

**A doktori értekezés címe: Nyálkaspórák halélősködők gazdafajlagossága és a gazda-parazita kölcsönhatás megnyilvánulásai**

A részletes tartalomjegyzéket, rövidítések jegyzékét, 93 oldal fő szövegrészt, 9 pontba szedett új tudományos eredményeket, valamint az értekezés alapját jelentő 16 saját közleményt (köztük 7 első szerzős, 3 könyvfejezet) és 13 oldalnyi irodalomjegyzéket tartalmazó értekezés összesen 118 oldalt tesz ki. A szöveget mintegy 36 ábra illusztrálja, és a megértést 10 táblázat segíti. A betűméretet és a sorközt a szerző jól választotta meg, a mű könnyen olvasható. A színes ábrák esztétikusak, szemléletesek, a táblázatok pedig jól szerkesztettek. A szöveg jól gondozott, világosan áttekinthető pontokba szedett, az elütések vagy helyesírási hibák számának elenyésző száma azt tükrözi, hogy a jelölt alapos munkát végzett. A szerző az egységes tárgyalásmódot választotta, tehát az általános bevezetés és irodalmi áttekintés után az összes módszert leírja (14 oldal), majd a doktori mű alapjául szolgáló valamennyi publikáció eredményei következnek (35 oldalon) és közös megbeszélésük ugyanabban a sorrendben (23 oldalon). Utóbbi hossza megfelel az eredmények alapján elvárható aránynak (tehát nem túlzott).

A doktori mű új tudományos eredményeket tartalmaz a nyálkaspórák gazdafajlagosságát befolyásoló tényezőkről és ezek filogenetikai háttéréről két kiemelten fontos csoport, a *Myxobolus* és a *Sphaerospora* nemek kapcsán. Vizsgálja a gazda-parazita kölcsönhatás megnyilvánulásait, így a nyálkaspórák gazdaspektrumát, szövet- és szervspecifitását halakban, illetve ez utóbbiakban a fogékonyságot befolyásoló tényezőket, mindennek a filogenetikai összefüggéseit. Röviden szól az új ismeretek tükrében gyarapodó védekezési lehetőségekről, az eredmények gyakorlatba ültethetőségéről. A disszertáció kilenc pontba szedve sorol fel új tudományos eredményeket, amelyek mindegyike hiteles adatokra épül és újként elfogadható.

Észrevételeim, kérdéseim a következők.

**(1) Irodalmi áttekintés:**

- A szerző a szövegben és az 1.1. táblázatban gerinces és gerinctelen gazdákra tesz említést. Azon fajknál, ahol a fejlődési ciklus részletei ismertek, megállapítható-e következetesen, hogy a gerinctelen gazdában történik az ivaros folyamat, vagy sem? Ha igen, helyesen állítják-e szakirodalmi források (például Lodh et al., 2012\*), hogy a gerinctelen gazda végleges gazdának tekinthető? Erre a disszertációban is történik utalás (például a 78. oldalon).

\*Lodh N, Kerans BL, Stevens L. The parasite that causes whirling disease, *Myxobolus cerebralis*, is genetically variable within and across spatial scales. J Eukaryot Microbiol. 2012 Jan-Feb;59(1):80-7.

- ahogy a főszövegben jelölte, azonos évszámmal hivatkozott első szerzős közleményeit jó lett volna az 1.1. táblázatban és a 99. oldalon is a/b betűvel pontosítani (Eszterbauer et al., 2015b)

- 12. oldal, ábramagyarázat és máshol: a "poláris kapszula" kifejezést célszerű lenne magyarul és következetesen "sarki tok"-nak hívni, ahogy a főszövegben ez zárójelben szerepel is (13. oldal)

- 13. oldal és hátrébb: milyen szempontok érvényesülnek abban, hogy a szerző egy tudományos kifejezést fonetikus átíratban használ-e (pl. sporoplazma), vagy latinos, eredeti alakban (pl. triactinomyxon)? Az "actinospóra" ebből a szempontból hibridnek tűnik: az előtag latinos, az utótag fonetikus.
- 14. oldal: a szerző a *Tubifex tubifex* fajra (fajkomplexre) "kevéssertéjú féreg" kifejezéssel és latin névvel utal: miért nem szerepel a magyar fajnév, a csővájóféreg?
- 15. oldal és máshol: a jelölt társszerzőségével 2018-ban született és a jelen disszertáció alapjai között felsorolt kézirat (Patra et al., 2018), továbbá a 18. oldalon hivatkozott Fiala et al., 2015b a Myxozoa csoportot besorolás nélküli altörzsnek nevezi, a Malacosporea és Myxosporea csoportokat pedig osztály rangban tünteti fel (89. oldal), szemben azzal, ahogy a szerző ezeket említi (Myxozoa osztály, Malacosporea és Myxosporea alosztály). A Fiala et al., 2015b forrásban az alosztály mint taxon nem szerepel. Kérem, legyen szíves oldja fel ezt az ellentmondást.
- 16. oldal: a "gazda valamelyik testüregében" kifejezés félrevezető, mert anatómiai értelemben testüreg csak egy van (legfeljebb kettéosztott), viszont több szervnek is lehet "lumene"; javasolt a "valamely szerv üregében" használata

## **(2) Anyagok és módszerek:**

Összességében ez a fejezet jól szerkesztett, a leírások pontosak és kellően részletesek: arról tanúskodnak, hogy az alkalmazott kutatási (főként molekuláris biológiai) módszerek nemcsak moderneek, de az évek során a szerző és munkatársai követték azok fejlődését és mindig törekedtek aktualizálásukra.

Az alábbi észrevételeim, kérdéseim lennének:

- 26. oldal: a *sensu stricto* egyszerűbb rövidítése az "s.s.", amit a jelölt is használt a disszertáció alapját képező közleményekben a *Sphaerospora* nem kapcsán (pl. Patra et al., 2018). Mi az oka, hogy itt másként szerepel ("s. str.")?
- a 2.1. táblázatban célszerű lett volna megemlíteni (től-ig formában), hogy a 18S rRNS gén szekvencia milyen hosszú szakaszra vonatkozik
- 28. oldal: számomra a "DNS feltárás" éppoly szokatlan (bár biokémiailag érthető), mint a sokak által használt "DNS izoláció" kifejezés: véleményem szerint a "DNS kivonás" áll a legközelebb a szakcikkekben leggyakrabban szereplő "extraction" szóhoz, és magához a DNS kinyeréséhez (ami tkp. történik). A Google keresés "DNS kivonás"-ra 1070, "DNS izoláció"-ra 148, a "DNS feltárás"-ra pedig 118 találatot ad. A DNS feltárása önmagában a proteinnel történő emésztés során már megtörténik, de attól még nincs tisztítva és eredeti közegéből kinyerve (azaz pusztán feltárva nem használható molekuláris vizsgálatokra).
- 30-31. oldal, 2.2. táblázat: a primereket áttekinthetőbb lett volna párban felsorolni, a köztük lévő szakasz hosszának említésével
- 36. oldal: a címben olvasható "Vér szerepe ..." nehezen értelmezhető, érdemes lett volna pontosítani (például vérösszetétel, vérvonal, parasitemia vagy hematogen szóródás szerepe)

### (3) Eredmények:

A 3.1.1. fejezet kitérő illusztrációkkal szemlélteti az actinospóra típusokat, és a szöveges részben megtalálhatóak az ezeknek megfelelő fajok (amelyek fejlődési alakjának bizonyultak). Nagyon hasznos lett volna egy áttekintő ábra, amelyen a myxospóra-actinospóra párosításokat összefoglalja, frissítve a Yokoyama, 2003\* közlemény 2. ábráját jelenlegi tudásunk szerint.

\*Yokoyama H (2003) A review: gaps in our knowledge on myxozoan parasites of fishes. Fish Pathol 38: 125–136.

- A 3.3. ábra alapján a nagyon fontos *Myxobolus* genus nem tűnik monofiletikusnak. Ez ismert-e a szakirodalomból, és kezdeményezték-e a genus taxonómiai revízióját? Ugyanez vonatkozik a *Sphaerospora*-fajokra (3.6. ábra).

- A 49. oldalon szerepel: "17 új *Sphaerospora*-fajt találtunk". Ha ezek tudományra (nem pedig hazai faunára) új fajok, mint azt a következő mondatban szereplő "új fajként leírás" sugallja, célszerű lett volna így említeni őket. Ez a felfedezés a szöveg szerint a 18S rRNS gén alapján történt, a 3.9. ábrán viszont egyértelmű morfológiai különbségek is szerepelnek. Hogyan foglalható össze a tudományra új nyálkaspórás fajok megállapításának kritériumai röviden, például milyen kulcsbélyegek és hány százalékos 18S szekvencia eltérés alapján vélelmezhető ez a státusz? A 78. oldalon található utalás szerint ez 1% körüli eltérés a 18S rRNS génben: mi a helyzet a többi, jelen munkában vizsgált genetikai markerrel? Van-e a nyálkaspórásoknak "barcoding" génje, amely kiváltja a magasabb rendű gerincteleneknél használt *cox1* gént?

- kissé félrevezető az ezen az oldalon közölt további nyolc új 18S szekvencia azonosításának összefüggésbe hozatala fajleírással anélkül, hogy az eltérés mértékét a szerző megadná (ugyanis az egyetlen bázispárral eltérő szekvencia is új, de valószínűleg nem ad okot fajleírásra)

- ugyanez vonatkozik az "újként szekvenált" kifejezésre (vö. szekvenálást követő molekuláris-filogenetikai összehasonlítás alapján új)

- a 3.10. ábra tetején a fentiek szempontjából nagyon fontos elkülönülések támogatottsági értékei nem vagy nehezen olvashatóak

- 51. oldal: a genus név rövidítések nagyobb körültekintéssel való alkalmazásával a laikus olvasó is különbséget tehet a fajok között; jelen esetben viszont azonos rövidítéssel szerepelnek eltérő nemek mondaton belül, sőt egymás után is (*P. moravicus*, *P. hammoniensis*). Ilyenkor célszerű még egy betűt használni a rövidítéshez (*Ps. moravicus*, *Po. hammoniensis*).

- 50-51. oldal: a 3.10. ábra alatt (18S szekvenciák), és a szövegben a 16S rRNS génnel összefüggésben sem szerepel, hogy milyen hosszúságú génszakasról van szó: ez informatív lett volna (a 3.8. ábrához hasonlóan)

- 51. oldal: a fogékony és nem fogékony *Tubifex* genetikai vonalak 16S rRNS génjük alapján nem különültek el egymástól. Nem lett volna érdemes ugyanezt filogenetikailag megvizsgálni egy fehérjekódoló génszakasz esetében is? Ezek "funkcionalitása" közelebb esik azokhoz a természetes folyamatokhoz, amelyek szerepet játszhatnak a fogékonyságban. Hasonló szempontokat a szerző figyelembe vett a gazda halfajok vizsgálatánál (65. oldal).

A 3.2.2. fejezet megfelelően ismerteti és szemlélteti (3.15. ábra) a nyálkaspórák fajok *niche*-elkülönülését a kopoltyúlemezeken, ami összefügg a 18S filogenetikai rokonsággal.

Az alábbi észrevételeim, kérdéseim lennének:

- az 57. oldal tetején hiányzik a részlegesen felerősített génszakasz hozzávetőleges hossza
- A 3.16. ábra kitűnő a szöveti lokalizáció és a filogenetikai rokonság összefüggéseinek érzékeltetésére. Mindazonáltal a *M. pavlovskii* nem került egy csoportba a *M. impressus* fajjal (vö. 3.1. táblázat), (az előbbi ág a törzsfán forgatható lett volna felfelé?); a *M. algonquinensis* pedig egy kládban van a *M. muelleri* fajjal, amelynek testvércsoportja tartalmazza a *M. cyprini* fajt, szemben egy másik forrással, ahol az utóbbi egy kládban van a *M. algonquinensis* fajjal, és az a klád a *M. muelleri* fajt tartalmazó klád testvércsoportja (Fiala and Bartosová\*, 2010: 3. ábra) – egy további genetikai marker vizsgálata nem oldotta volna-e fel ezt az eltérést?

\* Fiala I, Bartosová P. History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. BMC Evol Biol. 2010 Jul 28;10:228.

#### (4) Megbeszélés:

- 80. oldal: állatrendszertanban a genus taxonómiai kategóriája magyarul helyesen "nem"; a *Sphaerospora* kapcsán a jelölt által említett nemzetség a "tribus" kategóriát takarja

- 82. oldal: a szövegben szerepel, hogy "a nyálkaspórák fejlődési alakjai olyan halfajokban is előfordulhatnak, melyekben spórát nem képesek képezni". Akkor tehát ezeket a halfajokat fertőzni képesek, így azok fogékonyak tekinthetők a fertőzésre? Mi a rájuk vonatkozó helyes terminológia (pl. alkalmi gazda)? Vannak-e az 1.1. táblázatban is ilyen nyálkaspórák-hal párok, amelyeknél hiányzik erre vonatkozóan a kísérleti eredmény, tehát nem ismert, hogy a folyamat a halban eljut a spóráképződésig?

- 84. oldal, 92. oldal stb: a szerző "kergekór" név alatt utal a *Myxobolus cerebralis* által előidézett kórképre, de ez a kifejezés a haszonállat-parazitológiában már foglalt. Az angol név alapján (*Salmonid whirling disease*) pontosabb lenne "pisztrángfélék kergekórja" néven említeni.

- 85. oldal: a Naididae család filogenetikai vizsgálatának érdekes és fontos eredményeit egy jól szerkesztett bekezdés tárgyalja. Azonban teljesen hiányoznak a diszkusszióhoz elengedhetetlen referenciák, például amelyek alátámasztják a kapott szekvenciaeltérések mértéke és az új fajok létezésének feltételezése közötti összefüggést (például Marotta et al., 2014\*).

\* Marotta R, Crottini A, Raimondi E, Fondello C, Ferraguti M. Alike but different: the evolution of the Tubifex tubifex species complex (Annelida, Clitellata) through polyploidization. BMC Evol Biol. 2014;14(1):73. Published 2014 Apr 2. doi:10.1186/1471-2148-14-73

- A 89. oldalon ezt írja: "a *M. cerebralis* actinosporák nem tesznek különbséget fogékony és nem fogékony halfajok között", míg a másutt hivatkozott El-Matbouli et al. (1999) cikk szerint a ponty kültakarójának szövettani vizsgálata alapján nem volt bizonyíték a *M. cerebralis* triactinomyxon spóráinak behatolására. Kérem, legyen szíves ezt röviden megmagyarázni.

- 90. oldal: kitűnő megfigyelés és következtetés, hogy a *M. cerebralis* actinosporái a gazdában való megtelepedéskor a hal farokúszóját részesítik előnyben. A megfogalmazás azonban pontatlannak tűnik, mert talán nem a sporoplasma általi preferenciájáról van szó, hanem a poláris filamentum kilökődésének legfontosabb kiváltó – mechanikai – ingeréről és az úszó csapkodásáról, amely növeli a kontaktus valószínűségét?

- A 96. oldalon az szerepel, hogy kevésbé patogén kórokozó faj esetében a gazdának nem áll érdekében a parazita eliminálására energiát fordítani. Talán tovább is lehetne menni: ilyen esetben a gazdának érdeke fűződhet ahhoz, hogy ne eliminálja a parazitát. A premunitiv védettségre gondolok, amely megakadályozhatja a homológ újrafertőződést. Kérdésem: vizsgálták-e már a premunitio jelenségét halakban nyálkaspórások okozta fertőzöttség során?

### **Összegzés:**

Gratulálni szeretnék a színvonalas munkához, a jelentős számú és értékes kutatási eredményhez, ami a doktori disszertációban megjelenik. Ezt nagyon tanulságos volt végigolvasni és átgondolni, még egy fél-laikus számára is, amilyen én vagyok (nem lévén jártas a hal parazitológiában). A felsorolt 9 új tudományos eredményt újként elfogadom. A doktori művet nyilvános vitára alkalmasnak tartom.

### **További kérdések:**

(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?

(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.

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

Budapest, 2020. december 21.

Dr. Hornok Sándor

az MTA doktora