

MTA doktori értekezés opponensi véleményére adott válasz

Jelölt: Dr. Eszterbauer Edit
Értekezés azonosítója: dc_1729_20
Értekezés címe: Nyálkaspórák halélősködők gazdafajlagossága és a gazda–parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai
Opponens: Dr. Hornok Sándor, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tisztelt Professzor Úr!

Köszönöm szépen dolgozatomban alapos bírálatát, az elgondolkodtató kérdésfelvetéseket, és a támogató véleményt. A bírálatában részletezett javításokat, kiegészítéseket nagyon köszönöm. Dolgozatomban törekedtem a szabatos fogalmazásra, remélem az esetenként hibás, hiányos vagy pontatlan megfogalmazások nem fordultak elő zavaró számban. Tartalmi észrevételeire és kérdéseire azok említésének sorrendjében válaszolok.

1. Irodalmi áttekintés

Az 1.1. Táblázatban összesítettem az eddig megismert nyálkaspórák fejlődési ciklusokat. Az itt említett fajok spóra alakjait egyrészt laboratóriumi kísérletekkel, másrészt DNS szekvencia szintű egyezés alapján azonosították. A parazita fejlődésének részleteiről kevés faj esetében van ismertünk. A leginkább tanulmányozott „referencia” fajok, többek között a *Myxobolus cerebralis* esetében igazolták, hogy az ivaros szaporodás a kevésértéjű féreg gazdában zajlik (El-Matbouli et al. 1998, Morris et al. 2012). A legtöbb nyálkaspórák faj esetében azonban az ivaros és ivartalan szaporodás módja és mikéntje csak feltételezhető, kísérleti körülmények között nem bizonyított.

A magyar nyelvű elnevezések használatánál igyekeztem a szakirodalomban elfogadott írásmódot használni, annak ellenére, hogy magam is szembesültem azzal, hogy ez néha nem konzekvens, sőt egyes esetekben egyfajta latin-magyar vegyes írásmódnak tekinthető (pl. actinospóra, myxospóra). Az actinospóra típusoknál mind a magyar, mind a nemzetközi szakirodalom egységesen a latinos írásmódot alkalmazza. Ennek is vannak „különlegességei”, például a triactinomyxon, aurantiactinomyxon stb. spóratípusok -on végződést kaptak, a neoactinomyxum, -um végződéssel lett ellátva. Ezt követi azóta is a szakirodalom, annyi eltéréssel, hogy amíg nem derült fény arra, hogy az actinospóra és myxospóra típusok egy azon faj két megjelenési formái, addig az actinospórákat nagybetűvel írták, pl. Triactinomyxon, sőt néha a kettős nevezéktan szerint önálló fajként írták le (pl. *Raabeia magna*, Janiszewska 1957).

A Myxozoa taxon besorolását illetően nagyon köszönöm az észrevételét. Bár több adatbázis, pl. a [WoRMS](#) és a [NCBI taxonómiai rendszere](#) is, néhány éve már a Myxozoa-t a csalánozók törzsének osztályaként, a nyálkaspórások két fő csoportját, az Myxosporea-t és a Malacopsorea-t pedig alosztályként tüntetik fel, a hivatalos taxonómiai rendszerek ezt még nem követik. Így annak ellenére, hogy már évekkel ezelőtt felmerült a módosítás igénye a nyálkaspórásokkal foglalkozó kutatók körében, a hivatalos álláspont szerint a Myxozoa csoport valóban be nem sorolt, törzs alatti rangban van a mai napig.

2. Anyagok és módszerek

A 2.1. Táblázatban felsorolt fajok DNS szekvenciáinak azonosításakor valóban nem tüntettem fel 18S rDNS szekvenciák hosszát. Egyetértek opponensemvel, ezt annak ellenére érdemes lett volna megtenni, hogy a génbanki adatlapon, és az eredeti közleményekben ez az információ rendelkezésre áll. A molekuláris vizsgálatoknál arra törekedtünk, hogy a 18S rDNS lehető legnagyobb szakaszát meghatározzuk. Így a *Myxobolus* fajokra jellemző kb. 2000 bp hosszú génből átlagosan 1600 bp hosszú szakaszt, a *Sphaerospora* fajok esetében pedig sokszor a teljes gént (akár 3714 bp) vagy legalább egy 2000 bp hosszú részleges szekvenciát azonosítottunk.

A 2.2. Táblázatban szereplő oligonukleotidok listájával kapcsolatban másik bírálóm is hasonló megjegyzést tett. A 15 év alatt alkalmazott, igen nagyszámú PCR rendszer egyik fő összetevőjét összesítettem itt. Végül azért döntöttem az oligonukleotidok irányultság szerinti csoportosítása mellett, mert igen gyakran változtattuk a primerpárokat, attól függően, hogy melyik parazita fajra és milyen célból alkalmaztuk, ezért nehéz lett volna egy átlátható listát készíteni a primer kombinációkról, és a kapott PCR termékekről.

3. Eredmények

Az actinospóra típusok felmérő vizsgálata során meglepő módon a vártnál kevesebb myxospóra–actinospóra párt sikerült azonosítanunk. Ezért sem gondoltam arra, hogy szükséges lenne az említett áttekintő cikkben (Yokoyama 2003) megjelent ábra aktuális verziójának elkészítésére. Valójában sokkal több új információt az aktualizált ábra sem tartalmazna. Ha csupán a spóra típusokat nézzük, nincs releváns összefüggés abban, hogy melyik fajra vagy nemre milyen actinospóra típus jellemző. Tendenciák akadnak (pl. a *Myxobolus* fajok actinospórája gyakran triactinomyxon), de lehetséges, hogy ez csupán a *Myxobolus* fajok felülreprezentáltsága miatt van.

Egyetértek opponensemvel abban, hogy valóban nem tűnik monofiletikusnak a *Myxobolus* genus. Régóta tudjuk, hogy a 18S rDNS génen alapuló filogenetikai elemzésekben parafiletikus taxonként jelenik meg, főként a *Henneguya* genus tagjaival együtt. Már évekkel ezelőtt felmerült a nyálkaspórás kutatások két évente megrendezett, nemzetközi workshopján,

hog az érintett nemeket egyesíteni kellene. Végül a közös álláspontunk az lett (amivel magam is egyetértek), hogy ne nevezzünk át közel ezer fajt addig, amíg csupán egy genetikailag igen megőrzött, strukturális gén igazolja a két genus parafiletikus jellegét. A *Sphaerospora* fajoknál kicsit más a helyzet. Ott már részben megtörtént a genus revíziója. Ebben az esetben morfológiai bélyegek is támogatták a *Leptotheca* nem beolvasztását a *Sphaerospora* genusba (Gunter & Adlard, 2010). Ennek ellenére van még teendő. Azóta tudjuk, hogy a *Sphaerospora sensu stricto* fajok egy közös kládban helyezkednek el a filogenetikai fán. Az ezen kívül eső, jórészt nem cölizoikus fajok esetében a génbanki szekvenciák hibás faj szintű meghatározása is felmerült. Ez viszont nem a teljes genust, hanem csak egyes fajok felülvizsgálatát igényli.

Az új *Sphaerospora* fajok leírása kapcsán kérdezi opponensem a tudományosan új nyálkaspórák fajok meghatározásának kritériumait. A fajleírás alapja a mai napig a gerinces gazdában kifejlődő myxospóra. A dolgozatban ismertetett morfológiai bélyegek mellett, fontos ismérv a spóráképződés helye (melyik szövetben vagy milyen szerv üregében képez spórát) és módja (egy-, kettő-, vagy sokspórák plazmódium formájában), valamint a gazda faja is meghatározó. Fontos szempont, hogy parazita legalább egy génjének (általában 18S rDNS) szekvenciája alapján új fajnak legyen tekinthető (vagyis ne legyen azonos ismert DNS szekvenciával). A 18S rDNS szekvencia tekintetében valóban létezik egy javasolt faji határ (1% eltérés), azonban többek között doktori dolgozatom alapján képező egyik közlemény is (Forró & Eszterbauer, 2016) igazolta, hogy van néhány kivételt képező faj. A nyálkaspórák esetében valódi „barcoding” gént nem azonosítottak még. A más taxonoknál gyakran használt citokróm c oxidáz gén I. alegység (*coI*) alkalmazása több okból sem szerencsés. A mitokondriális gének azonosítása mindig is problémás volt a nyálkaspórák fajoknál. Talán nem véletlenül, ugyanis nemrég igazolták, hogy a mitokondriális genom erősen fragmentált, sőt van olyan nyálkaspórák faj (*Henneguya salminicola*), amelynek nincs mitokondriális genomja (Yahalomí et al. 2020).

Az új *Sphaerospora* fajok többoldalas, részletes leírását nem vettem át az eredeti közleményből, mert véleményem szerint túlzott hangsúlyt kapott volna a munka a többi téma rovására. Opponensem azon felvetésével egyetértek, hogy a myxospórák sematikus rajza és gazdafaj megadása mellett a DNS szekvenciabeli eltéréseket is ki kellett volna emelni.

A 18S rDNS szekvenciák hossza a 3.10. ábrán valóban nem szerepel. A legtöbb esetben a teljes gént azonosítottuk (>3000 bp *Sphaerospora* fajoknál), de legalább 2000 bp hosszú szakaszt vizsgáltunk. Ez a filogenetikai elemzés egy 3579 bp hosszú szekvencia-illesztés (alignment) alapján készült.

Egyetértek a *Tubifex tubifex* genetikai vonalak elkülönítése kapcsán tett megjegyzésével. A 16S rDNS-t választottuk anno, mert ebből állt rendelkezésre a legtöbb DNS szekvencia a génbankban akkoriban, és a szakterület képviselői is főként ezt a gént vizsgálták. Viszont mi

is szembesültünk azzal, hogy korlátozott a gén alkalmazhatósága genetikai vonalak szintjén történő elkülönítésre. Valóban, azóta a gyűrűsférgesek filogenetikájával foglalkozó szakirodalom is igazolta, hogy a *coi* és az ITS2 jobban használható fajok és genetikai vonalak azonosítására (pl. Vivien et al. 2015). A sebes pisztráng genetikai vonalainak elkülönítésére a mitokondriális DNS kontroll régiója mellett, kromoszomális géneket is vizsgáltunk (a laktát-dehidrogenáz gén C1 régióját, és nyolc mikroszatellit markert).

A 3.2.2 alfejezetben ismertetett, kopoltyú- és izomélősködő fajok esetében a 18S rDNS egy kb. 1600 bp hosszú szakaszát azonosítottuk (a teljes gén *Myxobolus* fajoknál kb. 2000 bp hosszú). Köszönöm a filogenetikai fán való elhelyezkedés részletes elemzését és összevetését Fiala & Bartošová (2010) munkájával. Való igaz, hogy vannak látszólagos eltérések, különösen a *M. cyprini* elhelyezkedését tekintve. Annak ellenére, hogy 2010-ben már nagyságrendnyivel több nyálkaspóráns DNS szekvencia volt ismert, mint 2004-ben, amikor közleményem megjelent, kiváló cseh kollégáim munkájából teljesen kimaradt az általam vizsgált izomélősködők legtöbbje, és a kopoltyúélősködőkből is számos faj. Ez okozhatta a különbséget a fa topológiában. Emellett egyetértek opponensem észrevételével, miszerint az ágak mozgatóásával a csoportok látványosabban elkülönülnének.

4. Megbeszélés

Elgondolkodtató kérdés, hogyan hívhatjuk azokat a hal és kevésertéjű féreg fajokat, amelyek megfertőződnek, de bennük fertőzőképes spóra nem alakul. Nem tudok arról, hogy ezekre, a gyakorlatilag biológiai szűrőként működő fajokra lenne konkrét szakkifejezés. E fajokat a parazitára nem-fogékony fajok csoportjába soroltam. A javasolt alkalmi gazda megnevezés találó, mert ezáltal elkülöníthetők lennének ezek a fejlődési „zsákutcák”. Másrészt viszont kísérletek azt igazolták (a gerinces gazdák esetében legalábbis), hogy a parazita nem tesz különbséget halfajok között, bármelyiket gazdaként ismeri fel, és törekszik annak kültakarójába való bejutásra. Ilyen alapon leginkább csak fogékony (érett spórák kialakulását lehetővé tevő) és nem-fogékony (a parazita fejlődését leállító) gerinces fajok különíthetők el.

Magam is fontos kérdésnek találok, hogy El-Matbouli és mtsai (1999) vizsgálata miért nem mutatott ki ponty bőrén *M. cerebralis* parazitát. Mi a parazita pontyba való bejutásának tényét fluoreszcens vitális festékekkel jelölt paraziták mikroszkópos számlálásával, és fajspecifikus valós-idejű PCR segítségével is igazoltuk (Kallert et al. 2009). A korai fejlődési stádiumokat nagyon nehéz elkülöníteni a gazda kültakarójának sejttípusaitól. Mivel nem *in situ* hibridizációs technikát alkalmaztak El-Matbouli és mtsai (1999), hanem klasszikus hematoxilín-eozin festést, így elképzelhető, hogy ez nagyban rontotta a detektálás esélyét.

A *M. cerebralis* faj testtáj preferenciája kapcsán úgy tűnik egy véleményen vagyunk opponensemmel. A 90. oldal 13–15. sorában hasonló gondolatokat fogalmaztam meg.

Köszönöm az érdekes felvetést a premunitív védettséggel kapcsolatban. Eddig tudtommal ilyen irányú vizsgálatok nyálkaspórásokon nem történtek. Azonban a felmérő vizsgálatokban gyakran megfigyelt szimultán fertőzöttség azt sugallja, hogy ez a fajta immunitás nem valószínű, hogy általános a nyálkaspórás fertőzöttségek esetében. Több tanulmány is igazolta, hogy mind a gerinces mind a gerinctelen gazda egyidőben több nyálkaspórás fajjal is fertőzött lehet (pl. El-Mansy et al. 1998, Molnár & Eszterbauer 2015). Sőt két magas patogenitású faj, a *M. cerebralis* és a *Tetracapsuloides bryosalmonae* okozta egyidejű fertőzés lehetősége is igazolást nyert (Kotob et al. 2017).

A további kérdéseire adott válaszaim:

(a) Magasabb rendű gerincteleneknél optimálisan nukleáris és mitokondriális genetikai markereket is kívánatos figyelembe venni az evolúciós rokonsági fok vizsgálatánál. Azon nyálkaspórás faj(ok) esetében, ahol nincs mitokondriális genom, milyen más alternatíva kínálkozik a nukleáris markerekkel párhuzamos vagy konkatenált szekvenciákon alapuló filogenetikai vizsgálatokra?

Filogenetikával foglalkozó kollégáimmal nem egyszer vetettünk fel hasonló gondolatokat már akkor, amikor még nem igazolódott, hogy létezik mitokondriális DNS nélküli nyálkaspórás faj is. Az új potenciális filogenetikai markerek azonosításához mindenekelőtt meg kell ismernünk a nyálkaspórások genomszerveződését. Így a teljes genom és transzkriptóma szekvenálásokban látom a továbblépési lehetőséget. Magam is kíváncsian várom, hogy sikerül-e olyan extrakromoszomális genetikai elemeket azonosítani, amelyek adott esetben alapjai lehetnek filogenetikai és evolúciós elemzéseknek is.

(b) A jelölt számos munkája kísérleti/laboratóriumi életkörülményekre és azokból való következtetésekre épül. Mi a véleménye arról, hogy a természetben ténylegesen zajló folyamatok mesterségesen fenntartott törzsek esetében, mesterséges körülmények között nem biztos, hogy helyesen reprodukálhatóak, hiszen nem sikerül minden körülményt megfigyelés alá vonni. Ilyen lehet az adott természetes biotóra jellemző kompetitív előnyök és hátrányok összetett megnyilvánulása, amit nem sikerül laboratóriumba hozni.

A kutatás során számos olyan kérdés merült fel, amik megválaszolásához ellenőrzött (kísérleti) körülmények voltak szükségesek. Egyetértek opponensemvel, a természetben számtalan egyéb faktor befolyásol(hat)ja egy parazita vagy éppen a gazda viselkedését, a fertőzés módját és dinamikáját. Ezért fontos az, hogy a mesterséges körülmények ellenére egy közel optimális környezetet alakítsunk ki mind a parazita, mind a gazda számára. Ez számos módon elérhető, a nyálkaspórások és gazdáik laboratóriumi fenntartásának tapasztalatairól érintőlegesen dolgozatomban is írtam. Azonban azt gondolom, hogy a kísérleti

rendszerben olyan eredmények és következtetések birtokába juthatunk, amik aztán a természetben lezajló parazitás fertőzöttségek mikéntjére is magyarázatot adhatnak. Ezért sok esetben a laboratóriumi kísérletek nem nélkülözhetőek.

(c) Az eredeti közleményekben szerepelnek a kísérleti etikai engedélyek: a disszertációban hol találhatóak ezek?

Sajnálatos módon a dolgozatból kimaradt az állatkísérleti etikai engedélyek tételes felsorolása. Az engedélyek azonosító száma időrendben: 22.1/10165-4/2010 (2010–2015); XIV-I-001/1326-4/2012 (2012-2017); PEI/001/4087-4/2015 (2015–2020).

Végezetül nagyon köszönöm dolgozatom pozitív értékelését, és ezúton kérem válaszaim szíves elfogadását.

Budapest, 2021. február 11.

Tisztelettel:



Dr. Eszterbauer Edit

Hivatkozások

- Beauchamp KA, Kathman RD, McDowell TS, Hedrick RP (2001) Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae). *Mol Phylogen Evol* 19:21–224
- EI-Mansy A, Székely C, Molnár K (1998) Studies on the occurrence of actinosporean stages of fish myxosporeans in a fish farm of Hungary, with the description of triactinomyxon, raabeia, aurantiactinomyxon and neoactinomyxon types. *Acta Vet Hung* 46:259–284
- EI-Matbouli M, Hoffmann RW, Schoel H, McDowell TS, Hedrick RP (1999) Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Org* 35:1–12
- EI-Matbouli M, Holstein TW, Hoffmann RW (1998) Determination of nuclear DNA concentration in cells of *Myxobolus cerebralis* and triactinomyxon spores, the causative agent of whirling disease. *Parasitol Res* 84:694–699
- Fiala I, Bartošová P (2010) History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. *BMC Evol Biol* 10:228
- 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

- Gunter, N. L. and Adlard, R. D. (2010) The demise of *Leptotheca* Thelohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thelohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Koie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Butschli, 1882 and *Sphaerospora* Thelohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). *Syst Parasitol* 75:81–104
- 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
- Kotob MH, Gorgoglione B, Kumar G et al. (2017) The impact of *Tetracapsuloides bryosalmonae* and *Myxobolus cerebralis* co-infections on pathology in rainbow trout. *Parasit & Vectors* 10:442
- Molnár K, Eszterbauer E (2015) Specificity of infection sites in vertebrate hosts. In: *Myxozoan evolution, ecology and development*. Springer International Publishing, Switzerland
- Morris DJ (2012) A new model for myxosporean (Myxozoa) development explains the endogenous budding phenomenon, the nature of cell within cell life stages and evolution of parasitism from a cnidarian ancestor. *Int J Parasitol* 42:829–840
- Sturmbauer C, Opadiya GB, Niederstatter H, Riedmann A, Dallinger R (1999) Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance. *Mol Biol Evol* 16:967-974
- Vivien R, Wyler S, Lafont M, Pawlowski J (2015) Molecular Barcoding of Aquatic Oligochaetes: Implications for Biomonitoring. *PLoS ONE* 10(4): e0125485.
- Yahalomi D, Atkinson SD, Neuhof M, Sally Chang E, Philippe H, Cartwright P, Bartholomew JL, Huchon D (2020) A cnidarian parasite of salmon (Myxozoa: *Henneguya*) lacks a mitochondrial genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117:5358–5363
- Yokoyama H (2003) A review: gaps in our knowledge on myxozoan parasites of fishes. *Fish Pathol* 38: 125–136