. moravicus* és a *P. barbatus* egyedei 100%-ban fertőzöttek voltak (vagyis PCR pozitívak). A II. vonal, a *P. moravicus* és a *P. barbatus* vizsgált egyedei közül mind ürített parazita TAM-ot, az V. vonal egyedei közül 12,5%-ban fejlődött ki érett TAM, az 1 db fertőzött *L. hoffmeisteri* egyed pedig nem ürített TAM-ot. A T-II-es tenyészetben TAM ürítést nem figyeltünk meg, de a *T. tubifex* II. és V. vonal összes vizsgált egyede fertőzött volt, a *L. hoffmeisteri* egyedeknek pedig 83,3%-a. Az AU tenyészetben a *T. tubifex* I. vonal 50%-ban, a III-as 65,4%-ban, míg a *L. hoffmeisteri* 30,8%-ban bizonyult fertőzöttnek. A WS tenyészetben a kis egyedszám miatt kevés adat állt

rendelkezésre. Ebben a *T. tubifex* III-as vonal egyedeinek fele, és IV-es vonal 1 db egyede volt fertőzött és ürített TAM-ot.

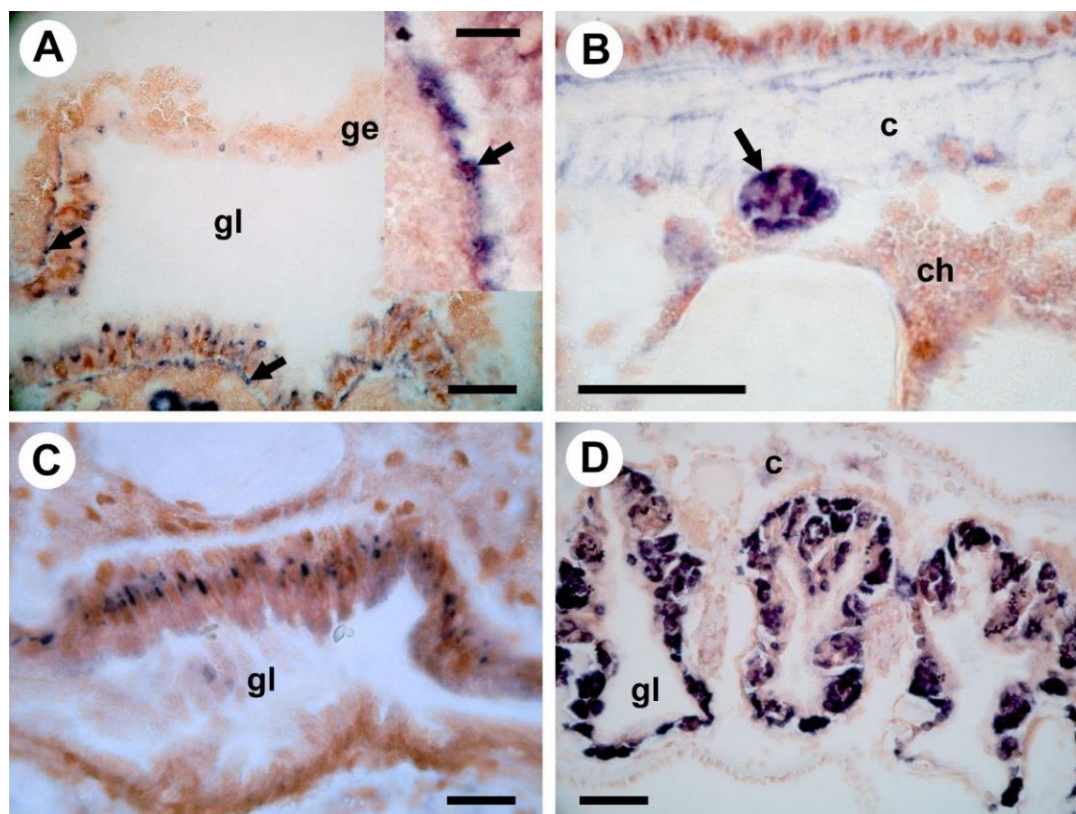


3.11. ábra: A vizsgált kevéssertéjű féreg egyedek 16S rDNS szekvenciája alapján készült filogenetikai fa (ML, GTR+I+G modell, 100 bootstrap). Külcsoport: *Lumbriculus variegatus*. A *M. pseudodispar* fertőzésre fogékony fajok bekeretezve vannak feltüntetve. A vastagon szedett fajok a kutatás során vizsgált fajokat jelölik. Génbanki azonosító zárójelben van feltüntetve.

Az egyes féreg fajok/vonalak parazitára való fogékonyága nagy különbségeket mutatott. A legfogékonyabbnak a *T. tubifex* II. vonal bizonyult; a vizsgált egyedek 90,5%-a ürített TAM-ot. Ezzel szemben a III-as vonal 22,2%-ában, az V-ös vonal 18,8%-ában fejlődött ki érett TAM. A *P. moravicus* és *P. barbatus* fajok szintén ürítettek érett TAM-ot. A VI. vonal vizsgált 5 egyede közül egyik sem volt fertőzött.

A *T. tubifex* I, III, V. vonal és *L. hoffmeisteri* egyedit vizsgálatuk ISH-val. A parazita féreggazdán belüli fejlődési útvonalát nyomon követve azt tapasztaltuk, hogy a fejlődés teljes 3 hónapja a bélhámhoz kötődik (3.12. ábra). Néhány órával a fertőzést követően az első hét végéig a paraziták a bél hámsejtjeiben és azok bazális membránjában (lamina basalis) nagy mennyiségben voltak megtalálhatók. Egy hónappal a fertőzést követően a parazita fejlődési

alakok hosszanti irányban szétterjedtek, de továbbra is a bélhamban lokalizálódtak. Három hónappal a fertőzés után a bélhamban, sokszor nagy számban voltak láthatóak a pánsporociszta nevű sporogóniás fejlődési stádiumok, bennük 8 db fejlődő TAM-mal. Néhány esetben a fejlődés elején a paraziták a gazda cölómájában is fellelhetőek voltak, nem ritkán a cölóma sejtes immunelemei, az amöbociták által körülvéve (3.12. ábra B).



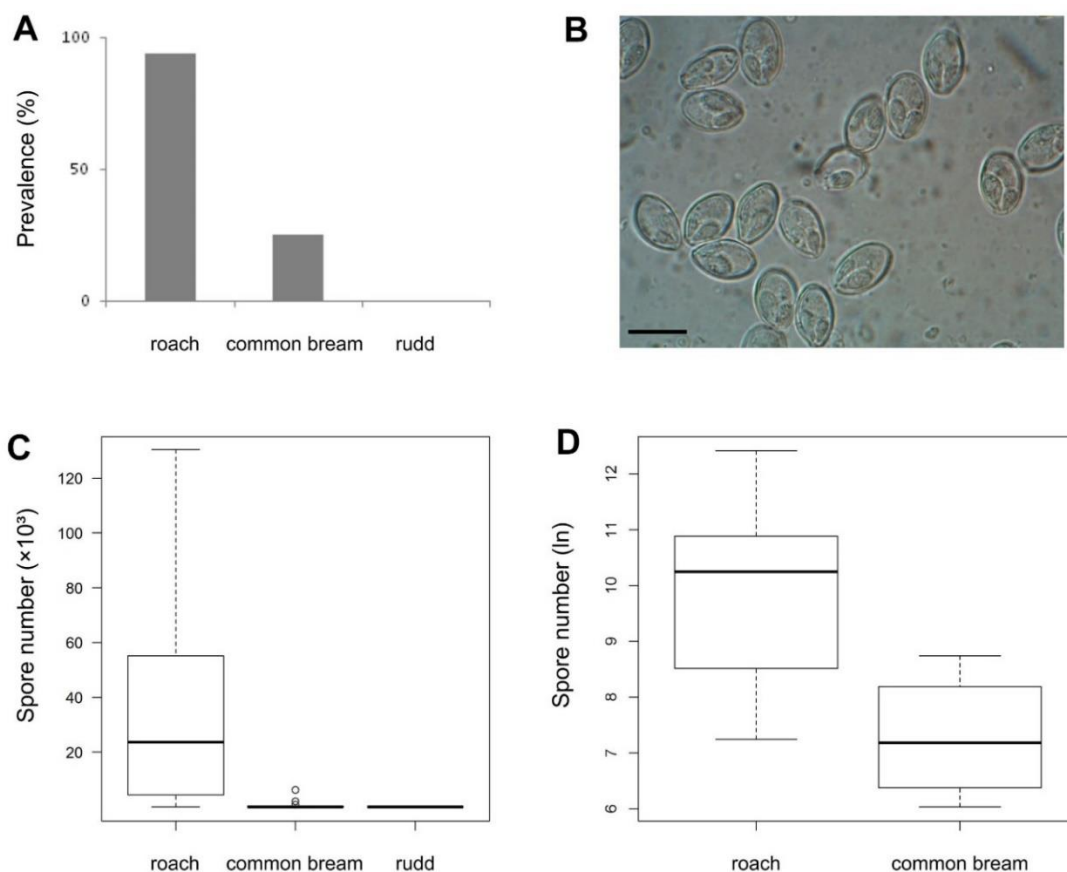
3.12. ábra: A *Myxobolus pseudodispar* kevésstertéjű féreg gazdán belüli fejlődésének nyomon követése fajspecifikus, biotin-jelölt oligonukleotid próbákkal végzett *in situ* hibridizációval (ISH). A parazita DNS sötétkék festődést mutat. A háttérfestés sárgás-barna. **A:** Oligochaeta hosszanti metszete 1 nappal a fertőzést követően. A hámsejtek és a bélhám bazális membránja (nyílak) mutat pozitív festődést. Bélhám (ge), bélcsatorna (gl). Lépték: 50 µm; **B:** A cölómában elhelyezkedő amöbocita sejt benne parazita fejlődési alakokkal (nyíl). Cölóma (c), kloragogén sejtek (ch). Lépték: 20 µm; **C:** Parazita fejlődési alakok hosszanti irányban szétterjedve a féreg bélhámjában 1 hónappal a fertőzést követően. Lépték: 20 µm; **D:** A bél intenzíven fertőzött szakasza 3 hónappal a fertőzést követően. Több pánsporociszta stádium (bennük 8 db fejlődő TAM-mal) is látható. Lépték: 50 µm.

***M. pseudodispar* gerinces gazdaspektrumának vizsgálata (Forró & Eszterbauer 2016)**

A fertőzés prevalenciája bodorkában volt a legmagasabb mindkét kísérletben (94 és 80%). Míg a dévérkeszegek 25%-a fertőződött meg az 1. kísérletben (3.13. ábra), a vörösszárnyú keszegek egyik korcsoportjában sem mutattuk ki a parazita jelenlétét (3.13. és 3.14. ábra).

A spóraszám szórása nagy volt mindkét kísérletben, különösen bodorka esetében, ahol a becsült spóraszám 1400 és 246667 db/hal egyed között ingadozott az első, és 167-216500 db/hal között a második kísérletben (3.13. E. és 3.14. C. ábra). Dévérkeszegben a becsült spóraszám 417 és 6250 db/hal között változott (3.13. E. ábra). Az első kísérletben a fertőzés

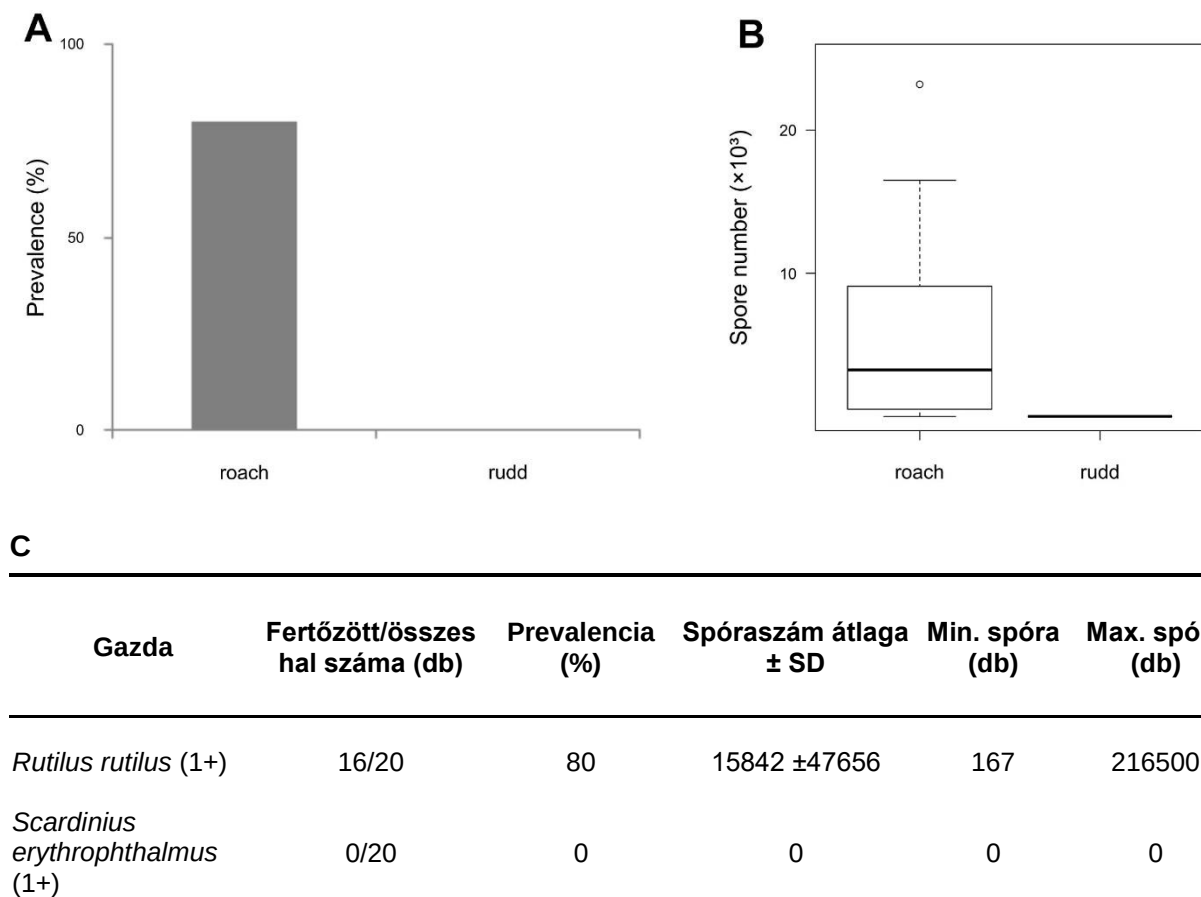
átlagos intenzitása és abundanciája szignifikánsan eltérő volt halfajonként ($p=0.0214$) (3.13. ábra). A második kísérletben a fertőzés prevalenciája és átlagos intenzitása bodorkában kicsit alacsonyabb volt, mint az első kísérletben, de a két vizsgált halfaj között (bodorka és vörösszárnú keszeg) itt is szignifikáns különbség mutatkozott, annak köszönhetően, hogy vörösszárnú keszegben a parazita myxospóra jelenléte ezúttal sem volt kimutatható (3.14. ábra).



E

Gazda	Fertőzött/összes hal száma (db)	Prevalencia (%)	Spóraszám átlaga $\pm$ SD	Min. spóra (db)	Max. spóra (db)
<i>Rutilus rutilus</i> (1+)	15/16	94	49388 $\pm$ 70054	1.400	246667
<i>Abramis brama</i> (2+)	4/16	25	599 $\pm$ 1603	417	6250
<i>Scardinius erythrophthalmus</i> (3+)	0/16	0	0 $\pm$ 0	0	0

3.13. ábra: Az *M. pseudodispar* fertőzés eredménye az 1. kísérletben. Három halfajt fertőztünk T50 vonalhoz tartozó *M. pseudodispar* TAM-mal. **A:** a fertőzés prevalenciája; **B:** a fertőzés végén bodorkában kialakult érett *M. pseudodispar* myxospórák; lépték: 10 μ m; **C:** a fertőzés átlagos abundanciája; **D:** átlagos intenzitása; **E:** a fertőzés prevalenciájának és intenzitásának összefoglaló táblázata, zárójelben a halak életkora években. Roach: bodorka (*Rutilus rutilus*); common bream: dévérkeszeg (*Abramis brama*); rudd: vörösszárnú keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*) SD: szórás (standard deviation).

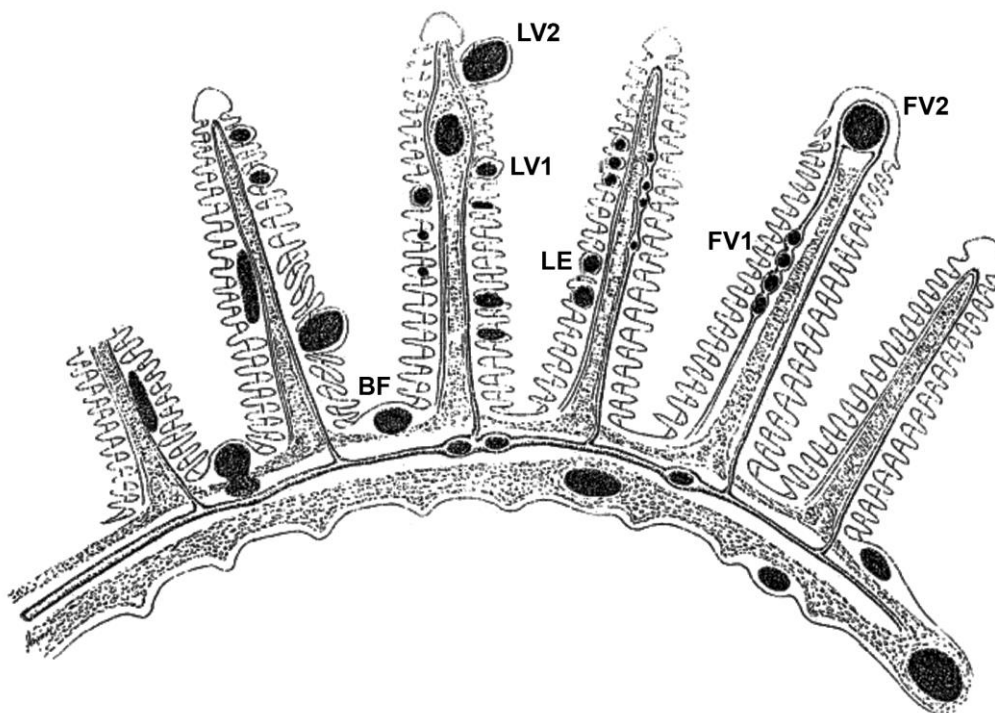


3.14. ábra: Az *M. pseudodispar* fertőzés eredménye a 2. kísérletben. Két halfajt fertőztünk T50 vonalhoz tartozó *M. pseudodispar* TAM-mal. **A:** a fertőzés prevalenciája; **B:** a fertőzés átlagos abundanciája; **C:** a fertőzés prevalenciájának és intenzitásának összefoglaló táblázata. Roach: bodorka (*Rutilus rutilus*); rudd: vörösszárnú keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*) SD: szórás (standard deviation).

3.2.2. Nyálkaspórások szövet- és szervspecifitása

Szövetspecifitás és filogenetikai rokonság kapcsolata (Eszterbauer 2004)

A vizsgált kopolyúélősködő *Myxobolus* fajok mindegyike a szöveti élősködők közé tartozott, myxospóráik plazmódiumokban fejlődtek a kopolyú különböző részein (3.15. ábra, 3.1. Táblázat). Korábbi szövettani vizsgálatok alapján (Molnár 2002a) a plazmódiumok elhelyezkedése szerint az általunk vizsgálat fajok 3 főcsoportba voltak sorolhatók: (1) a kopolyú filamentumok tövében, a hámszövetben fejlődő basifilamentális-epitheliális típushoz tartozott a *M. basilamellaris*; (2) a kopolyúlamellák között, a hámszövetben fejlődő interlamelláris-epitheliális típusba volt sorolható a *M. impressus* és *M. pavlovskii*; és (3) a kopolyúlamellákon belül, a kapillárisokban plazmódiumot képező intralamelláris-vaszkuláris típusba tartozott a *M. bramae*, *M. macrocapsularis*, *M. dispar*, *M. muelleri*, *Myxobolus* sp. dévérkeszegből és *M. intimus* (3.1. Táblázat).



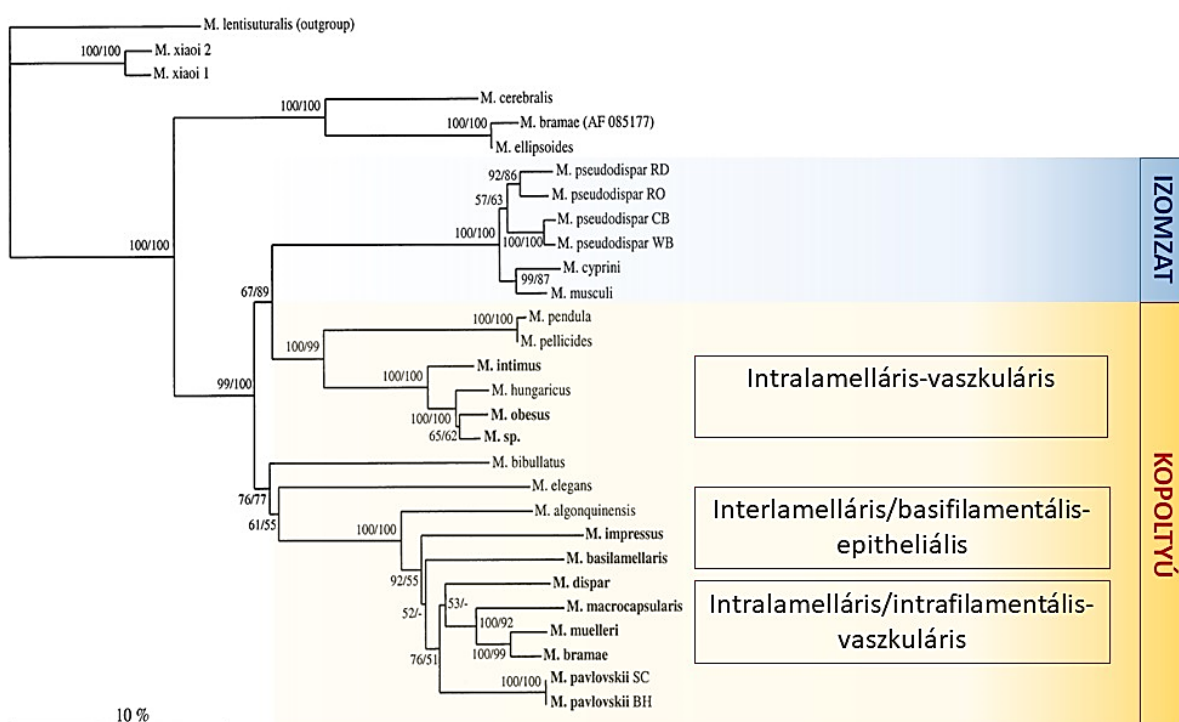
3.15. ábra: Kopolyúélősködő nyálkaspórák fajok plazmódiumainak lehetséges lokalizációja egy kopolyúív sematikus rajzán bemutatva. A porcos kopolyúívről kopolyú filamentumok ágaznak le, amiket kopolyúlamellák alkotnak. A plazmódiumok lokalizációja alapján a főbb kopolyúparazita típusok: **BF**: bazifilamentális pl. *Myxobolus basilamellaris*; **FV**: intrafilamentális-vaszkuláris, pl. *M. muelleri* (FV1); **LE**: interlamelláris-epitheliális pl. *M. impressus*, *M. pavlovskii*; **LV**: intralamelláris-vaszkuláris pl. *M. hungaricus* (LV1), *M. intimus* (LV1), *M. obesus* (LV1), *M. macrocapsularis* (LV2), *M. bramae* (LV2), *M. dispar* (LV2). Az LV2 és FV2 típus feltehetően ugyanaz. (Molnár 2002 alapján, módosítva). A plazmódiumokat sötét foltok jelölik az ábrán.

3.1. Táblázat: A vizsgált kopolyúélősködő *Myxobolus* fajok elkülönülése kopolyún belüli lokalizáció szerint (vagyis a kopolyú melyik részén és milyen szövetben fejlődik a myxospórákat tartalmazó plazmódium). Génbanki azonosító a fajnév után zárójelben. További információ vizsgált minták eredetéről a 2.1. Táblázatban található.

Parazita faj	Plazmódium lokalizációja	Kopolyú szövet
<i>M. basilamellaris</i>	Basifilamentális	hámszövet (epithelium)
<i>M. impressus</i>	Interlamellaris	hámszövet (epithelium)
<i>M. pavlovskii</i> SC	Interlamellaris	hámszövet (epithelium)
<i>M. pavlovskii</i> BH	Interlamellaris	hámszövet (epithelium)
<i>M. bramae</i> (AF507958)	Intralamelláris/intrafilamentális	kötőszövet (kapilláris)
<i>M. macrocapsularis</i>	Intralamelláris/intrafilamentális	kötőszövet (kapilláris)
<i>M. dispar</i>	Intralamelláris/intrafilamentális	kötőszövet (kapilláris)
<i>M. muelleri</i>	Intralamelláris/intrafilamentális	kötőszövet (kapilláris)
<i>Myxobolus</i> sp. CB (AY325283)	Intralamelláris	kötőszövet (kapilláris)
<i>M. intimus</i>	Intralamelláris	kötőszövet (kapilláris)
<i>M. obesus</i>	Intralamelláris	kötőszövet (kapilláris)

SC: fehér busa; BH: pettyes busa; CB: dévérkeszeg.

A nyálkaspórá-spezifikus nested PCR-rel, majd az azt követő DNS szekvenálással 10 *Myxobolus* faj részleges 18S rDNS szekvenciáját sikerült meghatározni. A fehér busában és a pettyes busában egyaránt kimutatott *M. pavlovskii* faj 18S rDNS szinten 100%-ban azonos volt. A dévérkeszegben talált, morfológiailag *M. hungaricus*-ra emlékeztető *Myxobolus* sp. (AY325283) genetikailag eltért a *M. hungaricus*-tól, így feltételezhetően új faj. A *M. bramae* néven szereplő, AF085177 génbanki azonosító számú DNS szekvencia (Andree et al. 1999) jelentősen eltért (több mint 20%-os különbséggel) az általunk vizsgált *M. bramae* minták DNS szekvenciájától (AF507958), és a saját mintáinktól eltérően a filogenetikai fán a pisztráng koponyaporcában élősködő, *M. cerebraalis* fajjal helyezkedett el egy csoportban (3.16. ábra).



3.16. ábra: Távolsági mátrix (TM) és maximum parszimónia (MP) módszerrel készült filogenetikai fa pontyfélék kopoltyú- és izomélősködő *Myxobolus* fajainak, 1593 bp hosszú, illetett 18S rDNS szekvenciája alapján. Az elágazásokban a 1000 ismétlés alapján számított, százalékos bootstrap érték van feltüntetve. A vastagon kiemelt fajok a kutatás során vizsgált fajokat jelölik. Kulcsoport: *Myxobolus lentisuturalis*. Lépték: 10%-os szekvencia szintű eltérés. RD: vörösszárný keszeg; RO: bodorka; CB: dévérkeszeg; WB: karikakeszeg; SC: fehér busa; BH: pettyes busa.

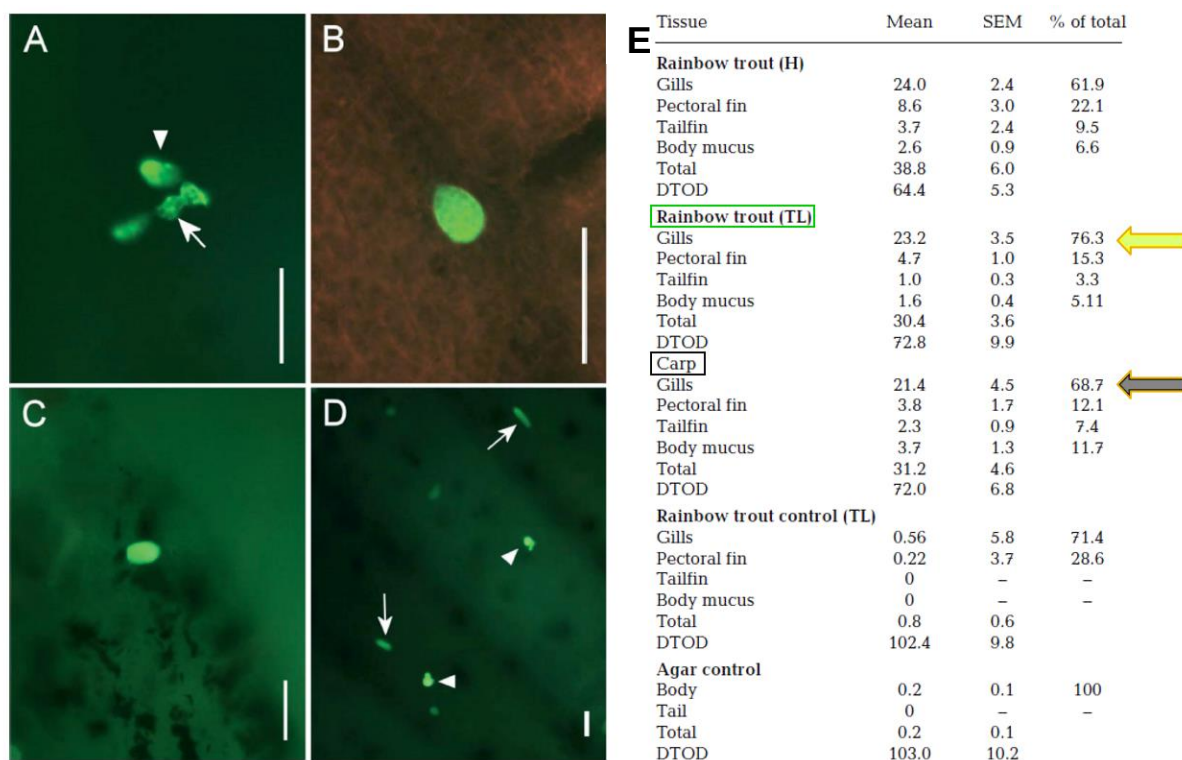
A filogenetikai fán két főcsoport volt elkülöníthető. Az egyik a vázizomzatban, izomszövetben fejlődő paraziták csoportja a *M. pseudodispar*, *M. cyprini* és *M. musculi* fajokkal (3.16. ábra). E főág alcsoportját képezte az intralamelláris-vaszkuláris típusú kopoltyúélősködők kládja, benne a *M. hungaricus*, *M. intimus*, *M. obesus*, *M. pendula* és *M. pellicides* fajokkal. A másik főcsoportot egy kivétellel kopoltyúélősködők alkották. Ezen belül a plazmódiumok kopoltyún belüli elhelyezkedése és szöveti preferenciája alapján két alcsoport különült el: az interlamelláris-epitheliális (a szintén hámszövetben fejlődő *M. basilamellaris*-sal együtt), és az

intralamelláris/intrafilamentális-vaszkuláris típusú paraziták csoportja (3.16. ábra; 3.1. Táblázat). A csoportban bazálisan helyezkedett el a *M. algonquinensis* petefészek kötőszövetében fejlődő faj, valamint a *M. elegans*, és *M. bibullatus* módosult kötőszövetben (kapilláris) spórát képező, kopoltyúélősködő fajok.

3.2.3. Gazdafelismerés megnyilvánulásai

M. cerebralis gazdafelismerése és gazdába való bejutása (Kallert et al. 2009)

A FDA festéssel festett, endospórából kiszabadult sporoplazmák (3.17. A. ábra) könnyen kimutathatók voltak a hal hámszövetében (3.17. B. ábra). A hámszövethez rögzült endospórák (3.17. C. ábra) jól elkülönültek az intakt actinospóráktól (3.17. D. ábra nyíljal jelölve). Utóbbiakat kizártuk a vizsgálatból, annak ellenére, hogy a spórák a poláris filamentumokkal rögzültek a hal testfelszínére és a mintavétel előtti mosás nem távolította el őket. A két szivárványos pisztráng törzs (TroutLodge, TL és Hofer, H), és a ponty kültakaróján, valamint az agar kontroll felületén rögzült vagy abba bejutott parazita sporoplazmák átlagos számát és százalékos arányát a 3.17. E. ábra táblázata mutatja.



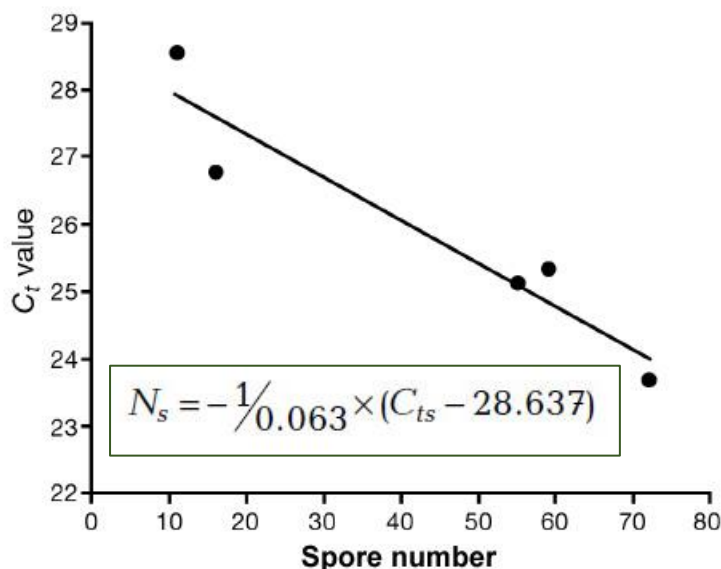
3.17. ábra: Fluoreszcein-diacetáttal (FDA) festett *M. cerebralis* actinospóra alakok (TAM-ok) 3 perccel a hal fertőzését követően (egyedi fertőzés, 8000 TAM/hal dózis). **A:** endospórából (nyílhegy) kiszabadult sporoplazma (nyíl) szivárványos pisztráng nyálkakaparékbán; **B:** ponty farokúszó hámszájába bejutott sporoplazma; **C:** szivárványos pisztráng farokúszójába jutott sporoplazma; **D:** rögzült actinospórák (nyíl) és kiszabadult sporoplazma (nyílhegy) ponty mellúszójába bejutva; **E:** hal hámszövetébe jutott sporoplazmák átlagos száma 3 perccel a fertőzés kezdetét követően (9 párhuzamos kísérletben). SEM: standard hiba (standard error of mean); % of total: a hámszövetbe bejutott sporoplazma átlagának

százalékos értéke az összes, fertőzéshez felhasznált TAM-hoz viszonyítva; DTOD: átlagos különbség a párhuzamos minták között. Szívárványos pisztráng törzsek: TroutLodge (TL), Hofer (H). Lépték: 45 µm.

A bejutott paraziták számában nem volt szignifikáns különbség a halfajok között ($p=0,42$; $F=0,89$, $df=2$, ANOVA). A bejutott sporoplazmák a kopoltyú szöveteiben fordultak elő a legnagyobb számban. Meglepő módon ponty kopoltyúhámába közel annyi sporoplazma jutott be, mint a parazitára legfogékonyabb TL pisztráng törzs kopoltyújába ($p=0,89$, t-teszt) (3.17. E. ábra, nyilakkal jelölve). A kontroll TL törzs fertőzésekor a kilencből az egyik párhuzamos minta kontaminálódott (valószínű a kontroll TAM mintával), ezért a kopoltyún és a mellúszón néhány sporoplazma volt kimutatható (3.17. E. ábra: rainbow trout control, TL).

A különböző napokon végzett párhuzamos kísérletekhez eltérő TAM szűrleteket használtunk, melyek fertőzőképessége/aktivitása között feltételezhető volt különbség. Ezért a sporoplazma átlagokat normalizáltuk az adott napi TAM izolátum teljes aktivitásával (DTOD). Szignifikáns különbség így sem volt kimutatható a halfajok között ($p=0,15$).

A halszövetbe bejutott sporoplazmák mennyiségét fajspecifikus qPCR-rel becsülve 140 bp hosszú, 18S rDNS fragmentumot sokszoroztunk fel magas hatékonysággal. Ismert spóraszámú minták segítségével kalibrációs egyenest készítettünk (3.18. ábra), ez alapján becsültük a vizsgált mintákban lévő sporoplazmák számát.



3.18. ábra: Ismert számú *M. cerebralis* TAM minták fajspecifikus qPCR-rel meghatározott C_t értékei alapján készült kalibrációs egyenes, és az egyenest leíró egyenlet, a vizsgálati mintákban lévő parazita TAM mennyiségének meghatározásához. N_s : actinospóra szám.

A molekuláris vizsgálattal, összhangban a mikroszkópos megfigyeléssel, TL pisztráng kopoltyúban átlagosan 26,2 db, míg ponty kopoltyúban átlagosan 29,9 db parazita jelenléte volt kimutatható (a különbség nem volt szignifikáns, $p=0,42$). Az FDA festék esetleges negatív

hatásának vizsgálata során a nem festett TAM-mal való fertőzéskor az átlagos parazita szám 61,5 db volt, míg az FDA-festett TAM esetén 57,6 db. Tehát a festett és nem festett TAM-mal való fertőzés hatékonysága között szignifikáns különbség nem volt kimutatható ($p=0,56$).

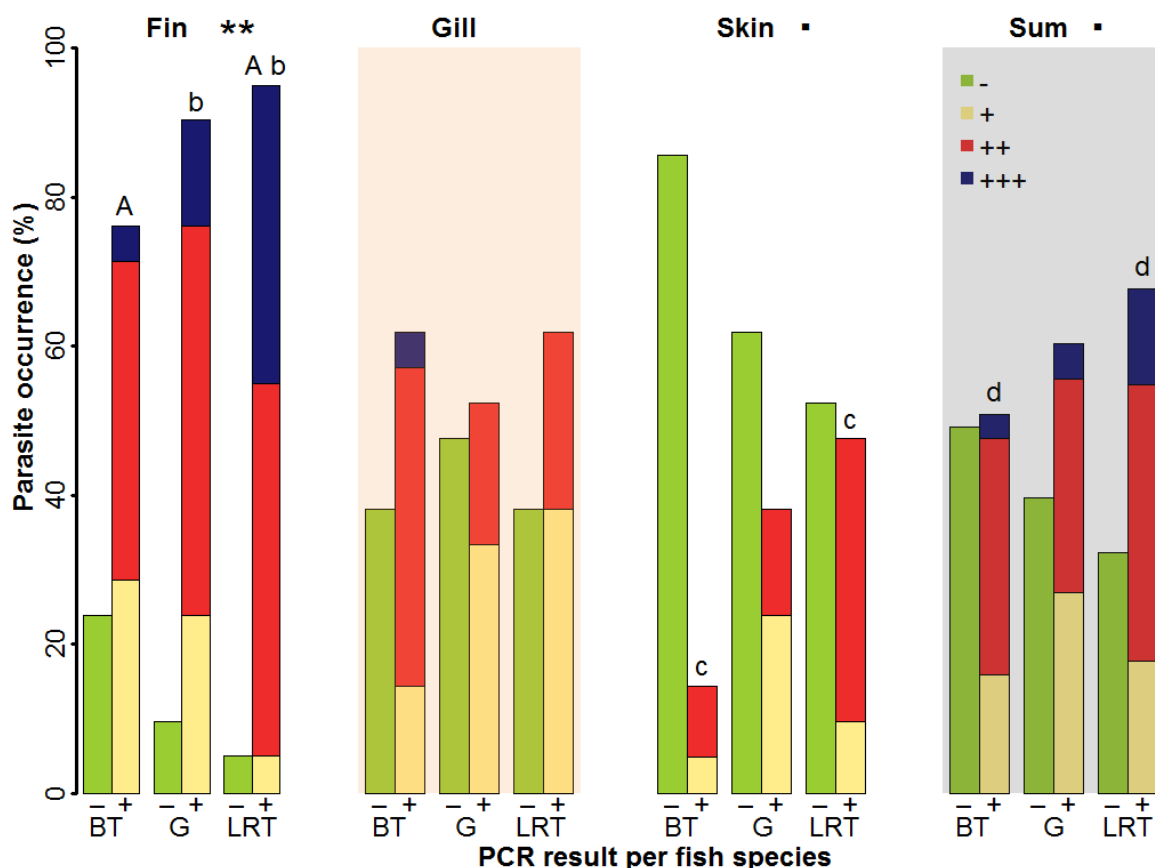
***M. cerebralis* gazdába való bejutásának lokalizációja** (Eszterbauer et al. 2019)

A fertőzés prevalenciája 85,7 és 100% között volt, ami a kísérletes fertőzési protokoll magas hatékonyságát jelzi (3.2. Táblázat). A legmagasabb prevalencia (100%) a parazitára leginkább fogékony halfajban, a szivárványos pisztrángban volt kimutatható. Érdekes módon, ezüstkárászban a fertőzés prevalenciája igen magas, 95,2%-os volt, magasabb, mint a parazita eredeti gazdájában, a sebes pisztrángban (3.2. Táblázat). A parazita előfordulása szignifikáns különbséget mutatott testtájak szerint minden vizsgált halfaj esetében; a legnagyobb százalékban a farokúszón, legkisebb mennyiségben a bőrben lehetett megtalálni (3.2. Táblázat, 3.19. ábra). Halfajok között nem mutattunk ki szignifikáns különbséget, bár a parazita bőrben való előfordulása a szignifikancia határán volt ($p=0,059$). A parazitával nem fertőzött kontroll állomány PCR vizsgálattal is negatív volt.

A fertőzés intenzitása kis különbségeket mutatott a halfajok között, és a prevalencia esetében megfigyelt trendet követte (3.20. ábra). A legmagasabb intenzitás szivárványos pisztrángban fordult elő, míg a legalacsonyabb sebes pisztrángban (3.19. ábra Sum). A kimutatott különbségek többsége azonban nem volt szignifikáns.

3.2. Táblázat: A *M. cerebralis* korai fertőzés prevalenciája, és becsült intenzitása és a parazita előfordulása testtájanként 2 órával a fertőzést követően. A fertőzés intenzitás kétkörös PCR eredménye alapján történő becslésének kategóriái: +: első kör negatív, második kör enyhén pozitív; ++: első kör enyhén pozitív, második kör erősen pozitív; +++: mindkét PCR kör erősen pozitív.

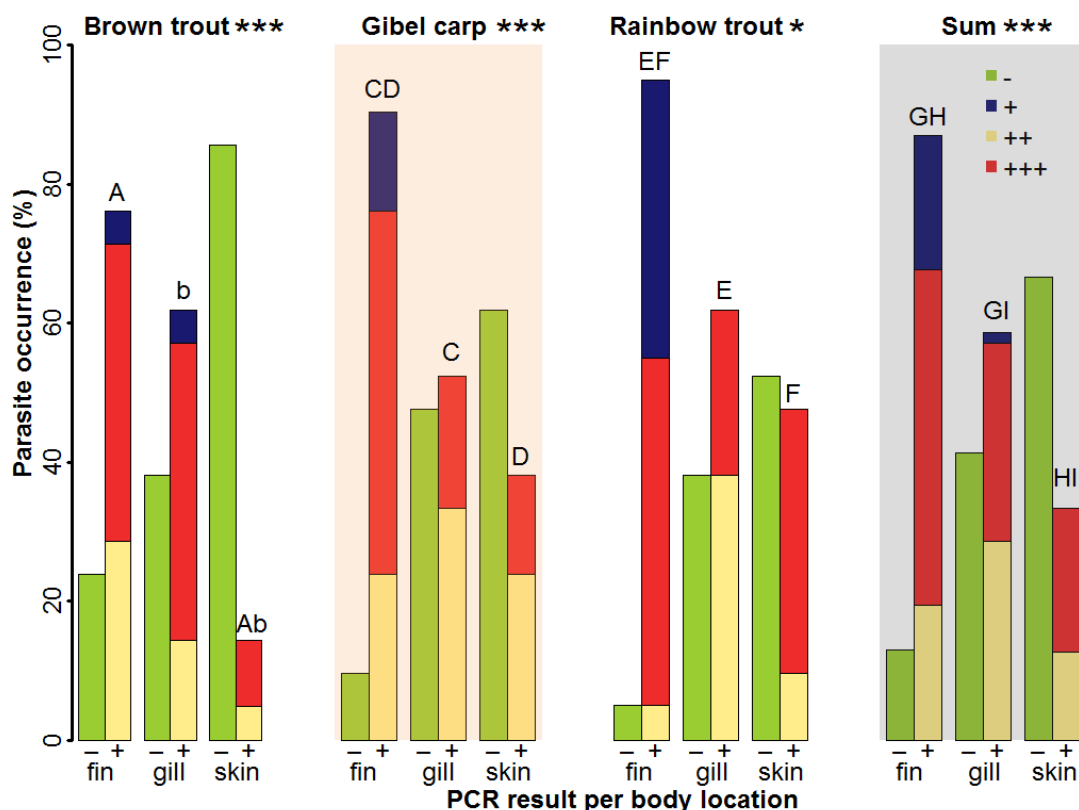
Hal faj	Testtáj	Fertőzött /összes hal (db)	Prevalencia (%)	Előfordulás (%)	Fertőzés intenzitás kategóriánként (%)		
					+	++	+++
Sebes pisztráng	farokúszó	18/21	85,7	76,2	37,5	56,3	6,3
	kopoltyú			61,9	23,1	69,2	7,7
	bőr			14,3	33,3	66,7	0,0
Szivárványos pisztráng	farokúszó	21/21	100	95,0	5,3	52,6	42,1
	kopoltyú			61,9	61,5	38,5	0,0
	bőr			47,6	20,0	80,0	0,0
Ezüstkárász	farokúszó	20/21	95,2	90,5	26,3	57,9	15,8
	kopoltyú			52,4	63,6	36,4	0,0
	bőr			38,1	62,5	37,5	0,0
Összes hal	farokúszó	59/63	93,6	87,1	22,2	55,6	22,2
	kopoltyú			58,7	48,6	48,6	2,7
	bőr			30,2	38,1	61,9	0,0



3.19. ábra: *M. cerebralis* fertőzés intenzitásának összehasonlítása a vizsgált halfajok között. A fertőzés intenzitását a parazita-specifikus kétkörös PCR során keletkezett 18S rDNS termék mennyisége alapján becsültük. A következő kategóriákat különítettük el: -/zöld: negatív; +/sárga: első kör negatív, második kör enyhén pozitív; ++/piros: első kör enyhén pozitív, második kör erősen pozitív; +++/kék: mindkét PCR kör erősen pozitív. BT: sebes pisztráng; G: ezüstkárász; LRT: szivárványos pisztráng. Szignifikancia szint Kluskall-Wallis teszttel: * p érték 0,05-0,01 között; ** 0,01-0,001 között; *** <0,001; • marginális szignifikancia, p érték 0,1 és 0,05 között. A halfajok közötti szignifikáns különbség nagy betűkkel, a marginális szignifikancia kis betűkkel van jelölve (páros összehasonlítás). Fin: farokúszó; gill: kopoltyú; skin: bőr.

Páros összehasonlítással a sebes és szivárványos pisztrángok farokúszó mintáiban kimutatott fertőzési intenzitás volt szignifikánsan eltérő ($p=0,002$). Továbbá marginális szignifikancia mutatkozott a sebes és szivárványos pisztrángok bőrmintáinak fertőzési intenzitásában ($p=0,059$), valamint az ezüstkárász és a szivárványos pisztráng farokúszó minták között ($p=0,061$). A testtájak között a legtöbb esetben szignifikáns volt a különbség a fertőzés intenzitásában. A legmagasabb intenzitás a farokúszón volt kimutatható, míg a bőr mintákban tapasztaltuk a legalacsonyabb fertőzési intenzitást minden halfaj esetében (3.19. ábra).

A kopoltyú fertőzöttsége átlagos intenzitásúnak volt mondható (3.20. ábra Sum). A fertőzés intenzitása szignifikánsan magasabb volt a farokúszón mint a kopoltyú mintákban minden halfaj esetében. A farokúszó és kopoltyú minták között a szivárványos pisztráng és ezüstkárász esetében, kopoltyú és bőr között pedig csak sebes pisztráng esetében mutatkozott szignifikáns eltérés.

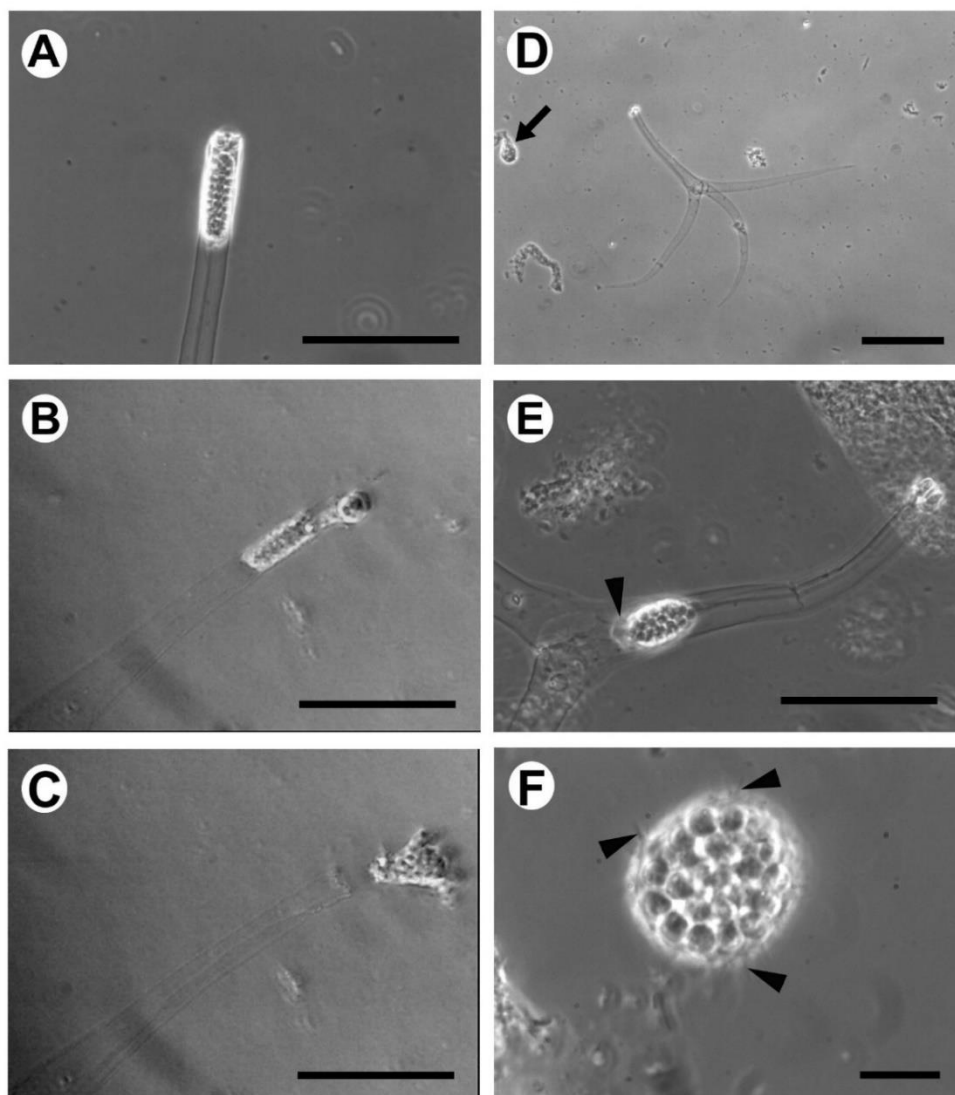


3.20. ábra: *M. cerebralis* fertőzés intenzitásának összehasonlítása a vizsgált testtájak között. A fertőzés intenzitását a parazita-specifikus kétkörös PCR során keletkezett 18S rDNS termék mennyisége alapján becsültük. A következő kategóriákat különítettük el: -/zöld: negatív; +/sárga: első kör negatív, második kör enyhén pozitív; ++/piros: első kör enyhén pozitív, második kör erősen pozitív; +++/kék: mindkét PCR kör erősen pozitív. Szignifikancia szint Friedman teszttel: * p érték 0,05-0,01 között; ** 0,01-0,001 között; *** <0,001; . marginális szignifikancia, p érték 0,1 és 0,05 között. Az oszlopok tetején azonos betűvel jelölt csoportok között volt szignifikáns a különbség. A testtájak közötti szignifikáns különbség nagy betűkkel, a marginális szignifikancia kis betűkkel van jelölve (páros összehasonlítás). Brown trout: sebes pisztráng; gibel carp: ezüstkárász; rainbow trout: szivárványos pisztráng.

***M. cerebralis* gazdafelismerésének molekuláris háttere (Eszterbauer et al. 2009)**

A TAM aktiválására kidolgozott *in vitro* módszerrel a spórák átlagosan 90,7%-át (SEM +0,61/-0,63) sikerült aktiválni, vagyis halgazda jelenléte nélkül, halnyálka kivonattal és mechanikai ingerrel elindítani a gazdafelismerés folyamatát. Ehhez képes a víz kontroll (9,9%, SEM +1,35/-1,27) és az mechanikai behatás nélkül alkalmazott halnyálka (14,7%, SEM +1,32/-1,27) hatására az aktív TAM-ok aránya szignifikánsan alacsonyabb volt.

Az aktiválódás, vagyis a gazdafelismerés során a sporoplazmák többsége aktív mozgással elhagyta a spórahéjat (3.21. ábra, B-D). A jellegzetes amőba-szerű mozgással előrehaladó sporoplazmán álláb (pseudopodium) jellegű kitüremkedések jelentek meg és tűntek el. Körülbelül 15 perccel az aktiválást követően a sporoplazma abbahagyta a mozgást, gömb alakot vett fel, és a mikroszkópos vizsgálatra használt tárgylemezre tapadt. A gömb felszínén apró nyálkatüskék jelentek meg és tűntek el, amíg az aktív életjelenségek meg nem szűntek (3.21. ábra, F).

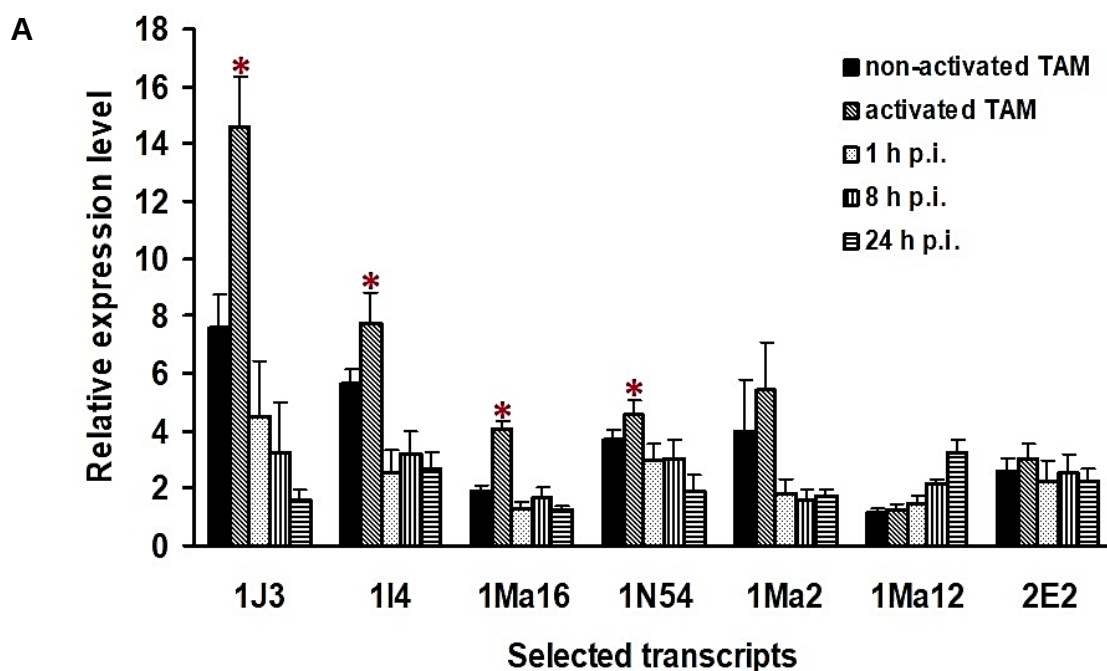


3.21. ábra: *M. cerebraлис* gazdafelismerést követő, gazdába való bejutásának folyamata *in vitro* aktiválás során. **A:** nem aktivált, *M. cerebraлис* TAM spórateste, sporoplazmában 64 db másodlagos (csíra)sejttel. Lépték: 50 μm ; **B és C:** A csírasejtek körülvéve az elsődleges sporoplazma sejtekkel amőba-szerű mozgással elhagyják a spóra héját néhány perccel a gazdafelismerést követően. Lépték: 50 μm ; **D:** Aktivált TAM a sporoplazma kijutását követően. A nyíl a kiszabadult sporoplazmát mutatja. Lépték: 150 μm ; **E:** Aktivált TAM olyan esetben, amikor a sporoplazma nem jut ki a spórahéjból, hanem megreked a TAM nyaki részén. A mozgás során álláb-szerű kitüremkedések képződnek és tűnnek el (nyílhegy). Lépték: 50 μm ; **F:** A kiszabadult sporoplazma 15-20 perccel a gazdafelismerést követően gömböt képez és letapad a tárgylemez felszínére. Ebben a stádiumban kis tüskeszerű nyálkaképződmények jelennek meg és tűnnek el (nyílhegy). Lépték: 10 μm .

Néhány esetben a sporoplazma nem tudott kijutni a spórahéjból (pl. mert nem nyílt fel a héjsejt a poláris kapszulák mentén), így nem a külvilág felé, hanem a TAM nyél részének alapja felé indult el (3.21. ábra, E). Az aktiválás hatásfokának számításakor ezeket az eseteket figyelmen kívül hagytuk.

Az SSH során az aktivált és a natív TAM minták génkészletét hasonlítottuk össze, és a 403 klónból álló SSH könyvtárban („forward” és „reverse”) azok a gének vagy gén fragmentumok kerültek többségbe, amelyek a TAM gazdafelismerésekor aktívan jelen voltak. Ennek tükrében

összesen 190 „forward” SSH klónt választottunk ki a további szelekciós lépésekhez. DNS:DNS dot-blottal a keresett géneket/génszakaszokat tartalmazó klónok száma 48-ra csökkent. Ezeket DNS szekvenálással azonosítottuk. A strukturális RNS-eket és háztartási géneket, valamint a néhány kontamináló hal gént kizártuk a további vizsgálatból. A BLAST keresés 15 klón (33%) esetében mutatott sejt motilitással, sejt lízissel és aktív mozgással kapcsolatos gén funkciót. Ezek közül 2 klón (1N26 és 1I4) nagyfokú hasonlóságot mutatott szabadon élő csalánozók (*Hydra magnipapillata* és *Hydractinia* sp.) nem annotált, expresszálandó szekvencia jelek („expressed sequence tag”, EST) fragmentumaival.



B

Parazita fehérje (azonosító)	Teljes transzkriptum	Feltételezett funkció
Ubiquitin-kötő enzim E2 (1J3)	785 nt/ 181 as	Fehérje lebontás
Aktin-függő fehérje 3 homológ (1I4)	1316 nt/ 413 as	Sejt motilitás, mozgás
Frekuensiin-szerű Ca^{2+} -kötő fehérje (1Ma16)	609 nt/ 175 as	Szignáltranszdukció
Phafin2 fehérje pleckstrin homológ és Zn^{2+} -kötő doménekkel (FYVE) (1N54)	821 nt/ 254 as	Sejten belüli jelátvitel

3.22. ábra: *M. cerebralis* parazita gének relatív kifejeződése a halgazda felismerésekor és a halban való fejlődés első 24 órájában. **A:** 1J3: Ubiquitin-conjugating enzyme E2/ UBC-complex (UBC-E2); 1I4: Actin-related protein 3 homolog (ARP3); 1Ma16: Myosin regulatory light chain, Ca^{2+} -binding protein (FRQ1); 1N54: Phafin2: Pleckstrin homology and FYVE domains (PH-FYVE); 1Ma2: Similar to Napb-prov protein; 1Ma12: Ca^{2+} -binding protein; 2E2: Coronin. *: szignifikáns különbség a gazdát felismert parazita (aktivált TAM) és a gazdától elkülönített parazita (nem aktivált TAM) vizsgált génjének relatív expressziója/abundanciája között ($p < 0,001$). **B:** Gazdafelismeréskor aktív parazita gének főbb jellemzői.

A 15-ből az ismétlődések/azonos gén funkciók miatt, a következő hét transzkriptum relatív expresszióját vizsgáltunk qPCR-rel: egy ubiquitin-kötő enzim E2/UBC-komplex (UBC-E2; 1J3:); aktin-függő fehérje 3-as homológ (ARP3; 1I4:); egy myosin szabályozó könnyű lánc, frequenin Ca²⁺-kötő fehérje (FRQ1; 1Ma16:); Phafin2, pleckstrin homológia és FYVE domének (PH-FYVE; 1N54:); egy Napb-prov fehérje-szerű transzkriptum (1Ma2); Ca²⁺-kötő fehérje (1Ma12); és egy coronin jellegű fehérje transzkriptumát (2E2) (3.22. ábra A). A qPCR során a vizsgált transzkriptumok expressziós szintjét a béta-aktin gén expressziójához normalizáltuk. A hétből 5 transzkriptum volt alulreprezentált a nyugvó TAM stádiumban és felülreprezentált az aktivált TAM stádiumban, majd ezt követően mind az öt transzkriptum expressziója fokozatosan csökkent a halban fejlődő korai stádiumokban. A génexpresszió szintjében mutatkozó különbség négy vizsgált transzkriptum (1J3, 1I4, 1Ma16, 1N54) esetében volt szignifikáns ($p < 0,001$) (3.22. ábra A és B).

A gazdafelismerésben feltételezhetően szerepet játszó négy gén teljes transzkriptumát meghatározva, rövid géneket azonosítottunk. Az ubiquitin-kötő enzim E2 (1J3, EU595015) 181 as-ból álló fehérje, benne aktív cisztein kötőhelyekkel, Ub-thioészter maradvánnyal és interakciós ponttal az E3 alegységhez. Az aktin-függő fehérje 3 homológ (1I4, EU595011) 413 as hosszú, az aktin újrendeződéséért felelős fehérje, gelsolin, profilin és ATP kötőhelyekkel. A frequenin-szerű Ca²⁺-kötő fehérjét (EF-hand superfamily, 1Ma16, EU595019) 175 as hosszúnak azonosítottuk, benne nagyszámú kalcium kötőhellyel. A negyedik gén, a 254 as hosszú ismeretlen, Phafin2-jellegű fehérje (1N54, EU595025) két doménnel, valamint cink és foszfátidil-inozitol kötőhelyekkel.

3.2.4. Parazitára való fogékonyság jellegzetességei

Halak beltenyésztettségének hatása a *M. cerebralis* fertőzöttségre (Eszterbauer et al. 2015)

A sebes pisztráng tenyészállományok vérvonal vizsgálata allélek szintjén három haplotípust mutatott ki. Mitokondriális gén alapján (mtDNS CR) az összes vizsgált egyed az atlanti vérvonal haplotípusát mutatta (3.3 Táblázat). A PCR-RFLP vizsgálattal történő azonosítás során az atlanti vérvonalra jellemző, 1088 bp hosszú génszakasz két fragmentumra vágódott (654 és 434 bp) SatiI restrikciós enzimmel (3.23. ábra). A dunai vérvonalra jellemző génfragmentum nem vágódik az enzimmel, azonban ez a haplotípus nem volt jelen a vizsgált egyedek között. Az LDH-C1 gén 428 bp hosszú fragmentuma a BseLI enzimmel történt emésztéssel 353 és 75 bp hosszú fragmentumokra vágódott az atlanti vérvonal egyedeinél, és vágatlan maradt a dunai vérvonalhoz tartozó egyedeknél (3.23. ábra). LDH-C1 gén alapján az atlanti vérvonal allélja 58%-ban, a dunai 42%-ban volt jelen. A hím és nőstény tenyészegedek között jelentős eltérés nem volt kimutatható (3.3. Táblázat). Az LDH-C1 gén

alapján három genotípus volt elkülöníthető: atlanti (At), dunai (Da) és atlanti-dunai hibrid (Hyb) vérvonal/genotípus. Ezek közül többségében hibrid (49%) és atlanti (34%) egyedeket azonosítottunk (3.3. Táblázat).

3.3. Táblázat: Egyedi azonosítóval jelölt sebes pisztráng tenyészállomány haplotípusai/allél típusai mtDNS CR és LDH-C1 gének alapján, és LDH-C1 genotípusai PCR-RFLP módszerrel azonosítva. mtDNS CR: mitokondriális DNS kontroll régió; LDH-C1: laktát-dehidrogenáz kontroll 1 régió; Da: dunai allél/vérvonal; At: atlanti allél/vérvonal; Hyb: atlanti-dunai hibrid vérvonal.

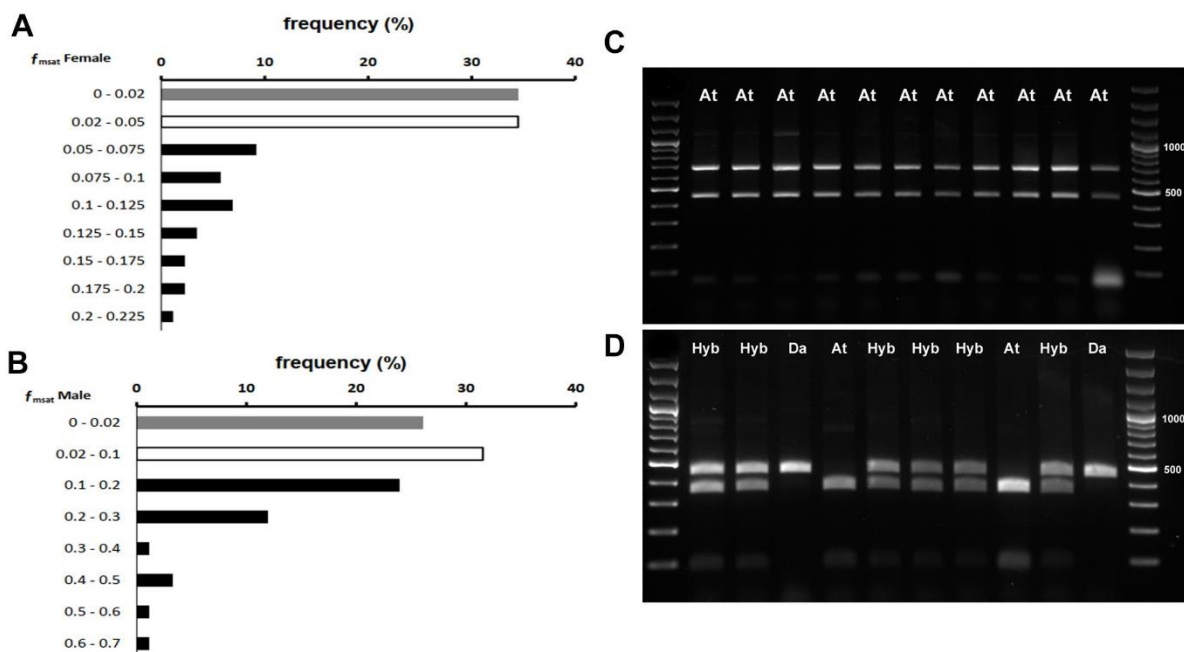
	Nőstény		Hím		Összes	
	Egyedszám (db)	Gyakoriság (%)	Egyedszám (db)	Gyakoriság (%)	Egyedszám (db)	Gyakoriság (%)
haplotípusok						
mtDNA*Da	0/64	0	0/80	0	0/144	0
mtDNA*At	64/64	100	80/80	100	144/144	100
LDH-C1*At	70/128	55	98/160	61	168/288	58
LDH-C1*Da	58/128	45	62/160	39	120/288	42
LDH-C1 genotípusok						
LDH-C1*Da-Da (Da)	15/64	23	10/80	12.5	25/144	17
LDH-C1*At-At (At)	21/64	33	28/80	35	49/144	34
LDH-C1*At-Da (Hyb)	28/64	44	42/80	52.5	70/144	49

Az ivari különbség a dunai vérvonalú egyedek között volt szembetűnő. A 144 vizsgált egyedből 25 volt dunai vérvonalú; a nőstények 23%-a, míg a hímek 12,5%-a tartozott az őshonos dunai vérvonalba.

A vizsgált 8 mikroszatellit (msat) marker közül az OKI-10 mutatta a legnagyobb variabilitást a keletkezett PCR termékek méretében; 23 különböző hosszúságú msat lókuszt azonosítottunk a vizsgált tenyészállományban. A legkisebb méret-variabilitást a Str-15 és az Str-60 msat markerek esetében tapasztaltuk (4-4 különböző hosszúságú terméket detektálva). Az msat méretekből összeállított adatbázisból számított egyedi beltenyésztettségi együttható (f_{msat}) értékek 0 és 0,2091 között változott a nőstény egyedeknél, és 0 és 0,6197 között a hímeknél (3.23. ábra). Nulla és ahhoz közeli érték az alacsony beltenyésztettségi fokú (nem beltenyésztett) egyedeket jelezte, míg a 0,1 fölötti értékek különböző fokú beltenyésztettségre utaltak. Az f_{msat} értékek alapján a tenyészegyedeket csoportokba rendeztük beltenyésztettségi fokuk alapján: a 0,02 f_{msat} érték alatt a nem beltenyésztett (NIB) csoportba, nőstényeknél 0,05, hímeknél pedig 0,1 f_{msat} érték felett a beltenyésztett (IB) csoportba kerültek. Az NIB és IB csoportok tenyészegyedait külön-külön célzottan szaporítva hoztuk létre a kísérleti fertőzéshez használt F1 utódállományt (3.4. Táblázat). A tenyészegyedek beltenyésztettségében ivari különbségek is mutatkoztak. Míg a hímek több mint 40%-a beltenyésztettnek volt tekinthető, a nőstényeknél ez az érték 30% körül volt csupán (3.23. ábra).

A közeli rokon (REL) csoportot az msat adatokból származtatott, páros rokonság (pairwise relatedness, r_{msat}) értékek becslése alapján alakítottuk ki. Az egymással nem rokon szülőpárok

r_{msat} értéke 0,0002 alatt volt, a közeli rokon (testvér-szintű) pároknál 0,2 felett. A kialakított REL csoport hím-nőstény párjainak r_{msat} értéke 0,2208 és 0,4481 között változott.



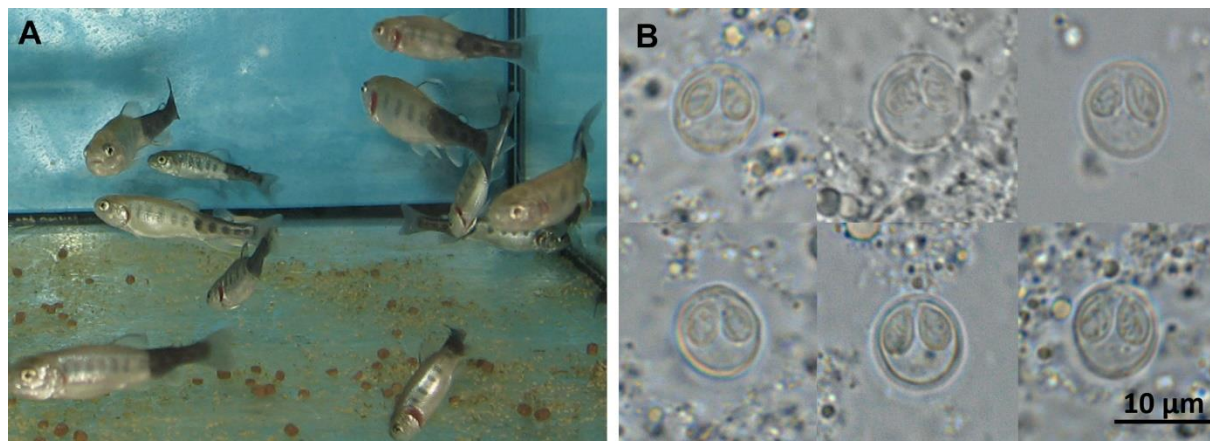
3.23. ábra: Sebes pisztráng tenyészállomány beltenyésztettsége és vérvonal összetétele. **A-B:** Az egyedi beltenyésztettségi együttható (f_{msat}) alapján az egyes beltenyésztettségi csoportok előfordulási gyakorisága mikroszatellitek vizsgálata alapján. A beltenyésztett csoportokat fekete oszlopokkal, a nem beltenyésztett csoportokat ($f_{\text{msat}} < 0,02$) pedig szürkével jelöltük. A fehér oszlopok a beltenyésztettség alapján átmenti zónába tartozó csoportot jelölik. (A) nőstény, (B) hím egyedek. **C-D:** vérvonalvizsgálat PCR-RFLP-vel (C) mtDNS CR gén és (D) LDH-C1 gén alapján. At: atlanti; Da: dunai; Hyb: atlanti-dunai hibrid.

3.4. Táblázat: A *M. cerebralis* fertőzési kísérlethez felhasznált, mikroszatellit és beltenyésztettségi szint alapján elkülönített, sebes pisztráng (BT) csoportok főbb jellemzői. A szívárványos pisztráng (LRBT) csoport a kísérlet pozitív kontrollja volt.

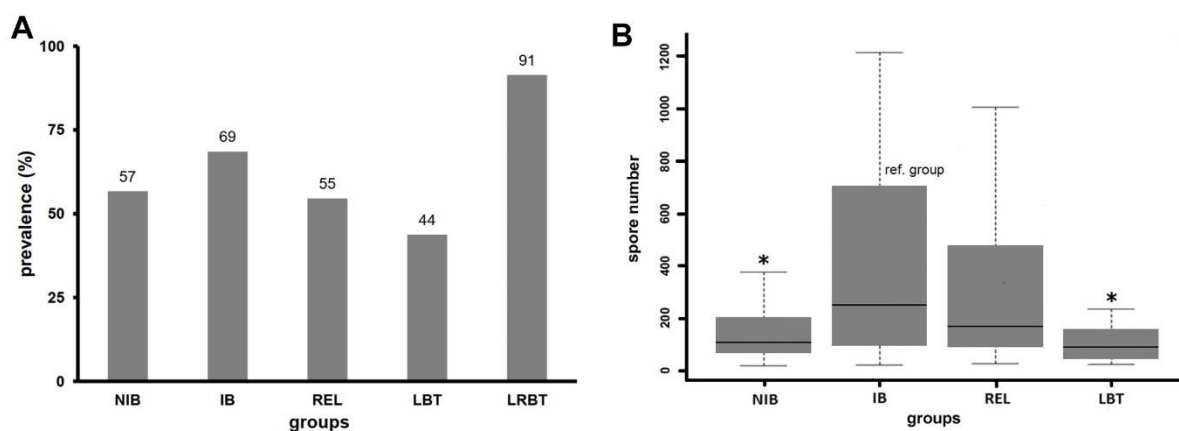
Csoport azonosító	Leírás	Faj	Származás
NIB	nem beltenyésztett (heterozigóta egyedek)	sebes pisztráng	Aufseß, Németország
IB	beltenyésztett (homozigóta egyedek)	sebes pisztráng	Aufseß, Németország
REL	rokon (heterozigóta, de közeli rokon hím-nőstény párok)	sebes pisztráng	Aufseß, Németország
LBT	atlanti-dunai hibrid	sebes pisztráng	Lillafüred, Magyarország
LRBT	pozitív kontroll	szívárványos pisztráng	Lillafüred, Magyarország

A fertőzési kísérlethez felhasznált, F1 utódgeneráció beltenyésztettségének ellenőrzése során az NIB f_{msat} értéke 0,0002 és 0,3414 között, az IB utódcsoportban 0,0004 és 0,1353 között változott. A *M. cerebralis*-sal kísérletesen fertőzött sebes pisztrángok egyik csoportjának egyedei sem mutattak klinikai tüneteket, míg a kontroll csoport szívárványos pisztrángok között

a farokúszó sötét elszíneződése és egyes egyedeknél a jellegzetes forgó mozgás is megfigyelhető volt 1-1,5 hónappal a fertőzés kezdetét követően (3.4. Táblázat, 3.24. A ábra). Az érett myxospórák a kísérlet negyedik hónapjában voltak kimutathatók (3.24. B ábra). A nem fertőzött, negatív kontroll szivárványos és sebes pisztráng állományok nem mutattak klinikai tüneteket, és myxospórák sem voltak detektálhatók bennük.



3.24. ábra: *M. cerebralis* fertőzési kísérletben (A) klinikai tüneteket mutató szivárványos pisztráng állomány (pozitív kontroll) 1,5 hónappal a fertőzést követően, és (B) fertőzött szivárványos és sebes pisztráng egyedekből származó *M. cerebralis* myxospórák.



3.25. ábra: *In vivo* kísérletben, sebes pisztráng csoportok *M. cerebralis* fertőzöttségének (A) prevalenciája, és (B) átlagos intenzitása. *szignifikáns különbség a referenciának tekintett beltenyésztett (IB) csoporthoz képest ($p < 0,005$). NIB: nem beltenyésztett csoport; IB: beltenyésztett; REL: közeli rokon egyedek csoportja; LBT: atlanti-dunai hibrid vérvonalú egyedek csoportja. Pozitív kontroll: szivárványos pisztráng (LRBT).

A kísérlet végén a fej és a gerinc szöveteinek homogenizátumában számlálással becsült parazita spóraszámok alapján a fertőzés prevalenciája 44 és 69% között alakult a sebes pisztráng (BT) állományokban, de az eltérés nem volt szignifikáns a csoportok között (3.25. A ábra). A fertőzés intenzitása már látványosabb különbségeket mutatott (3.25. B ábra). A sebes pisztráng csoportok közül a legnagyobb átlagos myxospóra számot az IB csoportban

mutattuk ki ($274 \pm 344,54$; átlagos spóraszám $\pm$ SD), míg az atlanti-dunai hibrid csoportban (LBT) volt a legalacsonyabb ($52 \pm 85,41$). Az NIB és a REL csoportok a két szélsőség között helyezkedtek el ($91 \pm 126,98$ és $174 \pm 274,72$). A pozitív kontroll, LRBT szivárványos pisztráng csoport a magas myxospóra számmal és az extrém szórással is kiemelkedett a többi csoport közül ($8517 \pm 25793,39$). A beltenyésztett (IB) csoporthoz viszonyítva a fertőzés átlagos intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt a nem beltenyésztett, NIB és az atlanti-dunai hibrid, LBT csoportban ($p < 0,005$). A REL és az IB csoport között szignifikáns eltérés nem volt kimutatható.

Vér szerepe a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* fertőzőttségben (Sipos et al. 2018)

A *M. cerebralis*-specifikus qPCR alkalmazásakor a Kelley et al. (2004) által leírt 88 bp hosszú 18S rDNS termék helyett, 178 bp hosszú DNS fragmentumot kaptunk, amit DNS szekvenálással is igazoltunk. A mintavételek során néhány halból, a halak kis mérete és az altatás során bekövetkező vérnyomás csökkenés miatt, nem sikerült vért venni, ezért az összes kísérletbe vont hal számához képest, a vizsgált (mintázott) halak száma a sebes és szivárványos pisztrángok 1 napos csoportja esetében alacsonyabb volt (3.5. Táblázat). Érdekes módon a *M. cerebralis* vérben való jelenléte kimutatható volt mindkét halfaj esetében. A negatív kontroll egyedek qPCR-rel mind negatívak voltak.

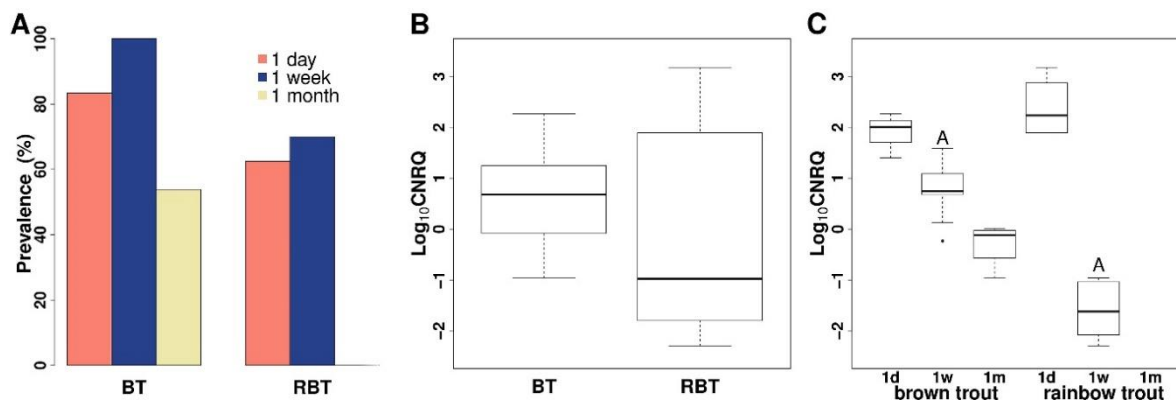
3.5. Táblázat: Pisztrángfélék vérében a kísérlet során kimutatott *M. cerebralis* fertőzés prevalenciája és qPCR adatokból származtatott relatív intenzitása. A fertőzés relatív intenzitásának becslése a kalibrált, normalizált relatív mennyiségi értékek logaritmusával ($\log_{10}\text{CNRQ}$) történt.

Halfaj	Időpont (p.e.)	$\log_{10}\text{CNRQ}$			Fertőzött /összes hal (db)*	Prevalencia (%)
		Min – Max	Medián	SD		
sebes pisztráng	1 nap	1,4 – 2,26	2,01	0,440	5/6	83,33
	1 hét	-0,23 – 1,59	0,74	0,580	9/9	100
	1 hónap	-0,96 – 0,02	-0,12	0,400	7/13	53,85
szivárványos pisztráng	1 nap	1,889 – 3,173	2,232	0,619	5/8	62,5
	1 hét	-2,292 – -0,957	-1,619	0,580	7/10	70
	1 hónap	0	0	0	0/12	0

0: nem mutattunk ki parazitát; *néhány esetben (pl. sebes és szivárványos pisztráng 1 napos mintavétel) nem minden egyedből tudtunk vért venni a halak kis mérete és az altatás okozta vérnyomáscsökkenés miatt, ezért a minták száma alacsonyabb a többi csoport mintaszámához képest.

A fertőzés prevalenciája szignifikánsan eltért a sebes és szivárványos pisztrángban (Chi-négyzet próba, $p=0,015$); több sebes pisztráng egyed volt fertőzött a parazitával, mint szivárványos pisztráng (3.5. Táblázat; 3.26. A ábra). Egy hónappal a fertőzést követően a fertőzés prevalenciája szivárványos pisztrángban nullára csökkent, pontosabban a parazita mennyisége a qPCR kimutatási határa alá került (3.26. A ábra). A fertőzés intenzitása a sebes pisztrángban összességében magasabb volt, mint szivárványos pisztrángban (3.26. B ábra), bár ez a különbség a magas szórás miatt és a fejlődés különböző stádiumaiban mért nagyon

eltérő értékek miatt nem volt szignifikáns. A fertőzés intenzitása folyamatosan csökkent a fejlődés előrehaladtával. Egy héttel a fertőzést követően a két halfajban kimutatott fertőzési intenzitás szignifikáns mértékben eltért (Welch-próba, $p < 0,001$; 3.26. C ábra). Szintén szignifikánsnak tekinthető a különbség 1 hónappal a fertőzést követően, amikor szivárványos pisztrángban a fertőzés intenzitása már a detektálási küszöb alá került (3.26. C ábra).



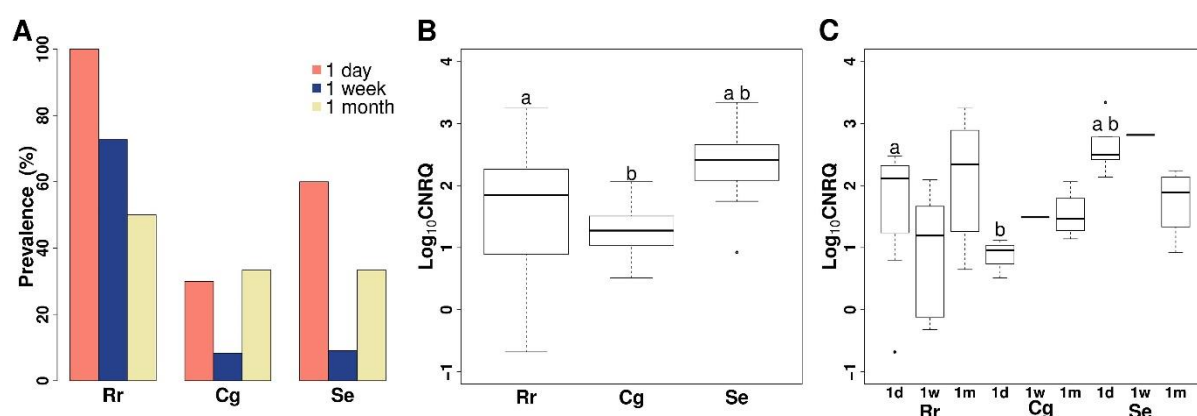
3.26. ábra: *M. cerebralis* fertőzés eredménye sebes pisztráng (BT) és szivárványos pisztráng (RBT) vérében 1 nappal, 1 héttel és 1 hónappal a fertőzést követően. **A:** a fertőzés prevalenciája; **B:** a fertőzés intenzitása halfajok közötti összehasonlításban; **C:** fertőzés intenzitásának dinamikája a különböző mintavételi időpontokban halfajonként. (A) szignifikáns különbség $p < 0,001$. A fertőzés relatív intenzitásának becslése a qPCR adatokból származtatott, kalibrált, normalizált relatív mennyiségi értékek logaritmusával ($\log_{10}\text{CNRQ}$) történt.

3.6. Táblázat: Pontyfélék vérében kimutatott *M. pseudodispar* fertőzés prevalenciája és qPCR adatokból származtatott, relatív intenzitása két fertőzési kísérletben. A fertőzés relatív intenzitásának becslése a kalibrált, normalizált relatív mennyiségi értékek logaritmusával ($\log_{10}\text{CNRQ}$) történt.

Halfaj	Időpont (p.e.)	log ₁₀ CNRQ			Fertőzött /összes hal (db)*	Prevalencia (%)
		Min – Max	Medián	SD		
Kísérlet 1						
bodorka	1 nap	-0,68 – 2,47	2,12	0,99	10/10	100
	1 hét	-0,32 – 2,10	1,19	0,97	8/11	72,73
	1 hónap	0,65 – 3,25	2,35	1,10	5/10	50
ezüstkárász	1 nap	0,51 – 1,12	0,96	0,31	3/10	30
	1 hét	1,49 – 1,49	1,49	-	1/12	8,33
	1 hónap	1,14 – 2,06	1,47	0,39	4/12	33,33
vörösszárnyú keszeg	1 nap	2,14 – 3,34	2,50	0,41	6/10	60
	1 hét	2,82 – 2,82	2,82	-	1/11	9,09
	1 hónap	0,92 – 2,24	1,89	0,58	4/12	33,33
Kísérlet 2						
bodorka	1 nap	0,78 – 1,83	1,33	0,43	6/9	66,67
	1 hét	0,91 – 1,83	1,07	0,40	5/9	55,56
	1 hónap	0,11 – 2,79	1,54	0,87	8/10	80
dévérkeszeg	1 nap	1,23 – 1,33	1,28	0,07	2/9	22,22
	1 hét	0,91 – 1,69	1,30	0,55	2/9	22,22
	1 hónap	n.a.	n.a	n.a	n.a	n.a
vörösszárnyú keszeg	1 nap	2,20 – 3,95	2,58	0,64	6/9	66,67
	1 hét	1,79 – 5,62	2,74	1,36	6/9	66,67
	1 hónap	2,05 – 3,11	2,41	0,39	4/10	40

n.a.: nincs adat, -: nem releváns

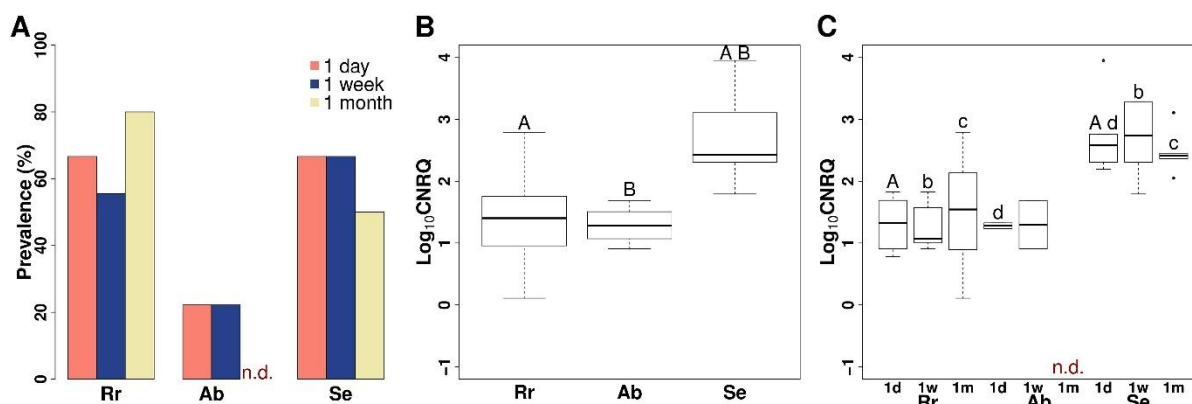
A *M. pseudodispar*-ral végzett 1. sz. kísérlet során a fertőzés prevalenciájában szignifikáns különbség mutatkozott a vizsgált halfajok között (Chi-négyzet próba, $p < 0,001$). Bodorkában szignifikánsan magasabb prevalenciát mutattunk ki, mint ezüstkárászban és vörösszárnú keszegben (3.6. Táblázat; 3.27. A ábra). A negatív kontroll egyedek qPCR-rel mind negatívak voltak. Érdekes módon a fertőzés összesített intenzitása, és az 1 héttel a fertőzést követő intenzitás a vörösszárnú keszegben volt a legmagasabb (3.27. B és C ábra). A fertőzés intenzitása szignifikánsan különbözött a vörösszárnú keszeg és az ezüstkárász között (Tukey teszt, összesített: $p = 0,041$ és 1 napos: $p = 0,016$), valamint vörösszárnú keszeg és bodorka között (összesített: $p = 0,043$). Viszont nem volt szignifikáns különbség bodorka és ezüstkárász között (3.27. C ábra). Egy héttel vagy 1 hónappal a fertőzést követően a fertőzés intenzitása nem volt szignifikánsan eltérő a halfajok között. A *M. pseudodispar* fertőzés időbeli alakulásában nem volt megfigyelhető tendencia, annak szintje a kísérlet ideje alatt közel azonos szinten maradt (3.27. C ábra).



A *M. pseudodispar* 2. sz. kísérletben a fertőzés prevalenciája szintén szignifikánsan eltérő volt halfajonként (Chi-négyzet próba, $p < 0,001$). Alacsonyabb prevalencia volt kimutatható dévérkeszegben, mint bodorkában és vörösszárnú keszegben (3.6. Táblázat; 3.28. A ábra).

A fertőzés intenzitása halfajonkénti összesítésben az 1. sz. kísérlethez hasonlóan a vörösszárnú keszegben szignifikánsan magasabb volt, mint a másik két vizsgált halfajban (3.28. B ábra). Dévérkeszegben és bodorkában a fertőzés intenzitása hasonló volt, szignifikáns különbség nem volt kimutatható. A fertőzés intenzitása ebben a kísérletben is közel azonos szintű volt, bár halfajonként ez a szint eltért. Vörösszárnú keszegben

szignifikánsan magasabb volt a vérben kimutatott paraziták mennyisége a másik két halfajhoz képest szinte minden mintavételi időpontban (kivétel dévérkeszeg és vörösszárnyú keszeg 1 hetes fertőzöttségének összehasonlításában) (3.28. C ábra).



3.28. ábra: *M. pseudodispar* 2. sz. fertőzési kísérlet eredménye bodorka (Rr), dévérkeszeg (Ab) és vörösszárnyú keszeg (Se) vérében 1 nappal, 1 héttel illetve 1 hónappal a fertőzést követően. **A:** a fertőzés prevalenciája mintavételi időpontokként és halfajonként; **B:** a fertőzés intenzitása halfajok közötti összehasonlításban; **C:** fertőzés intenzitásának dinamikája a különböző mintavételi időpontokban halfajonként. Szignifikáns különbség jelölése: (A) $p=0,002$; (b) $p=0,035$; (c) $p=0,02$; (d) $p=0,015$. A fertőzés relatív intenzitásának becslése a qPCR adatokból származtatott, kalibrált, normalizált relatív mennyiségi értékek logaritmusával ($\log_{10}\text{CNRQ}$) történt. n.d.: nincs adat.

3.3. Fertőzés elleni védekezés; gyakorlati alkalmazhatóság

„Csalihal” alkalmazásának lehetőségei (Kallert et al. 2009)

A kísérleti eredményre alapozva, mely igazolta, hogy a *M. cerebralis* gazdafelismerése és gazdába való bejutása nem halfaj-specifikus reakció (3.2.3. alfejezet, Kallert et al. 2009), *in vivo* kísérleti rendszerben vizsgáltuk „csalihal” alkalmazásának lehetőségét a fogékony halállomány fertőződésének megakadályozására. *M. cerebralis* esetében a pontyot mint csalihalat használtuk a parazita TAM-ok „előkezeléséhez” a TL szivárványos pisztráng fertőzést megelőzően. Az előkezelés nélküli TAM-mal fertőzött, kontroll pisztráng csoportban az átlagos myxospóra szám egységnyi térfogatú homogenizátumban $3,88 (\pm 0,54 \text{ SEM})$ volt, míg a ponty csalihallal inkubált TAM-mal való fertőzés eredményeként $1,74 (\pm 0,36 \text{ SEM})$. A ponttyal való „előinkubálás” fertőzési intenzitást csökkentő hatása erősen szignifikáns ($p<0,005$) volt a kontrollhoz képest.

Nyálkaspórás fertőzés akadályozása „csali vegyülettel” (Kallert et al. 2014)

Az inozin-arginin sóoldat (IA) mindkét *in vitro* tesztben nagyobb aktiváló hatást váltott ki a parazita TAM-ra mint az inozin (Ino) önmagában (3.7. Táblázat). A negatív kontroll (víz) által kiváltott aktiváló hatás minden esetben szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a pozitív kontroll halnyálka kivonat hatása ($p<0,05$) (3.7. Táblázat).

3.7. Táblázat: *M. cerebra*lis és *M. pseudodispar* actinospórákon (TAM-ok) végzett *in vitro* aktivációs tesztek eredménye a poláris filamentum kilökődés és a sporoplazma kijutás átlagos aránya (%-ban) alapján. Az **(A)** 1. sz. tesztet 6-6 párhuzamos mintával, **(B)** a 2. sz. tesztet fajonként 12 mintával végeztük. A TAM-ok aktiválására különböző koncentrációjú inozin (Ino) és inozin-arginin oldatot (IA), halnyálka kivonatot (pozitív kontroll) és vizet (negatív kontroll) használtunk. N: összes vizsgált TAM. * szignifikáns különbség a negatív kontrollhoz képest ($p < 0,05$).

	Poláris filamentum kilökődés (átlag, %)	+/- SEM	Sporoplazma kijutás (átlag, %)	+/- SEM	N (db)
(A) In vitro teszt 1					
<i>M. cerebra</i>lis					
Negatív kontroll	12,12	2,24	0	-	165
Ino 0,5 mg/ml	27,75	3,65	9,56*	3,63	251
IA 0,05 mg/ml	31,06	4,49	12,31*	4,52	268
Halnyálka kivonat	32,56*	2,13	14,34*	6,21	251
<i>M. pseudodispar</i>					
Negatív kontroll	6,92	2,82	0	-	159
Ino 0,5 mg/ml	11,29*	3,15	28,74*	8,19	174
IA 0,05 mg/ml	11,63*	1,87	35,82*	4,80	201
Halnyálka kivonat	18,03*	9,03	51,20*	7,0	125
(B) In vitro teszt 2					
<i>M. cerebra</i>lis					
Negatív kontroll	22,50	6,76	0	-	195
Ino 0,1 mg/ml	36,36*	4,38	2,76*	1,52	181
IA 0,01 mg/ml	27,16	4,40	1,62*	0,87	243
IA 0,1 mg/ml	58,27*	2,36	3,62*	1,33	219
Halnyálka kivonat	38,67*	5,08	6,22*	1,30	193
<i>M. pseudodispar</i>					
Negatív kontroll	7,32	2,68	2,38	1,20	252
Ino 0,1 mg/ml	11,95	2,50	22,53*	3,75	342
IA 0,01 mg/ml	15,73	3,12	17,08*	3,68	267
IA 0,1 mg/ml	38,64*	7,91	30,34*	3,86	379
Halnyálka kivonat	34,62*	3,84	43,65*	5,31	323

Az első kísérletben viszonylag alacsony aktiválási arányt tapasztaltunk a poláris filamentum kilökődésének vizsgálata alapján. A sporoplazma kijutás vizsgálatakor fajspecifikus különbségek voltak megfigyelhetők. Nagyobb arányú sporoplazma kijutás volt kimutatható *M. pseudodispar* esetén, mint *M. cerebra*lis-nál (3.7. A Táblázat). A sporoplazma kijutás aránya a pozitív kontroll esetében volt a legmagasabb mindkét parazita fajnál.

A második kísérletben, alacsonyabb koncentrációjú IA és Ino oldatok alkalmazása mellett is, az IA oldat aktiváló hatása mindkét fajnál szignifikánsan nagyobb volt, mint az azonos

koncentrációjú (0,1 mg/ml) Ino oldatának ($p<0,05$) (3.7. B Táblázat). A *M. pseudodispar* poláris filamentuma kilökődésének vizsgálata során az Ino oldatnál 10-szer hígabb (0,01 mg/ml) IA használatával is szignifikánsan nagyobb hatást lehetett elérni ($p<0,05$). A 0,1 mg/ml IA oldat pedig a pozitív kontrollnál is jobban teljesített mindkét fajnál; a *M. cerebralis*-nál megfigyelt 20%-os különbség már szignifikáns volt ($p<0,05$) (3.7. B Táblázat). A sporoplazma kilökődés aránya minden esetben szignifikánsan magasabb volt a negatív kontrollhoz képest ($p<0,001$).

Az *in vitro* kísérleti eredmények alapján, 0,01 mg/ml Ino és 0,018 mg/ml IA oldat TAM aktiváló hatását vizsgáltuk *in vivo* kísérletben. Az Ino vagy IA oldattal fertőzés előtt nem kezelt *M. pseudodispar* TAM-mal fertőzött bodorkák (kontroll csoport) közül 10-ből 4 maradt életben, amelyekben az átlagos myxospóra szám 181250 db/ml homogenizátum $\pm$ 38500 SEM volt. Az Ino oldattal előkezelt TAM-okkal fertőzött bodorkákban ($n=7$) az átlagos myxospóra szám 200000 db/ml $\pm$ 88250 volt, míg az IA oldattal kezelt csoportban ($n=7$) ez az érték 90000 $\pm$ 43750 volt. A kontrollhoz képest az IA oldattal történő kezelés esetén a fertőzés intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt ($p<0,05$). Az IA és Ino oldatok hatása között a nagy szórás miatt nem volt szignifikáns a különbség (t-teszt, $p=0,28$).

4. MEGBESZÉLÉS

A nyálkaspórások kutatásával 19. századi első kimutatásuk óta több száz parazitológus foglalkozott, ám a tanulmányok többsége fajok leírására, jellemzésére, és gerinces gazdában való előfordulásuk kérdéskörére koncentrált. Ez alól talán csak a kórtani jelentőséggel bíró fajok voltak kivételek, amelyek esetében a gazdát (elsősorban halakat) érintő fertőzés következtében kialakult betegség klinikai tüneteit, az elváltozások jellegét vizsgálták, illetve a diagnosztika, a megelőzés, és a kezelés lehetséges módjait keresték. A sok szempontból alapműnek számító Shulman (1966) monográfiát, a 2000-es években spóramorfológia, gazdakör, és szervi/szöveti lokalizáció tekintetében aktualizálták számos nemzetség esetében, kiegészítve a listákat az eltelt évtizedek alatt leírt több száz új fajjal: *Myxobolus* (Eiras et al. 2005, 2014), *Henneguya* (Eiras 2002, 2012); (Eiras & Adriano 2012), *Thelohanellus* (Zhang et al. 2013), *Ceratomyxa* (Eiras 2006), *Chloromyxum* (Eiras et al. 2012), *Sphaeromyxa* (Whipps & Zhao 2015), *Myxobilatus* (Rangel et al. 2014). Ezekben az összefoglaló művekben már helyet kaptak olyan korábban leírt fajok is, melyek „újra-leírása” molekuláris biológiai jellemzése alapján történt meg. A taxonómiai vizsgálatoknak nagy lendületet adott a nyálkaspórások életciklusának tisztázása, aminek alapján világossá vált, hogy egy adott nyálkaspórás faj két gazdában fejlődik, és két teljesen eltérő spóratípussal rendelkezik. Ettől kezdve a molekuláris és filogenetikai vizsgálatok a fajok életciklusának azonosításában is fontos szerepet játszottak (lásd később részletesen a 4.1. alfejezetben) (Eszterbauer et al. 2015a). Az azonosított életciklusok száma pillanatnyilag 47 (1.1. Táblázat), ezek közül azonban csak 5 faj (*M. cerebralis*, *M. pseudodispar*, *M. parviformis*, *Ceratonova shasta*, *Tetracapsuloides bryosalmonae*) teljes életciklusát sikerül *in vivo* laboratóriumi körülmények között fenntartani (Eszterbauer et al. 2015a). Az 5 fajból kettő (*M. cerebralis* és *M. pseudodispar*) életciklusa, a világon egyedülként, saját laboratóriumunkban elérhető. A *Sphaerospora molnari* és három *Enteromyxum* faj (*E. leei*, *E. scopthalmi*, *E. fugu*) életciklusának halon belüli fejlődése (fejlődési alakok halról-halra való átvitelével) tartható fent laboratóriumi körülmények között (Eszterbauer et al. 2015a, Korytář et al. 2019).

A rendkívül munka- és időigényes tenyésztés a legtöbb faj esetében nem megoldott. Egy könyvfejezet keretein belül foglaltuk össze ismereteinket a nyálkaspórások életciklusáról, a fejlődést befolyásoló tényezőkről, az *in vivo* és *in vitro* laboratóriumi tenyésztés lehetőségeiről és korlátairól (Eszterbauer et al. 2015a). A jelen dolgozatban összegzett kutatások alapját képezi az a lassan két évtizedre visszatekintő tapasztalatgyűjtés, módszertani fejlesztés, tesztelés és optimalizálás, ami szükséges volt ahhoz, hogy a parazita gazdáit (halakat és kevésértéjű férgeket) azonosításuk után szaporítani és SPF körülmények között nevelni tudjuk. Továbbá, hogy képesek legyünk a parazita időzített átvitelére egyik gazdáról a másikra, akár egyedi fertőzés formájában is, és hogy megfelelő mintákat tudjunk szolgáltatni a

molekuláris biológiai, funkcionális genetikai, vagy akár szövettani alapú (pl. ISH) vizsgálatokhoz. Az *in vivo* laboratóriumi tenyésztés módszertanának fejlesztése tette számunkra lehetővé, hogy a nyálkaspórások (ezek közül is leginkább a kutatócsoportomban fenntartott két modell faj) fejlődésének olyan aspektusait tanulmányozzuk kísérletesen, mint a gazdafelismerés vagy a gazdára való fogékonyság fejlődéstani háttere, amik természetes fertőzöttségű gazdák esetén nem lettek volna ilyen mélységben vizsgálhatók.

4.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vizsgálatának megbeszélése

***Myxobolus* fajok és közeli rokonaik**

Az 1990-es évek végétől a molekuláris biológiai módszerek elterjedése nagy lendületet adott a nyálkaspórák paraziták taxonómiai jellegű vizsgálatának. Korábban a nyálkaspórák fajok leírása és rendszerezése kizárólag a gerinces gazdában fejlődő myxospórák morfológiai jellemzői alapján történt, és Wolf és Markiw (1984) mérföldkőnek számító munkájának publikálásáig nem is volt ismert, hogy a nyálkaspórások kétféle spóratípussal rendelkeznek. Ezért a gerinctelen gazdában fejlődő actinospórákat az 1990-es évekig külön fajként írták le (Stolc 1899, Janiszewska 1955, 1957, Marques 1982). A DNS alapú technikák (PCR, DNS szekvenálás) lehetőséget adtak az „actinospóra – myxospóra párok” azonosítására, és utat nyitottak a nyálkaspórák fajok rokonsági viszonyainak és evolúciós fejlődésének beható tanulmányozásához. A korai tanulmányokban adott élőhely vagy földrajzi terület actinospóra típusainak felmérő jellegű vizsgálata során a morfológiai változatosság kimutatása volt az elsődleges cél. Az 1990-es évektől a fertőzöttség prevalenciájának és szezonálisának vizsgálata is fókuszba került (Yokoyama et al. 1991, El-Mansy et al. 1998a, b, Xiao & Dessler 1998a, b, c, Özer et al. 2002, Negredo et al. 2003, Oumouna et al. 2003). A legtöbb vizsgálat, földrajzi elterjedéstől függetlenül igen alacsony (sokszor 1% alatti) fertőzöttséget mutatott ki kevésertéjű féreg gazdákban, néhány kivétellel, mint pl. a 33,3%-os *Aurantiactinomyxon pavinsis* fertőzöttség a skót felföld gyorsfolyású patakjaiban (Holzer et al. 2004). A gerinctelen gazdák actinospóra fertőzöttségét hosszabb ideig vizsgálva (akár 1 évig is) magasabb prevalencia volt kimutatható (Yokoyama et al. 1993, El-Mansy et al. 1998a, b), bár a fertőzöttség így is ritkán lépte át az 5%-os értéket. Saját vizsgálataink során (Eszterbauer et al. 2006) egy hazai természetes vízben (Tisza) és egy hazai halgazdaságban (TEHAG, Százhalombatta) előforduló kevésertéjű féreg fauna actinospóra fertőzöttségének összehasonlításakor jelentős különbséget mutattunk ki a természetes vízi és a halgazdasági *Branchiura sowerbyi* féreg állomány nyálkaspórák fertőzöttségének prevalenciája között (Tisza: 0,9% és TEHAG: 50%). Érdekes módon a *Tubifex* és *Limnodrilus* féreg fajoknál ez a tendencia fordított volt, ha nem is ilyen szélsőséges mértékben (Tisza: 1,7%, TEHAG: 0,26%). A TEHAG actinospóra fertőzöttségét korábban behatóan tanulmányozták El-Mansy et al.

(1998a). Az évtizedeken át alaposan tanulmányozott halfauna mellett a TEHAG kevéssértéjű féreg állományának actinospóra fertőzöttségét célzó vizsgálat azonban DNS alapú összehasonlítás nélkül zajlott, így saját vizsgálati eredményeinkkel csak spóramorfológia alapján volt összevethető a kimutatott actinospóra fauna. Bár fenotípusos bélyegek alapján kimutattunk hasonlóságokat, az actinospóra típusokra jellemző, sokszor fajon belüli morfológiai változatosság nem tette lehetővé El-Mansy et al. által megfigyelt típusokkal való azonosítást. Az általunk kimutatott 10 „genotípus” 14 különböző „morfotípust” takart. A spóra morfológiában mutatkozó különbség legtöbb esetben morfometriai eltérés volt. Voltak azonban olyan típusok is (pl. AUR 'B1' és 'B2'), melyek DNS szinten azonosak voltak, azonban jelentős alaki eltérést mutattak. Hasonló eredményt korábban aurantiactinomyxon esetében kimutattak már (Hallett et al. 2002). A DNS szekvencia szintű és filogenetikai összehasonlítás több „myxospóra – actinospóra pár” azonosítását tette lehetővé. A kimutatott raabeia típusú actinospóra 99,4%-os azonosságot mutatott az aranyhal kopoltyúívéen fejlődő, hazánkban eddig nem detektált *Myxobolus cultus* fajjal. Így közvetve elsőként igazoltuk a *M. cultus* hazai jelenlétét. Elsőként azonosítottuk a ponty belső szerveiben fejlődő *Thelohanellus hovorkai* actinospóra típusát (aurantiactinomyxon 'A'), az aranyhal epehólyagjában spórát képező *Zschokkella* faj guyenotia típusú actinospóráját, valamint a bodorka úszóján, a bőralatti kötőszövetben fejlődő *Myxobolus woottenii* triactinomyxon típusát (TAM 'D'). Utóbbi faj leírása később történt meg a myxospóra teljes jellemzését követően (Molnár et al. 2010). Fejlődési kísérlettel korábban már igazoltuk, és a halgazdaság *Tubifex* állományában is kimutattunk triactinomyxon típusú actinospórákat (TAM 'A', 'B', 'C'), melyek a pontyfélék izomzatában fejlődő *M. pseudodispar* actinospóra alakjának bizonyultak. Bár a gazdaság halfaunája parazitológiai szempontból jól tanulmányozottnak volt tekinthető, a vártnál kevesebb spóra párt sikerült azonosítanunk. Ennek oka lehet, hogy kételtűek és hullók is a nyálkaspórások gerinces gazdái lehetnek, amelyek nyálkaspórás fertőzöttségét az adott területen még egyáltalán nem, de hazánkban máshol is legfeljebb csak esetleg vizsgálták eddig. Oka lehetett az is, hogy nem a megfelelő időpontban/évszakban történt a gerinctelen gazdák mintavétele, így sok esetben elmulaszthattuk az érett actinospórák kifejlődésének időszakát. Ezen túlmenően a nem elég specifikus PCR rendszer, vagy a myxospóra típus DNS szekvenciájának hiánya is okozója lehetett az alacsony arányú spóra párok kimutatásának. A 2000-es évek eleje volt a génbanki nyálkaspórás adatbázisok létrejöttének időszaka, a DNS szekvencia benyújtások száma ugyan erőteljesen növekvőben volt, de még viszonylag kisszámú kutatócsoport foglalkozott a szekvencia adatbázisok bővítésével. A Myxobolidae családba tartozó fajok DNS szekvenálásában és genetikai jellemzésében a világ élvonalába tartozunk kollégáimmal, az évek során több száz benyújtással növelve a génbank adatbázisát. Az actinospóra típusok felmérő vizsgálatával igazoltuk, hogy a spóramorfológia önmagában

nem elegendő adott nyálkaspórák faj actinospóra stádiumának jellemzéséhez, hanem a DNS szekvencia, és a gazdafaj azonosítása is elengedhetetlen része a pontos faj/típus leírásnak.

Az izomparazita nyálkaspórák, azok közül is a *M. pseudodispar* már a korábbi vizsgálatok alapján is különlegesnek volt tekinthető a fajon belüli nagyfokú genetikai variabilitás miatt. Az actinospóra stádiumok felmérő vizsgálata során detektált akár 3,6%-os különbség a 18S rDNS szekvenciában megerősítette a myxospórákon korábban végzett vizsgálatok eredményét, mely egyes esetekben 5% körüli különbséget mutatott ki pontyfélék *M. pseudodispar* izolátumai között (Molnár et al. 2002). Az izomzatban spórát képző nyálkaspórák esetében a fajon belüli genetikai variabilitás nem egyedülálló (Molnár et al. 2002, 2012, **Molnár & Eszterbauer 2015**). A főleg természetes fertőzöttségből származó *M. pseudodispar* izolátumok filogenetikai vizsgálata során öt, pontyfélékhez tartozó halfajból (bodorka, dévérkeszeg, karikakeszeg, vörösszárnýú keszeg, szélhajtó kűsz) származó 17-féle *M. pseudodispar* myxospóra izolátumot és a génbankban elérhető izolátumok szekvenciáit hasonlítottunk össze (**Forró & Eszterbauer 2016**). A rokonsági viszonyok alapján a halfaj szerinti elkülönülés szembetűnő volt, a legtöbb izolátum a gazdahalnak megfelelően öt főkládba csoportosult. Ezen eredmények egybeestek korábbi, kisebb mintaszámú vizsgálatunk eredményével (Molnár et al. 2002). Azonban az újabb vizsgálatban voltak kivételek, amelyek vagy másik halfaj csoportjában, vagy valamelyik klád külcsoporthaként helyezkedtek el a filogenetikai fán. A nagyobb elemszám valószínűsítette a kivételek megjelenését, és tekintve a csoportokon belüli és a csoportok közötti DNS szintű hasonlóságokat, a „csoporton kívüliek” megjelenése előre jelezhető volt. Az öt filogenetikai csoporton belül a 18S rDNS alapú genetikai azonosság 99,3-99,9% között mozgott, míg a csoportok között 95,2-98,8%-os azonosság mutatkozott, sok esetben átfedéssel a csoporton belüli értékekkel. A legtöbb nyálkaspórák faj esetében elfogadott, 1% körüli fajon belüli különbség a 18S rDNS szekvenciában (Molnár & Eszterbauer 2015) ennél a fajnál egyértelműen nem érvényesül, és felveti a kérdést, hogy a *M. pseudodispar* egy fajnak tekinthető-e, vagy több fajról van szó. A vizsgált izolátumok legtöbbször a Balatonból származott, ami egy hal- és nyálkaspórákfaunában gazdag vízterület (El-Mansy et al. 1998b, Molnár et al. 2002). A *M. pseudodispar* legtöbb ismert gazdája őshonos a tóban, és a gerinctelen kevéssértéjű féreg fauna is fogékony a parazitára. A parazitában gazdag élőhelyen a kevéssértéjű féreg gazdák gyakran többféle nyálkaspórák fajjal fertőzöttek egyidejűleg (El-Mansy et al. 1998b). A kevéssértéjű férgek a nyálkaspórák végleges gazdái, bennük zajlik a parazita ivaros szaporodási fázisa (Morris 2012, Feist et al. 2015). Ennek megfelelően elméletileg lehetséges, hogy a *M. pseudodispar* genetikai vonalak rekombinálódnak a végleges gazdában, így növelve a genetikai változékonyságot az izolátumok/genetikai vonalak között. A *M. pseudodispar* fertőzöttség magas prevalenciáját tekintve (akár 80% is lehet balatoni bodorkákban – személyes megfigyelés), nagy a valószínűsége, hogy genetikailag

eltérő vonalak „találkoznak”, ami teret adhat és felgyorsíthatja a fajképződés folyamatát. A paraziták eltérő evolúciós stratégiát követve alkalmazkodnak a megváltozott környezethez. Ez lehet gazdacseré (host-switch), vagy gazdaváltás (host-shift) (Rózsa et al. 2015). A gazdaváltás (host-shift) fokozatosan történik a természetben, és a parazita „különbséget tesz” elsődleges és másodlagos gazdák között. Az elsődleges gazda az, amihez a parazita megfelelő módon alkalmazkodott, és ez az a gazda, ami biztosítja a parazita túlélését. A másodlagos gazdához a parazita kevésbé adaptálódott, szaporodásának sikere is kevésbé függ ettől a gazdától. A kétféle gazda között azonban váltani tud a parazita, ha ezt a környezeti körülmények (pl. klímaváltozás, gazda elérhetősége stb.) megkívánják. A gazdacseré (host-switch) ennél jóval radikálisabb lépés. Ilyenkor egy teljesen új, korábban nem fogékony fajon telepszik meg a parazita, és akár nagymértékű taxonómiai ugrás is bekövetkezhet a gazdakörben (Rózsa et al. 2015). Gazdaváltás a *M. pseudodispar* esetében is bekövetkezhetett. A faj széles gazdaspektrummal rendelkezik, korábbi és a jelen vizsgálat is megerősítette, hogy elsődleges gazdája a bodorka, ami egyben a faj eredeti, típus gazdája is. A gazdaváltás magyarázhatja azt is, hogy bizonyos izolátumok a gazdafajtól eltérő kládban helyezkednek el a filogenetikai fán. Elképzelhető, hogy ezekben az esetekben már megtörtént a gazdaváltás, de genetikailag (a megőrzött 18S rDNS alapján) még a korábbi elsődleges gazdához tartoznak. A *M. pseudodispar* német genetikai vonalon (lineage GER; Mp R-T50) végzett kísérleteink eredménye (3.2.1. alfejezet) azt mutatta, hogy ennek a genetikai vonalnak a bodorka az elsődleges, és a dévérkeszeg a másodlagos gazdája (míg genetikailag sem a bodorka, sem a dévérkeszeg kládhöz nem tartozik, a filogenetikai fán azok között helyeződött bazálisan). A dévérkeszegben jóval alacsonyabb prevalenciájú és intenzitású fertőzés volt indukálható kísérletesen, mint az elsődleges gazda, bodorka esetében. Viszont érett myxospórák alakultak ki dévérkeszegben, ellentétben a szintén kísérletesen vizsgált vörösszárnýú keszeggel, amelyben csak fejlődési alakok, érett myxospóra azonban nem volt detektálható. Ez alapján a vörösszárnýú keszeg nem tekinthető sem elsődleges, sem másodlagos gazdának, sokkal inkább egy fejlődési zsákutcának a kísérletesen vizsgált parazita genetikai vonal szempontjából. Az Mp T-50 genetikai vonal viszont csak egy a tucatnyi *M. pseudodispar* izolátum közül, melyek gazdaspektruma különböző mértékben ugyan, de valószínűsíthetően eltér a kísérletesen vizsgált genetikai vonalétól. Ezek alapján az is feltételezhető, hogy újabb vizsgálatokkal a gazdák köre tovább bővül (a közlemény megjelenése óta balinban, domolykóban is kimutattuk *M. pseudodispar* jelenlétét). A gazdaváltás lehetőségét a tengeri halak izomzatában fejlődő *Kudoa thyrsites* faj esetében is valószínűsítik (Whipps & Kent 2006). A szerzők nyolc különböző földrajzi régió *K. thyrsites* faunáját vizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy lokális populációk földrajzi elszigeteltsége váltotta ki a genetikai vonalak elkülönülését. A gazdaváltás kapcsán kérdés, hogy a másodlagos gazdában fejlődő myxospórák fertőzőképesek-e. Az általunk végzett

kísérletes fertőzés során a dévérkeszegben kifejlődött myxospórákkal nem sikerült megfertőzni fogékony kevésertéjű állományt, míg a bodorkából származó myxospórákkal a fertőzés minden esetben sikeres volt. Lehet, hogy egyszerűen csak a fertőzés intenzitásának szignifikáns különbsége, a dévérkeszegből kinyert kisszámú myxospóra miatt volt sikertelen a fertőzési kísérlet, de az is elképzelhető, hogy a gazdaváltás a kevésertéjű féreg gazda tekintetében is érvényesült. Eddigi ismereteink alapján úgy tűnik, hogy a *M. pseudodispar* nem egységes faj, hanem egy faj-komplex, hasonlóan a *Chloromyxum fluviatile* és a *Zschokkella nova* faj-komplexekhez (Lom & Dyková 1993, Fiala 2006, Bartošová & Fiala 2011). Azonban a faji határok mesterséges meghúzása nem egyszerű feladat. Fertőzési kísérletekkel tisztázható lenne az egyes genetikai vonalak gazdaköre, mely a faji szintű elkülönítést segítené, azonban a nyálkaspórák életciklus laboratóriumi fenntartásának korlátai erősen limitálják a lehetőségeket. Addig is javasolt a *M. pseudodispar sensu lato* megnevezés használata.

***Sphaerospora* fajok**

A molekuláris módszerek elterjedése a *Sphaerospora* nemzetség taxonómiáját is átrendezte. A *Myxobolus* fajokhoz képest még leegyszerűsödöttebb myxospóra morfológia (kerek, legtöbbször függelékek és felületi barázdák nélküli spórák) a faj szintű meghatározást nagyban nehezítik, és nemritkán előfordult hibás fajleírás is, melyek során *Sphaerospora*-ként írtak le nem a nemzetségbe tartozó fajokat. Az azonosítást nehezítette, hogy a nemzetség legtöbb képviselője cölizoikus élősködő (főleg a kiválasztó szervrendszerben képeznek spórát), így a szöveti lokalizáció (ami a *Myxobolus*-ok esetében fontos határozóbélyeg) nem szolgálhat támpontul az elkülönítés során. A nemzetség több faja olykor jelentős gazdasági károkat kiváltó betegségek okozója, így ezek etiológiájának és a kórokozó fajok taxonómiájának tisztázása különösen fontos. Munkánk során hazánkban gyakori fajok vizsgálatára koncentrálna, a pontyok úszóhólyag-gyulladását okozó *S. dykoveae* (korábbi nevén *S. renicola*), a pontyok kopoltyú sphaerosporosis-át előidéző *S. molnari*, és pontyfélék eddig nem vizsgált *Sphaerospora* fajainak azonosítására, morfológiai és molekuláris jellemzésére törekedtünk. Cseh kollégákkal együttműködve a mintavételezést és a vizsgálatokat ki tudtuk terjeszteni hazai tógazdaságok és természetes vizek mellett, Közép-Európa több természetes és gazdasági vízterületére. Elsőként végeztük el a *S. molnari* molekuláris biológiai jellemzését (Eszterbauer et al. 2013). Bár a faj kopoltyú hámszövetben képez spórát, és szöveti élősködőként „kilóg” a cölizoikus élősködőket magába foglaló *Sphaerospora s. str.* kládból, 18S rDNS szekvenciák elemzésével és filogenetikai számításokkal igazoltuk, hogy a *S. molnari* a szigorú értelemben vett *Sphaerospora* fajok közé tartozik. A nyálkaspórák között eddig ismert leghosszabb 18S rDNS-t azonosítottuk (3714 bp). A nyálkaspórák parazitákra jellemző, átlagosan 1900-2000 bp hosszú gén, a *Sphaerospora* fajokban

jelentősen hosszabb (3000 bp körüli), köszönhetően a nemritkán, 50-100 bp hosszú inzerteknek (Fiala 2006, Holzer et al. 2007). Az *S. molnari* esetében több olyan régióban volt inzert, ami más *Sphaerospora s. str.* fajnál nem fordult elő. Viszonyítási alap azonban még kevés volt 2013-ban. Fajspecifikus ISH rendszer segítségével nyomon követve a *S. molnari* proliferatív stádiumainak útvonalát a halgazdán belül, elsőként igazoltuk, hogy a vese- és kopolyúkapillárisokban, valamint a vese parenchimában is előfordul a parazita, fejlődése korai szakaszában. Hogy a spóráképzés miatt mégis a kopolyú hámszövetben zajlik, arra vonatkozóan csak elméleteink vannak. A ponty ivadékokban gyakori a *S. molnari* és a *S. dykova*e egyidejű jelenléte. A *S. dykova*e a vesecsatornában képez spórát, sokszor a csatorna lumenének teljes keresztmetszetét kitöltve érett spórákkal (amik a csatornán keresztül jutnak a külvilágba). Elképzelhető, hogy a *S. molnari* is cölizoikus veseelősködő volt korábban és evolúciós fejlődése során, terjedési sikerének biztosítása érdekében adaptálódott a kopolyúban való fejlődéshez. A gazdából való kijutás a kopolyúhám mikrosérülése révén így is biztosított a gazda „elpusztítása” nélkül. Elhullás azonban intenzív fertőzöttség esetén előfordulhat, ha a kopolyúhám sérülése relatív oxigénhiányt és/vagy ozmoregulációs zavart idéz elő a gazdában.

A pontyokban a *S. dykova*e által okozott úszóhólyag-gyulladás kórokozó képességének tanulmányozásakor felmerült annak lehetősége, hogy olyan nem fajspecifikus élősködőről van szó, ami képes spórát képezni ezüstkárászban és aranyhalban is. Cseh kollégákkal közös vizsgálatban ennek tisztázására a myxospórák morfológiai vizsgálata mellett, a különböző gazdafajokból származó izolátumok molekuláris összehasonlítását és a véralakok molekuláris azonosítását elvégezve meglepő eredményeket kaptunk (**Holzer et al. 2013**). Az aranyhalból és ezüstkárászból származó izolátumok 18S rDNS szekvenciája eltért a ponty *S. dykova*e DNS szekvenciájától, így előbbi a korábban ezüstkárász veséből leírt *S. angulata* fajként azonosítottuk. A 18S rDNS mindkét faj esetében hosszú inzerteket tartalmazott, továbbá filogenetikailag legközelebbi rokonokként megerősítette pozíciójukat a *Sphaerospora s. str.* kládon belül. A morfológiai paraméterek összehasonlító elemzése azonban egyértelművé tette, hogy a két faj érett spórái nem elkülöníthetőek. Viszont a „fiatal”, még nem érett spórák héjsejtjeinek nagyméretű sejtmagja miatt a *S. angulata* spórái kissé szögletesek, ez azonban csak a spóráképzés elején kimutatható morfológiai különbség. Eredményeink újabb bizonyítékot szolgáltatottak arra, hogy az extrém módon leegyszerűsödött, 6 sejtű myxospórák morfológiai alapú elkülönítésének nehézségei miatt molekuláris jellemzés nélkül a faj meghatározás nem megbízható. Eddigi eredményeink alapján nem tudjuk eldönteni, hogy a morfológiai jellegek konvergens evolúciója, vagy evolúciós léptékben mérve nemrégiben történt gazdaváltás következtében különült el a két faj (*S. dykova*e és *S. angulata*). Az előbbi lehetőség mellett szól, hogy a cölizoikus veseparaziták esetében a kerek, leegyszerűsödött spóraszerkezet előnyt jelenthet a vesecsatornában való fejlődés és az abból való kijutás során.

A gazdaváltás szintén reális lehetőség, hiszen az érintett pontyfélék gyakran fordulnak elő közös élőhelyen, hasonló életmódot folytatnak, így a *M. pseudodispar* esetében feltételezett gazdaváltás itt sem kizárható. A *Sphaerospora* fajokra általában szigorú gazdaspecificitás jellemző (McGeorge et al. 1996, Holzer et al. 2003, Fiala 2006, Fiala & Bartosová 2010, **Molnár & Eszterbauer 2015**). Eredményeink ezt megerősítik, a ponty és az ezüstkárász (valamint az aranyhal, ami többek szerint az ezüstkárász egy változata, nem külön faj) *Sphaerospora* fajának egyértelmű elkülönítésével. A gazdában előforduló nyálkaspórák véralakok vizsgálata a spórát képező fajok előfordulása mellett gazdafaj-idegen parazitákat mutatott ki. Véralakok vizsgálata *Sphaerospora* fajok esetében elengedhetetlen, hiszen ez az a parazita csoport, melynek proliferációs fejlődése a vérben zajlik, és különleges mozgású („táncoló”) véralakjai évtizedek óta kutatások tárgyát képezi (Csaba 1976, Molnár 1980, Molnár & Kovács-Gayer 1986, Baska & Molnár 1988, Hartigan et al. 2016). Amellett, hogy *S. angulata* véralakja kimutathatók voltak két ponty egyedben is (*S. dykoveae* csak pontyban fordult elő), rendszertanilag jóval távolabb álló halfajok parazitáinak DNS-ét is azonosítottuk a vizsgált halfajok vérében. A főleg pisztrángfélék koponya kapillárisában plazmódiumot képező *Myxobolus encephalicus* fejlődési alakja igen magas prevalenciával (17,6%) fordult elő pontyban, hasonlóan a *Myxobilatus gasterostei*-hez (10,6-11,8%), ami tüskés pikó vesecsatornában képez spórákat. A kapott eredmények azt valószínűsítették, hogy a nyálkaspórák fejlődési alakjai olyan halfajokban is előfordulhatnak, melyekben spórát nem képesek képezni. Ennek kísérletes fertőzéssel történő bizonyítását a későbbiekben végeztük (Sipos et al. 2018). A „gazdaidegen” parazita véralakok bizonyított jelenlétének a pontyok jelentős gazdasági kárral járó megbetegedésének, az úszóhólyag-gyulladás etiológiájának szempontjából is lehet jelentősége. Az úszóhólyag-gyulladást az okozza, hogy az úszóhólyag kapillárisokat a parazita véralakok eltömik, vérpangást és közvetve gyulladást idéznek elő, ami az úszóhólyag falának megvastagodásával, a szerv részleges vagy akár teljes funkcióvesztésével járhat. Vizsgálataink eredménye alapján elsőként vetettük fel annak lehetőségét, hogy a *S. dykoveae* soksejtes, elsőként „K-protozoon”-ként leírt (Molnár et al. 1980) véralakjai mellett egyéb nyálkaspórák (akár távoli rokon) fajok véralakjai is szerepet játszhatnak az elváltozások kialakulásában.

A *Sphaerospora* s. str. klád biodiverzitását, rokonsági viszonyait és gazdafajlagosságát cseh kollégákkal együttműködésben vizsgálva kilenc új fajt írtunk le és jellemeztünk elsősorban pontyfélékhez tartozó gazdafajokból (**Patra et al. 2018**). A munka nehézségét elsősorban a *Sphaerospora* fajokra jellemző egyedi, hosszú inzerteket tartalmazó 18S rDNS felsokszorozását lehetővé tevő PCR módszerek kidolgozása és optimalizálása jelentette. A megfelelő rendszerek alkalmazásával végül, a *Sphaerospora* s. str. klád molekulárisan jellemzett 19 tagú csoportját 36 tagúra sikerült bővítenünk. A 18S rDNS-ben azonosított faj-specifikus, hosszú inzertek miatt a fajok nagy genetikai változatosságot mutattak (1,87-

59,00%). Azonban fontos kiemelni, hogy egy-egy inzert létrejötte akár egy egyszeri mutációs esemény eredménye is lehet. A Közép-Európában előforduló pontyfélék *Sphaerospora* faunájának biodiverzitása a korábban említett epidemiológiai okok miatt is fontos. Bár Baska és Molnár (1988) számos halfajban (főleg pontyfélékben) mutatott ki *Sphaerospora* fajra emlékeztető véralakokat, azok faji szintű azonosítása morfológiai alapon nem volt lehetséges. Munkánk eredményeként sikeresen elvégeztük számos pontyféléből (bodorka, dévérkeszeg, vörösszárnú keszeg, karikakeszeg, domolykó, jászkeszeg stb.) származó *Sphaerospora* faj molekuláris jellemzését, melyek közül hatot új fajként írtunk le. Az új adatok megerősítették korábbi eredményeinket, hogy azok a morfológiai alapon azonosnak tűnő *Sphaerospora* fajok, amik különböző gazdából származnak, DNS szinten jól elkülönülnek, így külön fajnak tekinthetők. A filogenetikai vizsgálatok eredménye alapján a *Sphaerospora* s. str. klád egy újabb szöveti élősködővel bővült; a korábban azonosított *S. molnari* mellett a bélhámában fejlődő, a filogenetikai fán bazálisan helyeződő *S. fugu* is a klád tagjai közé került. Ez viszont azt jelzi, hogy az evolúció során a cölizoikus lokalizációról kétszer is történhetett váltás a szöveti lokalizációra a *Sphaerospora* fajok között. Az, hogy ez megtörtént-e és így zajlott-e, olyan kérdés, amit további fajok molekuláris jellemzésével és filogenetikai vizsgálatával van esély megválaszolni. Az ismert fajok alapján erre számos lehetőség van. A leírt kb. 102 fajból eddig csupán alig több mint harmadának ismert a 18S rDNS szekvenciája.

4.2. Gazda–parazita kölcsönhatás vizsgálatának megbeszélése

A gazda-parazita kölcsönhatás több aspektusát vizsgálatuk a dolgozat alapját képező kutatások során. A gerinctelen és gerinces gazdák körét, a parazita spóráképzésének szöveti és szervi specificitását nemcsak természetes fertőzöttségű gazdákon, hanem kísérleti körülmények között megfertőzött gazdákon is tanulmányoztuk. Ezenkívül a két laboratóriumban fenntartott fajjal, a *M. pseudodispar*-ral és a *M. cerebralis*-szal végzett kísérletekben vizsgáltuk a gazdafelismerés menetét, annak befolyásoló tényezőit, valamint a gazdák parazitára való fogékonyságának hátterét.

Parazita gazdaspektrum

Korábbi (többek között saját) vizsgálatok igazolták, hogy gerinctelen gazdáiban jelenlévő, természetes nyálkaspórák fertőzés prevalenciája általában igen alacsony, gyakran az 1%-ot sem éri el (El-Mansy et al. 1998a, b, Eszterbauer et al. 2006). Ilyen alacsony prevalenciánál, nehéz pontos képet kapni a fogékony gazdák köréről, ezért jól működő, magas fertőzési hatékonyságú, sok lehetséges gazdafajt magába foglaló kísérleti rendszerek szükségesek a gazdakör feltérképezéséhez. Emiatt több kevéssértéjű féregállományon végzett, átfogó kísérletben vizsgáltuk a *M. pseudodispar* fogékony gerinctelen gazdáinak körét, és a gerinctelen gazdáiban zajló fejlődés menetét (Marton & Eszterbauer 2012). A gazdakör

azonosításához először a kevésértéjű féregállományok faji összetételének megállapítására volt szükség. Mivel a kevésértéjű férgek pontos meghatározása morfológiai bélyegek alapján csak kifejllett egyedeken történhet (Brinkhurst 1963), a vizsgálatot kiegészítettük a morfológiailag eltérő fajúnak tűnő egyedek 16S rDNS szekvenciájának meghatározásával, és az ismert DNS szekvenciák alapján elvégeztük a Naididae (azok közül is a korábban Tubificidae-be sorolt nemzetségek és fajok) család filogenetikai elemzését is. A korábbi kísérletes vizsgálatok során azonosított féreg gazdák (*Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri*) mellett (Székely et al. 1999), elsőként igazoltuk, hogy a *Psammoryctides barbatus* és a *Potamotrix moravicus* fajok fertőződnek *M. pseudodispar*-ral, és a parazita spórát is képez bennük. A vizsgált féregállományok két leggyakoribb faja a *T. tubifex* és a *L. hoffmeisteri* volt. A *T. tubifex* kozmopolita, édesvízi kevésértéjű féreg faj. A morfológiai bélyegek nagyfokú variabilitása miatt, a faji szintű meghatározás meglehetősen bonyolult. Sturmbauer et al. (2001) DNS szekvencia szintű vizsgálatokkal hat genetikai vonalat különítettek el. A morfológiai és DNS szintű variabilitás miatt a „gyűjtőfaj” taxonómiai felülvizsgálatát javasolták (Beauchamp et al. 2001, Sturmbauer et al. 2001). A *T. tubifex* genetikai vonalak *M. cerebralis* fajra való fogékonyosságát vizsgálva Beauchamp et al. (2002) a I. és III. vonalat találta fogékonyak a kergekórt okozó parazitára, míg a V. és VI. vonal egyedei nem tűntek fogékonyak a parazitára. A *M. pseudodispar*-ra való fogékonyság vizsgálatakor, hasonlóan az *M. cerebralis*-hoz, a I. és II. *T. tubifex* vonalat találtuk a legfogékonyabbnak. Emellett a III. vonal egyedei szintén magas fertőzési prevalenciát mutattak, és a férgekben a parazita DNS jelenléte mellett, intenzív TAM termelés is kimutatható volt. A VI. vonal egyedei a *M. pseudodispar*-ra sem voltak fogékonyak. A *T. tubifex* V. vonal és a *L. hoffmeisteri* egyedek ugyan nagy százalékban (30,8-100%) tartalmaztak parazita DNS-t, érett TAM spórák nem fejlődtek ki bennük. Ezekben az esetekben a féreg egyed fertőződött ugyan, de a fejlődés a spóráképzés fázisa előtt leállt, feltételezhetően a féreg gazda immunaktivitásának köszönhetően. Erre utaló jeleket tapasztaltunk az ISH-val nyomon követett gazdán belüli fejlődés vizsgálata során is. Több esetben találtunk parazita fejlődési alakokat a kevésértéjű férgek sejtes immunválaszában szerepet játszó, cölómában előforduló amöbociták által bekebelezve. A fertőződni képes, de TAM-ot nem termelő férgek a parazita fejlődési ciklus zsákutcáinak tekinthetők, és a parazita terjedésének gátjai azáltal, hogy felveszik és mintegy „inaktiválják” az iszapban/aljzaton lévő fertőzőképes myxospórákat, megakadályozva, hogy azok fogékony egyedekbe jussanak. Hasonló eredményre jutottak a *M. cerebralis*-ra fogékony féreg fajok vizsgálatával is (Beauchamp et al. 2006, Baxa et al. 2008). Így az is valószínűsíthető, hogy a kevésértéjű féreg állomány faji összetétele befolyásolja a fertőzés kimenetelét. Saját, *M. pseudodispar*-on végzett vizsgálataink is megerősítették, hogy amennyiben nagyobb arányban tartalmazott egy állomány fertőződni képes, de spórát nem termelő féreg egyedet, a fertőzés összprevalenciája csökkent. Ennek különösen a fertőzés

terjedése szempontjából van jelentősége, mivel a kevésértékű férgek a természetben szinte mindig kevert faji összetételű közösségekben fordulnak elő, „színtenyészetben” csak szélsőséges, vagy mesterséges körülmények között, és általában csak időlegesen tudnak létezni (Brinkhurst 1963, Baxa et al. 2008).

A Naididae család filogenetikai vizsgálata során, a korábban azonosított hat *T. tubifex* vonal mellett azonosítottunk egy, a filogenetikai fán magas bootstrap értékkel elkülönülő, feltételezhetően új vonalat is, melyben a 16S rDNS 4,7-5,3% különbséget mutatott a V. vonal egyedeinek szekvenciájához képest. A genetikai vonalon belüli átlagos variabilitásnál nagyobb különbség azt jelzi, hogy a *T. tubifex* faj az eddig ismertnél több genetikai vonalat tartalmaz. A filogenetikai elemzés nem mutatott összefüggést a parazitára való fogékonyság és a vonalak közötti rokonsági viszonyok között. A nem fogékony VI. vonal a fogékony I. vonal legközelebbi rokonának mutatkozott, valamint a szintén nem fogékony IV. vonal az erősen fogékony III. vonallal alkotott egy csoportot. A DNS szintű és filogenetikai vizsgálatok arra is alkalmasak voltak (ahogy ez a génbankban szereplő nyálkaspórák fajok egyes izolátumainál is előfordul), hogy a korábban hibásan meghatározott, és ezáltal a génbankba hibás néven benyújtott szekvenciákat kiszűrjük. Munkánk során fény derült arra, hogy a korábban *T. tubifex* IV. vonalként azonosított izolátum valójában *Potamothrix bavaricus*, a *Limnodrilus cervix*-ként azonosított izolátum pedig valójában a *Limnodrilus claparedianus* fajhoz tartozik. A vizsgált *L. hoffmeisteri* egyedek 16S rDNS variabilitása egyes esetekben elérte a 15,5%-ot. Ez az érték egy olyan megőrzött génnél, mint a 16S rDNS a fajon belüli variabilitás mértékét jelentősen túllépi, így azt feltételezzük, hogy hasonlóan a *T. tubifex* fajhoz, a *L. hoffmeisteri* is „gyűjtőfaj”, melynek molekuláris biológiai módszerek bevonásával történő taxonómiai felülvizsgálata javasolt.

A *M. pseudodispar* kevésértékű féregben történő fejlődésének fajspecifikus ISH-val történő nyomon követése során megerősítettük, hogy a parazita fejlődése a bélhámra koncentrálódik. A *M. cerebralis* féreg gazdán belüli fejlődéséről vannak kísérleti eredmények, melyek a bélhámon keresztüli parazita bejutást valószínűsítik (Antonio et al. 1998, El-Matbouli & Hoffmann 1998). Saját eredményeink is azt mutatják, hogy a fertőzés korai szakaszában (a fertőzést követő első 24 órában) parazita a féreg bélhámjában volt kimutatható, ami feltételezi az azon keresztüli bejutást. A fertőzés első napjának végén a bélhám bazális membránjának intenzív festődése arra utalt, hogy a parazita a hámsejtek rétege körüli extracelluláris mátrixon keresztül terjedt hosszanti irányban. Ezt az is erősíti, hogy 1 hónappal a fertőzést követően a parazita fejlődési alakok akár már a féreg teljes hosszában jelen voltak, a kezdeti elszórtan elhelyezkedő, lokális fertőzési góccokkal ellentétben. A harmadik hónap végén aztán a bélhámsejteket kitöltő, majd azok felhasadásával a bélcsatornába ürülő pánsporociszták

(benne a TAM-okkal) fejlődése volt megfigyelhető, hasonlóan El-Matbouli et al. (1998) *M. cerebralis*-on végzett szövettani vizsgálatokon alapuló megfigyeléseihez.

A kevéssertéjű féreg tenyészetek fogékonyságának vizsgálata során igazoltuk olyan féreg fajok létezését, melyekben a parazita fejlődése leáll, így tulajdonképpen zsákutcái a parazita terjedésének. Hasonló fajt azonosítottunk a *M. pseudodispar* halon belüli fejlődésének vizsgálata során is (**Forró & Eszterbauer 2016**). Bár a vörösszárnyú keszegben természetes körülmények között egyébként gyakori a *M. pseudodispar* plazmódiumok jelenléte, a bodorkából származó *M. pseudodispar* laboratóriumban fenntartott genetikai vonallal (Mp T-50) végzett kísérletes fertőzés során azt tapasztaltuk, hogy a parazita DNS kimutatható volt a gazda egyedekben, a parazita fejlődése azonban idővel leállt, és kifejlett myxospórák nem alakultak ki vörösszárnyú keszegben. A későbbiekben a fejlődés korai szakaszát behatóbban is vizsgáltuk annak kiderítése céljából, hogy a fejlődés mikor áll le a gazdában.

Szövet- és szervspecifitás

A szövet- és szervspecifitás a gazdafajlagosság mellett olyan jellegzetessége a szöveti nyálkaspórák élősködőknek, ami napjainkra már fontos faji elkülönítő bélyegnek tekintett (**Molnár & Eszterbauer 2015**). Hosszú volt az út, mire a tudományos közösség ezt elfogadta, és ezen információkat beépítette a fajok jellemzésébe és leírásába. Tradicionálisan a fajok leírása és jellemzése a myxospóra alakok morfológiája alapján történt. Az 1990-es évektől viszont megjelentek olyan tanulmányok, melyek részletes morfológiai és szövettani vizsgálattal igazolták, hogy a szöveti élősködő fajok nem véletlenszerűen, egy gazdában bárhol, hanem a gazda egy konkrét szervében, és azon belül egy konkrét szövetében képeznek plazmódiumot, benne a myxospórákkal (Molnár 1994, Molnár 2002a, b). Az első filogenetikai vizsgálatok eredményeit foglalták össze Kent et al. (2001), akik az akkor elérhető viszonylag kisszámú DNS szekvencia alapján a parazita fajok gazda szerinti filogenetikai elkülönülését mutatták ki, és feltételeztek egy, a szervi és szöveti lokalizációhoz kötődő kapcsolatot is. Több faj esetében azonban a morfológiai meghatározás bizonytalanságot mutatott, így a feltételezés bizonyítást nem nyert. A korábbi bizonytalanságokat elkerülve, érett, és morfológiai alapon meghatározott myxospóra mintákból kiindulva, kopoltyú- és izomparazita fajok molekuláris biológiai és filogenetikai összehasonlításával a szöveti és szervi lokalizáció kérdésköre vizsgálható volt (**Eszterbauer 2004**). A vizsgált izomparaziták a vázizomzat sejtjeiben intracellulárisan plazmódiumot képező fajok voltak, melyek közös szöveti lokalizációjuknak megfelelően magas bootstrap értékkel képeztek egy csoportot a filogenetikai fán. A kopoltyúélősködők főcsoportján belül a fajok elrendeződése már változatosabb képet mutatott. Molnár (2002a) szövettani vizsgálatai igazolták, hogy a kopoltyúélősködő fajok plazmódiumai a kopoltyú különböző részén, eltérő szövetet érintve fejleszt kisebb-nagyobb plazmódiumokat. Ennek megfelelően a következő hat fő kategóriát

különítette el: a kopoltyúíven, a kopoltyú filamentumok tövében fejlődő bazifilamentális típusú (BF); a kopoltyú filamentumokon belül, a kapillárisban fejlődő intrafilamentális-vaszkuláris típusú (FV); a lamellák között a hámban fejlődő, interlamelláris-epitheliális típusú (LE); a lamellák kapillárisaiban fejlődő intralamelláris-vaszkuláris típusú (LV); a lamellák közötti hámban fejlődő intralamelláris-epitheliális típusú; és a kopoltyúívben fejlődő típusokat. Ezek közül az első négy csoporthoz tartozó, hazánkban előforduló *Myxobolus* fajok molekuláris biológiai és filogenetikai vizsgálata jelezte a szöveti lokalizáció szerinti elkülönülést. Igazolást nyert, hogy a rokonsági viszonyokat többféle faktor együttesen befolyásolja, azonban feltételezhetően nem azonos súllyal. A vizsgált fajok alapján a szöveti lokalizáció úgy tűnt, hogy nagyobb jelentőséggel bír, mint a szervi lokalizáció. Ezt mutatta a *M. algonquinensis* esete, ami naphal petefészek kötőszövetében spórát képező faj egy kládban helyezkedett el olyan kopoltyú-kötőszöveti élősködőkkel (ha a vért módosult kötőszövetnek tekintjük), mint a *M. elegans* és a *M. bibullatus*. Az eredmények azt sugallták, hogy új parazita faj kialakulásakor inkább gazdaváltás történik, mintsem a parazita szervi és főleg szöveti preferenciája megváltozna. Bár ekkor még viszonylag kevés nyálkaspóráns DNS szekvencia állt rendelkezésre a filogenetikai vizsgálatokhoz, a tendencia már körvonalazódott, amit későbbi, 100-nál is több, nemcsak *Myxobolus* fajon végzett kutatás is igazolni látszott (**Molnár & Eszterbauer 2015**). Holzer et al. (2004) megerősítették a szöveti lokalizáció fontosságát az édesvízi nyálkaspóráns fajok rokonsági viszonyainak alakulásában, azonban arra a következtetésre jutottak, hogy emellett más befolyásoló tényező is van, különösen a cölizoikus élősködők esetében, melyek közül a kiválasztórendszerben, cölizoikusan spórát képező fajok a gazdafajtól, és spóra morfológiától függetlenül egyértelműen lokalizáció alapján csoportosulnak. A spóráképzés helyének szerepét igazolták tengeri *Kudoa* fajok (Whipps et al. 2004), és az izomparaziták és a vékonybél falában fejlődő *Kudoa* fajok filogenetikai elkülönülése alapján (Heiniger et al. 2013). Ahogy már nagyobb számú 18S rDNS szekvencia vált elérhetővé, a szövet- és szervspecifitás evolúciós szerepét is elkezdték vizsgálni (Fiala & Bartosová 2010). Evolúciós modelljük azt mutatta, hogy két olyan evolúciós esemény történt, melynek során a cölizoikus fejlődést a szöveti preferencia váltotta fel, egyszer a tengeri multivalvulidák szintjén, és jóval később a *Myxobolus* és *Henneguya* nemzetségek kialakulásakor. Modelljük alapján a legősibb nyálkaspóráns parazita valószínűleg tengeri élőhelyen élt, és a kiválasztó szervrendszerben képezett spórákat. A bélben, kopoltyúban, izomzatban belüli, specifikus szöveti elhelyezkedés az evolúció során később jelenhetett meg. Egységes véleményünk, hogy új fajok leírásakor a gazda vagy gazdakör mellett, a szerv és szöveti lokalizáció jellemzése is meg kell történnjen, és napjainkban már elengedhetetlen a spóramorfológia mellett a leírandó faj DNS szekvencia szintű vizsgálata (**Molnár & Eszterbauer 2015**).

Gazdafelismerés megnyilvánulásai

A nyálkaspórások gazdafelismerésének mikéntje bár régóta foglalkoztatta a szakterület képviselőit, hosszú időnek kellett eltelnie, mire a parazita laboratóriumi tenyésztésének és vizsgálatának technikája arra a szintre fejlődött, hogy az *in vivo* és *in vitro* kísérletekhez elegendő és megfelelő minőségű parazita minta álljon rendelkezésre. A halakat fertőző törékeny, vízben lebegő és önálló mozgásra képtelen actinospórák kíméletes bánásmódot igényelnek, különösen ha életképességük és fertőzőképességük megőrzése elengedhetetlen a vizsgálat sikeres kivitelezéséhez (**Eszterbauer et al. 2015a, Kallert et al. 2015**). Német kollégámmal, Dennis Kallert-tel könyvfejezetben gyűjtöttük össze azokat a gyakorlati tanácsokat, amelyek egy tudományos cikk terjedelmi kereteit túllépik, viszont alapvető fontosságúak a fertőzési kísérletek sikeres kivitelezése érdekében. A sikertelen fertőzési kísérletek hátterében gyakran az actinospórák nem megfelelő gyűjtése áll. A törékeny spórákat, nagy óvatossággal, kíméletesen kell a vízből szűréssel összegyűjteni, kerülve az intenzív mechanikai hatást, ami a gazdafelismerést kiváltó egyik fő inger. Kallert et al. (2005) mérföldkönek számító munkája igazolta *M. cerebralis* fajon végzett kísérletekkel, hogy a halat fertőző actinospórák kémiai és mechanikai ingerek együttes hatására aktiválódnak, vagyis ismerik fel a gazdát. A mechanikai inger feltételezhetően a hal úszása során keltett áramlás, a kémiai ingerként pedig a halnyálkában jelen lévő, kis molekulású nukleozid, az inozin szolgál (Kallert et al. 2011). A gazdafelismerés első lépéseként a poláris filamentum kilöködik, lehorgonyozza a spórát a hal testén, a spórahéj felnyílik, és a sporoplazma, benne a másodlagos csírasejtekkel, aktív, amőba-szerű mozgással bejut a halba annak kültakaróján keresztül. Ez viszont csak megfelelően puffertolt környezetben történhet, ha a kísérlethez használt oldatok pH-ja és ozmolaritása nem optimális, a poláris kapszula megfelelően időzített kilöködése és a sporoplazma halba való bejutása meghiúsul. A kísérlethez használt actinospórák kora is számít (Kallert & El-Matbouli 2008). A kevésértéjű férgekől a bélcsatornán keresztül a vízbe ürülő actinospórák akár hetekig a vízben lebeghetnek, viszont fertőzőképességük a kijutást követő harmadik napon szignifikánsan csökken. Javaslatunk, hogy a fertőzési kísérletet előzze meg a spórák életképességének vizsgálata FDA vitális festéssel (Yokoyama et al. 1997), és 48 óránál idősebb actinospórával ne dolgozzunk. A halak életkora és a halfajok eltérő érzékenysége miatt célszerű előzetes fertőzést végezni, a megfelelő spóradózis meghatározása céljából. A tömeges fertőzés helyett, a halak egyedi fertőzésére kell törekedni, mert az actinospórák a gazda jelenlétében gyakran összeállnak akár több ezer spórából álló óriás aggregátumokká, így a spóraszűrlet inhomogénné válik, és a hal egyedek nagy eséllyel nem egységes mennyiségű actinospórával fertőződnek. Fontos, hogy a spóraszűrleteket hűvös helyen tartsuk felhasználásig, a spórák ezáltal tovább fertőzőképesek maradnak, és az aggregátum képződés is lassul.

A gazdafelismerést kiváltó ingerek azonosítása és a folyamat egymást követő lépéseinek feltárása után következő cél annak vizsgálata volt, hogy mennyire specifikus a gazdafelismerés, képes-e a parazita különbséget tenni halfajok között. Német kollégáimmal végzett munka során a *M. cerebralis* gazdafelismerésének és gazdába való bejutásának első 3 percét vizsgáltuk (Kallert et al. 2009). Elsőként tanulmányoztuk a halba való bejutás folyamatát *in vivo* (élő hallal végzett) kísérleti rendszerben. Igazoltuk, hogy (a) a *M. cerebralis* actinospórák nem tesznek különbséget fogékony és nem fogékony halfajok, haltörzsek között; (b) pár perces expozíció során a legtöbb parazita a kopoltyún keresztül jut be a halba; (c) a *M. cerebralis*-ra nem fogékony ponty, melyben érett spóra nem alakul ki, szignifikáns mértékben csökkenti a parazitafertőzés intenzitását, ha a jelenlétében történik a fogékony halfaj (szivárványos pisztráng) fertőzése. A meglehetősen magas (8000 TAM/hal) fertőzési dózishoz képest a halba bejutott paraziták aránya viszonylag alacsony volt minden vizsgált halfajban. Ennek oka elsősorban az igen rövid (3 perces) expozíciós idő volt, amire azért volt szükség, mert a gazdafelismerést szerettük volna mérni, és egy hosszabb inkubációval a gazdában való megtelepedés folyamatának befolyásoló hatása ezt a specifikus reakciót elfedhette volna. Későbbi kísérletes vizsgálatunkban az utóbbi kérdéskörre kerestük a választ (Eszterbauer et al. 2019). Elsőként bizonyítottuk, hogy a nem fogékony pontyba bejutó parazita sporoplazmák mennyisége szignifikánsan nem különbözik a fogékony gazdába bejutott paraziták mennyiségétől, sőt kísérletünkben több parazita DNS-t mutattunk ki pontyban, mint szivárványos pisztrángban. Az eredmények értékelésekor felmerülhet, hogy a ponty akár fogékony gazdája is lehet a *M. cerebralis*-nak. Korábbi vizsgálatok (El-Matbouli et al. 1999a) és saját tapasztalataink azonban azt mutatták, hogy pontyban spóráképzés nem történik, három hónappal a fertőzést követően sem natív elnyomatban, sem szövettani készítményben, sem PCR-rel nem volt kimutatható parazita jelenléte. Így továbbra is igazoltnak véljük, hogy a ponty nem fogékony gazdája a *M. cerebralis*-nak. A ponttyal végzett előinkubációs kísérletek eredményei többszöri ismétléssel bizonyították a *M. cerebralis* actinospórák nem specifikus gazdafelismerési reakcióját. A pisztrángféléken kívül feltételezhetően minden halfaj potenciális biológiai csapda a parazitának, ami a fertőzés és a betegség elleni védekezés szempontjából bír jelentőséggel. Fajgazdag halfaunában ugyanis az adott parazita mennyiség eloszlik, így kisebb eséllyel és mennyiségben fertőződhetnek a fogékony gazdafajok. Az továbbra is kérdés, hogy mi az oka a gazdaspecifikus felismerési reakció hiányának. Egyelőre keveset tudunk a gazdafelismerés mechanizmusának háttéréről. Mivel az actinospórák a víz áramlásával sodródva, passzívan jutnak el a gazdához, így a gazdával való találkozás elég esetleges. A parazita terjedési sikere szempontjából valószínűleg jobban megéri, ha minden halat gazdaként ismer fel, és a gazdafelismeréskor csak „hal vagy nem hal”-szinten tesz különbséget, ahogy ezt *in vitro* kísérletek is igazolták (Kallert et al. 2005).

A gazdában való megtelepedés folyamatát vizsgálatuk a *M. cerebralis* fertőzést követően 2 órával (**Eszterbauer et al. 2019**). Arra voltunk kíváncsiak, hogy a hal melyik testtáját részesíti előnyben a parazita, melyik szerven, testrészen keresztül jut be a legtöbb parazita. A korábbi vizsgálatokhoz képest (Kallert et al. 2009) hosszabb inkubációs időt alkalmaztunk (3 perc helyett 2 óra), mivel nem a gazdafelismerés vizsgálatát tűztük ki célul (ahogy korábban), hanem a parazita sporoplazma gazdában való megtelepedését kívántuk szemikvantitatív módon, molekuláris módszerekkel, testtájanként vizsgálni és összehasonlítani. A hosszabb inkubációt követően azt tapasztaltuk, hogy a farokúszó volt a parazita által preferált testtáj, és a kopoltyún, mely a rövid idejű inkubáció során a legtöbb parazitát tartalmazta, csak második helyen végzett vizsgálatunkban. Ez valószínűleg az inkubáció eltérő hosszával és a testtájak közötti fiziológiás különbséggel állhat összefüggésben. A kopoltyún keresztül folyamatos vízáramlás zajlik, így a parazita gazdafelismeréséhez alapvetően szükséges mechanikai inger is folyamatosan jelen van. A farokúszó is általában mozgásban van, így e körül is folyamatos a vízáramlás vagy örvénylés, ami megfelelő mechanikai ingert biztosíthat a parazita számára különösen egy hosszabb idejű (legalábbis pár percnél hosszabb) kitettség esetén. A bőrfelület egyéb, jelentős részén ez az örvénylés nem érvényesül, ami okozhatja azt, hogy a parazita poláris filamentumok a mechanikai ingerben gazdag régióban „lőnek ki”, és a parazita ezeken a területeken tapad meg a halon. Mindkét vizsgálat megerősítette, hogy a legkevesebb parazita a törzset borító bőrön keresztül jut be a hal gazdába. Érdekes módon, korábbi, szövettani vizsgálatokon alapuló kutatás épp az ellenkezőjét igazolta, azt, hogy a bőrön keresztül jut be a legtöbb *M. cerebralis* parazita a fogékony szivárványos pisztrángba (El-Matbouli et al. 1995). Azonban itt jóval magasabb fertőzési dózist alkalmaztak, ami befolyásolhatta a kísérlet eredményét. Saját eredményeink megerősítették Antonio et al. (1998) vizsgálatát, akik szivárványos pisztráng kísérletes fertőzésével a farokúszó és a kopoltyú legfőbb érintettségét igazolták. Ezen túlmutatóan kísérleteink igazolták, hogy a testtáj szerinti elkülönülés nemcsak a fogékony, hanem a nem fogékony (ezüstkárász) gazdában is hasonló, mivel szignifikáns különbség nem volt kimutatható halfajok között. Munkánk az első kísérleti bizonyítéka annak, hogy a *M. cerebralis* actinospóra sporoplazmái a gazdában való megtelepedéskor a hal farokúszóját részesítik előnyben, és ez a preferencia halfajtól független.

A *M. cerebralis* gazdafelismerését és gazdában való megtelepedést vizsgálva felmerült a kérdés, hogy a parazitában milyen gének aktiválódnak a folyamat során. Ennek kiderítését tűztük ki célul abban a vizsgálatban, melynek során SSH segítségével azonosítottuk, majd jellemeztük azokat a parazita géneket, melyek kifejeződése a „nyugalmi” (nem aktivált) állapothoz képest szignifikánsan intenzívebbé válik gazdafelismeréskor (**Eszterbauer et al. 2009**). Kidolgoztunk egy *in vitro* TAM aktivációs módszert, amellyel olyan mennyiségű (millió nagyságrendű), gazdafelismerés szempontjából aktív spóratömeget tudtunk előállítani, amely

megbízható alapját képezte a későbbi vizsgálatoknak. A kidolgozott módszer további előnye, hogy halgazda jelenléte nélkül is megvalósítható az aktiváció. A kontamináló gazda DNS és RNS mennyisége drasztikusan csökken, ezáltal mind a génexpressziós vizsgálatok, mind a transzkriptóm szekvenálások esetén felbecsülhetetlen előnyt jelent a gazda kontamináció csökkentése szempontjából. A vártnál kevesebb olyan parazita gént sikerült azonosítanunk, amelyek potenciálisan részt vesznek a *M. cerebralis* gazdafelismerésében. Négy gén esetében szignifikáns különbség mutatkozott a relatív génexpresszióban a nem aktivált és az aktivált TAM-ok között, valamint a gének relatív expressziója a gazdába való bejutás után már 1 órával szignifikánsan csökkent (majd a fertőzést követő 8. és 24. órában további csökkenés volt kimutatható). Az egyik ilyen gén az aktin-függő fehérje 3-as homológját kódolja, ami a cytoskeleton aktin elemeinek szabályozásában vesz részt, és általában fontos szerepet tölt be a sejtmozgás folyamataiban. Mivel a gazdába való bejutás során a sporoplazma a benne lévő csírasejtekkel aktív, amöboid mozgással halad a sejtközi térben, a gén fokozott aktivitása érhetőnek tűnik. A frequenin-szerű Ca^{2+} -kötő fehérje általános szerepet tölt be a jelátvitel, a szignáltranszdukció folyamatában, de a sejtosztódás és a cytoskeleton működésében is részt vesz. Sokféle funkciót betölthet, így a gazdafelismerésben betöltött szerepét funkcionális genetikai vizsgálatok elvégzése nélkül csak találgatni lehet. Az ubiquitin-kötő E2 enzim a fehérjék sejten belüli lebontásának szabályozása mellett többféle fehérje (többek között a sejtmozgásban fontos funkciót betöltő aktin) sejten belüli stabilitásának szabályozásában vesz részt, ami szintén fontos eleme lehet az aktív mozgással a megfelelő szövetet kereső parazita csírasejteknek. Végül szignifikánsan aktívabb volt a pleckstrin homológia és Zn^{2+} -kötő doménekkel rendelkező Phafin2-jellegű fehérje mRNS-e, ami egy olyan egyedi fehérje, melynek funkcióját a megőrzött domének alapján csak találgatni lehet (jelátvitelben résztvevő fehérjék rendelkeznek hasonló doménekkel). Egyedi nyálkaspórási fehérjék létezése nem is meglepő a későbbi kutatási eredmények fényében. A 2010-es években kezdődött, nyálkaspórási fajokon végzett teljes genom szekvenálások során nagy százalékban találtak olyan géneket, melyek nem mutattak homológiát semmilyen eddig megismert fehérjével (Yang et al. 2014, Chang et al. 2015).

Bár kísérletes és génexpressziós vizsgálatok is történtek a gazdafelismerés hátterének tisztázására, továbbra is sok a megválaszolandó kérdés. A jóval nagyobb léptékű vizsgálatot lehetővé tévő, újgenerációs szekvenálás elterjedése adhat újabb lendületet az ilyen típusú vizsgálatoknak, melyek során, gazda és parazita transzkriptómok összehasonlító elemzésével a háttérben zajló molekuláris folyamatokról bővebb képet kaphatunk. Kutatócsoportunk, jelenleg futó alapkutatói projekt keretében (NKFIH NN124220) ennek vizsgálatát is célul tűzte ki.

Gazda fogékonyság

Az, hogy egy halgazda fogékony-e egy parazitára vagy kórokozóra, nem feltétlenül faji szinten dől el. Egyedi és populáció szintű genetikai és immunológiai különbségek nagyban befolyásolhatják a fertőzésre, és adott esetben a betegségre való fogékonyságot. Hosszú ideig a haltenyésztésben (is) bevett szokás volt, hogy a gazdaságilag fontos betegségek elleni védekezésésként, a túlélő egyedek kiválogatásával, és célzott szaporításával növelték a tenyészetekben a rezisztens genetikai vonalak arányát (Price 1985, Chevassus & Dorson 1990, Wiegertjes et al. 1996). Súlyos bakteriális (pl. furunkulózis) és vírusos (pl. vírusos hemorrágiás szeptikémia) betegségek ellen egyaránt sikerrel nemesítettek „rezisztens” (valójában kevésbé fogékony) lazac törzseket (Ehlinger 1977, Slierendrecht et al. 2001). Ahogy a környezetkímélő technológiák fokozottabban előtérbe kerülnek, és a – pl. EU-s – jogi szabályozás egyre inkább szűkíti az alkalmazható hatóanyagok körét, újból jelentősége lesz/lett rezisztens törzsek/vérvonalak létrehozásának. Az erősen patogén parazita, a *Ceratonova shasta* volt az első nyálkaspórási faj, ami ellen védekezésésként kevésbé fogékony pisztrángtörzseket hoztak létre (Ibarra et al. 1994, Nichols et al. 2003). A *M. cerebralis* fertőzésre a szivárványos pisztráng különböző törzsei is eltérő fogékonysággal reagálnak. A német Hofer törzs egyedein a betegség jóval enyhébb tünetekkel jelentkezik, és az elhullás mértéke is kisebb, mint az extrém fogékony észak-amerikai TroutLodge törzs egyedei esetében (Halliday 1976, Hoffman 1990, Hedrick et al. 1998, MacConnell & Vincent 2002, Fetherman et al. 2011). A célzott szaporításnak és genetikai vonalak szelekciójának lehet azonban negatív következménye is. Különösen kis gazdaságokban, ahol nem elérhető megfelelő számú tenyészhal a szaporításokhoz, gyakran előforduló jelenség a tenyészállományok beltenyésztettsége. A halpopuláció genetikai változatosságának csökkenése aztán számos probléma forrása lehet. A rossz termékenyülési és kelési arányok mellett, a növekedésben való visszamaradás, az ellenálló képesség és a stressztűrés csökkenése is jelentkezhet. Ráadásul a beltenyésztett nőstény tenyészhalakban nagyobb arányban marad el az ovuláció, és hiúsul meg a szaporítás. Vizsgálataink során arra voltunk kíváncsiak, hogy a beltenyésztettség milyen hatással van a kergekórt okozó *M. cerebralis* iránti fogékonyságra (**Eszterbauer et al. 2015b**). A célzott szaporítást az Európában őshonos, halgazdaságokban fenntartott sebes pisztráng állományokon végeztük, melyek utódait visszatelepítési program keretében természetes vizekbe telepítik. A parazita eredeti gazdájaként súlyos elváltozások csak ritkán alakulnak ki bennük. A halfaj jelentősége a kergekór szempontjából legfőképpen az, hogy általában tünetmentes hordozói a parazitának, veszélyt jelentve ezáltal a természetes vizek, betegségre fogékony pisztráng állományaira (Hoffman 1970). A célzott keresztezéssel létrehozott, nem beltenyésztett, NIB, és atlanti-dunai hibrid, Hyb, vérvonalú sebes pisztráng utód állományokban a *M. cerebralis* fertőzöttség

intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a beltenyésztett, IB állományban, jelezve, hogy a halgazda beltenyésztettségi foka befolyásolja a fertőzés kimenetelét.

Nichols et al. (2003), valamint Fetherman et al. (2012) feltételezték, hogy a pisztráng populációk filogeográfiai összetétele befolyásolja a *C. shasta* és *M. cerebralis* fajok iránti fogékonyságot, azonban ezt az összefüggést eddig nem tanulmányozták. Vizsgálataink részeként összehasonlítottuk a sebes pisztráng atlanti vérvonalába tartozó egyedek, és (mivel tisztán dunai vérvonalú populáció nem állt rendelkezésre) atlanti és atlanti-dunai hibrid vérvonalú egyedeket tartalmazó állomány, LBT, *M. cerebralis*-ra való fogékonyságát. Vizsgálataink az első kísérleti bizonyítékai annak, hogy a hibrid vérvonalú állomány kevésbé fogékony a parazitára (ez volt a legkevesbé fogékony a vizsgált csoportok közül). A heterozigóta NIB csoport szignifikánsan kisebb mértékben volt fogékony a parazitára, mint a beltenyésztett, homozigóta csoport, ami azt jelzi, hogy pozitív korreláció van a szülői heterozigotizáció és a betegséggel szembeni ellenálló képesség között. Az IB és közeli rokon, REL csoportokon belül a fertőzés intenzitása jóval nagyobb variabilitást mutatott, mint a NIB és LBT csoportokban, viszont a fertőzés prevalenciájában szignifikáns különbség nem mutatkozott. Az IB és REL csoportok fertőzési intenzitásának nagy szórása az egyedek kevesebb mint 5%-nak volt „köszönhető”, amikben extrém mennyiségű parazita myxospóra fejlődött ki a többi egyedhez képest. A fertőzés intenzitásában megmutatkozó egyedi különbségek gyakran előfordulnak a nyálkaspórások okozta fertőzések során; a legtöbb esetben az egyedi immunológiai különbségek, a szerzett immunválasz kialakulása során jelentkező eltérések okozhatják (Gómez et al. 2014). Esetünkben azonban az egyedi eltéréseket az is okozhatta, hogy a genetikai vizsgálatok és a csoportok létrehozása a tenyészállományon történt. Így az irányított szaporítás során a szülői párok/csoportok allél rekombinációjának következtében, létrejöttek a homozigóta szülői csoportokban olyan utódok, melyek eltérő beltenyésztettségi fokúak voltak. Az utódállomány genetikai státuszának random mintavétellel történt vizsgálata ezt megerősítette. Ha kis arányban is, de előfordultak egyedek az IB csoportban, melyek egyedi beltenyésztettségi együtthatójuk alapján a NIB csoportba tartoztak inkább. A REL csoport tagja közeli rokon párok voltak, melyek heterozigóták voltak ugyan, de az irányított szaporítás során létrejöttek homozigóta utódok is. Ez feltételezhetően szintén hozzájárult a REL csoportban kimutatott fertőzési intenzitás nagyfokú variabilitásához. Ellentétes hatás volt valószínűsíthető a beltenyésztett csoportban, ahol a szülők betenyésztettek voltak, de közös utódaik között lettek heterozigóták is. Ez a variabilitás a szülői és utódnemzedékben egyaránt magas heterozigotizációs NIB és LBT csoportokban nem volt kimutatható. Vizsgálataink eredményei arra utalnak, hogy a tenyészállomány beltenyésztettségi szintje és genetikai variabilitása jelentős befolyással bír az utódgeneráció fertőzéssel szembeni fogékonyságára. Mivel hatékony kezelési mód nem áll rendelkezésre a parazita ellen, megelőzésként, különösen az endemikus területeken célszerű

a tenyészállomány genetikai vizsgálata, és beltenyésztettség esetén az állomány „frissítése”, heterozigotizálásának növelése.

A halgazda fogékonyágának vizsgálata kapcsán, korábbi felmérő vizsgálatok során kimutattuk (DNS szinten) olyan paraziták jelenlétét a hal vérében, melyek gazdaidegenek voltak, mivel az adott halfajban eddigi ismereteink szerint nem képeznek érett myxospórát (Holzer et al. 2013, 2014). A gazdafelismerés kísérletes vizsgálata egyértelművé tette, hogy a parazita csak a halat ismeri fel, és nem tesz különbséget fogékony és nem fogékony gazdák között (Kallert et al. 2009). A gazdafajlagosság tehát a parazita fejlődésének egy későbbi stádiumában nyilvánul meg. Ezen előzmények után fertőzési kísérletekkel vizsgáltuk a vér szerepét a nyálkaspórák paraziták gazdafajlagosságában (Sipos et al. 2018). A szöveti élősködő nyálkaspórák fajok halon belüli fejlődésével kevés tanulmány foglalkozik. Ezek alapján az feltételezhető, hogy a szöveti élősködő fajok több szerven és szöveten át jutnak el a spóráképzés helyére (Molnár & Eszterbauer 2015). A keringési rendszeren keresztüli terjedés logikus lépésnek tűnik, hiszen ez a legegyszerűbb módja a szervek közötti, passzív terjedésnek. A vérben, a keringési rendszeren keresztüli terjedés legjobb példái a *Sphaerospora* fajok (köztük a *S. dykova*), melyek véralakja okozza a pontyok úszóhólyaggyulladását. Azonban a *Sphaerospora* fajok fejlődésének proliferációs szakasza a vérhez kötött, vagyis a parazita fejlődési alakok intenzíven osztódnak a vérben eltöltött hosszabb-rövidebb idő alatt (Baska & Molnár 1988, Lom & Dyková 1992, Hartigan et al. 2016). A *M. cerebralis* halon belüli fejlődésének fő lépéseit, és a fejlődés időbeli lefutását szövettani és elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazolták (El-Matbouli et al. 1995). Vizsgálatuk kiterjedt a vérkenet mikroszkópos vizsgálatára is, azonban a parazita fejlődési alakját nem találták meg, molekuláris biológiai vizsgálatot pedig nem végeztek. Ez alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a *M. cerebralis* elkerüli a keringési rendszert, és a perifériás idegrendszeren keresztül jut a spóráképzés helyére a koponyaporcba. A vérkenetben mi sem mutattuk ki a parazita jelenlétét. A véralakok kimutatása a vérben, mivel feltételezhetően a vizsgált *M. cerebralis* és *M. pseudodispar* fajok esetében proliferáció nem történik, olyan mintha „tűt keresnénk szénakazalban”. Ráadásul a fejlődési alak morfológiájáról csak elképzeléseink vannak, mivel nincs tudomásunk arról, hogy mikroszkópos kimutatása bármelyik „nem-sphaerospora” faj vérben előforduló alakjának megtörtént volna. A szövetben zajló, ISH és szövettani készítményeken nyomon követett fejlődés alapján, kisméretű, néhány sejtből álló, sejt-a-sejtben struktúrát feltételezünk, intenzív bazofil festődéssel. A várakozással ellentétben, a qPCR vizsgálataink egyértelműen igazolták a parazita korai fejlődési stádiumainak jelenlétét a vérben. Ez egyrészt a korábbi szövettani vizsgálatok miatt, másrészt Kallert et al. (2012) *in vitro* vérsérum kísérleteinek eredményei miatt volt meglepő, annak ellenére, hogy mi csak a parazita DNS-t mutattuk ki. Utóbbiak kísérlete azt mutatta, hogy a *M. cerebralis* fejlődési alakokat mind a fogékony, mind a nem fogékony halfajok vérséruma

elpusztítja, és a szerzők a gátló anyag biokémiai paramétereit vizsgálva feltételezték, hogy a vér valamelyik immunkomponense pusztítja el a parazita sporozoitokat. Arra a következtetésre jutottak, hogy ha a *M. cerebralis* a perifériás idegrendszeren keresztül jut el a koponyaporcba, akkor el tudja kerülni a véráramot, ha pedig mégis a véráramba kerül, akkor ott rövid időn belül elpusztul. Ha a véráramon keresztüli terjedés a fejlődés zsákutcája, akkor tulajdonképpen érthető, hogy miért csökkent drasztikusan a fogékony gazdában a parazita mennyisége az idő előrehaladtával (úgy, hogy 1 hónappal a fertőzést követően a *M. cerebralis* már nem volt kimutatható szivárványos pisztrángban). A perifériás idegrendszert nem vizsgáltuk, így sem cáfolni, sem megerősíteni nem tudjuk a korai, szövettani alapú vizsgálatokat. Másik magyarázat a drasztikusan csökkenő parazitamennyiségre, a fertőzés természete és időzítése. El-Matbouli et al. (1995) arra a következtetésre jutott, hogy a parazita a fertőzést követő 4-24. nap között „vándorol” a spóráképzés helyére. Ha így van, akkor elképzelhető, hogy a fertőzést követő 1 hónappal azért nem mutattunk ki parazitát a legfogékonyabb szivárványos pisztráng vérében, mert a parazita már a koponyaporcban vagy annak környezetében volt, és elhagyta a véráramot. Azt is igazolták már, hogy bizonyos nyálkaspórák fajok (pl. *Ceratonova shasta*) elhagyva a véráramot, egy idő után visszatérnek oda, és szisztémás fertőzést indukálnak (Bjork & Bartholomew 2010). Ez a jelenség a vizsgált *M. pseudodispar* esetében előfordulhat, és magyarázhatja is a parazitafertőzés közel állandó intenzitását a fejlődés vizsgált 1 hónapja alatt. Viszont a *M. cerebralis* esetében nem valószínű, hogy a visszajutás megvalósulhat, mert a koponyaporc viszonylag gyorsan „elcsontosodik”, és onnan a myxospórák csak a halgazda elpusztulása és lebomlása után juthatnak ki (talán ezért is csökkent a detektálási szint alá a parazita mennyisége).

A *M. pseudodispar* halon belüli fejlődésének lépéseiről kevesebb információ áll rendelkezésünkre. A fejlődés első hónapjának vizsgálatával azonban kimutattuk, hogy a keringési rendszer fontos állomása a parazita halon belüli fejlődésének. Az elsődleges gazda bodorka mellett, a másodlagos gazda dévérkeszeg, a biológiai szűrőként funkcionáló vörösszárnýú keszeg és a nem fogékony ezüstkárász (Forró & Eszterbauer 2016) fajok *M. pseudodispar* fertőzöttségének prevalenciáját és intenzitását vizsgálatuk qPCR módszerrel. A legmagasabb prevalencia a bodorkában fordult elő, viszont meglepő módon a vörösszárnýú keszeg vérében volt a legintenzívebb a parazitafertőzöttség. Mivel korábbi vizsgálataink igazolták, hogy érett myxospóra nem alakul ki ebben a fajban, így valószínűsíthető, hogy a vérben keringve fejlődési alakjai testszerte előfordulnak (kimutattuk a parazita DNS-ét kopoltyúban, vesében, májban, de izomszövetben nem). Másik érdekesség, hogy a nem fogékony halfajként kategorizált ezüstkárász vérében (ha alacsony prevalenciával is), de előfordult a *M. pseudodispar* véralak. Ráadásul a fertőzés intenzitása megközelítette a másodlagos gazda dévérkeszegben mért értékeket. Ez újabb megerősítése annak, hogy a gazdafajlagosság nem a vérben áramló fejlődési stádiumokban nyilvánul meg, hanem később,

vagy a spóráképzés előtt (pl. a spóráképzés helyének/szövetének inváziójakor) vagy a sporogóniás szakasz alatt.

A két vizsgált parazita faj fertőzési dinamikáját összehasonlítva szembetűnő különbségeket tapasztaltunk. Míg az erősen patogén *M. cerebralis* fejlődési alakok vérben való mennyisége az idő előrehaladtával szignifikánsan csökkent, addig az elhullást általában nem okozó *M. pseudodispar* fertőzésre egy közel konstans, tendenciát nem mutató lefutás volt jellemző. Hogy ez összefüggésben van-e a patogenitással, arra nincsenek bizonyítékaink. Annyi azonban valószínűsíthető, hogy egy erősen patogén kórokozó/parazita általában erős immunválaszt vált ki (és ha ez sikeres, idővel „eltünteti” a parazitát), míg egy nem, vagy kevésbé patogén faj esetében a gazdának nem áll „érdekében” egy „költséges” adaptív immunválaszt kialakítani, és a parazita eliminálására energiát fordítani.

Fertőzés elleni védekezés

A tény, hogy a nyálkaspórák paraziták halat fertőző actinospórái felismerik a halat, de nem tesznek különbséget fogékony és nem fogékony fajok vagy törzsek között, a biológiai védekezés egy fontos lehetőségét nyújtja. Ennek laboratóriumi kísérletekben történő igazolását is elvégeztük (Kallert et al. 2014). A két laboratóriumi modell faj, a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* actinospóráival végzett *in vitro* kísérletekben a korábban azonosított (Kallert et al. 2010), kémiai ingerként szolgáló inozin és arginin, illetve az ezek által képzett, jóval vízzoldékonyabb inozin-arginin só (IA) stimuláló hatását vizsgáltuk. A két egymásra épülő kísérlet közül az elsőben a magasabb, 0,5 mg/ml koncentráció az IA esetében a pozitív (halnyálka kivonat) kontrollhoz hasonló magas aktiváló hatást váltott ki a *M. cerebralis*-ban. A második kísérletben a 0,1 mg/ml IA koncentrációval az actinospóra aktiválás hatékonysága a poláris filamentum kilökődésének tekintetében túl is szárnyalta a halnyálka kivonatot, míg a 0,01 mg/ml ennél szerényebb reakciót váltott ki. Mivel a kémiai inger mellett mechanikai ingerre is szükség van a parazita actinospóra aktiválásához, a mechanikai inger feltételezhetően eltérő intenzitása okozhatta a mért különbséget a két kísérlet között. A vízzoldékony inozin-arginin só működött a legjobban a vizsgált vegyületek közül, ami a gyakorlati alkalmazhatóság szempontjából új és fontos eredmény. Az IA vegyület képlete $C_{16}H_{26}N_8O_7$, és jól oldódik poláris oldatokban. Az oldódás során konformáció változás nem következik be, ezt bizonyítja a vegyület hatékonysága is az *in vitro* tesztekben. Sőt az, hogy jobban működött a tesztekben, mint az inozin és az arginin önállóan, azt igazolja, hogy a vízben való oldódással homogén oldatot képez, ami elérhető az actinospóra receptorai számára, akár napokon keresztül is. Az *in vivo* kísérlet során azt vizsgáltuk, hogy az inozinnal és IA-val előinkubált *M. pseudodispar* actinospórák milyen mértékű fertőzést képesek előidézni az elsődleges gazda bodorkában. Bár az alacsony elemszám és magas egyedi variabilitás miatt szignifikáns különbség nem volt kimutatható, az eredményekből látszik, hogy

az IA-val előkezelt spórák nagy része kilökődött poláris filamentummal, és/vagy sporoplazmával (vagyis aktivált állapotban) a vízben maradt, és nem jutott be a halba. A halba bejutott paraziták aztán képesek voltak a spóráképzésre, de a fertőzés intenzitása elmaradt a pozitív kontroll csoportétól.

Az IA tehát olyan „csalivegyület”, amely a vízbe juttatva „kisütheti” a lebegő actinospórákat mielőtt azok kapcsolatba kerülnének a fogékony halgazdával, megakadályozva ezáltal a parazita terjedését, és a fertőzés létrejöttét. Eredményeink azt mutatják, hogy az IA vegyület, ha teljes mértékben nem is eliminálja a fertőzőképes actinospórákat, azok számának jelentős csökkentéséhez hozzájárulhat halgazdasági környezetben is. A vegyület nem toxikus, előállítása olcsó, így félüzemi kipróbálások sikeressége esetén a gyakorlatban is alkalmazható lehet a betegség-megelőzési stratégia részeként.

Az értekezés az elmúlt 15 év munkájából készült pillanatfelvételek sorozata, de a kutatás folyik tovább. Az eddig megszerzett tudásra építve, jelenleg futó projektünkben terápiás potenciállal rendelkező nyálkaspórák proteáz gátló gének azonosításával kívánjuk megalapozni egy hatékony kezelés kidolgozását, amelynek segítségével a nyálkaspórák okozta betegségek kezelhetőek lehetnek a halgazdaságokban.

5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Több nyálkaspórási faj actinospóra stádiumát azonosítottuk, és elsőként igazoltuk a *Myxobolus cultus* hazai előfordulását.
2. Filogenetikai vizsgálatokkal meghatároztuk a *Sphaerospora* s. str. kládba tartozó fajok körét, és jellemeztük a csoport genetikai diverzitását. Elsőként végeztük el a *S. dykova*, *S. angulata* és *S. molnari* fajok molekuláris jellemzését, és meghatároztuk különlegesen hosszú inzerteket tartalmazó 18S rDNS szekvenciájukat.
3. Elsőként igazoltuk a *Myxobolus pseudodispar* gazdaváltását. Valamint kísérletesen bizonyítottuk a nyálkaspórási paraziták fejlődésének zsákutcáját képező, biológiai csapdának tekinthető „gazdafajok” létezését.
4. Édesvízi szöveti élősködő fajoknál (főleg *Myxobolus* fajok) molekuláris biológiai és filogenetikai eredményeken alapulva igazoltuk a szöveti és szervi lokalizáció fontosságát.
5. Elsőként igazoltuk, hogy a *Myxobolus cerebralis* a gazdafelismerés során nem tesz különbséget a halfajok között, és hogy a parazita sporoplazmái a gazdában való megtelepedéskor – halfajtól függetlenül – a hal farokúszóját preferálják.
6. *In vitro* aktivációs eljárást dolgoztunk ki, melynek segítségével a gazdafelismerés molekuláris szinten, gazdakontamináció nélkül vizsgálható. A *M. cerebralis* gazdafelismerésében feltételezhetően szerepet játszó fehérjék közül néhányuk génjét azonosítottuk és részlegesen jellemeztük.
7. Elsőként vizsgáltuk különböző genetikai vonalú sebes pisztráng törzsek kergekórra való fogékonyágát. Kimutattuk, hogy a beltenyésztett állományokban a *M. cerebralis* fertőzés szignifikánsan intenzívebb, így a gazdahal genetikai heterozigotizása befolyásoló tényezője lehet a fertőzés kimenetelének.
8. Fertőzési kísérletekkel bizonyítottuk, hogy mind a *M. cerebralis*, mind a *M. pseudodispar* megtalálható a vérben a fertőzést követő 1 hónapig a fogékony és nem fogékony halfajokban egyaránt, és hogy ebben a fázisban a gazdafajlagosság nem nyilvánul meg.
9. Laboratóriumi *in vitro* és *in vivo* kísérletekben igazoltuk, hogy a vízóldékony inozin-arginin só hatékony „csalívegyszer”, ami képes a vízben „idő előtt” aktiválni a parazita halat fertőző actinospóráit, meggátolva ezzel a parazita terjedését.

6. ÉRTEKEZÉS ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

1. **Eszterbauer E**, Sipos D, Szakály Á, Herczeg D (2019) Distinctive site preference of the fish parasite *Myxobolus cerebralis* (Cnidaria, Myxozoa) during host invasion. *Acta Vet. Hung.* 67:212-223
IF 1,059 (2018-as érték); Q2.
2. Sipos D, Ursu K, Dán Á, Herczeg D, **Eszterbauer E** (2018) Susceptibility-related differences in the quantity of developmental stages of *Myxobolus* spp. (Myxozoa) in fish blood. *PLOS ONE.* 13: e0204437
IF 2,776; Q1. Nyilvános idézők összesen: 3 Független: 1
3. Patra S, Bartošová-Sojková P, Pecková H, Fiala I, **Eszterbauer E** and Holzer AS (2018) Biodiversity and host-parasite cophylogeny of *Sphaerospora* (sensu stricto) (Cnidaria: Myxozoa). *Parasites & Vectors* 11:347
IF 3,031; Q1. Nyilvános idézők összesen: 4 Független: 3
4. Forró B, **Eszterbauer E.** (2016) Correlation between host specificity and genetic diversity for the muscle-dwelling fish parasite *Myxobolus pseudodispar*: examples of myxozoan host-shift? *Folia Parasitol.* 63:019
IF 1,082; Q3. Nyilvános idézők összesen: 13 Független: 10
5. **Eszterbauer E**, Forró B, Tolnai Z, Guti CF, Zsigmond G, Hoitsy G, Kallert DM (2015) Parental genetic diversity of brown trout (*Salmo trutta* m. *fario*) brood stock affects offspring susceptibility to whirling disease. *Parasites & Vectors* 8:141 p.9
IF 3,234; Q1. Nyilvános idézők összesen: 8 Független: 6
6. **Eszterbauer E**, Atkinson S, Diamant A, Morris D, El-Matbouli M, Hartikainen H (2015) Myxozoan life cycles: Practical approaches and insights. *In: Okamura, Beth; Gruhl, Alexander; Bartholomew, Jerri (eds.) Myxozoan Evolution, Ecology and Development.* Springer International Publishing, Switzerland, pp. 175-198
(Könyvfejezet) Nyilvános idézők összesen: 24 Független: 20
7. Kallert DM, Grabner DS, Yokoyama H, El-Matbouli M, **Eszterbauer E** (2015) Transmission of myxozoans to vertebrate hosts. *In: Okamura, Beth; Gruhl, Alexander; Bartholomew, Jerri (eds.) Myxozoan Evolution, Ecology and Development.* Springer International Publishing, Switzerland, pp. 235-251
(Könyvfejezet) Nyilvános idézők összesen: 4 Független: 2
8. Molnár K, **Eszterbauer, E.** (2015) Specificity of infection sites in vertebrate hosts. *In: Okamura, Beth; Gruhl, Alexander; Bartholomew, Jerri (eds.) Myxozoan Evolution, Ecology and Development.* Springer International Publishing, Switzerland, pp. 295-313
(Könyvfejezet) Nyilvános idézők összesen: 23 Független: 20

9. Kallert DM, Forró B, **Eszterbauer E** (2014) Inosine-arginine salt as a promising agent for *in vitro* activation of waterborne actinospores of fish pathogenic myxozoans. Dis. Aquat. Org. 109:149-154
IF 1,752; Q2. Nyilvános idézők összesen: 1 Független: 0
10. **Eszterbauer E**, Sipos D, Forró B, Bartosová P, Holzer AS (2013) Molecular characterization of *Sphaerospora molnari* (Myxozoa), the agent of gill sphaerosporosis in common carp (*Cyprinus carpio carpio*). Dis. Aquat. Org. 104:59-67
IF 1,586; Q2. Nyilvános idézők összesen: 14 Független: 6
11. Holzer AS, Bartosová P, Pecková H, Týmł T, Atkinson S, Bartholomew J, Sipos D, **Eszterbauer E** and Dyková I (2013) 'Who is who' in renal sphaerosporids (Bivalvulidae: Myxozoa) from common carp, Prussian carp and goldfish: Molecular identification of cryptic species, blood stages and new members of *Sphaerospora* sensu stricto. Parasitology 140:46-60
IF 2,35; D1. Nyilvános idézők összesen: 26 Független: 14
12. Marton Sz, **Eszterbauer E** (2012) The susceptibility of diverse species of cultured oligochaetes for the fish parasite *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova (Myxozoa). J. Fish Dis. 35:303-314
IF 1,591; Q1. Nyilvános idézők összesen: 10 Független: 6
13. Kallert DM, **Eszterbauer E**, Grabner D, El-Matbouli M (2009) *In vivo* exposure of susceptible and non-susceptible fish species to *Myxobolus cerebralis* actinospores reveals non-specific invasion behaviour. Dis. Aquat.Org. 84:123-130
IF 1,687; Q2. Nyilvános idézők összesen: 26 Független: 16
14. **Eszterbauer E**, Kallert DM, Grabner D, El-Matbouli M (2009) Differentially expressed parasite genes involved in host recognition and invasion of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa). Parasitology 136:367-377
IF 2,316; Q1. Nyilvános idézők összesen: 22 Független: 10
15. **Eszterbauer E**, Marton Sz, Rácz OZ, Letenyi M & Molnár K (2006) Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification. Syst. Parasitol. 65:97-114
IF 0,856; Q2. Nyilvános idézők összesen: 45 Független: 36
16. **Eszterbauer E** (2004) Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. Dis. Aquat. Org. 58:35-40
IF1,583; Q1. Nyilvános idézők összesen: 156 Független: 134

7. ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Tudományos fokozat megszerzése után

1. Kosakyan A, Alama-Bermejo G, Bartošová-Sojtková P, Born-Torrijos A, Šíma R, Nenarokova A, **Eszterbauer E**, Bartholomew J, Holzer AS (2019) Selection of suitable reference genes for gene expression studies in myxosporean (Myxozoa, Cnidaria) parasites. *Sci. Rep.* 9:15073. (IF 4,011; D1)
2. Hartigan A, Estensoro I, Vancová M, Bílý T, Patra S, **Eszterbauer E**, Holzer AS (2016) New cell motility model observed in parasitic cnidarian *Sphaerospora molnari* (Myxozoa: Myxosporea) blood stages in fish. *Sci. Rep.* 6:39093. (IF 4,259; D1)
3. Molnár K, Székely Cs, Guti CsF, **Eszterbauer E** (2014) Two new *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) from white bream, *Blicca bjoerkna* (Linnaeus, 1758) developing in basifilamental location of gills. *Acta Protozool.* 53:277-285. (IF 0,836; Q2)
4. Holzer AS, Hartigan A, Patra S, Peckova H, **Eszterbauer E** (2014) Molecular fingerprinting of the myxozoan community in common carp suffering Swim Bladder Inflammation (SBI) identifies multiple etiological agents. *Parasites & Vectors* 7:398. (IF 3,43; Q1)
5. Yemmen C, Marton Sz, Bahri S, **Eszterbauer E** (2013) Morphology, seasonality and phylogeny of *Zschokkella soleae* sp. n. (Myxozoa, Myxosporea) parasite of *Solea solea* L. (Pleuronectiformes, Soleidae) from Ghar El Melh Lagoon, Tunisia. *J. Fish Dis.* 36:871-879. (IF 1,507; Q1)
6. Molnár K, **Eszterbauer E**, Marton Sz, Székely Cs, Eiras JC (2012) Comparison of the *Myxobolus* fauna of common barbel from Hungary and Iberian barbel from Portugal. *Dis. Aquat. Org.* 100:231-248. (IF 1,734; Q2)
7. Yemmen C, Marton Sz, **Eszterbauer E**, Bahri S (2012) *Ceratomyxa aegyptiaca* n. sp (Myxozoa: Myxosporea) from the gall-bladder of *Solea aegyptiaca* Chabanaud (Pleuronectiformes: Soleidae) in a Tunisian coastal lagoon. *Syst. Parasitol.* 83:21-28. (IF 1,26; Q3)
8. Marton Sz, **Eszterbauer E** (2011) The development of *Myxobolus pavlovskii* (Myxozoa: Myxobolidae) includes an echinactinomyxon-type actinospore. *Folia Parasitol.* 58:157-163. (IF 1,591; Q1)
9. Bahri S, Marton Sz, Marques A, **Eszterbauer E** (2010) *Henneguya tunisiensis* n.sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a new gill parasite of *Symphodus tinca* (L.) (Teleostei: Labridae) off Tunisia. *Syst. Parasitol.* 76:93-101. (IF 1,056; Q3)
10. Molnár K, Marton Sz, Székely Cs, **Eszterbauer E** (2010) Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary. *Parasitol. Res.* 107:1137-1150. (IF 1,812 Q1)
11. Molnár K, **Eszterbauer E**, Marton Sz, Cech G, Székely Cs (2009) *Myxobolus erythrophthalmi* sp. n. and *Myxobolus shaharomae* sp. n. (Myxozoa: Myxobolidae) from the internal organs of rudd

- (*Scardinius erythrophthalmus* L) and bleak (*Alburnus alburnus* L). J. Fish Dis. 32:219-231. (IF 1,697; Q1)
12. Baska F, Voronin VN, **Eszterbauer E**, Müller L, Marton Sz, Molnár K (2009) Occurrence of two myxosporean species, *Myxobolus hakyi* sp. n. and *Hoferellus pulvinatus* sp. n. in *Pangasianodon hypophthalmus* fry imported from Thailand to Europe as ornamental fish. Parasitol Res. 105:1391-1398. (IF 1,721; Q2)
 13. Molnár K, Marton Sz, **Eszterbauer E**, Székely Cs (2007) Description of *Myxobolus gayerae* sp n. and re-description of *M. leuciscini* infecting European chub from the Hungarian stretch of the river Danube. Dis. Aquat Org. 78:147-153. (IF 1,598; Q2)
 14. Kallert DM, Ponader S, **Eszterbauer E**, El-Matbouli M, Haas W (2007) Myxozoan transmission via actinospores: new insights in mechanisms and adaptations for host invasion. Parasitology 134:1741-1750. (IF 2,081; Q1)
 15. Molnár K, Marton Sz, **Eszterbauer E**, Székely Cs (2006) Comparative morphological and molecular studies on *Myxobolus* spp. infecting chub from the River Danube, Hungary, and description of *Myxobolus muellericus* sp. n. Dis. Aquat Org. 73:49-61. (IF 1,509 Q2)
 16. Kallert DM, **Eszterbauer E**, Erseus C, El-Matbouli M, Haas W (2005) The life cycle of *Henneguya nuesslini* (Schuberg & Schröder 1905) (Myxozoa) involves a triactinomyxon-type actinospore. J. Fish Dis. 28:71-79. (IF 1,661; D1)
 17. Rácz O, **Eszterbauer E**, Molnár K (2005) Hungactinomyxon, a new actinosporean type and collective group (Myxozoa) from *Branchiura sowerbyi* Beddard. Syst. Parasitol. 61:107-113. (IF 0,786; Q3)
 18. Székely Cs, Eiras JC, **Eszterbauer E** (2005) Description of a new synactinomyxon type from River Souza, Portugal. Dis. Aquat. Org. 66:9-14. (IF 1,361; Q2)
 19. Kallert DM, **Eszterbauer E**, Erséus C, Haas W, El-Matbouli M (2005) Life cycle studies of *Myxobolus parviformis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae) from bream. Dis. Aquat. Org. 66:233-243. (IF 1,361; Q2)
 20. **Eszterbauer E**, Székely Cs (2004) Molecular phylogeny of the kidney-parasitic *Sphaerospora renicola* from common carp (*Cyprinus carpio*) and *Sphaerospora* sp. from goldfish (*Carassius auratus auratus*). Acta Vet. Hung. 52:469-478. (IF 0,566; Q3)

Tudományos fokozat megszerzése előtt

1. Molnár K, **Eszterbauer E**, Székely Cs, Dán Á, Harrach B (2002) Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. J. Fish Dis. 25:643-652. (IF 1,298; Q1)
2. **Eszterbauer E** (2002) Molecular biology can differentiate morphologically indistinguishable myxosporean species: *Myxobolus elegans* and *M. hungaricus*. Acta Vet. Hung. 50:59-62. (IF 0,33; Q3)

3. Székely Cs, Rácz O, Molnár K, **Eszterbauer E** (2002) Development of *Myxobolus macrocapsularis* (Myxosporea: Myxobolidae) in an oligochaete alternate host, *Tubifex tubifex*. Dis. Aquat. Org. 48:117-123. (IF 1,561; Q1)
4. **Eszterbauer E**, Benkő M, Dán Á, Molnár K (2001) Identification of fish parasitic *Myxobolus* (Myxosporea) species using a combined PCR-RFLP method. Dis. Aquat. Org. 44:35-39. (IF 1,653; Q1)
5. **Eszterbauer E**, Székely Cs, Molnár K, Baska F (2000) Development of *Myxobolus bramae* (Myxosporea: Myxobolidae) in an oligochaete alternate host, *Tubifex tubifex*. J. Fish Dis. 23:19-25. (IF 0,898; Q1)
6. Székely Cs, Molnár K, **Eszterbauer E**, Baska F (1999) Experimental detection of the actinospores of *Myxobolus pseudodispar* (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts. Dis. Aquat. Org. 38:219-224. (IF 1,515; Q1)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki először is azoknak, akik nagyban hozzájárultak ahhoz, hogy az MTA doktori cím megszerzésének lehetősége egyáltalán felmerüljön. Elsősorban Dr. Molnár Kálmánnak, aki fiatal diplomásként befogadott, és bevezetett a halkórtani kutatások világába. Követte, és segítette munkámat PhD témavezetőmként, majd a PhD megszerzése után is. Hálásan köszönöm a rengeteg ismeretet, amit Dr. Baska Ferencről kaptam a halbetegségekről és a kórszövettanról. Dr. Benkő Máriának és Dr. Harrach Balázsnak néhány szóval megköszönni sem tudom barátságukat, és a sokrétű támogatást. Amellett, hogy bevezettek a molekuláris biológia és a filogenetika világába, jó néhány „mélypontra” lendítettek túl a hosszú évek során. Hálás vagyok Dr. Kassai Tibor professzor úrnak, hogy PhD hallgató korom óta figyelemmel kíséri és támogatja tudományos pályafutásom.

Külföldi kollégáim közül Dr. Dennis Kallertnek szeretném elsőként megköszönni a hosszú évek óta tartó sikeres együttműködést, a sok kreatív beszélgetést, és a közeli baráti viszonyt, ami rengeteg erőt és kitartást adott. Köszönöm Dr. Astrid Holzernek a szintén évtizedes együttműködést. Köszönöm, hogy ő és kutatócsoportja barátként, szinte a csoport tagjaként kezel hosszú ideje. Sok elismert közlemény, és még több pozitív élmény köt hozzá és csoportjához.

Hazai együttműködő partnereim közül, hálás köszönetem a NÉBIH volt és jelenlegi munkatársainak, Dr. Dán Ádámnak, Dr. Ursu Krisztinának, és Dr. Rónai Zsuzsannának, akiktől rengeteg új módszert tanultam, és akik nélkül a bemutatott eredmények egy része meg sem valósulhatott volna. Köszönöm a „halasoknak”, Dr. Láng Máriának, Dr. Papp Melittának, Dr. Paulus Petrának, Dr. Gonda Eszternek az együttműködést, és az „összetartást”.

Nagyon köszönöm a sokéves együttműködést Hoitsy Györgynek, a Lillafüredi Pisztrángtelep vezetőjének, aki a kutatás iránt mindig nyitott volt, tanácsaival és aktív közreműködésével segítette munkánkat, és akitől rengeteget tanultam a pisztrángokról, a halszaporításról, és a haltenyésztésről. Köszönetem a Dinnyési Halgazdaság vezetőjének, Szabó Krisztiánnak, hogy többek között az ikraállományok biztosításával hosszú évek óta támogatja kísérleteinket.

Nagyon köszönöm kutatócsoportom volt és jelenlegi tagjainak a lelkiismeretes munkát, és az együttműködést. A disszertációban szereplő eredmények nem jöhettek volna létre Sipos Dóra, Bertyné Hardy Tímea, Szegő Dóra, Dr. Zsigmond Gergely, Szakály Ágnes, Rigler Eszter, Nagy Borka, Dr. Herczeg Dávid, Dr. Forró Barbara és Dr. Marton Szilvia aktív közreműködése nélkül. Köszönöm közeli kollégáimnak, Dr. Papp Tibornak, Dr. Kaján Győzőnek, Dr. Vidovszky Mártonnak, Dr. Doszpoly Andornak a segítséget, a pozitív hozzáállást, és a jó hangulatú „labormegbeszéléseket”.

A kutatások anyagi fedezetét az OTKA F45908, OTKA K75873, OTKA K112301, NKFIH NN124220, a Bolyai János Kutatási Ösztöndíj, a német Alexander von Humboldt Kutatási Ösztöndíj, és az MTA NKM-57/2019 kutatási mobilitási pályázata biztosították.

Nem tudom eléggé megköszönni a támogatást szüleimnek, családomnak és barátaimnak. Köszönöm Dr. Pintér Zoltánnak, hogy lassan két évtizede áll mellettem barátként, támogató és „jelez” ha kell. Külön köszönöm öcsémnek, hogy tudományos pályám főbb lépéseinek elengedhetetlen katalizátora volt. Köszönöm nővéremnek és családjának a sokrétű támogatást, és a folyamatos lelki feltöltődést. Végtelenül hálás vagyok páromnak, Péternek a szeretetért, az elfogadásért, hogy mellettem áll és erősít. Türelme és megértése nélkül ez a disszertáció sem született volna meg.

IRODALOMJEGYZÉK

- Andree KB, MacConnell E, Hedrick R (1998) A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 34:145-154
- Andree KB, Székely C, Molnár K, Gresoviac SJ, Hedrick RP (1999) Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. J Parasitol 85:68-74
- Antonio D, Andree K, McDowell T, Hedrick R (1998) Defection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout and oligochaete tissues by using a nonradioactive *in situ* hybridization (ISH) protocol. J Aquat Animal Health 10:338-347
- Atkinson SD, Bartholomew JL (2010) Spatial, temporal and host factors structure the *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) population in the Klamath River basin. Infect Genet Evol 10:1019-1026
- Auerbach M (1910) Die Sporenbildung von *Zschokkella* und das System der Myxosporidien. Zool Anz 35:859-868 [in German]
- Baldwin T, Vincent E, Silflow R, Stanek D (2000) *Myxobolus cerebralis* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) exposed under natural stream conditions. J Vet Diagn Invest 12:312-321
- Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Barrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. J Parasitol 83:262-271
- Bartholomew JL, Ray E, Torell B, Whipple M, Heidel J (2004) Monitoring *Ceratomyxa shasta* infection during a hatchery rearing cycle: comparison of molecular, serological and histological methods. Dis Aquat Org 62:85-92
- Bartošová P, Fiala I (2011) Molecular evidence for the existence of cryptic species assemblages of several myxosporeans (Myxozoa). Parasitol Res 108:573-583
- Bartošová P, Fiala I, Jirků M, Cinková M, Caffara M, Fioravanti ML, Atkinson SD, Bartholomew JL, Holzer AS (2013) *Sphaerospora sensu stricto*: taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). Mol Phylogenet Evol 68:93-105
- Baska F (1987) Histological studies on the development of *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936 in the roach (*Rutilus rutilus*). Acta Vet Hung 35:251-257
- Baska F, Molnár K (1988) Blood stages of *Sphaerospora* spp. (Myxosporea) in cyprinid fishes. Dis Aquat Org 5:23-28
- Baxa DV, Kelley GO, Mukkatira KS, Beauchamp KA, Rasmussen C, Hedrick RP (2008) Arrested development of the myxozoan parasite, *Myxobolus cerebralis*, in certain populations of mitochondrial 16S lineage III *Tubifex tubifex*. Parasitol Res 102:219-228
- Beauchamp K, El-Matbouli M, Gay M, Georgiadis M, Nehring R, Hedrick RP (2006) The effect of cohabitation of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) populations on infections to *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxobolidae). J Inverteb Pathol 91:1-8

- Beauchamp KA, Gay M, Kelley G, El-Matbouli M, Kathman R, Nehring R, Hedrick RP (2002) Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis*, and genetic differences among populations of *Tubifex tubifex*. *Dis Aquat Org* 51:113-121
- Beauchamp KA, Kathman RD, McDowell TS, Hedrick RP (2001) Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). *Mol Phylogen Evol* 19:216-224
- Bernatchez L (2001) The evolutionary history of brown trout *Salmo trutta* L. inferred from phylogeographic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution* 55:351-379
- Bettge K, Wahli T, Segner H, Schmidt-Posthaus H (2009) Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Dis Aquat Org* 83:67-76
- Bjork S, Bartholomew JL (2010) Invasion of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) and comparison of migration to the intestine between susceptible and resistant fish hosts. *Int J Parasitol* 40:1087-1095
- Brinkhurst RO (1963) A guide for the identification of British aquatic Oligochaeta. *Freshwater Biol Assoc Sci Publ* 22:1-55
- Bütschli O (1882) Myxosporidia. In: Winter CF (ed) *Bronn's Klassen und Ordnungen des Tierreichs*, Volume 1 Protozoa, Book 1, Leipzig, pp. 590-603. [in German]
- Cavender W, Wood J, Powell M, Overturf K, Cain K (2004) Real-time quantitative polymerase chain reaction (QPCR) to identify *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 60:205-213
- Chang ES, Neuhoof M, Rubinstein ND, Diamant A, Philippe H, Huchon D, Cartwright P (2015) Genomic insights into the evolutionary origin of Myxozoa within Cnidaria. *Proc Natl Acad Sci USA* 112:14912-14917
- Chevassus B, Dorson M (1990) Genetics of resistance to disease in fishes. *Aquaculture* 85:83-107
- Csaba G (1976) An unidentifiable extracellular sporozoan parasite from the blood of the carp. *Parasitol Hung* 9:21-24
- Diamant A (1997) Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. *Dis Aquat Org* 30:99-105
- Dogiel VA (1965) General parasitology. 2nd ed., Vol 13. Oxford University Press, Oxford, UK
- Dyková I, Lom J (1988) Review of pathogenic myxosporeans in intensive culture of carp (*Cyprinus carpio*) in Europe. *Folia Parasitol* 36:289-307
- Ehlinger NF (1977) Selective breeding of trout for resistance to furunculosis. *N Y Fish Game J* 24:25-36
- Eiras J (2002) Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thelohan, 1892 (Myxozoa : Myxosporea : Myxobolidae). *Syst Parasitol* 52:43-54
- Eiras J (2006) Synopsis of the species of *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae). *Syst Parasitol* 65:49-71
- Eiras J, Adriano E (2012) A checklist of new species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2002 and 2012. *Syst Parasitol* 83:95-104

- Eiras J, Lu Y, Gibson D, Fiala I, Saraiva A, Cruz C, Santos M (2012) Synopsis of the species of *Chloromyxum* Mingazinni, 1890 (Myxozoa: Myxosporea: Chloromyxidae). Syst Parasitol 83:203-225
- Eiras J, Molnár K, Lu Y (2005) Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). Syst Parasitol 61:1-46
- Eiras J, Zhang J, Molnár K (2014) Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea, Myxobolidae) described between 2005 and 2013. Syst Parasitol 88:11-36
- El-Mansy A, Székely C, Molnár K (1998a) Studies on the occurrence of actinosporean stages of fish myxosporeans in a fish farm of Hungary, with the description of triactinomyxon, raabeia, aurantiactinomyxon and neoactinomyxon types. Acta Vet Hung 46:259-284
- El-Mansy A, Székely C, Molnár K (1998b) Studies on the occurrence of actinosporean stages of myxosporeans in Lake Balaton, Hungary, with the description of triactinomyxon, raabeia and aurantiactinomyxon types. Acta Vet Hung 46:437-450
- El-Matbouli M, Fischer-Scherl T, Hoffmann RW (1992) Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology, and therapy of some Myxosporea spp. important for freshwater fish. Ann Rev Fish Dis 3:367-402
- El-Matbouli M, Hoffmann RW (1998) Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*. Int J Parasitol 28:195-217
- El-Matbouli M, Hoffmann RW, Mandok C (1995) Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. J Fish Biol 46:919-935
- El-Matbouli M, Hoffmann RW, Schoel H, McDowell TS, Hedrick RP (1999a) Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Org 35:1-12
- El-Matbouli M, Holstein TW, Hoffmann RW (1998) Determination of nuclear DNA concentration in cells of *Myxobolus cerebralis* and triactinomyxon spores, the causative agent of whirling disease. Parasitol Res 84:694-699
- El-Matbouli M, McDowell T, Antonio D, Andree K, Hedrick RP (1999b) Effect of water temperature on the development, release and survival of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* in its oligochaete host. International J Parasitol 29:627-641
- Estoup A, Presa P, Krieg F, Vaiman D, Guyomard R (1993) (CT)_n and (GT)_n microsatellites: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). Heredity 71:488-496
- Eszterbauer E (2004) Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. Dis Aquat Org 58:35-40
- Eszterbauer E, Atkinson S, Diamant A, Morris D, El-Matbouli M, Hartikainen H (2015a) Myxozoan life cycles: practical approaches and insights. In: Myxozoan evolution, ecology and development. Springer International Publishing, Switzerland
- Eszterbauer E, Benkő M, Dán A, Molnár K (2001) Identification of fish-parasitic *Myxobolus* (Myxosporea) species using a combined PCR-RFLP method. Dis Aquat Org 44:35-39

- Eszterbauer E, Forró B, Tolnai Z, Guti CF, Zsigmond G, Hoitsy G, Kallert DM (2015b) Parental genetic diversity of brown trout (*Salmo trutta* m. *fario*) brood stock affects offspring susceptibility to whirling disease. *Parasit Vectors* 8:141
- Eszterbauer E, Kallert DM, Grabner D, El-Matbouli M (2009) Differentially expressed parasite genes involved in host recognition and invasion of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa). *Parasitology* 136:367-377
- Eszterbauer E, Marton S, Rácz OZ, Letenyei M, Molnár K (2006) Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification. *Syst Parasitol* 65:97-114
- Eszterbauer E, Sipos D, Forró B, Bartošová P, Holzer A (2013) Molecular characterization of *Sphaerospora molnari* (Myxozoa), the agent of gill sphaerosporosis in common carp *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Org* 104:59-67
- Eszterbauer E, Sipos D, Szakály Á, Herczeg D (2019) Distinctive site preference of the fish parasite *Myxobolus cerebralis* (Cnidaria, Myxozoa) during host invasion. *Acta Vet Hung* 67:212-223
- Eszterbauer E, Székely C (2004) Molecular phylogeny of the kidney-parasitic *Sphaerospora renicola* from common carp (*Cyprinus carpio*) and *Sphaerospora* sp from goldfish (*Carassius auratus auratus*). *Acta Vet Hung* 52:469-478
- Evans NM, Holder MT, Barbeitos MS, Okamura B, Cartwright P (2010) The phylogenetic position of Myxozoa: exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets. *Mol Biol Evol* 27:2733-2746
- Feist SW, Morris DJ, Alama-Bermejo G, Holzer AS (2015) Cellular processes in Myxozoans. In: *Myxozoan evolution, ecology and development*. Springer International Publishing, Switzerland
- Fetherman ER, Winkelman DL, Schisler GJ, Antolin MF (2012) Genetic basis of differences in myxospore count between whirling disease-resistant and susceptible strains of rainbow trout. *Dis Aquat Org* 102:97-106
- Fetherman ER, Winkelman DL, Schisler GJ, Myrick CA (2011) The effects of *Myxobolus cerebralis* on the physiological performance of whirling disease resistant and susceptible strains of rainbow trout. *J Aquat Anim Health* 23:169-177
- Fiala I (2006) The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Int J Parasitol* 36:1521-1534
- Fiala I, Bartošová P (2010) History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evol Biol* 10:228
- Fiala I, Bartošová-Sojková P, Okamura B, Hartikainen H (2015a) Adaptive Radiation and Evolution Within the Myxozoa. In: *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 69-84
- Fiala I, Bartošová-Sojková P, Whipps CM (2015b) Classification and phylogenetics of Myxozoa. In: *Myxozoan evolution, ecology and development*. Springer International Publishing, Switzerland
- Forró B, Eszterbauer E (2016) Correlation between host specificity and genetic diversity for the muscle-dwelling fish parasite *Myxobolus pseudodispar*: examples of myxozoan host-shift? *Folia Parasitol* 63:019

- Gorbunova M (1936) Changes in the parasitic fauna of pike and roach according to their age. Uchenye Zapiski Leningradskogo Ordena Lenina Gosudarstvennogo Universiteta, No 7 (Biol Ser) Fasc 3, Problems of Economical Parasitology, Leningrad:5–30
- Granath W, Gilbert M, Wyatt-Pescador E, Vincent E (2007) Epizootiology of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease in the Rock Creek drainage of west-central Montana. J Parasitol 93:104–119
- Grasse PP, Lavette A (1978) Myxosporidia *Sphaeromyxa sabrazesi* and new embranchment of Myxozoa - researches upon pluricellular stage and considerations on phylogeny. Annales Des Sciences Naturelles-Zoologie Et Biologie Animale 20:193-285
- Gómez D, Bartholomew JL, Sunyer JO (2014) Biology and mucosal immunity to myxozoans. Dev Comp Immunol 43:243-256
- Hallett SL, Atkinson SD, Bartholomew JL, Székely C (2015) Myxozoans Exploiting Homeotherms. In: Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Springer International Publishing, Switzerland
- Hallett SL, Atkinson SD, El-Matbouli M (2002) Molecular characterisation of two aurantiactinomyxon (Myxozoa) phenotypes reveals one genotype. J Fish Dis 25:627-631
- Hallett SL, Atkinson SD, Schöl H, El-Matbouli M (2003) Characterisation of two novel types of hexactinomyxon spores (Myxozoa) with subsidiary protrusions on their caudal processes. Dis Aquat Org 55:45-57
- Hallett SL, Diamant A (2001) Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia. Dis Aquat Org 46:197-212
- Halliday MM (1976) The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids. J Fish Biol 9:339–357
- Hartigan A, Estensoro I, Vancová M, Bílý T, Patra S, Eszterbauer E, Holzer AS (2016) New cell motility model observed in parasitic cnidarian *Sphaerospora molnari* (Myxozoa:Myxosporea) blood stages in fish. Sci Rep 6:39093
- Hedrick RP, El-Matbouli M, Adkison M, MacConnell E (1998) Whirling disease: re-emergence among wild trout. Immunol Rev 166:365-376
- Hedrick RP, McDowell TS, Gay M, Marty GD, Georgiadis MP, MacConnell E (1999) Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. Dis Aquat Org 37:173-183
- Hedrick RP, McDowell TS, Marty GD, Fosgate GT, Mukkatira K, Myklebust K, El-Matbouli M (2003) Susceptibility of two strains of rainbow trout (one with suspected resistance to whirling disease) to *Myxobolus cerebralis* infection. Dis Aquat Org 55:37-44
- Heiniger H, Cribb TH, Adlard RD (2013) Intra-specific variation of *Kudoa* spp. (Myxosporea: Multivalvulida) from apogonid fishes (Perciformes), including the description of two new species, *K. cheilodipteri* n. sp. and *K. cookii* n. sp., from Australian waters. Syst Parasitol 84:193-215
- Hervio D, Kent M, Khattra J, Sakanari J, Yokoyama H, Devlin R (1997) Taxonomy of *Kudoa* species (Myxosporea), using a small-subunit ribosomal DNA sequence. Can J Zool 75:2112-2119

- Hillis DM, Dixon T (1991) Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Rev Biol* 66:411-453
- Hofer B (1903) Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. *Allgemeine Fischereizeitung* 28:7-8 [in German]
- Hoffman CJB (1974) Fish age as related to susceptibility to *Myxosoma cerebralis*, cause of whirling disease. *Progress Fish-Cult* 36:151–151
- Hoffman GL (1970) Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). In: Snieszko SF (ed) A symposium on diseases of salmonids, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland
- Hoffman GL (1990) *Myxobolus cerebralis*, a worldwide cause of salmonid whirling disease. *J Aquat Animal Health* 2:30-37
- Hoffman GL, Dunbar CE, Bradford A (1962) Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. Special Scientific Report- Fisheries US Fish and Wildlife Service Federal Government Series No. 427
- Holland JW, Okamura B, Hartikainen H, Secombes CJ (2011) A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proc Biol Sci* 278:546-553
- Holzer AS, Bartošová P, Pecková H, Tymi T, Atkinson S, Bartholomew J, Sipos D, Eszterbauer E, Dyková I (2013) Who's who' in renal sphaerosporids (Bivalvulida: Myxozoa) from common carp, Prussian carp and goldfish--molecular identification of cryptic species, blood stages and new members of *Sphaerospora sensu stricto*. *Parasitology* 140:46-60
- Holzer AS, Bartošová-Sojtková P, Born-Torrijos A, Lovy A, Hartigan A, Fiala I (2018) The joint evolution of the Myxozoa and their alternate hosts: A cnidarian recipe for success and vast biodiversity. *Mol Ecol* 27:1651-1666
- Holzer AS, Hartigan A, Patra S, Pecková H, Eszterbauer E (2014) Molecular fingerprinting of the myxozoan community in common carp suffering swim bladder inflammation (SBI) identifies multiple etiological agents. *Parasit Vectors* 7:398
- Holzer AS, Sommerville C, Wootten R (2003) Tracing the route of *Sphaerospora truttae* from the entry locus to the target organ of the host, *Salmo salar* L., using an optimized and specific *in situ* hybridization technique. *J Fish Dis* 26:647-655
- Holzer AS, Sommerville C, Wootten R (2004) Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences. *Int J Parasitol* 34:1099-1111
- Holzer AS, Wootten R, Sommerville C (2007) The secondary structure of the unusually long 18S ribosomal RNA of the myxozoan *Sphaerospora truttae* and structural evolutionary trends in the Myxozoa. *Int J Parasitol* 37:1281-1295
- Huelsenbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-755
- Ibarra AM, Hedrick RP, Gall GAE (1994) Genetic analysis of rainbow trout susceptibility to the myxosporean *Ceratomyxa shasta*. *Aquaculture* 120:239–262

- Janiszewska J (1955) Actinomyxidia. Morphology, ecology, history of investigations, systematics, development. Acta Parasitol Polonica 2:405–443
- Janiszewska J (1957) Actinomyxidia II. New systematics, sexual cycle, description of new genera and species. Zool Poloniae 8:3-34
- Jimenez-Guri E, Okamura B, Holland P (2007a) Origin and evolution of a myxozoan worm. Integrat Comparat Biol 47:752-758
- Jimenez-Guri E, Philippe H, Okamura B, Holland P (2007b) *Buddenbrockia* is a Cnidarian worm. Science 317:116-118
- Jurine L (1825) Histoire des poissons du lac Léman. Memoires de la Société de physique et d'histoire naturelle de Genève 3 [in French]
- Kallert DM, El-Matbouli M (2008) Differences in viability and reactivity of actinospores of three myxozoan species upon ageing. Folia Parasitol 55:105-110
- Kallert DM, Bauer W, Haas W, El-Matbouli M (2011) No shot in the dark: myxozoans chemically detect fresh fish. Int J Parasitol 41:271-276
- Kallert DM, Borrelli J, Haas W (2012) Biostatic activity of piscine serum and mucus on myxozoan fish infective stages. Fish Shellfish Immunol 33:969-976
- Kallert DM, El-Matbouli M, Haas W (2005) Polar filament discharge of *Myxobolus cerebralis* actinospores is triggered by combined non-specific mechanical and chemical cues. Parasitol 131:609-616
- Kallert DM, Eszterbauer E, Grabner D, El-Matbouli M (2009) *In vivo* exposure of susceptible and non-susceptible fish species to *Myxobolus cerebralis* actinospores reveals non-specific invasion behaviour. Dis Aquat Org 84:123-130
- Kallert DM, Forró B, Eszterbauer E (2014) Inosine-arginine salt as a promising agent for *in vitro* activation of waterborne fish-pathogenic myxozoan actinospores. Dis Aquat Org 109:149-154
- Kallert DM, Grabner DS, Yokoyama H, El-Matbouli M, Eszterbauer E (2015) Transmission of Myxozoans to vertebrate hosts. In: Myxozoan evolution, ecology and development. Springer International Publishing, Switzerland
- Kallert DM, Ponader S, Adelt S, Kaese P, Geyer R, Haas W, El-Matbouli M (2010) Analysis of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* epidermal mucus and evaluation of semiochemical activity for polar filament discharge in *Myxobolus cerebralis* actinospores. J Fish Biol 77:1579-1598
- Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T (2012) Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin Infect Dis 54:1046-1052
- Kelley GO, Zagmutt-Vergara FJ, Leutenegger CM, Myklebust KA, Adkison MA, McDowell TS, Marty GD, Kahler AL, Bush AL, Gardner IA, Hedrick RP (2004) Evaluation of five diagnostic methods for the detection and quantification of *Myxobolus cerebralis*. J Vet Diagn Invest 16:202-211
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Dessler SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJ, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao C (2001) Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. J Eukaryot Microbiol 48:395-413

- Kent ML, Khattra J, Hedrick RP, Devlin RH (2000) *Tetracapsula renicola* n. sp. (Myxozoa : Saccosporidae); the PKX myxozoan--the cause of proliferative kidney disease of salmonid fishes. *J Parasitol* 86:103-111
- Kent ML, Margolis L, Corliss JO (1994) The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protest phylum Myxozoa Grassé, 1970. *Can J Zool* 72:932-937
- Kim J, Kim W, Cunningham C (1999) A new perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences. *Mol Biol Evol* 16:423-427
- Korytář T, Wiegertjes GF, Zusková E, Tomanová A, Lisnerová M, Patra S, Sieranski V, Šíma R, Born-Torrijos A, Wentzel AS, Blasco-Monleon S, Yanes-Roca C, Policar T, Holzer AS (2019) The kinetics of cellular and humoral immune responses of common carp to presporogonic development of the myxozoan *Sphaerospora molnari*. *Parasit Vectors* 12:208
- Kudo RR (1919) Studies on Myxosporidia: A synopsis of genera and species of Myxosporidia. III *Biol Monogr* 5:1-256
- Kudo RR (1933) A taxonomic consideration of Myxosporidia. *Trans Am Microsc Soc* 52:192-216
- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, Derous G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AÉ, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Spargue V, Varva J, Wallace FG (1980) A newly classification of the Protozoa. *J Protozool* 27:37-58
- Lieberkühn L (1854) Sur les psorospermies. *Bull Acad Roy Belg* 21:160-168 [in French]
- Lom J, Dyková I (1997) Ultrastructural features of the actinosporean phase of myxosporea (Phylum myxozoa): A comparative study. *Acta Protozool* 36:83-103
- Lom J, Dyková I (1992) Protozoan parasites of fishes, Vol. Elsevier, Amsterdam
- Lom J, Dyková I (1993) Scanning electron-microscopic revision of common species of the genus *Chloromyxum* (Myxozoa, Myxosporea) infecting european fresh-water fishes. *Folia Parasitol* 40:161-174
- Lom J, McGeorge J, Feist S, Morris D, Adams A (1997) Guidelines for the uniform characterisation of the actinosporean stages of parasites of the phylum Myxozoa. *Dis Aquat Org* 30:1-9
- Lom J, Noble ER (1984) Revised classification of the Myxosporea Bütschli, 1881. *Folia Parasitol* 31:93-205
- Longshaw M, Le Deuff R-M, Harris AF, Feist SW (2002) Development of proliferative kidney disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), following short-term exposure to *Tetracapsula bryosalmonae* infected bryozoans. *J Fish Dis* 25:443-449
- MacConnell E, Vincent ER (2002) The effects of *Myxobolus cerebralis* on the salmonid host. In: Bartholomew JL, Wilson JC (eds) Whirling disease: Reviews and current topics, American Fisheries Society, Symposium 29, Bethesda, Maryland
- Marić S, Simonović P, Razpet A (2010) Genetic characterization of brood stock brown trout from Bled fish-farm, Slovenia. *Period Biologorum* 112:145-148
- Markiw ME (1992) Salmonid Whirling Disease. Fish and Wildlife Leaflet US Fish and Wildlife Service (Federal Government Series No. 17)

- Marques A (1982) La spore des Actinomyxidies: *Synactinomyxon longicauda* n. sp., un nouveau type de groupement sporal et adaptations planctoniques. Emission et structure du sporoplasme. J Protozool 29:195–202 [in French]
- Marton S, Eszterbauer E (2012) The susceptibility of diverse species of cultured oligochaetes to the fish parasite *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova (Myxozoa). J Fish Dis 35:303–314
- McGeorge J, Sommerville C, Wootten R (1996) Epizootiology of *Sphaerospora truttae* (Myxozoa: Myxosporidia) infections of Atlantic salmon *Salmo salar* at freshwater smolt producing hatcheries in Scotland. Dis Aquat Org 26:33–41
- Molnár K (1979) Protozoan parasites of fish species indigenous in Hungary. Parasitol Hung 12:5–8
- Molnár K (1980) Renal sphaerosporosis in the common carp *Cyprinus carpio* L. J Fish Dis 3:11–19
- Molnár K (1988) Presporogonic development of *Sphaerospora renicola* Dyková and Lom, 1982. J Fish Dis 11:489–498
- Molnár K (1994) Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development. Parasitol Hung 27:5–20
- Molnár K (2002a) Site preference of fish myxosporeans in the gill. Dis Aquat Org 48:197–207
- Molnár K (2002b) Site preference of myxosporean spp. on the fins of some Hungarian fish species. Dis Aquat Organ 52:123–128
- Molnár K, Eszterbauer E (2015) Specificity of infection sites in vertebrate hosts. In: Myxozoan evolution, ecology and development. Springer International Publishing, Switzerland
- Molnár K, Eszterbauer E, Marton S, Székely C, Eiras JC (2012) Comparison of the *Myxobolus* fauna of common barbel from Hungary and Iberian barbel from Portugal. Dis Aquat Organ 100:231–248
- Molnár K, Eszterbauer E, Székely C, Dán Á, Harrach B (2002) Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. J Fish Dis 25:643–652
- Molnár K, Kovács-Gayer É (1986) Experimental induction of *Sphaerospora renicola* (Myxospora) infection in common carp (*Cyprinus carpio*) by transmission of SB protozoan. J Appl Ichthyol 2:214–217
- Molnár K, Marton S, Székely C, Eszterbauer E (2010) Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary. Parasitol Res 107:1137–1150
- Monteiro AS, Okamura B, Holland PWH (2002) Orphan Worm Finds a Home: *Buddenbrockia* is a Myxozoan. Mol Biol Evol 19:968–971
- Morris DJ (2012) A new model for myxosporean (Myxozoa) development explains the endogenous budding phenomenon, the nature of cell within cell life stages and evolution of parasitism from a cnidarian ancestor. Int J Parasitol 42:829–840
- Morris DJ, Freeman MA (2010) Hyperparasitism has wide-ranging implications for studies on the invertebrate phase of myxosporean (Myxozoa) life cycles. Int J Parasitol 40:357–369
- Müller J (1841) Über Psorospermien. Arch Anat Physiol Wissensch Med 5:477–496 [in German]
- Negredo C, Dillane E, Mulcahy M (2003) Small subunit ribosomal DNA characterization of an unidentified aurantiactinomyxon form and its oligochaete host *Tubifex ignotus*. Dis Aquat Org 54:229–241

- Nesnidal MP, Helmkampf M, Bruchhaus I, El-Matbouli M, Hausdorf B (2013) Agent of whirling disease meets orphan worm: phylogenomic analyses firmly place Myxozoa in Cnidaria. *PLOS One* 8:e54576
- Nichols KM, Bartholomew J, Thorgaard GH (2003) Mapping multiple genetic loci associated with *Ceratomyxa shasta* resistance in *Oncorhynchus mykiss*. 56:145–154
- Okamura B, Curry A, Wood TS, Canning EU (2002) Ultrastructure of *Buddenbrockia* identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa. *Parasitol* 124:215-223
- Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (2015a) An introduction to Myxozoan evolution, ecology and development. In: Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (eds) *Myxozoan evolution, ecology and development*. Springer International Publishing, Switzerland, pp 1-20
- Okamura B, Gruhl A, Bartholomew JL (2015b) *Myxozoan evolution, ecology and development*, Vol. Springer International Publishing, Switzerland, 441 p.
- Oumouna M, Hallett SL, Hoffmann RW, El-Matbouli M (2003) Seasonal occurrence of actinosporeans (Myxozoa) and oligochaetes (Annelida) at a trout hatchery in Bavaria, Germany. *Parasitol Res* 89:170-184
- O'Grodnick JJ (1979) Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). *Trans Am Fish Soc* 108:187–190
- O'Reilly P, Hamilton L, McConnell S, Wright J (1996) Rapid analysis of genetic variation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) by PCR multiplexing of dinucleotide and tetranucleotide microsatellites. *Can J Fisheries Aquat Sci* 53:2292-2298
- Özer A, Wootten R, Shinn AP (2002) Survey of actinosporean types (Myxozoa) belonging to seven collective groups found in a freshwater salmon farm in Northern Scotland. *Folia Parasitol* 49:189-210
- Patra S, Bartošová-Sojková P, Pecková H, Fiala I, Eszterbauer E, Holzer AS (2018) Biodiversity and host-parasite cophylogeny of *Sphaerospora* (sensu stricto) (Cnidaria: Myxozoa). *Parasit Vectors* 11:347
- Patra S, Hartigan A, Morris DJ, Kodádková A, Holzer AS (2017) Description and experimental transmission of *Tetracapsuloides vermiformis* n. sp. (Cnidaria: Myxozoa) and guidelines for describing malacosporean species including reinstatement of *Buddenbrockia bryozoides* n. comb. (syn. *Tetracapsula bryozoides*). *Parasitol* 144:497-511
- Presa P, Guyomard R (1996) Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J Fish Biol* 49:326-329
- Price D (1985) Genetics of susceptibility and resistance to disease in fishes. *J Fish Biol* 26:509–519
- Rangel L, Gibson D, Santos M (2014) Synopsis of the species of the genus *Myxobilatus* Davis, 1944 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobilatidae). *Syst Parasitol* 87:187-198
- Redondo M, Palenzuela O, Ríaza A, Macías A, Alvarez-Pellitero P (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *J Parasitol* 88:482-488
- Ryce EKN, Zale AV, MacConnell E, Nelson M (2005) Effects of fish age versus size on the development of whirling disease in rainbow trout. *Dis Aquat Org* 63:69-76

- Rácz OZ, Székely C, Molnár K (2004) Intraoligochaete development of *Myxobolus intimus* (Myxosporea: Myxobolidae), a gill myxosporean of the roach (*Rutilus rutilus*). *Folia Parasitol* 51:199-207
- Rózsa L, Tryjanowski P, Vas Z (2015) Under the changing climate: how shifting geographic distributions and sexual selection shape parasite diversification. In: Morand S, Krasnov BR, Littlewood DTJ (eds) *Parasite diversity and diversification: evolutionary ecology meets phylogenetics*. Cambridge University Press, Cambridge
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual* (3 volume set), 2nd Edition, Vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
- Saulnier D, De Kinkelin P (1997) Polymerase chain reaction primers for investigations on the causative agent of proliferative kidney disease of salmonids. *J Fish Dis* 20:467-470
- Schlegel M, Lom J, Stechmann A, Bernhard D, Leipe D, Dykova I, Sogin M (1996) Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv Fur Protistenkunde* 147:1-9
- Shulman SS (1966) Myxosporidian fauna of the USSR, Vol. Izdat. "Nauka", Moscow- Leningrad, 507 p. [in Russian]
- Siddall M, Whiting M (1999) Long-branch abstractions. *Cladistics-the International J Willi Hennig Society* 15:9-24
- Siddall ME, Martin DS, Bridge D, Dessler SS, Cone DK (1995) The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. *J Parasitol* 81:961-967
- Sipos D, Ursu K, Dán Á, Herczeg D, Eszterbauer E (2018) Susceptibility-related differences in the quantity of developmental stages of *Myxobolus* spp. (Myxozoa) in fish blood. *PLOS One* 13:e0204437
- Slettan A, Olsaker I, Lie Ø (1995) Atlantic salmon, *Salmo salar*, microsatellites at the SSOSL25, SSOSL85, SSOSL311, SSOSL417 loci. *Anim Gen* 26:281-282
- Slierendrecht WJ, Olesen NJ, Juul-Madsen HR, Lorenzen N, Henryon M, Berg P, al. e (2001) Rainbow trout offspring with different resistance to viral haemorrhagic septicaemia. *Fish Shellfish Immunol* 11:155–167
- Smith C, Koop B, Nelson R (1998) Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Mol Ecol* 7:1614-1616
- Smothers JF, von Dohlen CD, Smith LH, Spall RD (1994) Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science* 265:1719-1721
- Steinbach Elwell LC, Stromberg KE, Ryce EKN, Bartholomew JL (2009) Whirling Disease in the United States. A summary of progress in research and management, Vol. Trout Unlimited and the Whirling Disease Foundation, Bozeman, Montana
- Stolc A (1899) Actinomyxidies, nouveau groupe de Mesozoaires parent des Myxosporidies. *Bull Intl l'Acad Sci Bohème* 22:1-12 [in French]
- Sturmbauer C, Opadiya GB, Niederstatter H, Riedmann A, Dallinger R (2001) Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. *Mol Biol Evol* 16:967-974

- Székely C, Molnár K, Eszterbauer E, Baska F (1999) Experimental detection of the actinospores of *Myxobolus pseudodispar* (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts. *Dis Aquat Org* 38:219-224
- Székely C, Molnár K, Rácz O (2001) Complete developmental cycle of *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova) (Myxosporea : Myxobolidae). *J Fish Dis* 24:461-468
- Thompson K, Nehring R, Bowden D, Wygant T (1999) Field exposure of seven species or subspecies of salmonids to *Myxobolus cerebralis* in the Colorado River, Middle Park, Colorado. *J Aquat Animal Health* 11:312-329
- Thélohan P (1892) Observation sur les myxosporidies et essai de classification de ces organismes. *Bull Soc Phil Paris* 4:165-178 [in French]
- Wang J (2011) COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Mol Ecol Resources* 11:141-145
- Weill R (1938) L'interpretation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle comparé à la phase larvaire des Narcomeduses Cuninides. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereaux* 13:727-744 [in French]
- Whipps CM, Adlard R, Bryant M, Lester R, Findlay V, Kent M (2003) First report of three *Kudoa* species from Eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from Mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*). *J Eukar Microbiol* 50:215-219
- Whipps CM, Grossel G, Adlard R, Yokoyama H, Bryant M, Munday B, Kent M (2004) Phylogeny of the multivalvulidae (Myxozoa : Myxosporea) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. *J Parasitol* 90:618-622
- Whipps CM, Kent ML (2006) Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). *J Eukaryot Microbiol* 53:364-373
- Whipps CM, Zhao Y (2015) Synopsis of the species of the genus *Sphaeromyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Bivalvulida: Variisporina: Sphaeromyxidae). *Syst Parasitol* 92:81-99
- Wiegertjes GF, Stet RJM, Parmentier HK, van Muiswinkel WB (1996) Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Dev Comp Immunol* 20:365–382
- Wolf K, Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225:1449-1452
- Wolf K, Markiw ME, Hiltunen JK (1986) Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaete in the protozoan life cycle. *J Fish Dis* 9:83–85
- Xiao C, Desser S (1998a) Actinosporean stages of myxozoan parasites of oligochaetes from Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario: New forms of echinactinomyxon, neoactinomyxon, aurantiactinomyxon, guyenotia, synactinomyxon and antonactinomyxon. *J Parasitol* 84:1010-1019
- Xiao C, Desser S (1998b) Actinosporean stages of myxozoan parasites of oligochaetes from Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario: New forms of triactinomyxon and raabeia. *J Parasitol* 84:998-1009

- Xiao C, Desser S (1998c) The oligochaetes and their actinosporean parasites in Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario. *J Parasitol* 84:1020-1026
- Yang Y, Xiong J, Zhou Z, Huo F, Miao W, Ran C, Liu Y, Zhang J, Feng J, Wang M, Wang L, Yao B (2014) The genome of the myxosporean *Thelohanellus kitauei* shows adaptations to nutrient acquisition within its fish host. *Genome Biol Evol* 6:3182-3198
- Yokoyama H, Danjo T, Ogawa K, Wakabayashi H (1997) A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of viability of myxosporean and actinosporean spores. *J Fish Dis* 20:281–286
- Yokoyama H, Itoh N (2005) Two multivalvulid myxozoans causing postmortem myoliquefaction: *Kudoa megacapsula* n. sp. from red barracuda (*Sphyrna pinguis*) and *Kudoa thyrsites* from splendid alfonso (*Beryx splendens*). *J Parasitol* 91:1132-1137
- Yokoyama H, Ogawa K, Wakabayashi H (1991) A new collection method of actinosporeans –a probable infective stage of myxosporeans to fishes– from tubificids and experimental infection of goldfish with the actinosporean, *Raabeia* sp. *Fish Pathol* 26:133-138
- Yokoyama H, Ogawa K, Wakabayashi H (1993) Involvement of *Branchiura sowerbyi* (Oligochaeta, Annelida) in the transmission of *Hoferellus carassii* (Myxosporea, Myxozoa), the causative agent of kidney enlargement disease (KED) of goldfish *Carassius auratus*. *Fish Pathol* 28:135-139
- Yokoyama H, Urawa S (1997) Fluorescent labelling of actinospores for determining the portals of entry into fish. *Dis Aquat Org* 30:165-169
- Zhang J, Gu Z, Kalavati C, Costa Eiras J, Liu Y, Guo Q, Molnár K (2013) Synopsis of the species of *Thelohanellus* Kudo, 1933 (Myxozoa: Myxosporea: Bivalvulida). *Syst Parasitol* 86:235-256