

Szakdolgozat

Matuz Vanessza

2021

Állatorvostudományi Egyetem

Ökológia Tanszék

Fertőzöttség hatása kételtűek szociális viselkedésére

Készítette: Matuz Vanessza

Témavezetők:

Dr. Hettyey Attila

tudományos főmunkatárs, csoportvezető

Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport

Növényvédelmi Intézet

Agrártudományi Kutatóközpont

Eötvös Loránd Kutatási Hálózat

Dr. Kövér Szilvia

tudományos munkatárs

Állatorvostudományi Egyetem

Biológiai Intézet

Ökológiai Tanszék

Tartalom

Bevezetés	2
Célkitűzés.....	5
Anyag és módszer	6
Begyűjtés és nevelés.....	6
Kísérleti elrendezés és fertőzés	7
Választásos tesztek.....	9
qPCR módszerek	11
Statisztikai módszerek.....	12
Oldalválasztás	12
Aktivitás.....	13
Eredmények	14
Erdei béka.....	14
Oldalválasztás	14
Aktivitás.....	16
qPCR eredmények	17
Barna varangy	18
Oldalválasztás	18
Aktivitás.....	20
PCR eredmények	21
Diszkusszió	22
Összefoglalás	24
Summary	25
Irodalomjegyzék	26
Köszönetnyilvánítás	29
Mellékletek	30

Bevezetés

Az evolúció során az immunrendszer működése mellett más módok is kifejlődtek a betegségek legyőzésére az élőlényekben. Változó testhőmérsékletű állatokra jellemző az úgynevezett viselkedési láz, amikor a magasabb hőmérsékletű környezetet keresik, ahol nehezebben maradnak életben a patogének (Ouedraogo és mtsai, 2002; Roy és mtsai, 2005). A viselkedési láz kétélűekre is jellemző és adaptív a fertőzések visszaszorításában (Sauer és mtsai, 2019). A kórokozóval fertőzött környezete elkerülésére is van kísérletes bizonyíték kétélűeknél (McMahon és mtsai, 2014). A fertőzött fajtársaktól való távolságtartást egy jellemző viselkedésformának tartják kétélűeknél (Stockmaier és mtsai, 2021), de még nincsen róla elegendő ismeretünk.

A kétélűek tömeges kihalása napjaink egyik legkomolyabb természetvédelmi problémája (Alroy, 2015), a kétélűfajok 40%-ának egyedszáma csökkenő tendenciát mutat (Cheng és mtsai, 2011; Stuart és mtsai, 2004). Ennek fő oka az élőhelypusztulás mellett a különféle patogének által okozott pusztulások. A két legismertebb patogén ami felelős ezért, a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*), a kitridiomikózist okozó gombafaj (Stuart és mtsai, 2004) és a Ranavírusok (Cunningham és mtsai, 1996; Teacher és mtsai, 2010).

A *Bd* által okozott természeti károk első észlelése az 1970-es évek végén volt (Stuart és mtsai, 2004). Az ekkor történt kétélű pusztulások Ausztráliát, az Amerikai Egyesült Államokat és Puerto Ricot érintették. 1987-ban a Costa Ricai Monteverde egy védett felhőerdejében is jelentős fajpusztulás történt, ami többek között az endemikus Costa Rica-i aranyvarangy (*Incilius periglenes*) kihalásához is vezetett (Pounds és mtsai, 1997). A *Bd* a Rhizophydiales rendbe tartozó zoosporangiumokkal szaporodó fonalas gomba, ami a kétélűek bőrének hiperkeratinizációját okozza (Longcore és mtsai, 1999). Alacsonyabb hőmérsékleten képes csak életben maradni, 10-25 °C között szaporodik a leggyorsabban, 29°C-on 8 nap alatt pusztul el, 30°C-on 5 nap alatt, ha hamarabb visszakerül a hőmérsékleti optimumába képes regenerálódni (Longcore és mtsai., 1999;

Kásler és mtsai. 2021; Piotrowski és mtsai., 2004). A kitridiomikózis-fertőzés laboratóriumi körülmények között gyógyítható megemelt hőmérséklettel (Woodhams és mtsai, 2003), a tartóvíz sózásával, illetve fungicidek alkalmazásával is kezelhető a kitridiomikózis (Geiger és mtsai., 2017; Pessier, 2008; Whitfield és mtsai., 2013).

A ranavírusok az Iridoviridae családba tartozó, változó testhőmérsékletű gerinceseket (halakat, kételtűeket és hüllőket) megbetegítő vírusok, melyek 32 °C felett nem képesek replikálódni, ezért állandó testhőmérsékletű állatokat nem fertőznek, de gyulladásokat és sejthalált emlősöknél is kiválthatnak (Gray és Chinchar, 2015). A békákat elsősorban az FV3 (Frog Virus 3) ranavírus pusztítja (Hyatt és mtsai, 2000). A betegségnek kétféle lefolyása ismert: fekélyek megjelenése a bőrön vagy bevérvések a vázizmokban, csontokban, zsigeri szervekben (Cunningham és mtsai, 1996). A mortalitása rendkívül magas is lehet, az Amerikai Egyesült Államokban 1996 és 2001 között bekövetkezett tömeges pusztulási eseményeknél 90% feletti értékeket is tapasztaltak (Green és mtsai, 2002). A terjedése közvetlen érintkezéssel, fertőzött vízzel, táplálékkal, aljzattal történik, gazdatest nélkül is életképes marad a fertőzött vízben 7 napig, ellenálló a környezettel szemben (Gray és Chinchar, 2015). Mivel a már megfertőződött egyedek hatékony fertőtlenítő eljárása nem ismert, a fertőzés terjedésének megelőzése kulcsfontosságú a járványok megfékezése szempontjából.

Korábbi kutatásokban választásos tesztekkel vizsgálták, hogy a kételtűek elkerülik-e a *Bd*-vel fertőzött fajtársakat (Han és mtsai, 2008) vagy környezetet (McMahon és mtsai, 2014). Han és munkatársai ebihalakkal végezték a kísérletet egy vízzel feltöltött választókamrában. 5 fertőzött és 5 kontroll stimuláns egyedet tettek a választókamra két ellentétes oldalára és egy fertőzött vagy kontroll fokális egyedet középre. A fertőzöttséget bináris változóként kezelték. A *Bufo boreas* fajnál a fertőzött fokális egyedek többet tartózkodtak a fertőzött stimuláns oldalán, a kontroll fokális egyedek egyenlő arányban töltötték az idejüket a két térfélén. A *Rana cascadae* fajban egyenlő arányban tartózkodtak a fertőzött fokális egyedek a két térfélén, de a kontroll fokális egyedek többet tartózkodtak a fertőzött oldalon. Az aktivitásukat tekintve nem volt különbség a *Rana cascadae* fertőzött és kontroll fokális

egyedei között, de a *Bufo boreas* esetén aktívabbak voltak a fertőzött fokális egyedek, mint a kontrollok. McMahon és munkatársai (2014) eredményei szerint a *Bufo quercicus* kifejlett egyedei kevesebb időt tartózkodtak a *Bd*-vel fertőzött aljzaton, mint a nem fertőzött oldalon, de csak akkor, ha már korábban átestek a fertőzésen. Ezekben az vizsgálatokban azért vizsgáltak fertőzött és kontroll fokális egyedeket is, mert a kórokozó befolyásolhatja a gazdatest viselkedését olyan irányba, hogy könnyebben átadódjon a fertőzés (Webster, 2001). Ugyanakkor a fertőzésen már átesett egyedben immunitás is kialakulhat (McMahon és mtsai. 2014), és megtanulhatják elkerülni a kórokozót.

Az általam végzett kísérlet abban különbözik Han és munkatársai, 2008-as kísérletétől, hogy nemrég átalakult, fiatal egyedeket használtunk, szárazföldi választókamrában. Ha a kételtűek érzékelik és elkerülik a beteg fajtársakat, azt elsősorban vizuális és kémiai ingerek alapján tehetik. Az általam vizsgált fajokra nem jellemző a fejlett szociális viselkedés, ezért esetükben nem várható a fertőzött egyedek önkéntes távolságtartása, sem a fajtársak aktív figyelmeztetése (Stockmaier és mtsai, 2021).

Célkitűzés

Jelen szakdolgozatban egy Han és munkatársai (2008) kísérletéhez hasonló vizsgálatot végeztem el, de metamorf egyedekkel dolgoztam szárazföldi körülményeket imitáló választókamrában. Kérdésünk, hogy az erdei béka (*Rana dalmatina*) és a barna varangy (*Bufo bufo*) egyedek képesek-e felismerni és elkerülni a fertőzött fajtársaikat egy választásos kísérletben. Hipotézisem az volt, hogy a fokális egyedek több időt töltenek a kontroll stimuláns egyedek melletti választási zónában, mint a fertőzött stimuláns mellettiben, tehát igyekeznek a fertőzött fajtársukat elkerülni, és tőlük távolságot tartani. A fokális egyedek azon részének viselkedésére, amely fertőzött volt, az volt a predikcióm, hogy nagyobb arányban tartózkodtak a választási zónákban, a fajtársak közelében, mert a kórokozó befolyásolhatja a viselkedést olyan módon, ami megkönnyíti a terjedését. Ugyanakkor arra is számíthattam, hogy a fertőzött fokális egyedek hatékonyabban kerülnek el a fertőzött stimulánsokat, mert már van tapasztalatuk a kórokozóval (McMahon és mtsai, 2014). A stimuláns egyedek aktivitásával kapcsolatban azt várta, hogy a fertőzött fokális egyedeké a betegség okozta letargia miatt alacsonyabb lesz, ezért kevesebb zónahatárt lépnek át, mint az egészséges egyedek.

Anyag és módszer

Begyűjtés és nevelés

A petéket a Kerek-tóból (47° 47' 52" É, 18° 48' 09" K) és a Garancsi-tóból (47° 37' 24" É, 18° 48' 25" K) gyűjtöttük 2020. március 10-én. Mindkét élőhelyről erdei béka (*Rana dalmatina*) és barna varangy (*Bufo bufo*) petéket gyűjtöttünk, mindkét faj esetében 8-8 családból 100-100 db-ot. Az ebihalakat 50 fős csoportokban, családonként külön, szabadtéren elhelyezett mezokozmoszokban neveltük. A mezokozmoszok 150 literes műanyag ládák voltak, amelyekben az ebihalak hozzáadása előtt 2-3 héttel egy természetes élővízhez hasonló önfenntartó rendszert alakítottunk ki: 130 liter állott csapvízhez adtunk 60 g bükkfa (*Fagus sylvatica*) levelet és 1 liter tóvizet. A bükkfalevelek rejtőzködési lehetőséget nyújtottak az ebihalaknak, valamint megnövelték az ebihalak táplálékául szolgáló, tóvízzel bejuttatott algák számára a kolonizálható felületet. A bükkfa leveleit alacsony csersavtartalmuk miatt választottuk erre a célra. A mezokozmoszokat hálóval fedtük le, hogy megakadályozzuk a víztestek ragadozók általi kolonizációját. A mezokozmosz, mint ebihal nevelési eljárás más kutatócsoportoknál is sikeresen alkalmazott módszer (pl.: Buskirk és mtsai., 2011; Ferrari és mtsai., 2015; Relyea és Diecks, 2008). Az átalakulás közeledtekor naponta ellenőriztük a mezokozmoszokat átalakuló egyedeket keresve. A mellső lábak megjelenésekor (42-es lárvaállapot Gosner, 1960 szerint, amikor az átalakulás elkezdődik) kivettük az adott egyedet, majd a farok visszaszívásáig 1-2 liter saját mezokozmosz vizet és száraz felületet is tartalmazó, megdöntött, 45 liter térfogatú, fedett műanyag dobozban tartottuk őket mezokozmosz szerint külön-külön. Az ebihalak átalakulása (a farok teljes felszívódása (46-os lárvaállapot Gosner, 1960 szerint) június 22-ig tartott. Ezt követően az átalakult egyedeket laboratóriumi körülmények között tartottuk egyesével: minden egyed külön benedvesített papíraljzattal és búvóhellyel (tojástartó karton darab) ellátott 1,5 liter űrtartalmú műanyag dobozba került. A laboratóriumban 21 °C-ot és 14:10 óra világos:sötét ciklust tartottunk. Az átalakult egyedeket *ad libitum* etettük tücsöklárvával, a papíraljzatot ötnaponta cseréltük és hetente kétszer újrapárasítottuk a dobozokat vízpermetezővel.

Kísérleti elrendezés és fertőzés

A barna varangyokat az átalakulás után átlagosan 10 nappal fertőztük *Bd*-vel 2 lépcsőben: június 8.-án és június 16.-án (1. táblázat). Az állatokat véletlenszerűen kiválasztva 3 fős kísérleti csoportokba osztottuk, amelyek egy kontroll stimuláns, egy fertőzött stimuláns és egy fertőzött vagy kontroll fokális egyedből álltak.

1. táblázat: Barna varangyok Bd-vel történt fertőzésének, valamint a kialakított kísérleti csoportok választásos tesztjeinek időpontja a mintaszámokkal.

Fertőzés időpontja	Kontroll egyedek száma	Fertőzött egyedek száma	3 fős kísérleti csoportok száma	Tartalék egyedek száma	Választásos tesztek időzítése a fertőzés után
június 8.	21	22	12	7	4 csoport 4 nap múlva 4 csoport 6 nap múlva 4 csoport 10 nap múlva
június 16.	20	20	12	4	4 csoport 3 nap múlva 4 csoport 6 nap múlva 4 csoport 10 nap múlva

A felhasznált kórokozó a GPL (Global Pandemic Lineage) leszármazási vonalához tartozó H-2014-es elnevezésű izolátum volt, amit dr. Vörös Judit (Magyar Természettudományi Múzeum, Állattár) 2014-ben izolált a Bakonyban sárgahasú unkáról (*Bombina variegata*). Az izolátum tenyésztését és fenntartását Matthew Fisher és munkatársai (Imperial College London, Egyesült Királyság) valósították meg, az ATK NÖVI LEÖK munkatársai tőlük jutottak hozzá 2018-ban. A tenyészet 4 °C-on volt tárolva és három havonta lett átoltva friss mTGHL táplevesbe (8 g tripton, 2 g zselatin, 4 g laktóz, 1000 ml desztillált víz). A kísérletekhez ebből a törzstenyészetből származó, egy hét alatt mTGHL táplevesben, 25 cm² felületű sejtenyésztő flakóban, 20 °C-on felszaporított *Bd* tenyészetet használtunk. A tenyészet zoospóra-koncentrációját Bürker-kamra segítségével becsültük és steril mTGHL hozzáadásával 500.000 zoospóra/ml koncentrációra hígítottuk. Az egyedek fertőzéséhez 9 cm átmérőjű steril műanyag Petri-csészében 1 ml *Bd*-tenyészetet 9 ml RSW-ben (reconstituted soft water; APHA. 1985) feloldottunk és a békákat ebben a ~50.000 zoospóra/ml koncentrációjú szuszpenzióban áztattuk a Petri-

csészéket lefedve 5 órán át. Ehhez hasonló nagyságrendű koncentrációval korábban mások is sikeresen fertőztek kétéltűeket (pl.: Andre és mtsai, 2008). A kontroll egyedek esetében ugyanígy jártunk el, de a *Bd*-tenyészetet 1 ml steril mTGHl táplevessel helyettesítettük.

Az erdei békákat FV3-mal fertőztük meg. A fertőzéshez használt FV3 izolátumot Rachel E. Marschang (Laboklin GmbH, Bad Kissingen, Németország) biztosította számunkra. A vírust EPC (Epithelioma papulosum cyprini) sejtvonalon szaporítottuk, majd Advanced DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 5 % borjú savó hozzáadásával) médiumban szuszpendáltuk. A kívánt vírus titer beállítása után -80 °C-on, mélyfagyasztva tároltuk a kísérlet megkezdéséig. Az átalakulás után átlagosan 10 nappal az egyedeket 9 cm átmérőjű, műanyag Petri-csészében 14 ml RSW és 1 ml vírus szuszpenzió hozzáadásával 6×10^5 PFU¹/ml végkoncentrációjú eleggyel fertőztük 22 órán át. A kontroll egyedek esetében a FV3-szuszpenziót 1 ml steril RSW-vel helyettesítettük. Az erdei békáknál 3 lépcsőben történt a fertőzés: június 20-21-én; június 25-26-án és június 30 - július 01-én (2. táblázat2. táblázat)

¹ plaque forming unit

2. táblázat: Erdei békák FV3-mal történt fertőzésének, valamint a kialakított kísérleti csoportok választásos tesztjeinek időpontja a mintaszámokkal.

Fertőzés időpontja	Kontroll egyedek száma	Fertőzött egyedek száma	3 fős kísérleti csoportok száma	Tartalék egyedek száma	Választásos tesztek időzítése a fertőzés után
2020. június 20-21.	29	26	16	7	8 csoport 2 nap múlva 8 csoport 4 nap múlva
2020. június 25-26.	30	33	19	6	8 csoport 2 nap múlva 8 csoport 4 nap múlva 3 csoport 6 nap múlva
2020. június 30-július 1.	24	24	16	0	8 csoport 2 nap múlva 8 csoport 4 nap múlva

Választásos tesztek

A kísérletben használt választókamrák téglalap alaprajzúak voltak (30 cm hossz, 10 cm szélesség, 10 cm magasság). A stimuláns egyedek alkamrái 5x10 cm alapterületűek voltak és a doboz két végén helyezkedtek el, a fokális egyed így 20x30 cm alapterületű középső kamrában mozgott (lásd 1. ábra).

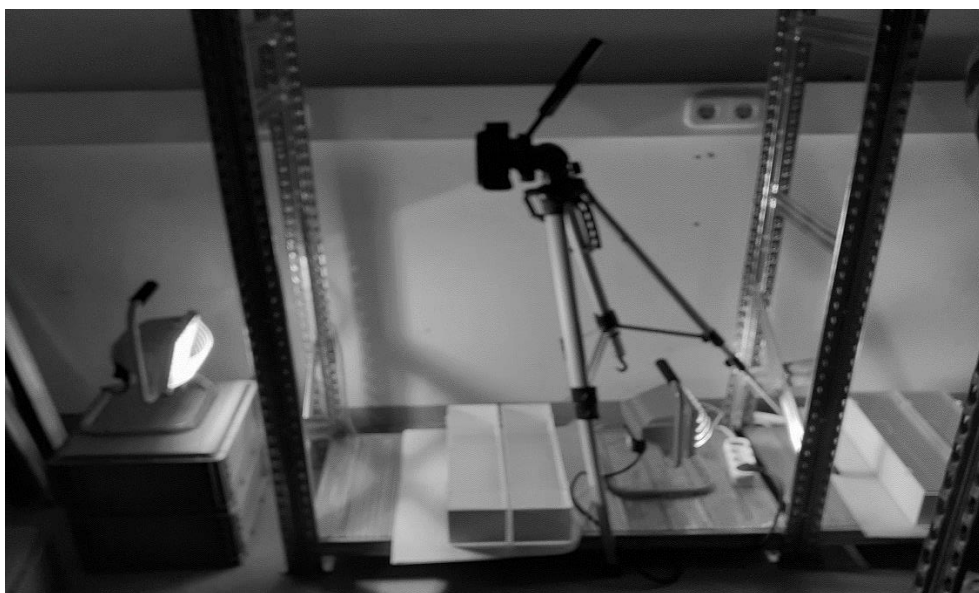
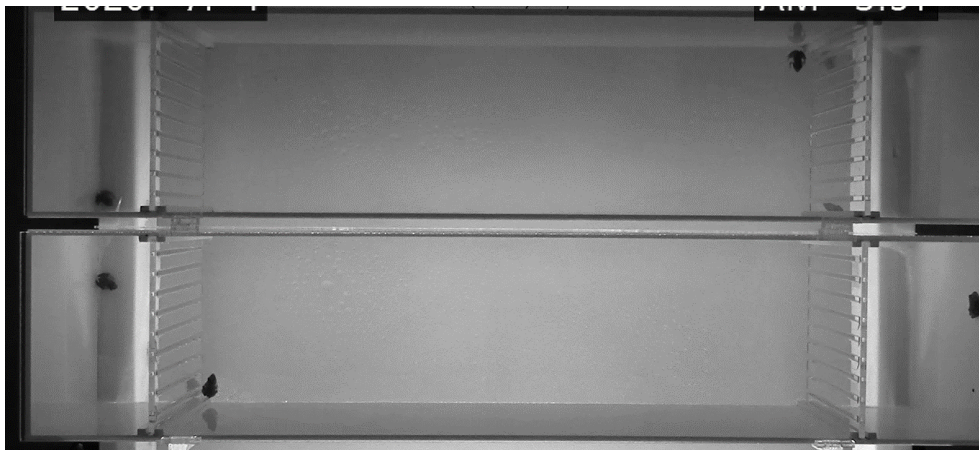


1. ábra: A választókamra. A szaggatott vastag vonalak jelzik a válaszfalakat, a vékony vonalak a választási zónák határait jelzik. A világos béka piktogramok jelzik a kontroll egyedeket, a sötét a fertőzöttet.

A választókamrákat felülről átlátszó, csúsztatható fedő zárta le. A választókamrák oldalfalai átlátszatlan fehér plexiből készültek, a belső válaszfalak és a fedél átlátszóból (lásd 2. ábra). A belső válaszfalak

fésűszerűek voltak, ezáltal a fokális egyedhez a stimuláns egyedektől a vizuális ingerek mellett átjuthattak a kémiai ingerek is, de az egyedek közvetlen (bőr)érintkezésbe nem tudtak lépni.

A választási zónák határait csak utólag az elemzésnél a képernyőn rajzoltam fel, a válaszfalak előtt a fokális egyed rekeszének hosszának $1/6$ -ánál.



2. ábra: Fénykép két választókamráról (felülnézet és oldalnézet).

Minden kísérleti csoport esetében két körben készítettem felvételt. A felvételek mindig egy 1 órás akklimatizációt megengedő és iránypreferenciát vizsgáló szakasszal kezdődött, ami alatt csak a fokális egyed tartózkodott a választókamrában, a stimuláns egyedek még nem. Ezt követően behelyeztük a stimuláns egyedeket és újabb 1 órán át készítettem felvételt az állatokról. Ezután 30 perc szünetet tartottunk, amely időtartamra az állatok visszakerültek a lakódobozukba, majd az 1.-nek megfelelően kivitelezett 2.

kör következett, annyi különbséggel, hogy a stimulánsok pozícióját megcseréltem. A tesztek végeztével az állatokat mélyhűtőben túlhűtöttem, majd 4 ml 96 %-os EtOH-ban tartósítottam a DNS-kivonásig.

qPCR módszerek

A *Bd*-vel való fertőzést és a fertőződés mértékét valós idejű PCR (real-time PCR, qPCR) segítségével igazoltuk vissza, mivel ez a szövettani vizsgálatnál pontosabb és megbízhatóbb eredményt ad (Boyle és mtsai., 2004). A konzervált metamorfoknál a hátsó végtag ujjait eltávolítottuk, és a DNS kivonásig 0,5 ml etanolban, 4 °C-on konzerváltuk. A DNS kivonáshoz a szövetmintákról először lepároltuk az alkoholt, majd kisebb darabokra vágtuk őket. Ezeket steril eppendorf csövekbe, 30-40 mg szilika gyöngy közé tettük, és 50 µl PrepMan Ultra (Life Technologies) DNS kivonó folyadékot adtunk hozzájuk. A mintákat 45 másodpercig sejtmalomban ráztuk, majd 14.500 RPM-el (round per minute) 1 percig centrifugáltuk, majd megismételtük a rázatást és a centrifugálást. A mintákat ezután 10 percig 100 °C-ra felfűtött szárazblokkba helyeztük, majd hagytuk őket szobahőmérsékletűre hűlni. Végül három perces centrifugálást (14.500 RPM) követően a felülúszót (odafigyelve, hogy a folyadék szövetdarabot és szilika gyöngyöket ne tartalmazzon) új, steril eppendorf csövekbe pipettáztuk, majd a mintákat -20 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

A qPCR reakciókat BioRad CFX96 Touch Real-Time PCR System gépen végeztük, 2x TaqMan Universal PCR Mastermix-et (Life Technologies) használva, a Boyle és munkatársai (2004) által közölt protokoll szerint, kettő párhuzamossal. A DNS kivonatokból 11 mikroliternyi, 10-szeresére hígított oldatokat készítettünk, ezekből vittünk fel 5-5 mikrolitert a 96 lyukú qPCR lemezre. A teljes reakciótérfogat a templáttal együtt 25 µl volt. Két well-be negatív kontrollként PCR víz, nyolcba pedig, két-két ismétléssel, a genom ekvivalens standardok kerültek: 100, 10, 1 és 0,1 GE/ml (genom-ekvivalens/milliliter) hígítású standardot használtunk. Ez azt jelenti, hogy az oldat 1 millilitere 100, 10, 1, illetve 0,1 db zoospóra genomjának megfelelő mennyiségű DNS-t tartalmaz, ezek segítségével

kalibrálható a qPCR és becsülhető az ismeretlen összetételű minták *Bd* DNS koncentrációja, amiből következtethetünk az egyedek fertőzési intenzitására, vagyis a rajtuk lévő gomba mennyiségére.

Az *FV3* qPCR vizsgálatához az állatokat felboncoltuk, majd a teljes májszövetet további genetikai vizsgálatok céljából 96 %-os etil-alkoholban konzerváltuk. Az *FV3* örökítőanyagát Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) segítségével izoláltuk a gyártó által javasolt protokoll szerint. Az izolált DNS-ből kvantitatív PCR (Bio Rad Cfx96) segítségével határoztuk meg a prevalenciát és a fertőzési intenzitást a Stilwell és munkatársai (2018) által javasolt protokoll szerint. A PCR tesztek annak ellenőrzésére szolgáltak, hogy valóban megfertőződtek-e a fertőzött állatok és a kontroll állatoknál történt-e kontamináció.

Statisztikai módszerek

A videófelvételeket BORIS (Friard és Gamba, 2016) eseményrekorderrel értékeltem ki. A fokális egyed területét felosztottuk bal és jobb választási zónákra, melyek alapterülete a fokális egyed kamrájának 1/6-a volt a válaszfalaktól számítva. A középső terület semleges, választásnak nem minősülő zóna volt.

A mért magyarázó változók a következők voltak: a fokális és stimuláns egyedek fertőzöttsége bináris és folytonos skálán. Bináris skálán két értéke lehetett a fertőzöttségnek, kontroll vagy fertőzött, az alapján, hogy a qPCR eredménye szerint jelen volt-e a kórokozó DNS-e. Folytonos skálán a qPCR-rel számolt kópiaszám alapján mértük a fertőzöttség intenzitását, két mérést futtattunk le minden egyedre és ezeknek az átlagát vettük az érvényes eredménynek.

Oldalválasztás

Az oldalválasztás vizsgálatánál csak azokat az egyedeket vettük figyelembe, amelyek bejárták a kontroll és a fertőzött oldali választási zónát is (Courtney L. és mtsai, 2019). Ezen egyedek viselkedésének azt az időintervallumát elemeztük, ami 300 másodperccel azután történt, hogy megjelentek a második választási zónában. Erdei békáknál 15 fokális egyed felelt meg

ennek a feltételnek, barna varangyoknál 11. Vizsgáltuk, hogy az egyedek a kontroll oldalon több időt töltöttek-e, mint a fertőzött oldalon. Ehhez a következőképpen számítottuk ki a relatív kontroll oldali időt: $\text{Kontroll oldalon töltött relatív idő} = \frac{\text{kontroll oldalon töltött idő}}{(\text{kontroll oldalon töltött idő} + \text{fertőzött oldalon töltött idő})}$

A Fisher próbához és az előjel próbához bináris, a választásra vonatkozó változót is előállítottunk: a „siker” 1-es értéket kapott, ha a fokális egyed a kontroll oldalon töltött több időt, és 0-t, ha a fokális egyed a fertőzött stimuláns oldalán volt többet.

A statisztikai elemzéseket R környezetben végeztem. Előjelpróbával teszteltük, hogy több volt-e a sikeres egyed, mint a sikertelen. Kevert modellel kerestem, hogy van-e összefüggés a fokális egyed kontroll oldalon töltött idejének aránya és a fokális egyed fertőzöttségének intenzitása között, illetve a fokális egyed aktivitása és fertőzöttségének intenzitása között, random faktorként figyelembe véve a családot. A modellben logaritmus transzformálva szerepelt a függő és a magyarázó változó is. Egzaktt Wilcoxon-Pratt teszttel vizsgáltuk, hogy a kontroll oldalon töltött idő több volt-e, mint a fertőzött oldalon töltött idő. Fisher egzakt próbával teszteltük, hogy a sikeres és sikertelen fokális egyedek eloszlása megegyezett-e a fertőzött és kontroll fokális egyedek között, illetve az aktív és inaktív (egyetlen zónahatárt sem átlépő) fokális egyedek eloszlása megegyezett-e a fertőzött és kontroll fokális egyedek között.

Aktivitás

Az aktivitást az első iránypreferencia kísérletben megtett zónaátlépések számával becsültük. Itt minden egyed adatait felhasználtuk, ami az erdei békáknál 49 mintát jelentett, a varangyoknál 24-et. Az aktivitást is kétféle skálán vizsgáltuk. Az egyik a zónaátlépések száma volt, ami a teljes 1 órás felvétel alatt a fokális egyed által összesen átlépett zónahatárok száma volt. Bináris skálán is mértük az aktivitást, az alapján, hogy volt-e egyáltalán zónaátlépés („1” érték, aktív), vagy végig egyhelyben maradt („0” érték, inaktív) a fokális egyed. A zónaátlépések számának és a fokális egyed folytonos skálán mért fertőzöttségének kapcsolatát kevert modellel

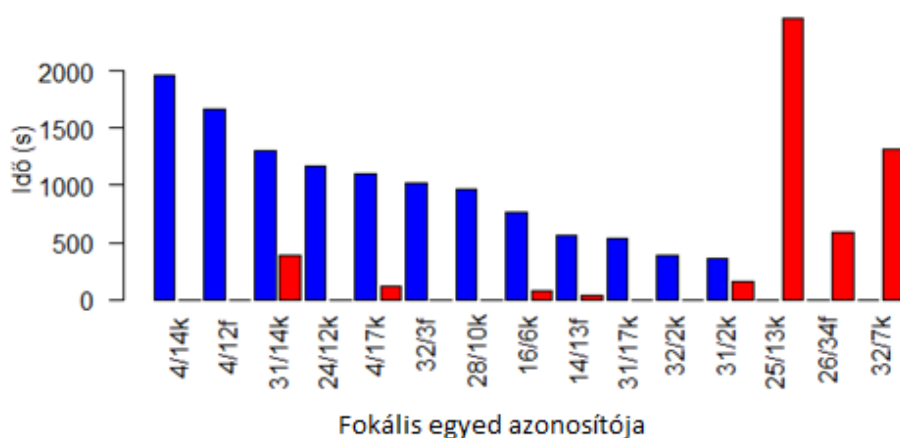
vizsgáltuk. Az aktivitás (aktív, inaktív) és a bináris skálán számolt fokális egyed fertőzöttség (fertőzött, kontroll) kapcsolatát Fisher egzakt próbával elemeztük

Eredmények

Erdei béka

Oldalválasztás

A kontroll fokális egyedek kontroll (N=11) oldalon töltött relatív idejének átlaga $0,752 \pm 0,386$ s. A fertőzött fokális egyedek (N=4) kontroll oldalon töltött relatív idejének átlaga $0,734 \pm 0,491$ s. Az alábbi oszlopdiagramon látható a fokális egyedek kontroll és fertőzött választási zónában töltött ideje (3. ábra).



3. ábra: A fokális erdei béka egyedek kontroll (kék oszlopok), illetve fertőzött oldalon (piros oszlopok) eltöltött ideje onnantól számítva, hogy bejárták mindkét oldalt (+5 perc). Az egyedek azonosítóiban a „k” a névben a kontroll egyedeket jelöli, az „f” a fertőzötteket

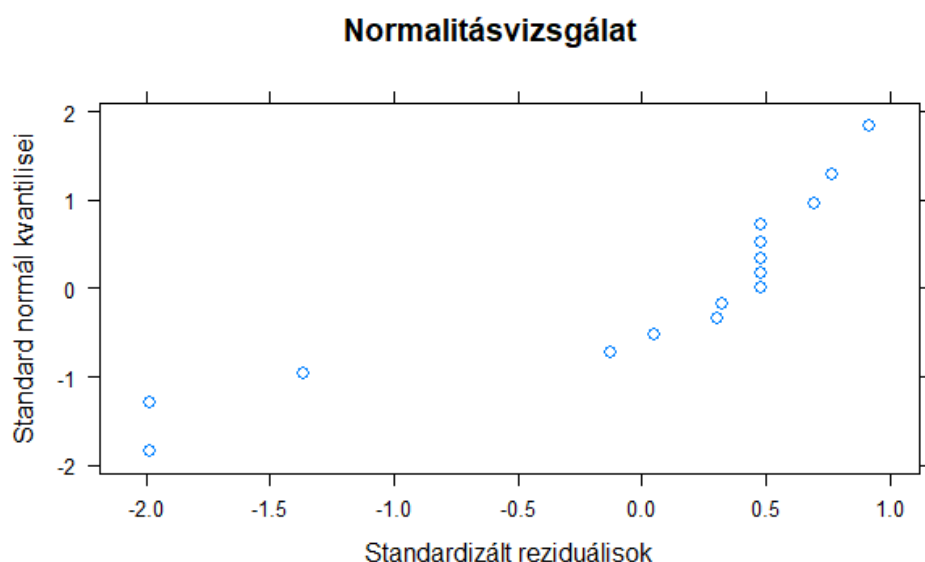
Az előjel-próba eredménye szerint szignifikánsan több egyed (az egyedek 80 %-a) töltött több időt a kontroll stimuláns egyedek oldalán, mint a fertőzöttekén (N = 15, P = 0,0352). Fisher-féle egzakt próbával vizsgáltuk, hogy a fertőzött és kontroll fokális egyedeknél homogén volt-e a siker

eloszlása. (táblázat). Az eredmény nem szignifikáns ($P = 1$; OR 1,458; $CI_{95} = 0,019-39,227$). 15 fokális egyedből 12 volt sikeres (3. táblázat).

3. táblázat: Kontingencia tábla a siker és fertőzöttség kapcsolatáról (*Rana dalmatina*).

	Siker	Kudarac
Kontroll	9	2
Fertőzött	3	1

A kontroll oldalon eltöltött relatív idő elemzésére felállított kevert modellre kapott képlet a következő lett: Relatív kontroll idő = $1,75 * (\text{fertőzöttség} + 1)^{-0,01}$. Azonban az összefüggés nem szignifikáns ($P = 0,4841$). A kevés adat miatt nem lehetek biztos, hogy a modell megfelelően illeszkedik, a szórás homogenitása nem tűnik, hogy teljesülne, a reziduálisok eloszlása enyhén eltér a normális eloszlástól (4. ábra).



4. ábra Normalitás vizsgálat a kevert modell adatpontjairól kontroll oldali időre (*Rana dalmatina*).

Egzakt Wilcoxon-Pratt rangpróbával nem volt szignifikánsan több a kontroll oldalon töltött relatív idő aránya, mint a fertőzött oldalon töltött relatív idő aránya ($P = 0,0975$). Spearman-korrelációval vizsgáltuk, hogy a fertőzött stimuláns fertőzöttségének intenzitása hatással van-e a kontroll oldalon töltött időre, de az eredmény nem szignifikáns ($P = 0,3871$).

Aktivitás

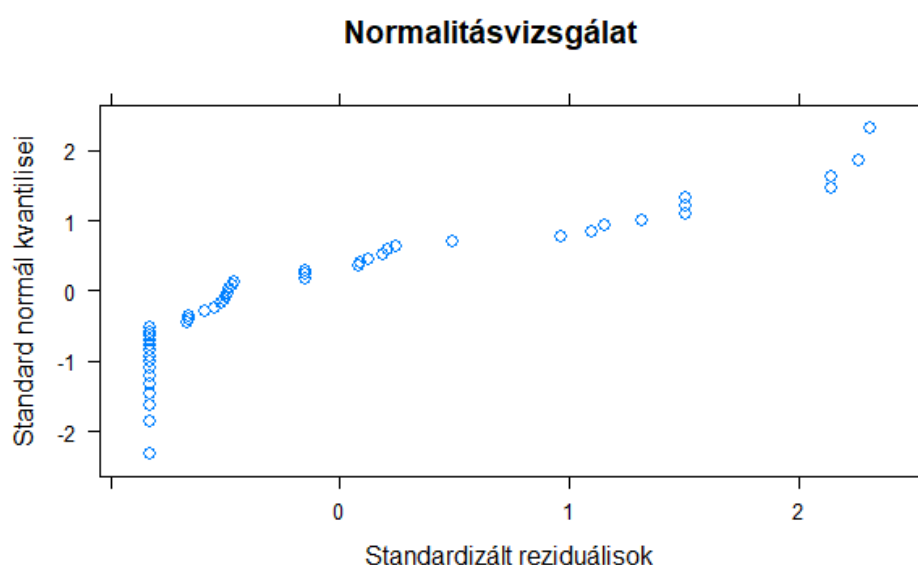
A zónaátlépések számának átlaga $4,12 \pm 7,23$ darab kontroll fokális egyedeknél ($N = 26$). A zónaátlépések minimuma 0, maximuma 24. Fertőzött fokális egyedeknél ($N = 23$) a zónaátlépések átlaga $1,65 \pm 3,5$ darab. A minimum 0 zónaátlépés, a maximum 16.

A Fisher-féle egzakt teszt eredménye szerint a fokális egyedek fertőzöttségi státusza nem hatott szignifikánsan az aktivitásukra ($P = 0,78$), a fertőzöttek 0,8-szor magasabb eséllyel voltak inaktívabbak a kontrolloknál. A tényleges eloszlás a 4. táblázatban látható.

4. táblázat: Kontingencia tábla az aktivitás és fertőzöttség kapcsolatáról (*Rana dalmatina*).

	Aktív	Inaktív
Kontroll	11	15
Fertőzött	11	12

A zónaátlépések száma és a fertőzöttség intenzitása közötti kapcsolatot elemző kevert modell egyenlete: Zónaátlépések száma = $1,33 * (\text{fertőzöttség} + 1)^{-0,019} - 1$. Az összefüggés nem volt szignifikáns, vagyis ($P = 0,33$). Modelldiagnosztikák alapján a modell megfelelően illeszkedett, bár a normalitási feltétel itt sem teljesült tökéletesen (5. ábra).



5. ábra: Normalitás vizsgálat a kevert modell adatpontjairól az aktivitásra (*Rana dalmatina*).

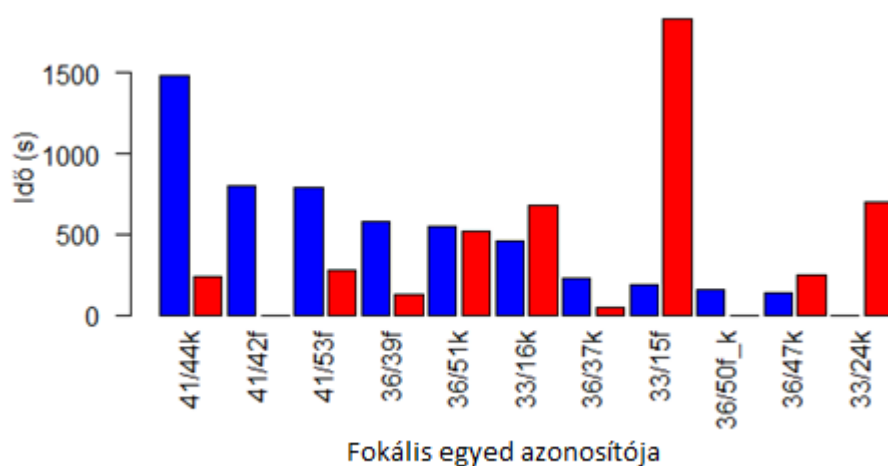
qPCR eredmények

A PCR vizsgálat eredményei szerint minden egyed ami kontroll volt elkerülte a kontaminációt a fertőzött egyedek pedig sikeresen megfertőződtek. A fertőzött fokális egyedekből visszamért FV3 titer 4052 (4/12f), 12949 (14/13f), 309518 (32/3f), illetve 61841868 (26/34f) PFU volt.

Barna varangy

Oldalválasztás

A kontroll fokális egyedek (N=7) kontroll oldalon töltött relatív idejének átlaga $0,57 \pm 0,35$ s szórással. A fertőzött fokális egyedeknek (N=4) a kontroll oldalon töltött relatív idő átlag $0,66 \pm 0,39$ s. Az alábbi oszlopdiagramon látható a fokális egyedek kontroll és fertőzött választási zónában töltött ideje (6. ábra).



6. ábra: A kék oszlopok jelentik a kontroll oldali időt, a piros oszlopok a fertőzött oldalit. Az alul látható kódok az egyedek azonosítói, a „k” a névben a kontroll egyedeket jelöli, az „f” a fertőzötteket. A 36/50 egyed eredetileg fertőzött kezelés kapott, de a PCR eredmények szerint nem fertőződött meg, ezért kontrollként jelöltük az elemzésekben.

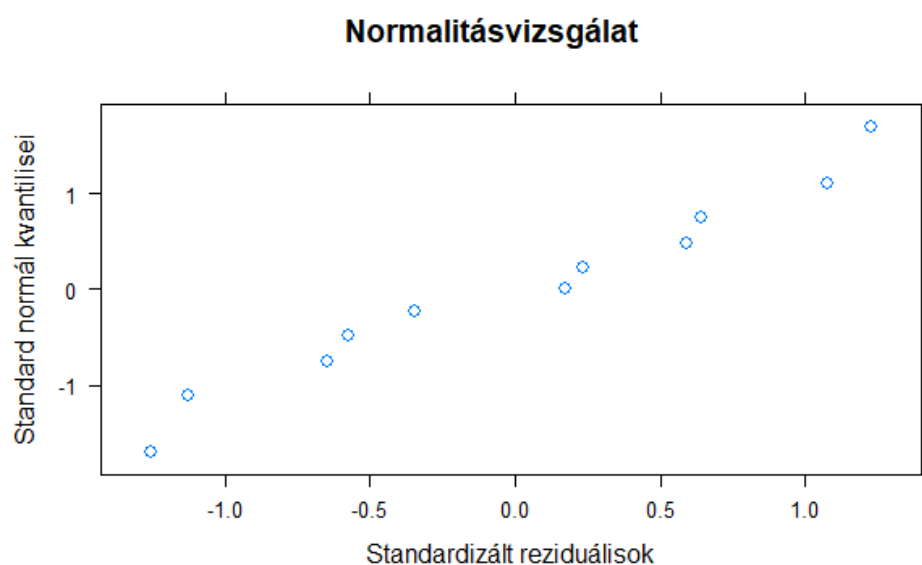
Előjel-próbában 11 megfigyelt állatból 7-nél volt siker (64,0%). Az eredmény nem szignifikáns ($P = 0,5488$, $N=11$).

A Fisher-féle egzakt próba eredménye az siker és a fertőzöttség összefüggésére nem szignifikáns ($P=1$; OR 0,478; $CI_{95}=0,006-10,522$) (5. táblázat).

5. táblázat: Kontingencia tábla az siker és fertőzöttség kapcsolatáról (*Bufo bufo*)

	Siker	Kudarac
Kontroll	4	3
Fertőzött	3	1

A kontroll oldalon eltöltött relatív idő elemzésére felállított kevert modellre kapott képlet a következő lett: Relatív kontroll idő = $0,528 * (\text{Fertőzöttség} + 1)^{0,029} - 1$. Az eredmény nem szignifikáns ($P = 0,7369$). A kevés adat miatt nem lehetek biztos, hogy a modell megfelelően illeszkedik, a szórás homogenitása nem tűnik, hogy teljesülne, a reziduálisok eloszlása enyhén eltér a normális eloszlástól (7. ábra).



7. ábra Normalitás vizsgálat a kevert modell adatpontjairól kontroll oldali időre (*Bufo bufo*).

Egzakt Wilcoxon-Pratt rangpróbával nem volt szignifikánsan több a kontroll oldalon töltött relatív idő aránya, mint a fertőzött oldalon töltött relatív idő aránya ($P = 0,4121$). A fokális egyed kontroll oldalon töltött ideje és a fertőzött stimuláns fertőzöttségi intenzitásának kapcsolatát Spearman-

korrelációval vizsgáltuk, a kapcsolt rangokat Monte-Carlo szimulációval kezelve. A korreláció nem szignifikáns ($P=0,3154$).

Aktivitás

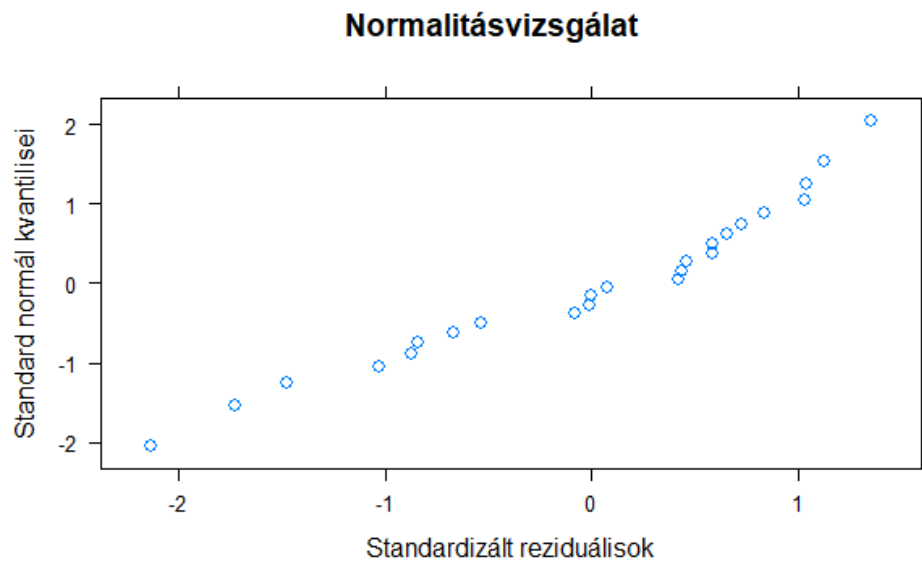
A zónaátlépések átlaga a kontroll fokális egyedekre ($N=13$) $20,62 \pm 17,19$ darab. A minimum 0 zónaátlépés volt, a maximum 49. A fertőzött fokális egyedekre ($N=11$) a zónaátlépések átlaga $19,64 \pm 21,2$ darab volt. A minimum érték 0, a maximum 64.

A Fisher-féle egzakt próba eredménye az siker és a fertőzöttség összefüggésére nem szignifikáns ($P=0,3002$). A fertőzött fokális egyedek 4,228-szor voltak inaktívabbak a kontrolloknál (6. táblázat).

6. táblázat: Kontingencia tábla az aktivitás és fertőzöttség kapcsolatáról (Bufo bufo).

	Aktív	Inaktív
Kontroll	12	1
Fertőzött	8	3

A zónaátlépések tényleges számának és fertőzöttség intenzitásának kapcsolatára kevert modellt állítottam fel, random faktorként a családot bevonva. A modell egyenlete: $\text{Zónaátlépések száma} = 13,992 * (\text{Fertőzöttség} + 1)^{-0,386} - 1$. Az összefüggés nem szignifikáns ($P=0,1035$). Modelldiagnosztika a modell megfelelően illeszkedik és normalitás teljesül (8. ábra)



8. ábra: Normalitás vizsgálat a kevert modell adatpontjairól az aktivitásra (*Bufo bufo*).

PCR eredmények

Egyetlen egyed, a 36/50-es, kivételével az összes fertőzött kezelést kapott fokális egyed megfertőződött és a kontroll egyedek nem kontaminálódtak. A fertőzött fokális egyedekből visszamért *Bd* 0,015845 (41/42f); 0,45615 (41/53f); 6,556 (36/39f); 0,7311(33/15f) titer PFU volt.

Diszkusszió

A kísérletben részt vevő fokális egyedeknek egy jelentős százalékát kizártuk a statisztikai elemzésből túlzott inaktivitás miatt. Erdei békák esetén 34-et a 49-ből, barna varangyok esetén 13-at a 24-ből. Ezeket az egyedeket úgy értékeltük, hogy nem tudtak megfelelően hozzászokni a választókamrához és valós viselkedést mutatni. Más választási teszteknel is csak azokat a felvételeket értékelték, ahol a fokális egyed bejárta mindkét választási zónát (Courtney L. és mtsai., 2019).

Korábban Han és munkatársai (2008) is arra az eredményre jutottak vízi választókamrában *Pseudacris regilla*, *Rana aurora*, *Bufo boreas* és *Rana cascadae* fajba tartozó ebihalakkal, hogy nincs szignifikánsan kimutatható elkerülő viselkedés a *Bd*-vel fertőzött fajtársak iránt és az aktivitásban megmutatkozó változás sem jelentős. Ebben a kutatásban szárazföldi választókamrát alkalmaztam metamorf egyedekkel. A metamorf egyedek közötti szociális interakciók sokkal kevésbé jelentősek, mint az ebihalak között, ezért érdekes ezt a kérdést metamorfokkal is vizsgálni. McMahon és mtsai (2014) a *Bd*-vel fertőzött környezet elkerülését mutatta ki *Litoria booroolongensis*, *Osteopilus septentrionalis* és *Bufo quercicus* fajoknál, de csak a már fertőzésen átesett és kigyógyult metamorfoknál. Jelen vizsgálatban nem voltak betegségből kigyógyult fokális egyedek, csak fertőzött és kontroll. Az általam talált eredmények szerint a barna varangy metamorfok nem képesek felismerni és elkerülni a *Bd*-vel fertőzött fajtársakat, az erdei békák azonban az előjel teszt eredménye szerint sikeresen felismerhetik és elkerülhetik FV3-al fertőzött egyedeket.

A tesztekben a kevert modell kivételével nem teljesül a függetlenség feltétele, mert vannak azonos családból származó fokális egyedek. Azonban korábbi vizsgálatokban is fennállt ez probléma, amit úgy oldottak fel, hogy összekeverték és véletlenszerűen válogatták az egyedeket (Laurila és mtsai., 2011; Mogali és mtsai., 2015; Relyea és Diecks, 2008), nem vették figyelembe a rokoni kapcsolatot. Ebben a kutatásban ezt az információt nem mellőztük, mert a kevert modell tudta kezelni.

A fertőzöttség a kevert modell egyenlet szerint elhanyagolható mértékben csökkentette az aktivitást és a kontroll oldalon töltött időt az *FV3*-mal fertőzött erdei békáknál, a *Bd*-vel fertőzött varangyoknál pedig kissé növelte a kontroll oldalon töltött relatív időt, de csökkentette az aktivitást. Ezek a tendenciák nem szignifikánsak, ezért nem lehet őket érvényesnek tekinteni. Az egyetlen szignifikáns eredményt az előjel próba mutatta a *FV3*-al fertőzött erdei békáknál, amelyeknél több fokális egyednek volt a kontroll oldali relatív ideje több mint 0,5. Ennek oka a fajok közötti különbség lehet a felismerő képességben, esetleg a fajok közötti különbség az adott betegségre való érzékenységben. Az erdei békák számára az *FV3* nagymértékű mortalitást okoz, a barna varangyok viszont nagyarányban túlélnek a *Bd* fertőzést. Emiatt az erdei békákra lehetséges, hogy erősebb szelekció hatott az *FV3* elkerülésére, mint amilyen a barna varangyokra hatott a *Bd* elkerülésére. A kórokozók jelenlétének időtartamában lévő különbség is lehetővé tehetné a jobb adaptálódást, hiszen az *FV3* régebb óta jelen van Magyarországon, mint a *Bd* (Vörös és mtsai., 2018).

Az alacsony mintaelemszám és a család zavaró hatása miatt azonban ezt az eredményt is fenntartásokkal kell kezelni. Az eddigiek alapján nem tudjuk biztosan eldönteni, hogy a kételtűeket sújtó járványok problémáját tudja-e jelentősen mérsékelni az állatok természetes elkerülő mechanizmusa. Az ellentmondások miatt az eredményekben és a kis mintaszám miatt további vizsgálatokra van szükség a kérdés eldöntésére.

Összefoglalás

A kutatás témája a *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) gomba, illetve az *FV3* ranavírus hatása barna varangy (*Bufo bufo*) illetve erdei béka (*Rana dalmatina*) juvenilis egyedeinek szociális viselkedésére. Választásos teszttel vizsgáltam, hogy a fertőzött vagy nem-fertőzött (kontroll) fokális egyedek elkerülik-e a fertőzött stimuláns egyedeket, valamint, hogy módosul-e a fokális egyedek aktivitása a fertőzés hatására. A választókamrák középső rekeszébe helyeztem a fokális egyedet és a két ellentétes végére a kontroll és a fertőzött stimuláns egyedet, amelyek a fokális egyedtől résekkel áttört, átlátszó válaszfallal voltak elválasztva, amin a vizuális és a kémiai ingerek átjuthattak. Kamerával rögzítettem az állatok viselkedését, majd BORIS eseményrekorder segítségével lemértem, hogy mennyi időt tartózkodtak a fokális egyedek a kontroll és a fertőzött stimuláns egyedek közelében, valamint, hogy hányszor lépték át a választási zónák határait. Eredményeim alapján a barna varangyok nem kerültek el a *Bd*-vel fertőzött stimuláns egyedeket és aktivitásukra sem volt hatással a fertőzőség. Erdei békák esetében sem befolyásolta az aktivitást az *FV3*-fertőzés, a beteg egyedek elkerülésével kapcsolatban ugyanakkor nem konkluzív a vizsgálatom: szignifikánsan több fokális egyed volt többet a kontroll oldalon, mint a fertőzöttén, ugyanakkor összességében nem tartózkodtak több időt a kontroll oldalon. További vizsgálatokra, nagyobb mintaszámra van szükség azzal a kérdéssel kapcsolatban, hogy az erdei békák elkerülik-e fertőzött fajtársaikat.

Summary

The effect of infection on the social behaviour of amphibians

This study investigated the effect of *Batrachochytrium dendrobatidis* (*Bd*) and *FV3* ranavirus infection on the social behaviour of juvenile common toads (*Bufo bufo*) and agile frogs (*Rana dalmatina*), respectively. In classic preference trials I tested whether infected and non-infected focal individuals avoided infected conspecifics and whether infection status affected movement activity of focal individuals. I placed one focal individual into the central compartment of chambers and one infected and one non-infected stimulus individual into opposite end-chambers, which were divided by transparent and perforated walls from the central compartment, thus, the frogs could smell and see each other. I video-recorded the behaviour of focal individuals and later analysed videos using the event logging software BORIS. I measured the time focal individuals spent on the side of the infected vs. uninfected stimulus individuals and counted the number of zone-crossings. The avoidance of infected stimulant individuals was not significant. My results indicated no behavioural avoidance of *Bd*-infected conspecifics by common toad juveniles and their activity also did not seem to be affected by infection. In case of agile frogs, behavioural activity was also not affected by *FV3* infection, but my study remained non-conclusive regarding the avoidance of infected conspecifics: significantly more focal individuals spent more time on the side of non-infected than infected stimulus individuals, but they did not spend more time in total on the control side. Further studies and larger sample sizes will be necessary to draw a firm conclusion on spatial avoidance of infected conspecifics in agile frogs.

Irodalomjegyzék

- Alroy, J., 2015. Current extinction rates of reptiles and amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 13003.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1508681112>
- Andre, S.E., Parker, J., Briggs, C.J., 2008. Effect of Temperature on Host Response to *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection in the Mountain Yellow-legged Frog (*Rana muscosa*). *J. Wildl. Dis.* 44, 716–720. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.3.716>
- APHA. 1985. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th ed. American Public Health Association, Washington DC
- Boyle, D.G., Boyle, D.B., Olsen, V., Morgan, J.A.T., Hyatt, A.D., 2004. Rapid quantitative detection of chytridiomycosis (*Batrachochytrium dendrobatidis*) in amphibian samples using real-time Taqman PCR assay. *Dis. Aquat. Organ.* 60, 141–148.
<https://doi.org/10.3354/dao060141>
- Buskirk, J.V., Ferrari, M., Kueng, D., Nöpflin, K., Ritter, N., 2011. Prey risk assessment depends on conspecific density. *Oikos* 120, 1235–1239.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.19311.x>
- Cheng, T.L., Rovito, S.M., Wake, D.B., Vredenburg, V.T., 2011. Coincident mass extirpation of neotropical amphibians with the emergence of the infectious fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9502.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1105538108>
- Courtney L., M., Natalie S., R., Tamra C., M., 2019. Male preference for conspecific females depends on male size in the splendid darter, *Etheostoma barrenense*. *Anim Behav* 89–96.
<https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.04.022>
- Cunningham, A.A., Langton, T.E.S., Bennett, P.M., Lewin, J.F., Drury, S.E.N., Gough, R.E., MacGregor, S.K., 1996. Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 351, 1539–1557. <https://doi.org/10.1098/rstb.1996.0140>
- Ferrari, M.C.O., Crane, A.L., Brown, G.E., Chivers, D.P., 2015. Getting ready for invasions: can background level of risk predict the ability of naïve prey to survive novel predators? *Sci. Rep.* 5, 8309.
<https://doi.org/10.1038/srep08309>
- Friard, O., Gamba, M., 2016. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- Geiger, C.C., Bregnard, C., Maluenda, E., Voordouw, M.J., Schmidt, B.R., 2017. Antifungal treatment of wild amphibian populations caused a transient reduction in the prevalence of the fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Sci. Rep.* 7, 5956.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05798-9>

- Gosner, K.L., 1960. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica* 16, 183–190.
- Gray, M.J., Chinchar, V.G. (Eds.), 2015. *Ranaviruses*. Springer International Publishing, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13755-1>
- Green, D.E., Converse, K.A., Schrader, A.K., 2002. Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996–2001. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 323–339. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04400.x>
- Han, B.A., Bradley, P.W., Blaustein, A.R., 2008. Ancient behaviors of larval amphibians in response to an emerging fungal pathogen, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63, 241–250. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0655-8>
- Hyatt, A.D., Gould, A.R., Zupanovic, Z., Cunningham, A.A., Hengstberger, S., Whittington, R.J., Kattenbelt, J., Coupar, B.E.H., 2000. Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Arch. Virol.* 145, 301–331. <https://doi.org/10.1007/s007050050025>
- Kásler A, Ujszegi J, Holly D, Jaloveczki B, Gál Z, Hettyey A 2021 In vitro thermal tolerance of a hypervirulent lineage of the chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Mycologia*, bírálat alatt.
- Laurila, A., Crochet, P.-A., Merilä, J., 2011. Predation-induced effects on hatchling morphology in the common frog (*Rana temporaria*). *Can. J. Zool.* <https://doi.org/10.1139/z01-045>
- Longcore, J.E., Pessier, A.P., Nichols, D.K., 1999. *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogenic to amphibians. *Mycologia* 91, 219–227. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061011>
- McMahon, T., Sears, B., Venesky, M., Bessler, S., Brown, J., Deutsch, K., Halstead, N., Lentz, G., Tenouri, N., Young, S., Civitello, D., Ortega, N., Fites, J., Reinert, L., Rollins-Smith, L., Raffel, T., Rohr, J., 2014. Amphibians acquire resistance to live and dead fungus overcoming fungal immunosuppression. *Nature* 511, 224–7. <https://doi.org/10.1038/nature13491>
- Mogali, S.M., Shanbhag, B.A., Saidapur, S.K., 2015. Strong food odours mask predation risk and affect evocation of defence behaviours in the tadpoles of *Sphaerothera breviceps*. *J Ethol* 6.
- Ouedraogo, R.M., Kamp, A., Goettel, M.S., Brodeur, J., Bidochka, M.J., 2002. Attenuation of fungal infection in thermoregulating *Locusta migratoria* is accompanied by changes in hemolymph proteins. *J. Invertebr. Pathol.* 81, 19–24. [https://doi.org/10.1016/S0022-2011\(02\)00117-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2011(02)00117-9)
- Pessier, A.P., 2008. Management of disease as a threat to amphibian conservation. *Int. Zoo Yearb.* 42, 30–39. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1090.2008.00047.x>
- Piotrowski, J.S., Annis, S.L., Longcore, J.E., 2004. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 96, 9–15. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11832990>
- Pounds, J.A., Fogden, M.P.L., Savage, J.M., Gorman, G.C., 1997. Tests of Null Models for Amphibian Declines on a Tropical Mountain.

- Conserv. Biol. 11, 1307–1322. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1997.95485.x>
- Relyea, R.A., Diecks, N., 2008. An Unforeseen Chain of Events: Lethal Effects of Pesticides on Frogs at Sublethal Concentrations. *Ecol. Appl.* 18, 1728–1742. <https://doi.org/10.1890/08-0454.1>
- Roy, H. e., Steinkraus, D. c., Eilenberg, J., Hajek, A. e., Pell, J. k., 2005. BIZARRE INTERACTIONS AND ENDGAMES: Entomopathogenic Fungi and Their Arthropod Hosts. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 331–357. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.150941>
- Sauer, E.L., Trejo, N., Hoverman, J.T., Rohr, J.R., 2019. Behavioural fever reduces ranaviral infection in toads. *Funct. Ecol.* 33, 2172–2179. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13427>
- Stilwell, N.K., Whittington, R.J., Hick, P.M., Becker, J.A., Ariel, E., Beurden, S. van, Vendramin, N., Olesen, N.J., Waltzek, T.B., 2018. Partial validation of a TaqMan real-time quantitative PCR for the detection of ranaviruses. *Dis. Aquat. Organ.* 128, 105–116. <https://doi.org/10.3354/dao03214>
- Stockmaier, S., Stroeymeyt, N., Shattuck, E.C., Hawley, D.M., Meyers, L.A., Bolnick, D.I., 2021. Infectious diseases and social distancing in nature | Science. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.abc8881>
- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodrigues, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W., 2004. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306, 1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
- Teacher, A.G.F., Cunningham, A.A., Garner, T.W.J., 2010. Assessing the long-term impact of Ranavirus infection in wild common frog populations. *Anim. Conserv.* 13, 514–522. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2010.00373.x>
- Vörös J., Herczeg D., Fülöp A., Gál J.T., Dán Á., Harnos K., Bosch J., 2018. Batrachochytrium dendrobatidis in Hungary: an overview of recent and historical occurrence. *Acta Herpetol.* 13, 125–140.
- Webster, J.P., 2001. Rats, cats, people and parasites: the impact of latent toxoplasmosis on behaviour. *Microbes Infect.* 3, 1037–1045. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01459-9](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01459-9)
- Whitfield, S.M., Geerdes, E., Chacon, I., Rodriguez, E.B., Jimenez, R.R., Donnelly, M.A., Kerby, J.L., 2013. Infection and co-infection by the amphibian chytrid fungus and ranavirus in wild Costa Rican frogs. *Dis. Aquat. Organ.* 104, 173–178. <https://doi.org/10.3354/dao02598>
- Woodhams, D.C., Alford, R.A., Marantelli, G., 2003. Emerging disease of amphibians cured by elevated body temperature. *Dis. Aquat. Organ.* 55, 65–67. <https://doi.org/10.3354/dao055065>

Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani elsősorban a témavezetőmnek Dr. Hettyey Attilának, akinek a kezdeményezése és folyamatos támogatása nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. A belső konzulensemnek, Dr. Kövér Szilviának is szeretném megköszönni a türelmét, segítségét és hasznos javaslatait. Dr. Lang Zsoltnak a statisztikai kiértékelés kapcsán adott tanácsait köszönöm. A kutatócsoportból szeretném megköszönni Dr. Herczeg Dávidnak, Ujszegi Jánosnak, Üveges Bálintnak, Kásler Andreának és Holly Dórának a gyakorlati segítséget, amit az állatok gondozásában és a laboratóriumi munkában nyújtottak.

A szükséges engedélyeket a Pest Megyei Kormányhivatal Környezetvédelmi és Természetvédelmi Főosztálya adta ki: PE-06/KTF/8060-3/2018; PE-06/KTF/8060-1/2018; PE/EA/295-7/2018

Kutatásunkat az MTA Lendület Program (P2012-24/2012), az MTA Bolyai és Bolyai+ Program, illetve az NKFIH (NKFIH-K/124375) támogatta.

Kutatásunkat az MTA Lendület Program (P2012-24/2012), az MTA Bolyai és Bolyai+ Program, illetve az NKFIH (NKFIH-K/124375) támogatta.

Mellékletek

HuVetA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: Matuz Vanessza

Elérhetőség (e-mail cím): mvanessza12@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Fertőzőtség hatása kételtűek szociális
viselkedésére

A mű megjelenési adatai: 2021. Budapest

Az átadott fájlok száma: 1

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti

vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):**



engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,



az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,



a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**



Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 2021. 04. 30.


aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.



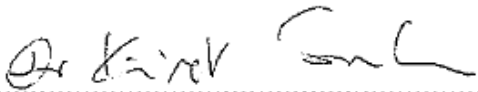
A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;
- a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;
- az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;
- a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,
- a nyílt hozzáférés támogatása.

Alulírott HETTYEY ATTILA Igazolom, hogy
 MATUZ VANDERA (a hallgató neve)
 FERTŐZŐTISZES HATÁSÚ KÉTELTŐK SZOCIÁLIS VISELKEDÉSÉRE
 című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.
 Budapest, 2021. 04. 24.

..... MT
 a témavezető neve és aláírása
 ELKH ATK NŐM LENDÜLET EVOLÚCIÓS
 ÖKOLÓGIAI KUTATÓCÍSPORT
 tanszék

Alulírott Dr. Kövér Szilvia igazolom, hogy
Matuz Vanessza Fertőzöttség hatása kételtűek szociális viselkedésére
című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.
Budapest, 2021. 04. 26.



.....

Dr. Kövér Szilvia belső konzulens
Ökológiai Tanszék