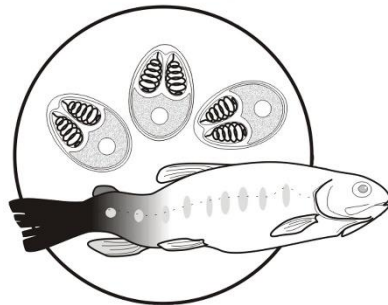


MTA doktori értekezés tézisei

**Nyálkaspórák halélősködők gazdafajlagossága és a gazda–parazita
kölcshatás megnyilvánulásai**

Dr. Eszterbauer Edit



dc_1729_20

Budapest

2020

TARTALOMJEGYZÉK

1. Bevezetés	3
2. Célkitűzések.....	4
3. Anyagok és módszerek	4
3.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vonatkozásai	4
Minták eredete, mintagyűjtés.....	5
Morfológiai és szövettani vizsgálatok.....	5
Molekuláris módszerek.....	5
Filogenetika.....	5
3.2. Gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai	6
<i>In vivo</i> parazita rendszerek.....	6
Kísérleti rendszerek.....	6
Kísérletek statisztikai értékelése.....	6
Molekuláris módszerek.....	6
4. Eredmények és értékelésük	7
4.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vonatkozásai	8
4.1.1. <i>Myxobolus</i> fajok és közeli rokonaik.....	8
4.1.2. <i>Sphaerospora</i> fajok	11
4.2. Gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai	14
4.2.1. Parazita gazdaspektrum vizsgálata	14
4.2.2. Nyálkaspórások szövet- és szervspecifitása	17
4.2.3. Gazdafelismerés megnyilvánulásai.....	18
4.2.4. Parazitára való fogékonyság jellegzetességei.....	22
4.3. Fertőzés elleni védekezés; gyakorlati alkalmazhatóság	25
5. Új tudományos eredmények	27
6. Értekezés alapját képező közlemények.....	28
7. Értekezés témájához kapcsolódó egyéb közlemények	29
Köszönetnyilvánítás.....	32

1. 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 bélgyulladás 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 kopoltyú-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 nyálkaspórás 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 nyálkaspórások 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 kopolyú-sphaerosporosis etiológiájának és a betegséget okozó fajok filogenetikájának tanulmányozását párhuzamosan kezdtük Astrid Holzer kolléganőmmel és cseh kutatócsoportjával. Tudatosan szakítva elődeink „rivalizáló hagyományával”, évekkal ezelőtt egyesítettük erőinket, és egymás munkáját kiegészítve és erősítve, közösen haladtunk és haladunk a kórokozó *Sphaerospora* fajok, még a nyálkaspórások 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 nyálkaspórás parazitákat különlegessé, más állatcsoporthoz nem hasonlíthatóan egyedivé teszik. Ahogy egyre mélyebbre ástunk a nyálkaspórások 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...

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezés alapját képező kutatások célja a következő volt:

- A gazdafajlagosság filogenetikai hátterének, valamint a *Myxobolus* és *Sphaerospora* fajok genetikai diverzitásának feltérképezése.
- A nyálkaspórás fajok szöveti és szervi preferenciája, valamint rokonsági viszonyai közötti összefüggés feltárása.
- A gazdafelismerés folyamatának mélyebb megértése; genetikai hátterének és specificitásának vizsgálata.
- A gazdák nyálkaspórásokra való fogékonyságát befolyásoló tényezők kimutatása.
- A nyálkaspórás fertőzés elleni védekezés lehetőségeinek vizsgálata.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Gazdafajlagosság filogenetikai vonatkozásai

A gazdafajlagosság kérdéskörét két nyálkaspórás csoporton vizsgáltuk. Az egyik a hazánkban és Európában gyakori, az édesvízi, szöveti élősködők csoportja, melyben

Myxobolus, *Henneguya* és *Thelohanellus* fajok dominálnak. A másik, a cölozoikus élősködők ősi csoportja a *Sphaerospora sensu stricto* (s. str.) klád tagjai.

Minták eredete, mintagyűjtés

A gyűjtött parazita minták többsége hazai halgazdaságból származott. A leggyakoribb mintavételi helyek a százhalombattai Temperált Vízü 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. A *M. cerebralis* minták Németországból, bajor pisztrángos gazdaságokból származtak. Számos *Sphaerospora* minta csehországi halgazdaságokból származott.

Morfológiai és szövettani vizsgálatok

A myxospóra és actinospóra alakok morfometriai jellemzése során a klasszikus protokollt követtük. A morfológiai vizsgálat kiegészült a parazita spórák szervi és szöveti lokalizációjának natív mikroszkópos és szövettani vizsgálatával.

Molekuláris módszerek

DNS feltárás és PCR:

A mintákban levő DNS kivonására számos módszert kipróbáltunk. A PCR-rel felerősített DNS szakaszok mindegyike a 18S rDNS különböző hosszúságú szakaszai voltak. A felsokszorozáshoz (amplification) többféle primerpárt használtunk, melyek egy részét szakirodalmi adatokból gyűjtöttük, másik részét a munka során magunk terveztük és optimalizáltuk alkalmazhatóságukat.

Sanger szekvenálás:

A DNS szekvenálást magunk végeztük, míg a DNS szekvenciák detektálását a Szegedi Biológiai Központ Szekvenáló Laboratóriumától rendeltük szolgáltatásként.

In situ hibridizáció:

A *M. pseudodispar* parazita oligochaeta gazdában történő fejlődésének és a *Sphaerospora molnari* pontyban való fejlődését vizsgálatára *in situ* hibridizációs (ISH) módszert alkalmaztunk. Előbbi esetben faj-specifikus, biotin-jelölt oligonukleotidokat, utóbbi munka során DIG-jelölt próbákat használtunk a hibridizációhoz.

Filogenetika

A filogenetikai módszerek elméleti és technikai fejlődését követve változtak az elemzésekhez használt szoftverek és paraméterek. A filogenetikai számításokat általában a legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) becslési módszerrel, valamint Bayesian statisztikával (Bayesian inference of phylogeny) is elvégeztük.

3.2. Gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai

***In vivo* parazita rendszerek**

Az *in vivo* laboratóriumi nyálkaspórási tenyésztés fenntartásához folyamatosan ellenőrzött faji összetételű, parazitamentes kevéssertéjű féreg állományokat (*Tubifex* és *Limnodrilus* fajokat) neveltünk és tartottunk zárt, laboratóriumi rendszerben. Az *in vivo* parazita tenyésztés laboratóriumi fenntartásához és a kísérletekhez szükséges specifikus parazitamentes (SPF) halakat a laboratóriumi akvárium rendszerben neveltük parazitamentes körülmények között. A kísérletes munkához két nyálkaspórási faj, a *Myxobolus cerebralis* és a *Myxobolus pseudodispar* élelciklusát *in vivo* laboratóriumi rendszerben folyamatosan fenntartottuk.

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. A paraziták minden esetben zárt laboratóriumi rendszerben fenntartott állományból származtak. 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.

A fertőzési kísérletek az alábbi célból történtek:

- *M. pseudodispar* gazdafajlagosságának vizsgálata kevéssertéjű féreg gazdában.
- *M. pseudodispar* gerinces gazdaspektrumának vizsgálata.
- *M. cerebralis* gazdafelismerésének vizsgálata.
- *M. cerebralis* lokalizációjának kimutatása a gazdába való bejutás során.
- *M. cerebralis* gazdafelismerése molekuláris hátterének vizsgálata.
- Beltenyésztettség hatásának vizsgálata a *M. cerebralis* fertőzöttségére.
- Vér szerepének igazolása a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* fertőzöttségben.
- Betegségmegelőzés lehetőségeinek vizsgálata.

Kísérletek statisztikai értékelése

A kapott kísérleti eredmények értékelése és 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 Kluskal-Wallis teszttel és azt követő Dunn próbával elemeztük az adatsort.

Molekuláris módszerek

Hal vérvonal és mikroszatellit vizsgálat:

A sebes pisztráng tenyészállomány vérvonalának meghatározásához a mitokondriális DNS kontroll régiót és a laktát-dehidrogenáz enzim génjének C1 régióját vizsgáltuk PCR-hez kötött RFLP módszer segítségével. A sebes pisztráng tenyészállományok genetikai

variabilitásának meghatározásához a következő nyolc mikroszatellit lókuszt vizsgáltunk: Str-15, Str-60, Str-543, SsoSL-417, SsoSL-438, Ssa-85, Ssa-197, OKI-10.

Szupressziós szubtraktív hibridizáció (SSH):

A gazdafelismerés során aktiválódó gének kimutatásához a nem-aktivált (intakt), és az aktivált (gazdát felismert) TAM-ok transzkriptóm-készletének összehasonlítását szupressziós szubtraktív hibridizációval (SSH) végeztük.

Kevéssertéjű féreg-specifikus PCR:

A kevéssertéjű férgemet morfológiai bélyegek mellett molekuláris biológiai módszerekkel is vizsgáltuk. Ehhez a mitokondriális 16S rDNS (mt 16S rDNS) egy 370 bp hosszú szakaszát sokszoroztuk fel.

Valós idejű qPCR rendszerek:

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

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

A nyálkaspórák kutatás számára nagy lendületet adott a parazita csoport életciklusának tisztázása, ami alapján világossá vált, hogy egy adott nyálkaspórák 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 (Eszterbauer et al. 2015a). Az azonosított életciklusok száma pillanatnyilag 47, 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. 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).

A rendkívül munka- és időigényes tenyésztés a legtöbb faj esetében nem megoldott. Egy könyvfejezet keretein belül foglaltuk össze ismereteinket a nyálkaspórák 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 kevéssertéjű férgemet) 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 nyálkaspórák (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 vonatkozásai

4.1.1. *Myxobolus* fajok és közeli rokonaik

Actinospóra típusok felmérő vizsgálata

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 nyálkaspórák kétféle spóratípussal rendelkeznek. Ezért a gerinctelen gazdában fejlődő actinospórákat az 1990-es évekig külön fajként írták le. 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 szezonális viselkedésének vizsgálata is fókuszba került. A legtöbb vizsgálat, földrajzi elterjedéstől függetlenül igen alacsony (sokszor 1% alatti) fertőzöttséget mutatott ki kevéssertéjű féreg gazdáiban, néhány kivétellel, mint pl. a 33,3%-os *Aurantiactinomyxon pavinsis* fertőzöttség a skót felföld gyorsfolyású patakjaiban. A gerinctelen gazdák actinospóra fertőzöttségét hosszabb ideig vizsgálva (akár 1 évig is) magasabb prevalencia volt kimutatható, 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 kevéssertéjű 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 kevéssertéjű 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 kopoltyúívén 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 wootenii* 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 spóra morfológia önmagában nem elegendő adott nyálkaspórás faj actinospóra stádiumának jellemzéséhez, hanem a DNS szekvencia, és a gazdafaj azonosítása is elengedhetetlen része a pontos faj/típus leírásnak.

***M. pseudodispar* gazdaspektruma és a gazdaváltás igazolása**

Az izomparazita nyálkaspórások, azok közül is a *M. pseudodispar* már a korábbi vizsgálatok alapján is különlegesen 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 képező nyálkaspórások 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, vörösszárnyú 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 szembeütő 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 külcsoportjaként 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 5 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 nyálkaspórási 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 nyálkaspórási faunában gazdag vízterület (El-Mansy et al. 1998b, Molnár et al. 2002). A *M. pseudodispar* legtöbb ismert gazdája őshonos a tóban, és a gerinctelen kevéssertéjű féreg fauna is fogékony a parazitára. A parazitában gazdag élőhelyen a kevéssertéjű féreg gazdák gyakran többféle nyálkaspórási fajjal fertőztek egyidejűleg (El-Mansy et al. 1998b). A kevéssertéjű férgek a nyálkaspórásiok végleges gazdái, bennük zajlik a parazita ivaros szaporodási fázisa. 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 gazdacsere (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 gazdacsere (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 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 kládrohoz 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 vörösszárnyú keszeggel, amelyben csak fejlődési alakok, érett myxospóra azonban nem volt detektálható. Ez alapján a vörösszárnyú 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 kevéssertéjű 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 kevéssertéjű 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 (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.

4.1.2. *Sphaerospora* fajok

***Sphaerospora molnari* fertőzőttség jellemzése**

A molekuláris módszerek elterjedése a *Sphaerospora* nemzetség taxonómiáját is átrendezte. A *Myxobolus* fajokhoz képest még leegyszerűsödötterebb 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 spórákat), 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 koncentrálni, a pontyok úszóhólyag-gyulladását okozó *S. dykova*e (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 cölozoikus 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 nyálkaspórások között eddig ismert leghosszabb 18S rDNS-t azonosítottuk (3714 bp). A nyálkaspórás parazitákra jellemző, átlagosan 1900-2000 bp hosszú gén, a *Sphaerospora* fajokban jelentősen hosszabb (3000 bp körüli), köszönhetően a nemritkán, 50-100 bp hosszú inzerteknek. 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 kopoltyúkapillárisokban, valamint a vese parenchimában is előfordul a parazita, fejlődése korai szakaszában. Hogy a spóráképzés miatt mégis a kopoltyú 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 cölozoikus vese élősködő volt korábban és evolúciós fejlődése során, terjedési sikerének biztosítása érdekében adaptálódott a kopoltyúban való fejlődéshez. A gazdából való kijutás a kopoltyúhám mikrosérülése révén így is biztosított a gazda „elpusztítása” nélkül. Elhullás azonban intenzív fertőzöttség esetén előfordulhat, ha a kopoltyúhám sérülése relatív oxigénhiányt és/vagy ozmoregulációs zavart idéz elő a gazdában.

Vese parazita *Sphaerospora* fajok jellemzése

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 szolgáltatott arra, hogy az extrém módon leegyszerűsödött, 6 sejtes 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 (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* fájának 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 (Hartigan et al. 2016). Amellett, hogy *S. angulata* véralakja kimutathatók voltak két ponty egyedben is (*S. dykova*e csak pontyban fordult elő), rendszertanilag jóval távolabb álló halfajok 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 *Myxobolus 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. dykova*e soksejtes, elsőként „K-protózoon”-ként leírt (Molnár et al. 1980) véralakjai mellett egyéb nyálkaspórák (akár távoli rokon) fajok véralakjai is szerepet játszhatnak az elváltozások kialakulásában.

***Sphaerospora s. str.* biodiverzitása**

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 létrejötté 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, vörösszárnyú 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 bélhámiban fejlődő, a filogenetikai fán bazálisán elhelyezkedő *S. fugu* is a klád tagjai közé került. Ez viszont azt jelzi, hogy az evolúció során a cölozoikus 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 megnyilvánulásai

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.

4.2.1. Parazita gazdaspektrum vizsgálata

***M. pseudodispar* gazdafajlagossága kevésértéjű féreg gazdában**

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 kevésértéjű féregállományon végzett, átfogó kísérletben vizsgáltuk a *M. pseudodispar* fogékony gerinctelen gazdáinak körét, és a gerinctelen gazdában zajló fejlődés menetét (Marton & Eszterbauer 2012). A gazdakör

azonosításához először a kevésertéjű féregállományok faji összetételének megállapítására volt szükség. Mivel a kevésertéjű férgek pontos meghatározása morfológiai bélyegek alapján csak kifejlett egyedeken történhet, 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 kevésertéjű féreg faj. A morfológiai bélyegek nagyfokú variabilitása miatt, a faji szintű meghatározás meglehetősen bonyolult. Sturbauer et al. (2001) DNS szekvencia szintű vizsgálatokkal hat genetikai vonalat különítettek el. A morfológiai és DNS szintű variabilitás miatt a „gyűjtőfaj” taxonómiai felülvizsgálatát javasolták. A *T. tubifex* genetikai vonalak *M. cerebrealis* fajra való fogékonyosságát vizsgálva Beauchamp et al. (2002) a I. és III. vonalat találta fogékonynak a kergekórt okozó parazitára, míg a V. és VI. vonal egyedei nem tűntek fogékonyak a parazitára. A *M. pseudodispar*-ra való fogékonyosság vizsgálatakor, hasonlóan az *M. cerebrealis*-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 kevésertéjű 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 „inaktíválják” az iszapban/aljzaton lévő fertőzőképes myxospórákat, megakadályozva, hogy azok fogékony egyedekbe jussanak. Hasonló eredményre jutottak a *M. cerebrealis*-ra fogékony féreg fajok vizsgálatával is. Így az is valószínűsíthető, hogy a kevésertéjű 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 egyed, a fertőzés összprevalenciája csökkent. Ennek különösen a fertőzés terjedése szempontjából van jelentősége, mivel a kevésertéjű férgek a természetben szinte mindig kevert faji összetételű közösségekben fordulnak elő, „színtenyészetben” csak szélsőséges, vagy mesterséges körülmények között, és általában csak időlegesen tudnak létezni.

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 fogékonyág 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* kevéssertéjű 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 (24 óráig a fertőzést követően) parazita a féreg bélhámjában volt kimutatható, ami feltételezi az azon keresztüli bejutást. A fertőzés 1. 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.

***M. pseudodispar* gerinces gazdaspektrumának vizsgálata**

A kevéssertéjű féreg tenyészetek fogékonyágának 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 fejlődés egy adott szakaszán azonban 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.

4.2.2. Nyálkaspórások szövet- és szervspecifitása

Szövetspecifitás és filogenetikai rokonság kapcsolata

A szövet- és szervspecifitás a gazdafajlagosság mellett olyan jellegzetessége a szöveti nyálkaspórás 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 főkategóriát 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 nyálkaspórás 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 nyálkaspórák fajok rokonsági viszonyainak alakulásában, azonban arra a következtetésre jutottak, hogy emellett más befolyásoló tényező is van, különösen a cöllozoikus élősködők esetében, melyek közül a kiválasztórendszerben, cöllozoikusan spórát képező fajok a gazdafajtól, és spóra morfológiától függetlenül egyértelműen lokalizáció alapján csoportosulnak. A spóráképzés helyének szerepét igazolták tengeri *Kudoa* fajok, és az izomparaziták és a vékonybél falában fejlődő *Kudoa* fajok filogenetikai elkülönülése alapján. Ahogy már nagyobb számú 18S rDNS szekvencia vált elérhetővé, a szövet- és szervspecifitás evolúciós szerepét is elkezdtek vizsgálni (Fiala & Bartosová 2010). Evolúciós modelljük azt mutatta, hogy két olyan evolúciós esemény történt, melynek során a cöllozoikus fejlődést a szöveti preferencia váltotta fel, egyszer a tengeri multivalvulidák szintjén, és jóval később a *Myxobolus* és *Henneguya* nemzetségek kialakulásakor. Modelljük alapján a legősibb nyálkaspórák parazita valószínűleg tengeri élőhelyen élt, és a kiválasztó szervrendszerben képezett spórákat. A bélen, kopoltyún, izomzaton 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**).

4.2.3. Gazdafelismerés megnyilvánulásai

A nyálkaspórák 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) mérföldkőnek 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 kevésertéjű 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, 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.

***M. cerebralis* gazdafelismerése és gazdába való bejutása**

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 kopolyún 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. 1999) 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 gazdafelimerés 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).

***M. cerebralis* gazdába való bejutásának lokalizációja**

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 gazdafelimerés 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 gazdafelimeréséhez 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) kitétségen. 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.

***M. cerebralis* gazdafelismerésének molekuláris háttere**

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 sejt közötti térben, a gén fokozott aktivitása érthetőnek tűnik. A frequenin-szerű Ca^{2+} -kötő fehérje általános szerepet tölt be a jelátvitel, a szignáltranszdukció folyamatában, de a sejtostódás 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 doménnel 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 doménnel). 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.

Bár kísérletes és génexpressziós vizsgálatok is történtek a gazdafelismerés hátterének tisztázására, továbbra is sok a megválaszolendő kérdés. A jóval nagyobb léptékű vizsgálatot lehetővé tevő, 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.

4.2.4. Parazitára való fogékonyság jellegzetességei

Halak beltenyésztettségének hatása a *M. cerebralis* fertőzöttségre

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 védekezésékként, a túlélő egyedek kiválogatásával, és célzott szaporításával növelték a tenyészetekben a rezisztens genetikai vonalak arányát. Súlyos bakteriális (pl. furunkulózis) és vírusos (pl. vírusos hemorrágiás szeptikémia) betegségek ellen egyaránt sikerrel nemesítettek „rezisztens” (valójában kevésbé fogékony) lazac törzseket. 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 védekezésékként kevésbé fogékony pisztrángtörzseket hoztak létre. A *M. cerebralis* fertőzésre a szívárványos 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 (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

vérvonallú egyedeket tartalmazó állomány, LBT, *M. cerebralis*-ra való fogékonyágát. Vizsgálataink az első kísérleti bizonyítékai annak, hogy a hibrid vérvonallú állomány kevésbé fogékony a parazitára (ez volt a legkevésbé 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, létrejöhetnek 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 fogékonyágára. Mivel hatékony kezelési mód nem áll rendelkezésre a parazita ellen, megelőzőként, különösen az endemikus területeken célszerű a tenyészállomány genetikai vizsgálata, és beltenyésztettség esetén az állomány „frissítése”, heterozigotizálásának növelése.

Vér szerepe a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* fertőzöttségben

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 nyálkaspórás paraziták gazdafajlagosságában (Sipos et al. 2018). A szöveti elősködő nyálkaspórás 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 úszóhólyag-gyulladását. Azonban a *Sphaerospora* fajok fejlődésének proliferációs szakasza a vérhez kötött, vagyis a parazita fejlődési alakok intenzíven osztódnak a vérben eltöltött hosszabb-rövidebb idő alatt (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* vérszérum 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 vérszéruma 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 szívárványos 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 szívárványos 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 vörösszárnyú keszeg és a nem fogékony ezüstkárász (Forró & Eszterbauer 2016) fajok *M. pseudodispar* fertőzöttségének prevalenciáját és intenzitását vizsgáltuk qPCR módszerrel. A legmagasabb prevalencia a bodorkában fordult elő, viszont meglepő módon a vörösszárnyú keszeg vérében volt a legintenzívebb a parazita fertőzöttség. 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 szembevető 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*-nál egy közel konstans, tendenciát nem mutató dinamikát tapasztaltunk. 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.

4.3. Fertőzés elleni védekezés; gyakorlati alkalmazhatóság

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 vízdoldékonyabb 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 kontrollhoz (halnyálka kivonat) 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 vízdékony 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 *M. 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 *M. 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 részletesen 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 heterozigotizáció 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 vízdoldékony inozin-arginin só hatékony „csalivegyület”, 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, Tylm 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

IF 1,583; 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 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 Borika, 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.

És nem tudom eléggé megköszönni a támogatást szüleimnek, családomnak és barátaimnak...