

**Szent István Egyetem**  
**Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Nyálkaspórák (Myxozoa) halparaziták**  
**gazdafajlagosságának kísérletes és molekuláris vizsgálata**

PhD értekezés

Marton Szilvia

2012

Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Témavezető és témabizottsági tagok:

.....  
Dr. Eszterbauer Edit  
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet  
témavezető

.....  
Dr. Molnár Kálmán  
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet  
témabizottság tagja

.....  
Dr. Benkő Mária  
MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézet  
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez az ..... sz. példány.

.....  
Marton Szilvia

# Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás .....	7
2. Bevezetés .....	9
3. Irodalmi áttekintés .....	11
3.1. Nyálkaspórások általános jellemzői, rendszertanuk.....	11
3.2. Myxospórák.....	14
3.3. Aktinospórák .....	17
3.4. A vizsgált paraziták .....	18
3.4.1. <i>Myxobolus pavlovskii</i> .....	18
3.4.2. <i>Myxobolus pseudodispar</i> .....	19
3.5. Oligochaeták és filogenetikájuk.....	20
3.6. A nyálkaspórások gazdafajlagossága, és a gazdák fogékonysága .....	21
4. Anyagok és módszerek .....	25
4.1. Kísérleti állatok és a paraziták fenntartása.....	25
4.2. Fertőzési kísérletek .....	27
4.2.1. <i>Myxobolus pavlovskii</i> fertőzési kísérletek .....	27
4.2.2. <i>Myxobolus pseudodispar</i> fertőzési kísérletek .....	27
4.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok .....	28
4.4. Filogenetikai vizsgálatok .....	31
4.5. <i>In situ</i> hibridizáció (ISH) .....	31
4.6. Fluoreszcens festés .....	32
5. Eredmények .....	33
5.1. A <i>Myxobolus pavlovskii</i> fejlődési ciklusa .....	33
5.2. Kevéssertéjű férgek azonosítása .....	37
5.3. A kevéssertéjű férgek filogenetikai vizsgálatainak eredményei.....	38
5.4. A <i>M. pseudodispar</i> fertőzési kísérletek eredményei.....	42
5.5. A <i>M. pseudodispar</i> kevéssertéjű férgen belüli fejlődése .....	45
5.6. Az aktino- és myxospórák fluoreszcens festésének eredményei .....	45
6. Megbeszélés .....	49
7. Új tudományos eredmények és megállapítások .....	57
8. Irodalomjegyzék .....	59
9. Tudományos publikációk .....	71

9.1. Lektorált, impakt faktoral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények.....	71
9.2. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztrakt vagy proceeding.	71
9.3. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények.....	72
10. Köszönetnyilvánítás.....	75

## Rövidítések

18S rDNS	18S riboszomális RNS gén
APES	3-aminopropil-trietoxi-szilán
bp	bázispár
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
FDA	fluoreszcein-diacetát
H&E	hematoxylin-eozin festés
ISH	<i>in situ</i> hibridizáció
mp	másodperc
mt	mitokondriális
mt 16S rDNS	mitokondriális 16S rRNS gén
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció
PCR-RFLP	polimeráz láncreakcióhoz kötött restrikciós fragmentum hossz polimorfizmus
PI	propídium-jodid
PKD	proliferatív vesebetegség
RAPD	véletlen amplifikált polimorf DNS (randomly amplified polymorphic DNA)
SDS	nátrium-lauril-szulfát
SPF	specifikus parazitamentes
SSC	nátrium-citrátos sóoldat (saline-sodium citrate)
TAM	triactinomyxon
TBS	tris-pufferelt sóoldat (tris buffered saline)
TEHAG	százhalombattai Temperáltvízű Halgazdaság



# 1. Összefoglalás

A doktori munka keretében nyálkaspórák halparaziták kevésértéjű férgek belüli fejlődését vizsgáltuk kísérletes és molekuláris biológiai módszerekkel. A százhalombattai halastavakból származó kevésértéjű féregállományban talált echinactinomyxon típusú aktinospórákról bizonyítottuk, hogy azok a *Myxobolus pavlovskii* aktinospórái. Molekuláris biológiai módszerekkel meghatároztuk a faj 18S rRNS génjének közel teljes szekvenciáját, emellett sikeres fertőzési kísérlettel is igazoltuk, hogy valóban a talált echinactinomyxon a *M. pavlovskii* aktinospóra alakja, ezzel cáfolva Ruidish és mtsai (1991) korábbi eredményét, melyben hexactinomyxont írnak le a parazita aktinospóra típusaként. Munkánk során a *Myxobolus pseudodispar* esetében igyekeztünk felderíteni a parazita oligochaeta gazdaspektrumát, és vizsgáltuk, hogy a féregtenyészetek fajösszetétele milyen hatással van a parazita fertőzés kimenetelére. Eredményeink azt mutatják, hogy a *M. pseudodispar* gerinctelen gazdaspektruma a gerinces gazdának köréhez hasonlóan széles. A már korábban is leírt fogékony oligochaeta gazdákon, a *Tubifex tubifex*-en és *Limnodrilus hoffmeisteri*-n kívül kimutattuk a *Psammoryctides barbatus* és *Psammoryctides moravicus* fajok fogékonyágát *M. pseudodispar*-ra. A féregtenyészetekben előforduló különböző oligochaeta fajok és leszármazási vonalak fogékonyágbeli eltérését is vizsgáltuk. A *Tubifex tubifex* leszármazási vonalak közül az I-es, II-es és III-as vonalba tartozó egyedek fogékonyak voltak a parazitára, megfertőzhetőek voltak a myxospórákkal és az érett aktinospórák is kifejlődtek bennük. A *T. tubifex* VI-os leszármazási vonalba tartozó kevésértéjű férgek ezzel szemben nem bizonyultak fogékonyak. A *T. tubifex* V-ös leszármazási vonalba tartozó és a *Limnodrilus hoffmeisteri* egyedeknél gyakran tapasztaltuk, hogy a *M. pseudodispar* DNS-t ki tudtuk mutatni az egyedekből, ugyanakkor aktinospóra termelést nem tapasztaltunk. Valószínűsíthető, hogy ezekben az esetekben a parazita bejutott ugyan a kevésértéjű féregbe, de a továbbfejlődését valószínűleg a féreg immunrendszere blokkolta, így nem alakultak ki a halakat fertőzni képes aktinospóra stádiumok. *In situ* hibridizációs vizsgálataink eredményei is ezt a feltételezést erősítik meg, a kevésértéjű férgek sejtes immunválaszában részt vevő amöbociták bekebelezték a bejutó parazita sejteket. Mivel a halakat fertőzni képes aktinospóra stádiumok nem fejlődtek ki ezekben a férgekben, valószínűsíthető, hogy ezek az oligochaeták egyfajta „biológiai szűrőként” funkcionálnak, csökkentve a kibocsátott fertőzőképes paraziták mennyiségét azáltal, hogy a myxospórákat felveszik, de érett aktinospórákat nem termelnek. Fertőzési kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a fogékony fajok jelenléte mellett nagyon fontos a kevésbé fogékony illetve esetleges biológiai szűrőként funkcionáló fajok és típusok jelenléte és aránya a fertőzött féregállományban. Vizsgálatainkkal sikerült bizonyítanunk, hogy egy

féregpopuláció fajösszetétele fontos befolyásoló tényezője a fertőzés kimenetelének. Az *in situ* hibridizációs vizsgálataink eredményei alapján úgy tűnik, hogy a *M. pseudodispar* a bélcsatornán keresztül jut be a féregbe, és fejlődése nagyrészt a bélhámiban zajlik. Emellett a bélhámot körülvevő extracelluláris mátrix erős festődését tapasztaltuk a fertőzést követő első héten, ami valószínűsíti, hogy ez a réteg részt vehet a parazita hosszanti irányú terjedésében a bélhám mentén. A fogékonysági vizsgálatokból rendelkezésünkre álló szekvenciák alapján a kevésertéjű férgek rokonsági viszonyait is megvizsgáltuk. A *Limnodrilus hoffmeisteri* egyedekből származó szekvenciákban jelentős különbségeket tapasztaltunk, a megvizsgált minták között 15,5% volt a legnagyobb genetikai különbség. Így a molekuláris és filogenetikai elemzéseink is megerősítették, hogy a *L. hoffmeisteri* gyűjtőfaj. A fogékony féreg fajok és leszármazási vonalak nem különültek el a kevésé fertőzhető csoportoktól a filogenetikai fán. Filogenetikai elemzéseink tehát azt mutatják, hogy nincs összefüggés a különböző oligochaeta fajok és leszármazási vonalak rokonsági viszonyai és *M. pseudodispar*-ra való fogékonysága között.



## 2. Bevezetés

A nyálkaspórások (Myxozoa) a halak gyakori élősködői, eddig 62 nembe tartozó több mint 2000 nyálkaspórás faj ismert (Lom és Dykova 2006), melyek közül számos faj jelentős gazdasági károkat okoz. Az egyik legjobban kutatott nyálkaspórás faj a pisztrángok kergekórját okozó *Myxobolus cerebralis*, ami jelentős veszteséget idéz elő az amerikai és nyugat-európai halgazdaságokban és természetes vízi pisztráng állományokban. A nyálkaspórások számos jellemzőjének megismerése köszönhető a *M. cerebralis*-szal folytatott kutatásoknak. A számos Magyarországon előforduló faj között is vannak kórtani jelentőséggel bírók. Ilyenek például a ponty paraziták közül a rosszindulatú vérfogyottságot előidéző faj, a *Myxobolus cyprini* (Molnár és Kovács-Gayer 1985), a *Sphaerospora molnari*, amely a kopoltyú-sphaerosporosis okozója (Molnár 1979a), valamint a *Sphaerospora renicola*, mely az úszóhólyag-gyulladás kiváltója (Csaba 1976, Molnár 1980, Kovács-Gayer és mtsai 1982, Molnár 1988a,b). A busa-fajok kopoltyúján fejlődő *M. pavlovskii* és a fehér busa feji kötőszöveinek *M. drjagini* bántalma szintén gyakori hazánkban (Molnár 1971). A nyálkaspórás kutatások a kórtani vizsgálatok mellett elsősorban a fajok fejlődési ciklusára, valamint taxonómiai és filogenetikai csoportosítására irányulnak (Kent és mtsai 2001, Lom és Dyková 2006). A nyálkaspórásokra jellemző kétgazdás fejlődésmenet, ami egy gerinctelen (általában kevéssejtű féreg /Oligochaeta/ vagy mohaállat /Bryozoa/) és egy gerinces (általában hal, ritkán magasabb rendű gerinces) gazdát érint, különös figyelmet érdemel. Mivel a nyálkaspórások többsége erősen gazdaspecifikus élősködő, ezért a gazdafelismerésnek és a gazdában való megtelepedésnek a fejlődésük szempontjából kiemelt jelentősége van. A gazda-parazita kölcsönhatás vizsgálata során eddig elsősorban a gerinctelen gazdából kiszabaduló aktinospórák halgazdába való bejutását, megtelepedését vizsgálták (Kallert és mtsai 2005, 2007, 2009, 2011, Eszterbauer és mtsai 2009), és kevés figyelmet fordítottak a myxospóra stádiumok bejutásának és fejlődésének vizsgálatára a kevéssejtű férgekben. Az eddigi eredmények azt sugallják, hogy a gazdára általánosan jellemző kémiai és mechanikai ingerek váltják ki az aktinospórák „invazív” viselkedését, majd a későbbiekben a halak fajspecifikus immunreakciója révén érvényesül a nyálkaspórásokra jellemző gazda-specifitás (Kallert és mtsai 2007, 2011). A féregket fertőző myxospórák esetében ilyen vizsgálatok ezideig nem történtek, ezért a doktori munka keretében elsősorban a nyálkaspórások kevéssejtű férgekben zajló fejlődését kívántuk vizsgálni kísérletes és molekuláris módszerek alkalmazásával. Korábbi, *M. cerebralis* fajjal végzett szövettani és elektronmikroszkópos vizsgálatok eredményei alapján valószínűsíthető volt, hogy a myxospórák a bélhámon keresztül jutnak be a féregbe (El-Matbouli és Hoffmann 1998), de ennek kísérletes igazolása eddig nem történt meg. A munkához a

Magyarországon gyakori bodorkából (*Rutilus rutilus*) származó *M. pseudodispar* nyálkaspórák parazitát választottuk, és kísérleti rendszerben kevésfertéjtű férgeseket fertőztünk vele. Vizsgáltuk a kevésfertéjtű féreg tenyészetek összetételét, annak hatását a fertőzés kimenetelére, a különböző féregfajok fogékonyságát, valamint *in situ* hibridizációval a *M. pseudodispar* myxospóráinak bejutását és fejlődését az oligochaeta gazdáiban. Ezenkívül kísérletes és molekuláris vizsgálatokkal tisztáztuk a gyakori busaparazita, a *M. pavlovskii* kétgazdás fejlődésmenetét.

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Nyálkaspórások általános jellemzői, rendszertanuk

A nyálkaspórások széles körben elterjedt, leegyszerűsödött testfelépítésű, többsejtű élősködők. Életciklusuk kétgazdás, egy gerinces és egy gerinctelen gazda vesz részt a fejlődésükben, melynek során két morfológiailag eltérő spóraalakot képeznek. A gerinces gazdában fejlődnek ki a myxospóra alakok, melyek a gerinctelen gazdát fertőzik, majd abban kialakul az aktinospóra stádium. A gerinces gazda a fajok többségénél édesvízi vagy tengeri hal. Emellett több kutatás során találtak kételtűekben (Hartigan és mtsai 2011, Jirků és mtsai 2011, Szczepianiak és mtsai 2011, Reda 2010, Hartigan és mtsai 2010, Jirků és mtsai 2006, Duncan és mtsai 2004, Mutschmann 2004, Browne és mtsai 2002, Upton és mtsai 1992) és hüllőkben is (Eiras és mtsai 2005; Garner és mtsai 2005) nyálkaspórás parazitát. Állandó testhőmérsékletű gerincesekben is fejlődhetnek ezek az élősködők. Leírtak már vízi madarak májából, és epevezetékéből nyálkaspórás fajt (Lowenstine és mtsai 2002, Bartholomew és mtsai 2008). Kisemlősök közül vakondban találtak nyálkaspórás-szerű parazita fejlődési alakokat (Friedrich és mtsai 2000), emellett erdei cickányból írták le és jellemezték a *Soricimyxum fegati* faj fejlődési alakjait, és érett spóráit (Prunescu és mtsai 2007; Dykova és mtsai 2007). Hazánkban Székely és mtsai (2011) mutatták ki a *Soricimyxum fegati* fajt ugyancsak erdei cickányból, emellett törpecickányban is találtak egy morfológiailag hasonló, de 18S rDNS szekvenciája alapján valószínűleg új nyálkaspórás fajt. Emberi fertőzésként eddig csak bélrendszeri betegségben szenvedő (Boreham és mtsai 1998) illetve HIV fertőzött egyénekből (Moncada és mtsai 2001, Hessen és Zamzame 2004) mutattak ki myxospórákat. A gerincesek mellett myxospóra alakot találtak már gerinctelen fajokban pl. óriáspolip (*Paroctopus dofleini*) karjának izomzatában (Yokoyama és Masuda 2001), valamint rovarokban is (Thelohan 1895, Sundara Rajulu és Radha 1966, Abdel-Aal és mtsai 2001). Bár ez utóbbi eredmények kétségesek.

A gerinctelen gazda legtöbbször kevéssertéjű féreg (Annelida: Clitellata: Oligochaeta), leggyakrabban Tubificida, ezen kívül tengeri soksertéjű férgek (Annelida: Polychaeta) valamint fecskendőféreg (Sipunculida) és mohaállatok (Bryozoa) is lehetnek a nyálkaspórások gazdái.

A nyálkaspórások rendszertani besorolása még mindig bizonytalan és vita tárgya, bár több szerző bizonyítottan véli a csoport csalánozókhöz (Cnidaria) tartozását. Siddall és mtsai 1995-ös munkájáig az egysejtűek közé sorolták őket. Majd a nyálkaspórások poláris kapszulájának és a csalánozó csalánsejtjének nagyfokú morfológiai hasonlósága alapján a két csoport rokonságát valószínűsítették (Weill 1938, Siddall és mtsai 1995). Ezt a rokonságot molekuláris biológiai vizsgálatokkal, a 18S riboszomális RNS gén (18S rDNS)

szekvenciák elemzésével is bizonyították, a *Polypodium hydriforme* parazita életmódú csalánozó közeli rokonaiként írva le a nyálkaspórásokat (Siddall és mtsai 1995). Egy másik elképzelés szerint a kétoldali szimmetriájú állatok (Bilateria) közeli rokonsága a valószínűbb. Ez az elképzelés a *Buddenbrockia plumatellae* (Malacosporea) nyálkaspórás parazita férgekhez való morfológiai hasonlóságán (Okamura és mtsai 2002), valamint a 18S rDNS molekuláris vizsgálatán (Smothers és mtsai 1994, Monteiro és mtsai 2002) alapul. A nyálkaspórások kétoldali szimmetriájú állatokkal való rokonságát számos egyéb molekuláris módszereken alapuló munka is támogatta (Katayama és mtsai 1995, Hanelt és mtsai 1996, Schlegel és mtsai 1996, Kim és mtsai 1999). De olyan, a 18S rDNS vizsgálatok is voltak, melyekben a nyálkaspórások a *Polypodium* fajokkal együtt egy csoportba kerültek, vagy a kétoldali szimmetriájúak ősi rokonaiként (Zrzavý és mtsai 1998, Siddall és Whiting 1999, Zrzavý és Hypša 2003), vagy a csalánozókon belül csoportosulva (Siddall és mtsai 1995). A riboszóma kis és nagy alegységek RNS génszekvenciáinak együttes vizsgálatai viszont a nyálkaspórások kétoldali szimmetriájú állatokhoz való közeli rokonságát erősítették meg (Fiala és Bartošová 2007, Evans és mtsai 2010). Ezzel szemben a *B. plumatellae* multigén analízis vizsgálata, melyben 50 különböző fehérje kódoló gén szekvenciáját vizsgálták, a nyálkaspórások csalánozó eredetét támasztotta alá (Jiménez-Guri és mtsai 2007). Holland és mtsai (2011) sikeresen felerősítettek a *Tetracapsuloides bryosalmonae* nyálkaspórás parazitából egy minikollagén-hez hasonló gént. A minikollagén gén a csalánozók csalánsejtjeinek fehérjéit kódoló génje. Így ennek jelenléte a nyálkaspórásokban megerősíti a csoport csalánozókkal való rokonságát. A közeli rokonság viszont nem jelenti automatikusan, hogy a nyálkaspórások a csalánozók törzsébe tartoznak. Ennek igazolására további vizsgálatok szükségesek.

A nyálkaspórások törzsén belül napjainkban elfogadott taxonómiai csoportosítás (Lom és Dyková 2006) a morfológián, a myxospóra alakok hasonlóságán alapul (3.1. ábra). Ám ez a beosztás nem tükrözi az aktinospórák morfológiáját, a fejlődési ciklus sajátosságait, a gazda- illetve szövetspecifitást, és nem mutatja a filogenetikai rokonságot sem. A filogenetikai vizsgálatok alapján a csoportok közül sok para- ill. polifiletikusnak bizonyult (Fiala 2006). Monofiletikusnak bizonyult az *Enteromyxum*, *Gadimyxa* és *Sphaeromyxa* nem, polifiletikusnak a *Henneguya*, *Sphaerospora*, *Zschokkella*, *Chloromyxum* nemek, és parafiletikus nem a *Kudoa*, *Parvicapsula* és a *Myxobolus*. Ugyanakkor a gazdafajok élőhelye és a parazita gazdán belüli fejlődésének helye nagymértékben egybevágnak a filogenetikai eredményekkel. Fiala (2006) eredményei alapján két fő ágra válnak szét a nyálkaspórások, nagyjából az édesvízi vagy tengeri előfordulásuk alapján, és egy harmadik kisebb ág is elkülönült három fajjal (*Sphaerospora truttae*, *S. elegans*, *Leptotheca ranae*). A fő ágakon elhelyezkedő fajok az ágakra jellemző hosszúságú 18S riboszomális RNS génnel (18S rDNS) rendelkeznek, a tengeri fajoknál általában rövidebb (kb.1800 bp), míg az édesvízi

csoportba tartozóknál hosszabb (>2000 bp) ez a génszakasz. A fő ágakon belül a legjellemzőbben az azonos fertőzési helyel, hasonló szöveti specificitással rendelkező fajok képeztek csoportokat.

Törzs: Myxozoa

Osztály: Myxosporea

Rend: Bivalvulida

Alrend: Variisporina

Myxidiidae

Nemek: *Myxidium*, *Enteromyxum*, *Zschokella*, *Coccomyxa*

Ortholineidae

Nemek: *Ortholinea*, *Neomyxobolus*, *Cardimyxobolus*, *Triangula*, *Kentmoseria*

Sinuolineidae

Nemek: *Sinuolinea*, *Davisia*, *Myxoproteus*, *Bipteria*, *Paramyxoproteus*, *Neobipteria*, *Schulmania*, *Noblea*

Fabesporidae

Nem: *Fabespora*

Ceratomyxidae

Nemek: *Ceratomyxa*, *Leptotheca*, *Meglitschia*, *Ellipsomyxa*

Sphaerosporidae

Nemek: *Sphaerospora*, *Hoferellus*, *Myxobilatus*, *Polysporoplasma*, *Wardia*, *Palliatus*

Chloromyxidae

Nemek: *Chloromyxum*, *Caudomyxum*, *Agarella*

Auerbachidae

Nemek: *Auerbachia*, *Globospora*

Alatosporidae

Nemek: *Alatospora*, *Pseudoalatospora*, *Renispora*

Parvicapsulidae

Nemek: *Parvicapsula*, *Neoparvicapsula*

Alrend: Platysporina

Myxobolidae

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

Alrend: Sphaeromyxina

Sphaeromyxidae

Nem: *Sphaeromyxa*

Rend: Multivalvulida

Kudoidae

Nemek: *Kudoa*, *Pentacapsula*, *Hexacapsula*, *Septemcapsula*, *Trilosporoides*

Spinavaculidae

Nem: *Octospina*

Trilosporidae

Nemek: *Triplospora*, *Unicapsula*

Osztály: Malacosporea

Rend: Malacovalvulida

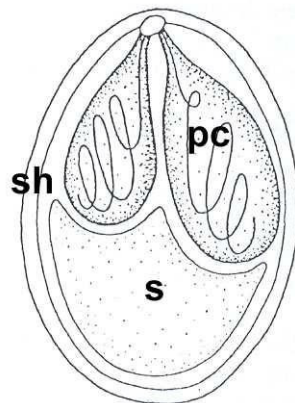
Saccosporidae

Nemek: *Tetracapsuloides*, *Buddenbrockia*

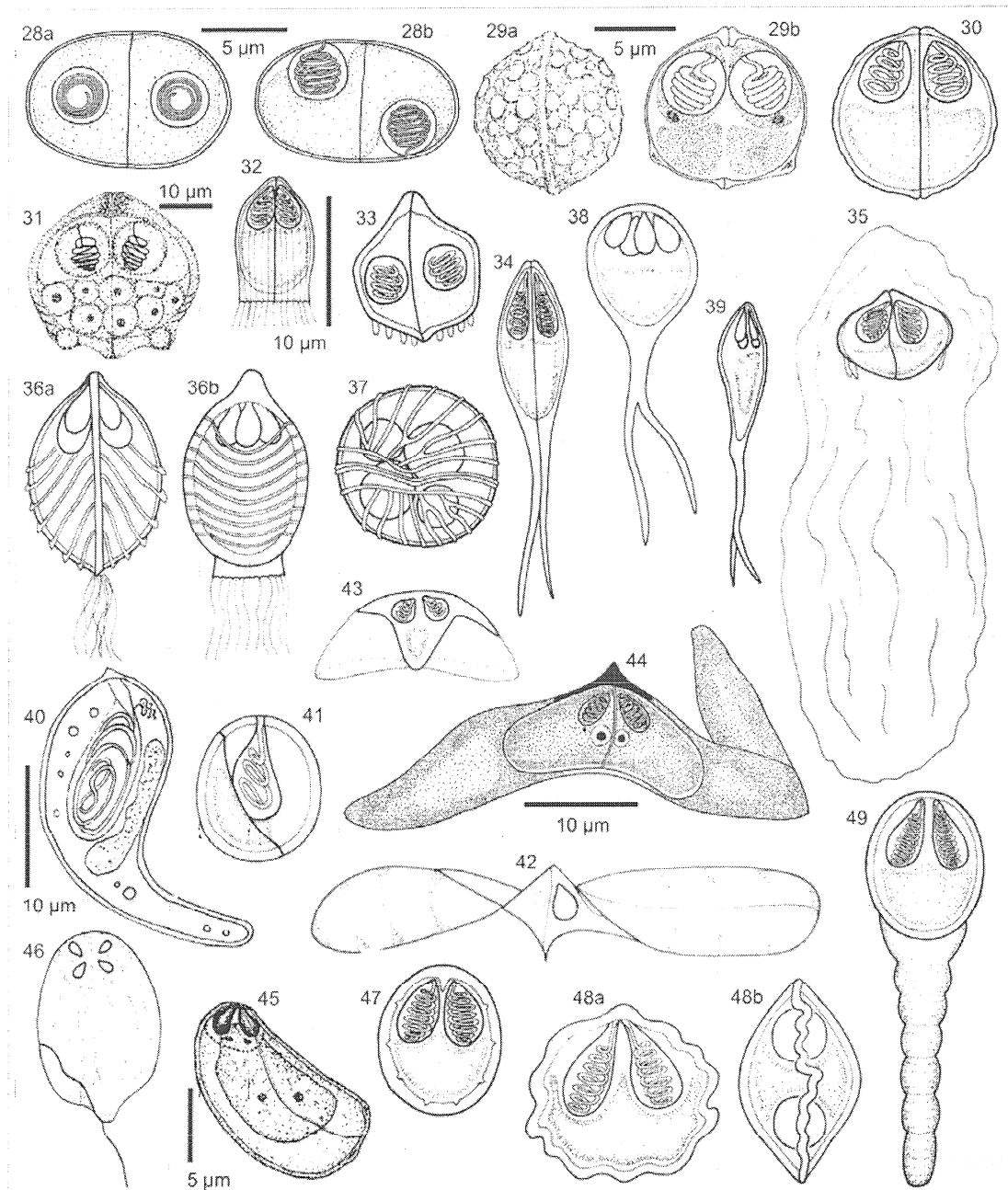
**3.1. ábra:** Myxozoa törzs osztályozása (Lom és Dyková 2006)

### 3.2. Myxospórák

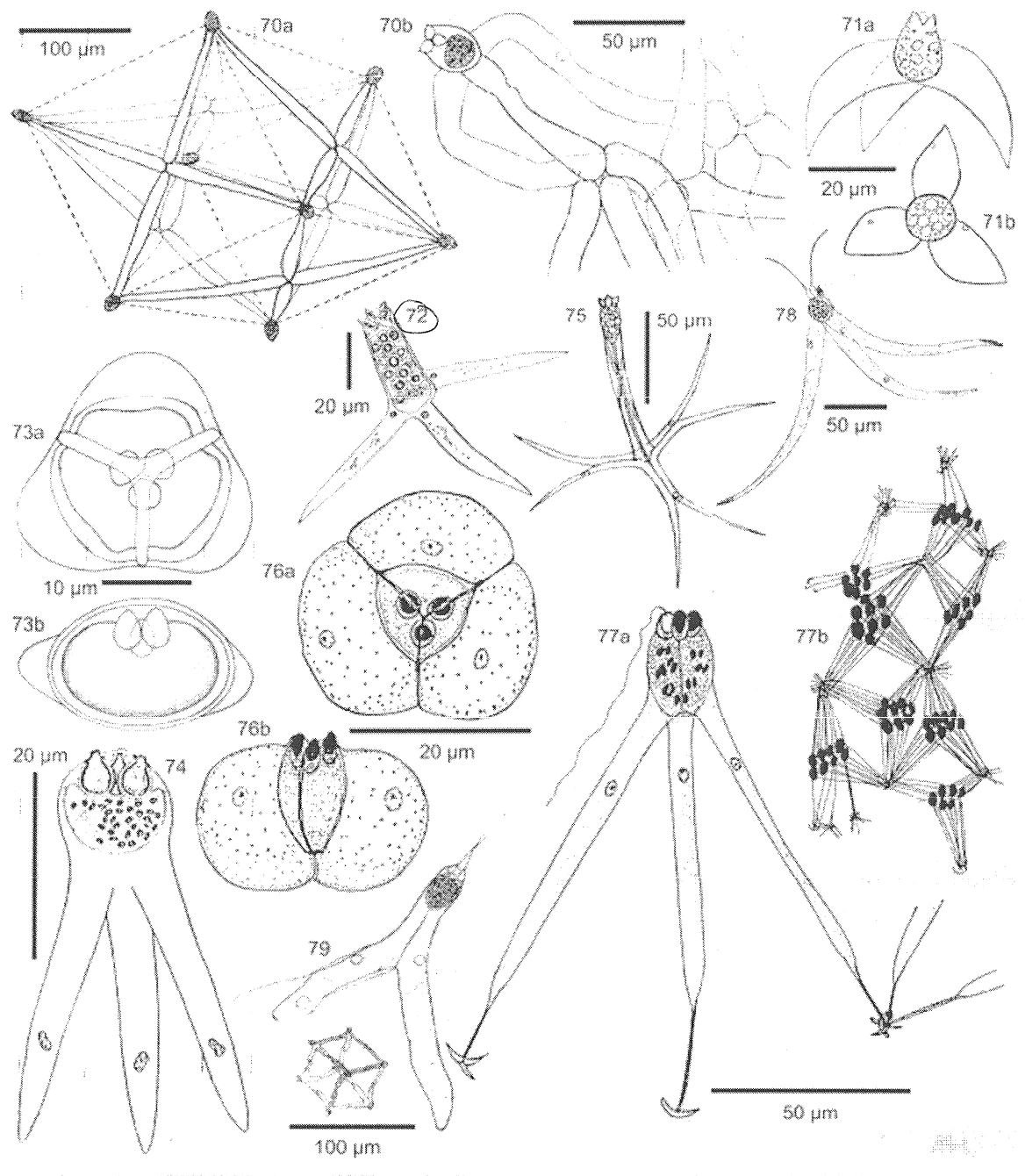
A nyálkaspórák kétgazdás fejlődése során a gerinces gazdáiban fejlődnek ki a myxospóra alakok. A fajok fejlődésük helye alapján lehetnek cölizoikusak, vagyis a gazda szerveinek üregében kifejlődők, vagy hisztozoikusak, a gazda szöveteiben inter- vagy intracellulárisan plazmódiumokat (cisztát) képező élősködők. A myxospórák mérete változatos lehet, de legtöbbször 10-20 µm hosszúak. Kétoldali szimmetria jellemző rájuk, de alakjuk és felépítésük nagyon sokféle. A spórák 2-7 spórahéjjal, 1-7 poláris kapszulával, 1 kétmagvú vagy két egymagvú sporoplazmával rendelkeznek. A poláris filamentumok a poláris kapszulákban találhatóak feltekeredve. A nyálkaspórák taxonómiai osztályozása nagyrészt a myxospórák morfológiáján, főleg a spórahéjak számán és alakján alapul. Az általunk vizsgált fajok a *Myxobolus* nembe tartoznak, amely tagjaira jellemző, hogy a myxospórák 2 sima felszínű spórahéjjal, kétmagvú sporoplazmával, és két poláris kapszulával rendelkeznek, amelyek egyes esetekben eltérő méretűek lehetnek (3.2. ábra). Néhány nyálkaspórák faj myxospóra típusa a 3.3. ábrán látható.



**3.2. ábra** *Myxobolus* nembe tartozó nyálkaspórák fajokra jellemző myxospóra alak sematikus rajza (Molnár és mtsai 2002), 2 sima felszínű spórahéjjal (sh), kétmagvú sporoplazmával (s) és 2 poláris kapszulával (pc).



**3.3. ábra** A néhány nyálkaspórák faj myxospóra típusa (Lom és Dyková 2006) 28. *Ellipsomyxa gobi*; 29. *Sphaerospora elegans*; 30. *Sphaerospora renicola*; 31. *Polysporoplasma spar*; 32. *Hoferellus cyprini*; 33. *Wardia ovinocua*; 34. *Myxobilatus gasterostei*; 35. *Palliatu mirabilis*; 36. *Chloromyxum leydigi*; 37. *Chloromyxum cristatum*; 38. *Caudomyxum nanum*; 39. *Agarella gracilis*; 40. *Auerbachia anomala*; 41. *Globospora sphaerica*; 42. *Alatospora samaroidea*; 43. *Pseudoalatospora scombri*; 44. *Renispora simae*; 45. *Parvicapsula asymmetrica*; 46. *Neoparvicapsula ovalis*; 47. *Myxobolus muelleri*; 48. *Spirosutura carassii*; 49. *Unicauda clavicauda*

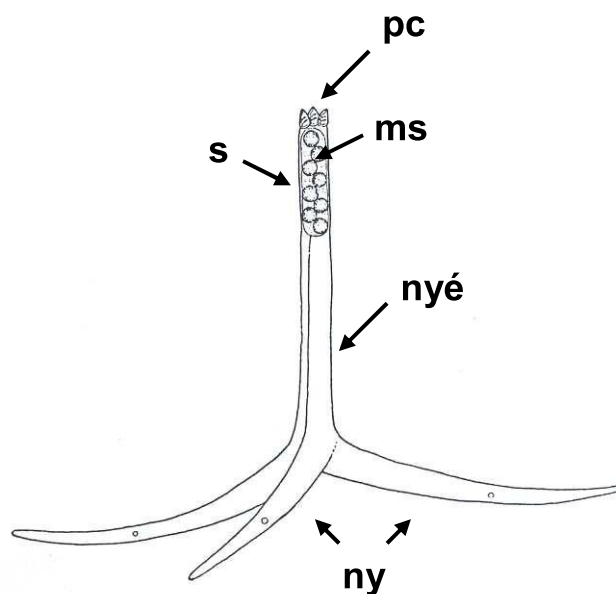


**3.4. ábra** Néhány aktinospóra típus sematikus rajza (Lom és Dyková 2006) 70. Antonactinomyxon; 71. Aurantiactinomyxon; 72. Echinactinomyxon; 73. Endocapsa; 74. Guyenotia; 75. Hexactinomyxon; 76. Neoactinomyxum; 77. Ormieractinomyxon; 78. Raabeia; 79. Siedleckiella



### 3.3. Aktinospórák

Az aktinospórák a nyálkaspórások gerinctelen gazdában kifejlődő spóra alakjai. Morfológiájuk nagyon változatos, de általában jellemző rájuk a hármasszimmetria. A spórák legtöbbször 3 poláris kapszulával és 3 nyúlvánnyal rendelkeznek, melyeket egyes esetekben nyél köt össze a poláris kapszulákat és sporoplazmát tartalmazó feji résszel. A 3.4. ábrán néhány aktinospóra típus sematikus rajza látható. A típusokat az aktinospórák esetében is a morfológiai jellemzőik alapján különítik el, és 18 gyűjtőcsoportba sorolják őket: Antonactinomyxon, Aurantiactinomyxon, Echinactinomyxon, Endocapsa, Guyenotia, Hexactinomyxon, Hungactinomyxon, Neoactinomyxon, Ormieractinomyxon, Pseudotriactinomyxon, Raabeia, Siedleckiella, Sphaeractinomyxon, Synactinomyxon, Tetractinomyxon, Tetraspora, Triactinomyxon, Heliactinomyxon (Lom és Dyková 2006). Kent és mtsai (2001) összefüggésbe hozták ezeket az aktinospóra típusokat a nyálkaspórások rendszertani csoportjaival. A *Myxobolus* nembe tartozó fajok leggyakrabban triactinomyxon (TAM) típusú aktinospórával rendelkeznek, míg a Variisporina alrend képviselői aurantiactinomyxon, neoactinomyxon vagy tetractinomyxon típusú spórákat képeznek. Ugyanakkor számos kivétel létezik e szabályok alól, ahogy például a *M. cultus*, *M. dispar* és *M. lentisuturalis* raabeia típusú aktinospórákat képez. A doktori dolgozatban is vizsgált nyálkaspórás faj, a *M. pseudodispar* triactinomyxon típusú aktinospórával rendelkezik, aminek testfelépítését a 3.5. ábra szemlélteti.



**3.5. ábra** TAM típusú aktinospóra sematikus rajza (Eszterbauer 2002). A spóra 3 poláris kapszulával (pc), a a másodlagos sejteket (ms) tartalmazó sporoplazmával (s), nyéllal (nyé) és 3 nyúlvánnyal (ny) rendelkezik.

### 3.4. A vizsgált paraziták

A doktori dolgozatban vizsgált nyálkaspórák fajok a *Myxobolus* nembe tartoznak. Ez a nem ma körülbelül 800 leírt fajt foglal magába (Eiras és mtsai 2005), melyek közül eddig 15 faj esetében sikerült az *in vivo* fejlődésüket kísérletesen reprodukálni (Lom és Dyková 2006, Székely és mtsai 2009). Az ide tartozó fajok többsége édesvízi előfordulású, és a gazda szöveteiben, hisztocitákban fejlődik. De van néhány tengeri előfordulású, cöllozoikusan fejlődő fajuk is. A *Myxobolus* fajok többségének gerinces gazdái a halak, de kétélűekben fejlődő fajokat is leírtak már ebből a csoportból (Lom és Dyková 2006). Gazdafajlagosságukban nagy különbségek lehetnek. Vannak egy vagy csak közel rokon fajokban fejlődni képesek, és számos eltérő halgazdát megfertőzni képesek fajaik is.

#### 3.4.1. *Myxobolus pavlovskii*

A *Myxobolus pavlovskii* (Akhmerov 1954) a fehér busa, *Hypophthalmichthys molitrix* és a pettyes busa, *Hypophthalmichthys nobilis* nyálkaspórák parazitája. A kopolyúlemezek hámszélén fejlődve képez cisztákat, és erős fertőzés esetén a plazmódiumok kitölthetik a kopolyúredők közti helyet, így nehezíthetik a halak oxigénfelvételét (Molnár 2002). A fehér busát és a pettyes busát az 1960-as években telepítették be Magyarországra Kelet-Ázsiából (Kínából és a volt Szovjetunióból). A Kínából származó állományok nagy valószínűséggel már fertőzöttek voltak *M. pavlovskii* nyálkaspórák parazitával, így a halakkal együtt ez a parazita is bekerült az országba. Az 1970-es években a növényevő halak, köztük a fehér és pettyes busák, tenyésztési programja során a parazita szétterjedhetett a magyarországi halgazdaságokban (Molnár 1979b). Molnár (1979b) már az 1970-es évek végén vizsgálta a nyálkaspórák faj fejlődését három magyarországi halgazdaságból származó fehér és pettyes busákon. Vizsgálta a *M. pavlovskii* parazita jelenlétét, valamint fertőzési kísérleteket végzett a halastavakban és laboratóriumi körülmények között. A halastavi kísérletek közül egy esetben sem sikerült megakadályozni az eredetileg parazitamentes halak megfertőződését a számos megelőző intézkedés ellenére. A fertőzés megakadályozására megpróbálkoztak a tavak kiszáritásával, a felső iszapréteg eltávolításával és meszes kezeléssel is, de ezek sikertelenek voltak, és az ezután betelepített halak minden esetben fertőződtek a parazitával. A laboratóriumban végzett kísérletek közül, amik a fertőzés továbbvitelét célozták, viszont csak egy esetben, fertőzött tóból származó iszapos víz felhasználásával sikerült halakban fertőzést kiváltani (Molnár 1979b).

Az 1990-es évek elején Ruidish és mtsai (1991) is fertőzési kísérleteket végeztek a *M. pavlovskii*-val, hogy bizonyítsák, más nyálkaspórák parazitákhoz hasonlóan e faj fejlődési ciklusa is két gazdában, a halakon kívül kevésértéjű férgekben zajlik. Sikeresen megfertőztek kevésértéjű férgeseket a halakból származó, morfológiai jellemzőik alapján *M. pavlovskii*-nak azonosított myxospóra alakokkal, és 93 nappal a fertőzés után

hexactinomyxon típusú aktinospórákat találtak az oligochaeták vizében. Majd ezekkel az aktinospórákkal megfertőzött 1 éves fehér busák kopoltyúján 120 nap múlva kimutatták a myxospórákat a kopoltyúlemezek között. Kísérleti eredményeiket azonban molekuláris vizsgálatokkal nem támasztották alá.

Eszterbauer és mtsai 2002-es munkájukban kopoltyúparazita nyálkaspórákat vizsgáltak, többek között fehér és pettyes busából gyűjtött *M. pavlovskii* mintákat is, polimeráz láncreakcióhoz kötött restrikciós fragmentum eloszlás módszerével (PCR-RFLP). A három használt enzimmel mindkét halfajból származó minta RFLP mintázata megegyezett egymással, bizonyítva, hogy a *M. pavlovskii* mindkét halfajt egyaránt képes megfertőzni. Ezt a megállapítást Eszterbauer 2004-es kopoltyúparazita *Myxobolus* fajokon végzett filogenetikai vizsgálata is megerősítették.

### **3.4.2. *Myxobolus pseudodispar***

A *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova (Myxozoa, Myxobolidae) a pontyfélék gyakori nyálkaspórák parazitája. Közép-Európában, így Magyarországon is gyakran előforduló élősködő, amely a halak izomzatában intracellulárisan képez cisztákat. Számos vizsgálatot végeztek a parazita előfordulásával, elterjedtségével és fejlődésmenetével kapcsolatban. Baska (1986) szövettani vizsgálatokat végzett a *M. pseudodispar* halon belüli fejlődésének felderítésére. Később a teljes fejlődési ciklus tisztázására fertőzési kísérletek is történtek (Székely és mtsai 1999; 2001). Székely és mtsai 1999-es munkájukban *Tubifex tubifex* és *Limnodrilus hoffmeisteri* kevéssertéjű féreg egyedeket fertőztek bodorkából származó *M. pseudodispar* myxospórákkal. Mindkét féregfaj esetében sikeres volt a fertőzés, és TAM típusú aktinospórák fejlődtek ki bennük. A későbbi munkájukban (Székely és mtsai 2001) már a teljes fejlődési ciklust sikerült kísérletesen reprodukálniuk. Bodorka izomzatából gyűjtött *M. pseudodispar* myxospórákkal fertőztek parazitamentes *T. tubifex* állományokat, majd a férgekben kifejlődő aktinospórákkal sikeresen fertőztek parazitamentes bodorka ivadékokat. A nyálkaspórák fajok többségével ellentétben a *M. pseudodispar* gerinces gazdaspektruma széles. A bodorka (*Rutilus rutilus*), a karika keszeg (*Blicca bjoerkna*), a dévérkeszeg (*Abramis brama*), a vörösszárnyú keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*) és a szélhajtó kűsz (*Alburnus alburnus*) is fogékony e parazitára (Molnár és mtsai 2002). Gerinctelen gazdaként eddig a *Tubifex tubifex* és a *Limnodrilus hoffmeisteri* kevéssertéjű férgek szerepe bizonyított (Székely és mtsai 1999). Hasonló alakjuk, és fejlődési helyük miatt korábban a *M. pseudodispar*-t a *M. cyprini* szinonimájának tekintették (Dykova és Lom 1988), bár a többi intracellulárisan fejlődő izomparazita nyálkaspórák fajtól való elkülönítését segíti, hogy a myxospórák poláris kapszulái különböző méretűek, valamint a TAM típusú aktinospórák nyúlványai is eltérő hosszúságúak (Székely és mtsai 1999). Molnár és mtsai (2002) munkájukban izomparazita nyálkaspórák fajokot vizsgáltak, köztük a *M.*

*pseudodispar*-t és *M. cyprini*-t. Kisebb morfológiai eltérések mellett (a *M. cyprini* myxospórái a leginkább szimmetrikusak), szekvenciabeli különbségeket is találtak: 5,5-6,42% eltérés volt a 18S rDNS szekvenciájuk körülbelül 1000 bp hosszú darabjában, így ma külön fajnak tekintjük őket. Morfológiai és szövettani vizsgálatok mellett tehát molekuláris biológiai módszerekkel is vizsgálták a *M. pseudodispar*-t. Eszterbauer és mtsai (2001) több más izomparazita nyálkaspórással együtt bodorkából és vörösszárnyú keszegből gyűjtött *M. pseudodispar* mintákat vizsgáltak PCR-RFLP módszerrel. Eredményeik alapján a két halfajból származó *M. pseudodispar* izolátumok RFLP mintázata megegyezett egymással. Azonban egy későbbi munkájukban (Molnár és mtsai 2002) akár 5,1%-os eltérést találtak a különböző halfajokból származó *M. pseudodispar* minták 18S rDNS-e között a gén egy körülbelül 1500 bp hosszú szakaszának vizsgálata során.

### 3.5. Oligochaeták és filogenetikájuk

A kevésertéjű férgek (Annelida, Clitellata, Oligochaeta) számos ökológiai vizsgálat fontos célpontjai a vízi életterekben betöltött indikátor szerepük miatt. Széles körű elterjedtségük és a különböző környezeti tényezőkre mutatott eltérő érzékenységük miatt gyakran használják őket a vízminőséget vizsgáló kutatásokban is (Chapman és mtsai 1982, LaFont 1984, Reynoldson és mtsai 1991, Sturmbauer és mtsai 1999). Ezenkívül kórtani szempontból is jelentősek, hiszen több más parazitacsoport mellett a nyálkaspórássok gazdái is lehetnek.

A *Tubifex tubifex* világszerte elterjedt édesvízi kevésertéjű féreg, számos nyálkaspórással együtt, többek között az általunk is vizsgált *Myxobolus pseudodispar* gerinctelen gazdája. A kevésertéjű férgek többségéhez hasonlóan biztonsággal csak az ivarérett egyedeket lehet morfológiailag azonosítani. Külső jegyei nagyon változékonyak, a szőrserték például a különböző környezeti tényezők hatására különbözőek lehetnek (Chapman és Brinkhurst 1987). Ez a külső változékonyság megnehezíti a férgek taxonómiai azonosítását (Holmquist 1983, Chapman és Brinkhurst 1987). Ezek a nehézségek előtérbe helyezték a molekuláris biológiai módszerek alkalmazását az utóbbi években ezen a területen is. A *T. tubifex* esetében a mitokondriális (mt) 16S rDNS vizsgálata alapján hat genetikailag eltérő leszármazási vonalat különítették el egymástól (Sturmbauer és mtsai 1999, Beauchamp és mtsai 2001). Sturmbauer és mtsai (1999) munkájukban a Közép- és Kelet-Európából származó *T. tubifex* állományokat vizsgáltak, és öt csoportot különítették el a mt 16S rDNS alapján. Beauchamp és mtsai (2001) munkájukban főleg az észak-amerikai állományokra összpontosítottak, és a Sturmbauer és mtsai (1999) által leírt csoportok közül hármat megtaláltak, valamint egy új csoportot is leírtak.

Crottini és mtsai (2008) szintén a mt 16S rDNS-t választották az olaszországi Lambro folyó *T. tubifex* populációjának genetikai feltérképezéséhez. Ennek eredményeként kilenc

csoportot különítettek el. Az ő csoportosításuk átfed az előzőekben említettel, bár más elnevezéseket használnak.

### **3.6. A nyálkaspórások gazdafajlagossága, és a gazdák fogékonysága**

A nyálkaspórások között különböző fokú gazdafajlagossággal rendelkező fajok fordulnak elő, az egy vagy néhány közeli rokon halfajban kifejlődni képes fajoktól az egészen tág gazdaspektrumú fajokig. A *Myxobolus drjagini* például csak a fehér busa parazitája, a *M. pavlovskii* a fehér és pettyes busát egyaránt képes megfertőzni, míg a *M. cerebralis* tág gazdaspektrummal rendelkezik, számos pisztrángfélében, a szivárványos (*Oncorhynchus mykiss*) és a sebes pisztrángban (*Salmo trutta* m. *fario*), a gyilkos pisztráng (*Oncorhynchus clarki*) több alfajában és pataki szajblingban (*Salvelinus fontinalis*) is fejlődhet (Hedrick és mtsai 1999a, Thompson és mtsai 1999). A különböző gazdafajok nyálkaspórásokra való fogékonyságát eddig főleg a halgazdák esetén vizsgálták. Ebben a tekintetben is a *Myxobolus cerebralis* a legjobban tanulmányozott nyálkaspórás faj. El-Matbouli és mtsai (1999) szivárványos pisztránggal, aranyhállal (*Carassius auratus*), ponttyal (*Cyprinus carpio*), paduccal (*Chondrostoma nasus*), medakával (*Oryzias latipes*), guppival (*Poecilia reticulata*) és ebihállal (*Rana pipiens*) is végeztek fertőzési kísérleteket, de e fajok közül csak a szivárványos pisztrángot sikerült fertőzni *M. cerebralis*-szal. Hedrick és mtsai (1999b) szivárványos és sebes pisztrángok *M. cerebralis*-ra való fogékonyságát hasonlították össze. A fertőzési kísérleteik során különböző aktinospóra mennyiséget használtak, és eredményeik alapján a szivárványos pisztrángot találták fogékonyabbnak, bár a sebespisztráng is fertőzhető volt. A fertőzés prevalenciája, az egy-egy gazdaegyedben kifejlődő spórák mennyisége is magasabb volt a szivárványos pisztrángban. A mikroszkópos vizsgálatok során súlyosabb károsodásokat találtak ennél a fajnál, és kevesebb spóramennyiség is kiváltotta a fertőzést. Egy későbbi munkájukban (Hedrick és mtsai 2003) két különböző szivárványos pisztráng törzs fogékonyságát is összehasonlították. Az Amerikából származó, úgynevezett TroutLodge törzs sokkal fogékonyabbnak bizonyult a német Hofer törzs egyedeinél. A parazita gazdaspektrumának vizsgálata mellett a *M. cerebralis* esetében vizsgálták, hogy milyen tényezők befolyásolják, illetve aktiválják az aktinospóra stádiumok gazdába való bejutását, valamint, hogy képes-e a parazita megkülönböztetni a fogékony és nem fogékony gazdafajokat egymástól (Kallert és mtsai 2005, 2009).

Grabner és El-Matbouli (2009) a *Tetracapsuloides bryosalmonae* esetében vizsgálták a gazdafajok fogékonyságát. Ez a parazita a lazacfélék nagy mortalitással járó proliferatív vesebetegségét (PKD) okozza. A munka során kvantitatív real-time PCR módszerrel vizsgálták négy szivárványos pisztráng törzs és a sebes pisztráng fogékonyságát. Ezzel a módszerrel lehetővé vált a parazita kimutatásán túl annak mennyiségi meghatározása még

akkor is, ha az a hagyományos (pl. szövettani) módszerekkel nem lehetséges. Így a különböző gazdafajok fogékonyasága pontosabban összehasonlítható volt. Eredményeik szerint a *T. bryosalmonae*-ra a sebes pisztráng volt a legfogékonyabb. A *Henneguya ictaluri* gazdaspecificitását vizsgálva Griffin és mtsai (2010) pettyes harcsát (*Ictalurus punctatus*), a kék törpeharcsát (*I. furcatus*) és ezek hibridjét fertőzték a parazitával. A pettyes harcsa és a hibrid egyedek is sokkal fogékonyabbnak bizonyultak, amit a kvantitatív PCR eredményeken kívül a klinikai tünetek is bizonyítottak.

A gerinctelen gazdák esetében a *T. tubifex* leszármazási vonalak fogékonyaságbeli különbségeit eddig csak a *Myxobolus cerebralis* esetén vizsgálták. Beauchamp és mtsai (2002) vizsgálatukban kimutatták, hogy a *T. tubifex* I-es és III-as leszármazási vonalba tartozó férgek voltak a legfogékonyabbak a parazitára, míg a V-ös és VI-os leszármazási vonalba tartozó egyedek nem, vagy csak kevésbé tűntek fogékonyak.

Baxa és mtsai (2008) különbségeket találtak az egy leszármazási vonalba tartozó férgek fogékonyasága között is. Egy-egy, a III-as leszármazási vonalból származó kokonból neveltek féregpopulációkat. Ezen féregpopulációk *M. cerebralis*-ra való fogékonyaságának vizsgálatok is különbségek voltak tapasztalhatóak. Annak ellenére, hogy az összes vizsgált populáció a III-as leszármazási vonalba tartozó, TAM termelő *T. tubifex* állományból gyűjtött kokonokból származott, voltak olyan populációk, amelyek termeltek TAM típusú aktinospórát, és voltak olyanok, amelyek nem. A mt 16S rDNS szekvenciára alapozott genetikai vizsgálatok is bizonyították, hogy az összes vizsgált féreg a III-as leszármazási vonalba volt sorolható, ugyanakkor véletlen amplifikált polimorf DNS (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) elemzés alapján ezen belül két genotípust tudtak elkülöníteni. Ez a két genotípus megegyezett a fogékony és nem fogékony csoportokkal (Baxa és mtsai 2008).

Hasonló eredményre jutottak Rasmussen és mtsai (2008) vizsgálatuk során, melyben statisztikailag szignifikáns különbséget találtak a genetikailag III-as leszármazási vonalba tartozó *T. tubifex* populációk *M. cerebralis*-ra való fogékonyaságában. Ezen vizsgálatok alapján úgy tűnik, a mt 16S rDNS szekvenciák alapján elkülönített *T. tubifex* leszármazási vonalakon belül is lehetnek fogékonyaságbeli különbségek. Így ez a csoportosítás nem jelzi teljes biztonsággal a kevéssertéjű féreg parazitára való fogékonyaságát.

Több kutatás is foglalkozott azzal a témával, hogy a különböző fogékonyaságú *T. tubifex* leszármazási vonalak együttes jelenléte a fertőzött oligochaeta populációkban milyen hatással van a *M. cerebralis* fertőzés kimenetelére. Steinbach Elwell és mtsai (2006) eredményei azt mutatták, hogy a fertőzött féregpopuláció összetétele nem befolyásolta sem a fogékony férgek fertőzhetőségének mértékét, sem az általuk termelt aktinospórák mennyiségét. Ez arra utal, hogy a fertőzésnek ellenálló férgek jelenléte a populációban nem befolyásolja a fogékony férgek fertőződését és spóratermelését. Ezzel szemben Beauchamp és mtsai (2006) valamint Baxa és mtsai (2008) kutatásaikban azt találták, hogy a vegyes

összetételű, fogékony és nem fogékony féreg egyedeket egyaránt tartalmazó populációkban kevesebb volt a spóratermelés, mint a tisztán csak fogékony egyedekből álló populációkban. Beauchamp és mtsai (2006) munkájukban RFLP módszerrel vizsgálták a fertőzési kísérletekben használt kevésertéjű férgeket, egyes esetekben pedig leszármazási vonalakra specifikus PCR-t is végeztek a kísérletek előtt és befejezésük után. Eredményeik azt mutatták, hogy a rezisztens (V-ös leszármazási vonalba tartozó) *T. tubifex* egyedek kompetitív előnyben vannak a fogékony leszármazási vonalakba tartozó egyedekkel szemben. A vegyes összetételű populációkban a fertőzési kísérletek végére jelentősen megnőtt a rezisztens leszármazási vonalba tartozó férgek aránya. Hasonló arányeltolódásokat nem csak laboratóriumi körülmények között találtak. Colorado államban végzett vizsgálatok azt mutatták, hogy a *M. cerebralis*-ra fogékony féreggyedek aránya jelentősen visszaesett, míg a rezisztens leszármazási vonalba tartozó *T. tubifex*ek aránya megnőtt 1998-tól 2004-ig (Beauchamp és mtsai 2001, 2002, 2006). Shirakashi és El-Matbouli 2009-es vizsgálatának eredményei magyarázattal szolgálhatnak erre az arányeltolódásra. Kísérleteik bizonyították ugyanis, hogy a nyálkaspórák parazita jelenléte gátló hatással van a fertőzött férgek szaporodására, gátolja a nyeregképzést és csökken a kokon termelés.





## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Kísérleti állatok és a paraziták fenntartása

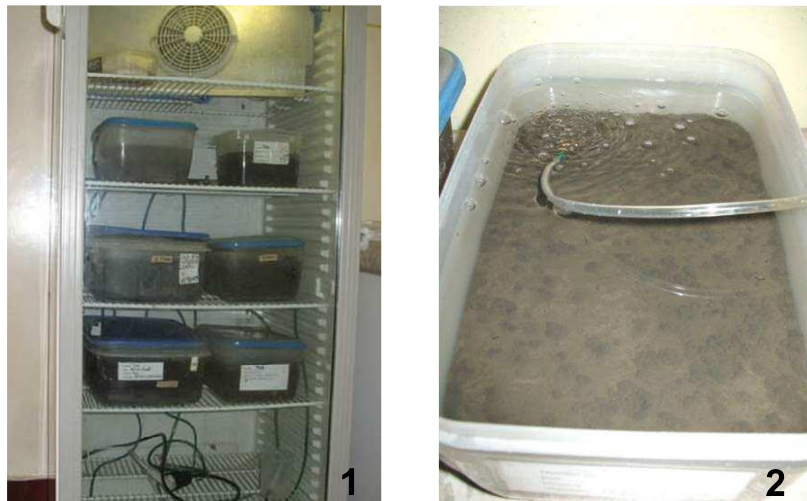
Az *in vivo* laboratóriumi nyálkaspórák tenyésztés folyamatos fenntartásához parazitamentes oligochaeta állományokat és specifikus parazitamentes (SPF) halakat neveltünk és tartottunk a laboratóriumban. A kísérletekben használt oligochaeta állományok különböző eredetűek voltak. A laborban tartott négy féregállomány közül kettőt az azóta megszűnt Százhalombattai Temperált Vízű Halgazdaságban (TEHAG) gyűjtöttünk halastavakból, illetve egy úgynevezett halágyból, a lehalásztást elősegítő árokból, ahol a tavak őszi leeresztése után a halak szétválogatását végzik. Egy állomány a németországi Aufseß-ben lévő pisztrángos halgazdaság közelében lévő csatornákból származott. A munka során egy kereskedelmi forgalomban kapható állományt is használtunk, melynek származási helye valószínűleg Erdély. A begyűjtött oligochaeta állományokat iszappal együtt a laboratóriumba szállítottuk, és ott kb. 25 literes levegőztetett műanyag edényekben tartottuk őket. A heti vízcsere mellett autoklávozott iszappal pótoltuk az elhasználdott aljzatot és fagyasztott fejes saláta, Spirulina por (MaBitec) és fagyasztott sórák (van Gerven) vagy vörös szúnyoglárva (van Gerven) összeturmixolt keverékével etettük a féregállományokat. A laborba behozott oligochaeta állományok vizét a természetes fertőzőtlenségük megállapítására rendszeres időközönként szűrtük. A szűréshez 20 µm-es hálósövetet használtunk és a szűrőn fennmaradt vízből néhány cseppet fázis kontraszt mikroszkóppal (Zeiss Axiostar Plus) vizsgáltunk a vízben lebegő aktinospórák kimutatására. Ezek a rendszeresen ellenőrzött oligochaeta törzsállományok szolgálták negatív kontrollként is a későbbi fertőzési kísérleteink során.

A kísérletekhez szükséges SPF halakat a laborban neveltük fel parazitamentes körülmények között. Az szempontos ikrák és zsengek a dinnyési halgazdaságból (Haltermelők Országos Szövetsége Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdasága) származtak, és kikelés után nem érintkeztek tóvízzel. A kikelt ivadékokat 30-100 literes levegőztetett akváriumokban tartottuk. Kezdetben az általunk a laborban frissen keltetett sórakkal, a későbbiekben fagyasztott planktonnal és száraz haltáppal (Perla larva, Bio-optimal) etettük őket.

A *Myxobolus pseudodispar* laborunkban történő fenntartásához a következőképpen végeztük a fertőzéseket: 5 literes, aljzatként kb. 5 cm vastag rétegben autoklávozott iszapot és homokot tartalmazó vízzel telt műanyag dobozokba körülbelül 10 g férget helyeztünk (4.1. ábra). A munka kezdetén a férgeket természetes fertőzőtlenségből származó *M. pseudodispar* myxospórákkal fertőztük, amit Balatonban fogott fertőzött bodorkák (*Rutilus rutilus*) izomzatából gyűjtöttük. A későbbiekben, a laboratóriumban folyamatosan fenntartott fejlődési

ciklus szolgáltatja a myxo- és aktinospórákat a további munkához. A fertőzött halak izomzatát homogenizáltuk, majd a spórák koncentráálásához ezt a homogenizátumot körülbelül két napig főzőpohárban ülepítettük, és naponta kétszer a felülúszót óvatosan leöntve vizet cseréltünk rajta. A homogenizátumban lévő *M. pseudodispar* myxospórák számát Bürker-kamrás számolással becsültük, és az egyes fertőzési edényekben tartott férgeket  $10^5$ - $10^6$  mennyiségű myxospórával fertőztük. A fertőzött oligochaeta populációknál a fertőzést követő hatodik héttől kezdve rendszeresen ellenőriztük az aktinospóra termelést a korábban, a törzsállományoknál már leírt szűrési módszer segítségével. A talált spórákról a mikroszkópra szerelt Moticom 2000 (Motic) digitális kamera segítségével készítettünk felvételeket, és a spórák méreteit Motic Images Plus 2.0 szoftver használatával határoztuk meg. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz az aktinospórákat 1,5 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttük, és  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a további vizsgálatokig.

Az SPF bodorkák fertőzése előtt a laboratóriumban fertőzött férgek által termelt aktinospórákat mikroszkóppal ellenőriztük, és közelítő számukat becsléssel állapítottuk meg. A halak fertőzéséhez 1 literes főzőpoharakban a szűréssel összegyűjtött aktinospórákat átkeveztetett vízben (kb. 4-5 dl) rövid ideig inkubáltuk, majd 1-1 halat helyeztünk az edényekbe. A halakat fél óráig levegőztetés nélkül majd további 3 óráig levegőztetéssel az edényekben tartva fertőztük, ezután akváriumokba helyeztük őket. Körülbelül 3 hónap alatt a halak izomzatában kifejlődtek a *M. pseudodispar* myxospórák. A halak boncolása során a myxospórák kigyűjtését az izomból a már korábban, a természetes fertőzöttségéből származó spórák esetén leírt módon végeztük az izomszövet homogenizálásával. A gyűjtött myxospórákkal újabb oligochaeta populációkat fertőztünk a fertőzési ciklus fenntartásához.



**4.1. ábra:** Tömeges fertőzés 1) Kísérleti rendszerek a *Myxobolus pseudodispar* laboratóriumban való fenntartásához és az oligochaeta állományok fogékonyságának megállapítására tömeges fertőzéssel.  
2) A vízzel teli műanyag edény aljára 4-5 cm vastagságban autoklávozott iszap-homok keveréket helyeztünk. Majd ebben körülbelül 10 g férget fertőztünk a parazitával.

## 4.2. Fertőzési kísérletek

### 4.2.1. *Myxobolus pavlovskii* fertőzési kísérletek

A fertőzési kísérlethez nyolc SPF fehér busa (*Hypophthalmichthys molitrix*) egyedet használtunk. A 3-4 cm méretű halakat a fertőzésükhöz 2 hétig együtt tartottuk az aktinospórát termelő oligochaeta állománnyal. Ezt követően 30 literes akváriumba helyeztük át őket. 94 nap után a halakat felboncoltuk, és vizsgáltuk a kopoltyújukat *M. pavlovskii* myxospórákat keresve. A fertőzött kopoltyú-lemezekről mikroszkópos fényképeket készítettünk. Néhány kopoltyúívet 10%-os pufferolt formalinban fixáltuk, paraffinba ágyasztuk, és körülbelül 5 µm vastagságú hosszanti metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilinnal és eozinnal festettünk. A talált plazmódiumokat legyűjtöttük, és a myxospórákat morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk.

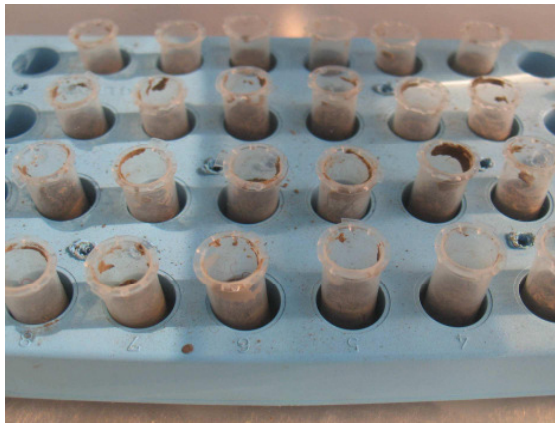
A fertőzött fehér busák kopoltyújáról gyűjtött myxospórákkal oligochaetákat is fertőztünk. A fertőzésre használt férgek a százhalmobattai halastavakból valamint az aufseß-i törzsállományból származtak. A fertőzés a *M. pseudodispar* életciklusának laborban való fenntartásánál leírt módon történt. A fertőzéshez körülbelül  $10^6$  db *M. pavlovskii* myxospórárt használtunk. A fertőzést követő egy hónaptól kezdve fél éven keresztül a fertőzött féregpopulációk valamint a kontrollként szolgáló törzsállományok vizében rendszeresen ellenőriztük az aktinospórák jelenlétét.

### 4.2.2. *Myxobolus pseudodispar* fertőzési kísérletek

Kétféle kísérleti rendszert használtunk az oligochaeták fertőzésére. A *Myxobolus pseudodispar* életciklusának laborban történő fenntartásához valamint a négy rendelkezésünkre álló féregállomány *M. pseudodispar* parazitára való fogékonyságának felméréséhez tömeges fertőzési kísérleteket végeztünk. Ennek során a *M. pseudodispar* életciklusának fenntartásánál már leírt módon végeztük a fertőzéseket.

Az oligochaeták fertőzésére és fogékonyságuk vizsgálatára egyedi fertőzési kísérleteket is végeztünk. A kísérletekhez a két százhalmobattai valamint az aufseß-i féregállományból gyűjtöttünk egyedeket. A myxospórákat tartalmazó homogenizátumot iszappal összekevertük, majd ebből a keverékből körülbelül 1,5 ml-t 2 ml-s centrifugacsövekbe mértünk. A csöveket állványokban 5 literes műanyag edénybe helyeztük víz alá, és a vizet folyamatosan levegőztettük (4.2. ábra). A fertőzéshez egy-egy féregegyedet az ily módon előkészített 2 ml-s csövekbe helyeztünk. Egy-egy egyed fertőzése körülbelül  $10^3$ - $10^4$  mennyiségű myxospórával történt. A fertőzést követően 1, 4, 8, 24 óra, 1, 4 hét, 3 hónap múlva mintát vettünk, mintavételi időpontonként 5-5 oligochaeta egyedet szövettenyésztő lemezek mélyedéseibe helyeztünk Yokoyama és mtsai. (1991) módszere alapján. Az egyedek fertőzöttségének megállapítására fénymikroszkópos vizsgálattal kerestük a

kiszabaduló aktinospórákat a szövettenyésztő lemezre helyezett féreggyedeknél, valamint a későbbiekben *M. pseudodispar*-specifikus PCR-t is végeztünk. Miután a férgek béltartalma nagyrészt kiürült, az egyedeket fixáltuk a további vizsgálatokhoz. Az oligochaeta egyedek farki végéből egy kis darabot lefagyasztottunk a későbbi molekuláris vizsgálatokhoz, a férgek elülső részét pedig 10%-os pufferolt formalinban fixáltuk 2-3 napig, majd 70%-os alkoholban tároltuk a morfológiai és az *in situ* hibridizációs (ISH) vizsgálatokhoz.



**4.2. ábra** Egyedi fertőzés kísérleti rendszere. Myxospórákkal összekevert iszapot tartalmazó 2 ml-es centrifugacsövek, bennük egy-egy kevéssertéjű féreggel.

### 4.3. Molekuláris biológiai vizsgálatok

Az oligochaeta DNS kivonásakor homogenizáltuk az oligochaeta egyedek molekuláris vizsgálatához lefagyasztott farki végét. A myxospórák és aktinospórák DNS szintű vizsgálatához 5000 x g fordulaton 5 percig centrifugáltuk a felolvasztott mintákat, majd a felülúszót leöntöttük úgy, hogy a csőben kb. 10-20 µl spóraszuszpenzió maradt. A spóraszuszpenzióhoz vagy a homogenizált oligochaeta mintához 480 µl lízis puffert (100 mM NaCl; 10 mM Tris pH7,6; 10 mM EDTA; 0,2% SDS) és 10 µl 20 mg/ml koncentrációjú proteináz K általános fehérjebontó enzimet adtunk, majd 55°C-on körülbelül 3 órán át inkubáltuk, amíg a minta teljesen homogén és átlátszó lett. Ezután Miniprep Express Matrix oldatot (Bio101 Inc.) használtunk a DNS tartalom kinyerésére. A mintához azonos mennyiségű (kb. 500 µl) mátrix oldatot adtunk, azt összeráztuk, majd egy percig 13000 x g fordulaton centrifugáltuk. A felülúszó leöntését követően 500 µl 80%-os etanolt adtunk a mátrixhoz, majd ismét egy percig 13000 x g fordulaton centrifugáltuk. Az alkoholos mosás után a pelletet vákuumcentrifuga segítségével beszárítottuk. Ezután a mátrix által megkötött DNS-t 30-35 µl MilliQ ultratiszta vízben leoldottuk, és 2 perc azonos fordulaton való centrifugálás után a felülúszót új csőbe pipettáztuk. A kinyert DNS minőségét 1%-os agaróz gélen gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

A nyálkaspórák paraziták (myxospórák és aktinospórák) 18S riboszomális RNS gén egy szakaszának felerősítéséhez nested (szűkítő) polimeráz láncreakciót (PCR) alkalmaztunk. Először a 18e - 18r általános 18S rDNS-t felsokszorozó primerpárt használtuk, majd a második körben a Myxosporea-specifikus SphF - SphR primereket alkalmaztuk (4.1. táblázat). Az amplifikációt 50 µl végtérfogatban végeztük a következő összetétellel: körülbelül 10-150 ng DNS, 1× Taq DNS polimeráz puffer (Fermentas), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP mix (Sigma) 1 µM az egyes primerekből, 2,5 unit Taq DNS polimeráz (rekombináns, Fermentas). A PCR program lépései a következők voltak: kezdeti denaturációs lépés 95°C-on 5 perc, majd 35 ciklus 95°C 50 másodperc (mp) (denaturáció), 59°C 50 mp (primer tapadás), 72°C 80 mp (szálszintézis) és befejező lépésként 72°C-on 5 perc.

*Myxobolus pavlovskii* minták esetén a közel teljes 18S rDNS felerősítéséhez a következő primerkombinációkat alkalmaztuk: ERI-B1 - MB3 valamint Myx4rF - ERIB-10. A két PCR termék azok átfedő szakaszai révén összeilleszthető volt, így néhány nukleotid híján megkaptuk az egész 18S rDNS-t.

A *Myxobolus pseudodispar* kimutatására faj-specifikus PCR-t dolgoztunk ki. Az *M. pseudodispar* 18S rDNS egy körülbelül 610 bp hosszú szakaszának felerősítéséhez 2 fajspecifikus primert terveztünk, a MpF1 és PseudoR primereket (4.1. táblázat). A PCR-t 25 µl végtérfogatban végeztük a korábban leírt arányokkal. 5 perc 95°C-on történő denaturációt 35 ciklus követte: 95°C 30 mp, 60°C 30 mp, 72°C 60 mp, majd befejező lépésként 5 perc 72°C-on. A reakció specificitásának tesztelésére számos különböző bodorka egyedből származó *M. pseudodispar* myxospóra mintát, fertőzött oligochaeta egyedeket, és a bennünk kifejlődött TAM típusú aktinospórákat használtuk. Emellett különböző fajokból származó myxospórákat is vizsgáltunk: *Myxobolus muelleri*-t bodorkából, *Myxobolus pfeifferi*-t márnából (*Barbus barbus*), vörösszárnýú keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*) veséjéből, paduc (*Chondrostoma nasus*) beléből és szilvaorrú keszeg (*Vimba vimba*) kopoltyújáról gyűjtött *Myxobolus* myxospórákat, sügérben (*Perca fluviatilis*) talált *Henneguya* fajt és nem fertőzött *T. tubifex* egyedeket is a reakció specificitásának ellenőrzéséhez. Valamint a kitisztított PCR terméken az MpF1 *M. pseudodispar*-specifikus primerrel ellenőrző szekvenálásokat is végeztünk.

Az oligochaeták azonosítására a mt 16S rDNS egy körülbelül 370 bázispár hosszú szakaszát erősítettük fel a Tub16SF - Tub16SR primerek alkalmazásával. A PCR körülményei megegyeztek a korábban a myxo- és aktinospórák 18S rDNS-ének felerősítésénél leírtakkal.

A PCR-hez T1 Thermocycler (Biometra) PCR gépet használtunk. A PCR termékek detektálását 1%-os agaróz gélen végeztük TAE pufferben. Szekvenálás előtt a PCR termékeket közvetlenül a reakcióelegyből vagy aspecifikus termék jelenléte esetén agaróz

gélből tisztítottuk MEGAquick-Spin PCR and Agarose Gel DNA Extraction System (INtRON Biotechnology) kit segítségével. A szekvenáláshoz a felerősítéshez használt primereken kívül egyéb (belső) primereket is használtunk (4.1. táblázat), és a DNS fragmentumokat mindkét szálon szekvenáltuk. A szekvenáláshoz használt belső primereket a PCR primerekkel kapott szekvenciadarabok ismeretében választottuk ki. A szekvenáló reakciót ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük. A reakciót a templát mennyiségétől függően 5-10 µl végtérfogatban végeztük a kit leírásában meghatározott összetétellel és az ott leírt körülmények között. A kicsapáshoz etanolos és nátrium-acetátos módszert alkalmaztunk, és a DNS szekvenciák detektálását a Szegedi Biológiai Központ Szekvenáló Laboratóriumában végezték szolgáltatásként ABI Prism 3100 Genetic Analyzer szekvenáló készüléken. A szekvenciák összeillesztésére a STADEN Sequence Analysis Package (Staden 1996) 4.1 verziójú programját használtuk. A szekvenciák hasonlóságának kiszámításához a BioEdit (Hall 1999) program Sequence Identity Matrix funkcióját alkalmaztuk.

**4.1. táblázat** A PCR-hez és a szekvenáláshoz használt primerek szekvenciája és referenciája.

<b>név</b>	<b>szekvencia (5' → 3')</b>	<b>referencia</b>
18e	CTG GTT GAT TCT GCC AGT	Hillis és Dixon (1991)
18r	CTA CGG AAA CCT TGT TAC	Whipps és mtsai (2003)
SphF	ACT CGT TGG TAA GGT AGT GGC T	Eszterbauer és Székely (2004)
SphR	GTT ACC ATT GTA GCG CGC GT	Eszterbauer és Székely (2004)
MpF1	TGT GCT TCT GGT GCG TCT GC	jelen munka
PseudoR	AAG CAC CGA AGC ACA GTC AA	jelen munka
ERI-B1	ACC TGG TTG ATC CTG CCA G	Barta és mtsai (1997)
ERIB-10	CTT CCG CAG GTT CAC CTA CGG	Barta és mtsai (1997)
MB3	CCA ACC GCT CCT GTT AAT CAT C	Molnár és mtsai (2002)
Myx4rF	GTT CGT GGA GTG ATC TGT CAG	Hallett és Diamant (2001) által tervezett primer reverz komplementere
Tub16SF	AAC GGC CGC GGT ATC CTG	Beauchamp és mtsai (2001)
Tub16SR	TAA RCC AAC ATY GAG GTG CCA	Beauchamp és mtsai (2001)
Act1F	GGC AGC AGG CGC GCA AAT TAC CCA A	Hallett és Diamant (2001)
Act1Fr	TTG GGT AAT TTG CGC GCC TGC TGC C	Hallett és Diamant (2001)
MB5	GGT GAT GAT TAA CAG GAG CGG T	Molnár és mtsai (2002)
MC3	GAT TAG CCT GAC AGA TCA CTC CAC GA	Molnár és mtsai (2002)

#### 4.4. Filogenetikai vizsgálatok

Az oligochaeták filogenetikai vizsgálatához az összesen vizsgált 156 minta közül 31 db egymástól DNS szinten különböző egyed 16S rDNS szekvenciáját és 21 db génbanki szekvenciát használtunk fel. A DNS szekvenciákat a Multalin program (Corpet 1988) segítségével illesztettük, majd a GeneDoc Sequence Alignment Editor program használatával manuálisan javítottuk. A filogenetikai számításokat legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) becslési módszerrel valamint Bayesian statisztikával is elvégeztük. Az előbbihez a Phylip programcsomag 3.67 verzióját használtuk online a Mobile portálon keresztül (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>; Néron és mtsai 2009). A Bayesian statisztikához MrBayes programot alkalmaztuk (Huelsenback és Ronquist, 2001) a TOPALi v2.5 program csomagból (Milne és mtsai, 2009) a következő paraméterekkel: general-time reversal (GTR) modell állandó helyek becslésével (estimate of invariable sites, I) és gamma eloszlással (gamma distribution, G). Független futtatások száma: 2, generációszám: 1 millió, mintavételi sűrűség: 100, beégetés (burn-in): 25%. A kapott filogenetikai fákat a Treeview vagy a FigTree programok segítségével jelenítettük meg.

#### 4.5. *In situ* hibridizáció (ISH)

A *Myxobolus pseudodispar* parazita oligochaeta gazdában történő fejlődésének vizsgálatára *in situ* hibridizációs módszert alkalmaztunk. Az *in situ* hibridizációhoz a 10%-os formalinban fixált oligochaeta mintákat paraffinba ágyasztuk és 5 µm-es hosszanti metszeteket készítettünk belőlük. A metszeteket 3 óra alatt 60°C-on APES-sal (3-aminopropil-trietoxi-szilán) bevont tárgylemezre fixáltuk. 2 × 15 perc xilolban való áztatással eltávolítottuk a paraffint, majd etanol soron rehidratáltuk a mintákat. 2 × 5 percig 100% etanolban, majd 96% - 80% - 70% etanolban 5-5 percig inkubáltuk őket. Ezután a metszeteket 1 percig desztillált vízben öblítettük, 1× TBS-ben (pH 8,0) (Tris-pufferelt sóoldat) mostuk 10 percig, majd megszáritottuk. A szövet DNS tartalmának feltárásához egy 25 perces proteináz K enzim (100 µg/ml 100mM TBS-ben, pH 8,0) emésztés következett 37°C-on, majd 5 perc mosás 10 mM PBS-ben (foszfát-pufferelt sóoldat). Post-fixációs lépésként a metszeteket hideg (4°C-os) 0,4%-os paraformaldehidben inkubáltuk 20 percig, majd leöblítettük desztillált vízzel és megszáritottuk őket. A metszetekre 125 µl hibridizációs puffert mértünk, melynek összetétele a következő volt: 4× SSC (nátrium-citrátos sóoldat), 1× Denhardt oldat, 100 µg/ml borjú csecsemőmirigy DNS (calf thymus DNA), és 1-1 ng/µl mennyiségű biotin-jelölt oligonukleotidok. A *M. pseudodispar*-specifikus PCR-hez használt MpF1 és PseudoR primerek mellett a szintén fajspecifikus MpR (5'-AAC AGC CAA CTG AGA TCA C-3') és PseudoF (5'-CTT CAG TCG ATG TTA GCC GT-3') primereket is jelöltettük biotinnal és felhasználtuk az ISH vizsgálatokhoz. Hogy megakadályozzuk a hibridizáció során a párolgást GeneFrame (ABgene) kereteket használtunk a metszetek

lefedésére. A metszeteket 96°C-on inkubáltuk 5 percig, majd egész éjszakán át 42°C-on végeztük a hibridizációt. Ezután 2× SSC-ben 2 × 5 percig szobahőmérsékleten mostuk, majd 0,2× SSC + 0,1% Tween 20 oldatot mértünk a lemezekre, és 10 percig inkubáltuk őket 42°C-on a specifikus mosás (stringency wash) elvégzéséhez. Ezután a metszeteket 2 × 5 percig mostuk 100 mM TBS-ben (pH 7,5), majd a lemezekre 1:5000 higítású streptavidin-alkálfoszfátáz konjugátum-ot (Roche) mértünk és 30 percig inkubáltuk. Ezután a metszeteket 2 × 10 percig mostuk mosó pufferrel (10 mM TBS, pH 7,5). A detektáláshoz a metszeteket 2-5 percig mostuk detektáló pufferben (100 mM Tris-HCl, pH 9.5), majd BCIP/NBT szubsztrát oldattal 1 órán keresztül sötétben inkubáltuk. Ezután detektáló pufferben 5 percig, majd desztillált vízben 1 percig mostuk őket. Háttérfestésként 0,5%-os Bismark Brown Y-t használtunk 1-2 percig, majd desztillált vízben leöblítettük a lemezeket. A metszeteket 96-100%-os etanolban, és két lépésben xilolban dehidratáltuk, majd Vectamount (Vector) beágyzó anyag hozzáadása után fedőlemezzel lefedtük őket. A fejlődés különböző időpontjában fixált metszeten a parazita elhelyezkedését fénymikroszkóppal (Zeiss AxioStar Plus) vizsgáltuk, és Axiovision v4.7 (Zeiss) programot használva Canon PowerShot A640 digitális kamerával készítettünk felvételeket.

#### **4.6. Fluoreszcens festés**

A parazita kevéssertűjű féregbe való bejutását, és a spórák életképességét Yokoyama és mtsai (1997) által kidolgozott vitális festési eljárás segítségével kívántuk vizsgálni. A festéshez fluoreszcein-diacetát (FDA) és propídium-jodid (PI) fluoreszcens festékeket alkalmaztunk. Előbbi vitális festék és az élő sejtek citoplazmáját festi élénkzöld színűre, míg az utóbbi a már elhalt sejtek magját színezi pirosra. A festékoldatokat Markiw (1992) leírása alapján készítettük el. Az 5 mg/ml koncentrációjú FDA törzsoldat acetonnal készült, míg a PI desztillált vízben volt oldva 0,02 mg/ml koncentrációban. A törzsoldatokat -20°C-on, fénytől védve tároltuk. A festéshez Yokoyama és mtsai (1997) leírása alapján 20 µl FDA törzsoldatot hígítottunk fel 4,2 ml desztillált vízzel, és ebből a frissen hígított oldatból és a PI oldatból 25-25 µl-t mértünk 50 µl spóra szuszpenzióhoz. Az egészet összekevertük és +4°C-on sötétben állni hagytuk. A festéshez a spóratípustól függően különböző időre volt szükség. A festés eredményét fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A festődött spórákról Nikon Labophot-2 típusú fluoreszcens mikroszkópra szerelt Moticam 2000 (Motic) digitális kamera segítségével készítettünk felvételeket.



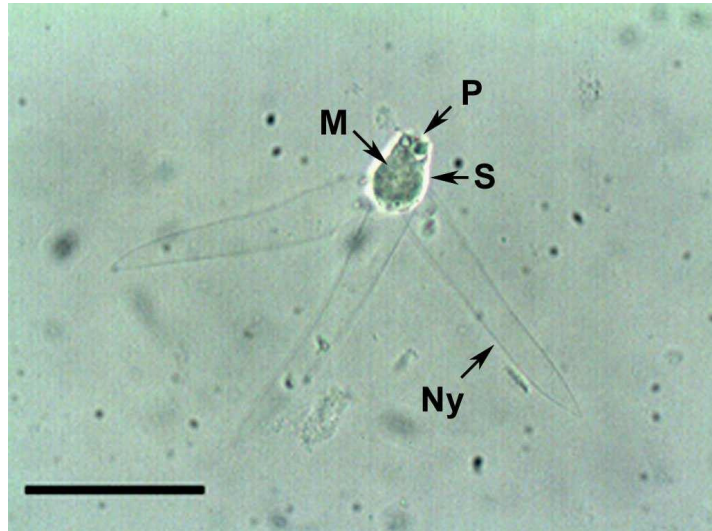
## 5. Eredmények

### 5.1. A *Myxobolus pavlovskii* fejlődési ciklusa

A laboratóriumba behozott négy oligochaeta állomány közül a fertőzési kísérletek előtt végzett rendszeres vizsgálat során csak egyben észleltünk természetes nyálkaspórák fertőzöttséget. A TEHAG-i halastavakból származó tenyészetben echinactinomyxon típusú aktinospórákat találtunk. Körülbelül 300 kevéssertéjű férget vizsgáltunk egyedileg szövettenyésztő lemezekon, de közülük csak kettő echinactinomyxon típusú aktinospórát termelő féregegyedet találtunk. Az echinactinomyxonon kívül egyéb aktinospóra típust sem a lemezekon, sem a tenyészetben nem találtunk. A két fertőzött féreg közül sajnos az egyik a mikroszkópos vizsgálat során elpusztult, így csak a másikat tudtuk felhasználni a vizsgálatainkhoz. A morfológiai vizsgálat során nem találtunk szőrsertéket az egyeden, így azt egy *Limnodrilus* fajként soroltuk be, de pontos meghatározása sajnos nem volt lehetséges, mivel a példány nem volt ivarérett. Az echinactinomyxont termelő féreg egyed molekuláris módszerekkel történő meghatározásához a mt 16S rDNS szekvenciájának egy 335 bp hosszú szakaszát erősítettük fel (génbanki azonosító: HM991165), és a BLASTn keresőprogrammal 95,59%-os hasonlóságot találtunk a génbanki *Limnodrilus udekemianus* (AF325986) szekvenciával.

A talált echinactinomyxon típusú aktinospórák spórateste körte formájú, a sporoplazmájában 32 (30-34) másodlagos sejtet (n=6) tudtunk megszámolni. A poláris kapszulák a spóratest apikális részén, mélyen a héj alatt helyezkednek el. A nyúlványok a spóratesthez nyél nélkül, közvetlenül kapcsolódnak, a csúcsuk felé fokozatosan elvékonyodnak, és hegyesen végződnek (5.1.ábra). A talált echinactinomyxon méreteit, a már korábban leírt hasonló típusú spórák méreteivel együtt a 5.1. táblázatban összegeztük.

A molekuláris biológiai vizsgálatok első eredményeként egy 1400 bp hosszú szakaszt sikerült felerősítenünk a 18S rDNS-ből a 18e-18r és SphF-SphR primerpárokat nested PCR-ben alkalmazva. Ennek a szakasznak a szekvenciája alapján úgy tűnt, hogy ez az echinactinomyxon a *Myxobolus pavlovskii* aktinospóra alakja. Később a teljes 18S rDNS szekvenciát is sikerült meghatároznunk az ERI-B1 – MB3 és Myx4rF – ERI-B10 primerekkel felerősített átfedő DNS szakaszok összeillesztésével. A 2004 bp hosszú szekvencia (génbanki azonosító: HM991164) 99,87%-ban volt azonos a génbankba már korábban benyújtott 1578 bp hosszú, részleges *M. pavlovskii* szekvenciával (AF507973). A BLASTn keresés eredménye alapján a leginkább hasonló nyálkaspórák faj a ponty kopoltyú parazitája, a *Myxobolus musseliasae* (FJ710801) volt, 91,79%-os DNS szekvencia azonossággal.



**5.1. ábra** A vizsgálatunkban talált echinactinomyxon típusú aktinospóra a mélyen ülő 3 db poláris kapszulával (P), a spóratesttel (S) benne  $32 \pm 2$  db másodlagos sejttel (M), és 3db nyúlvánnyal (Ny). Natív preparátum. A lépték 50  $\mu\text{m}$ -nek felel meg.

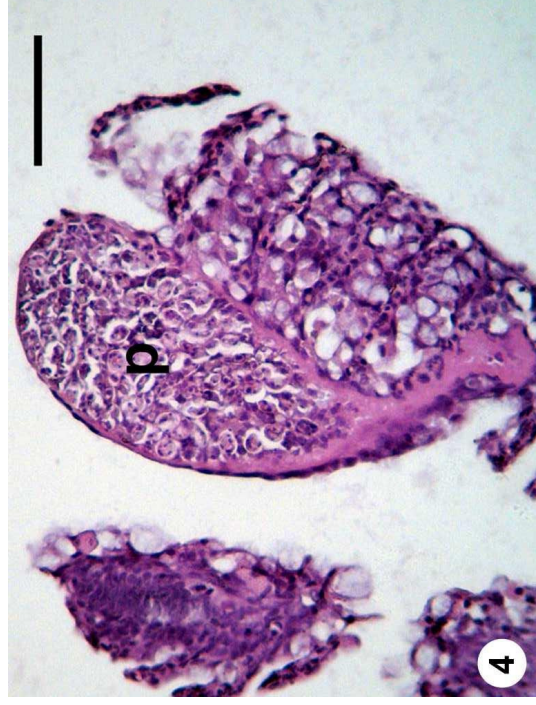
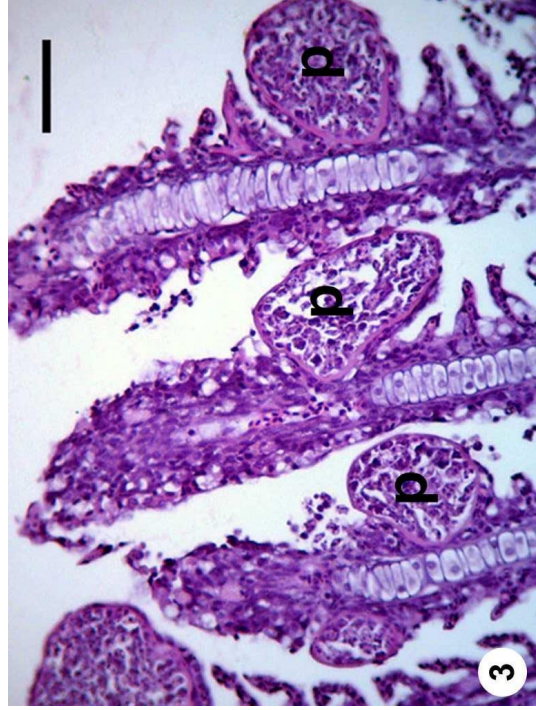
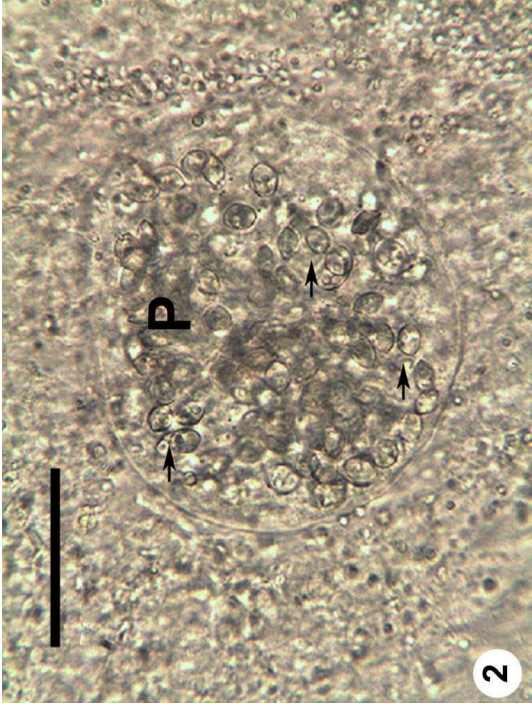
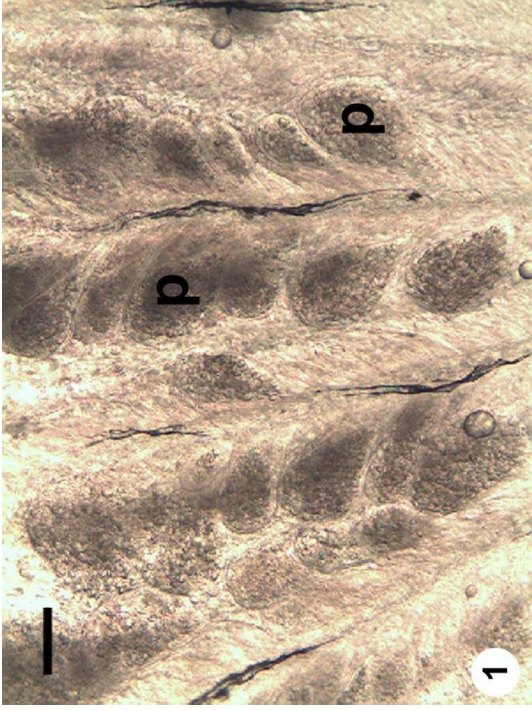
A nyolc laboratóriumban nevelt SPF fehér busa ivadék közül, amelyeket az echinactinomyxon-t termelő féregtenyésztéssel együtt tartva fertőztünk, hat fertőzése volt sikeres. Egyben nem találtunk myxospórákat, a nyolcadik hal pedig elpusztult a parazita kifejlődéséhez szükséges a három hónapos inkubációs idő alatt. Az elpusztult egyed boncolásakor nem találtunk *M. pavlovskii* fejlődési alakokat. A fertőzés után 94 nappal a fertőzött halak boncolása során nagy számú, kis méretű plazmódiumot találtunk a kopolyúredőkben (5.2. ábra 1, 2)

A sikeresen megfertőzött halak mindegyikében súlyos fertőzést tapasztaltunk. Számos kopolyúlemezen a kopolyúredők többsége érintett volt a fertőzésben. A *M. pavlovskii* myxospórák nagyszámú cisztában fejlődtek, és ezek a kopolyúlemezek hámjában elhelyezkedő plazmódiumok a boncolás során könnyen leválaszthatóak voltak. A szövettani metszetekben jól látható a plazmódiumok pontos elhelyezkedése, a bennük fejlődő myxospóra alakokkal (5.2. ábra 3, 4).

A vizsgált halak boncolása során nem találtunk egyéb nyálkaspórák parazitát. A talált myxospórák (5.3. ábra) morfológiailag nagyon hasonlóak voltak az Akhmerov által 1954-ben leírt *M. pavlovskii* spórákhoz, és azokhoz hasonlóan különböző méretű poláris kapszulákkal és kifejezett interkapszuláris nyúlvánnyal rendelkeztek. A spóraméreteken voltak kisebb mértékű eltérések. A kísérletünkben kapott myxospórák kicsit keskenyebbek voltak, mint az Akhmerov által leírtak, a nagyobbik poláris kapszulájuk pedig rövidebb volt. Az általunk talált és az Akhmerov által leírt *M. pavlovskii* myxospórák méreteit a 5.2. táblázatban összegeztük.

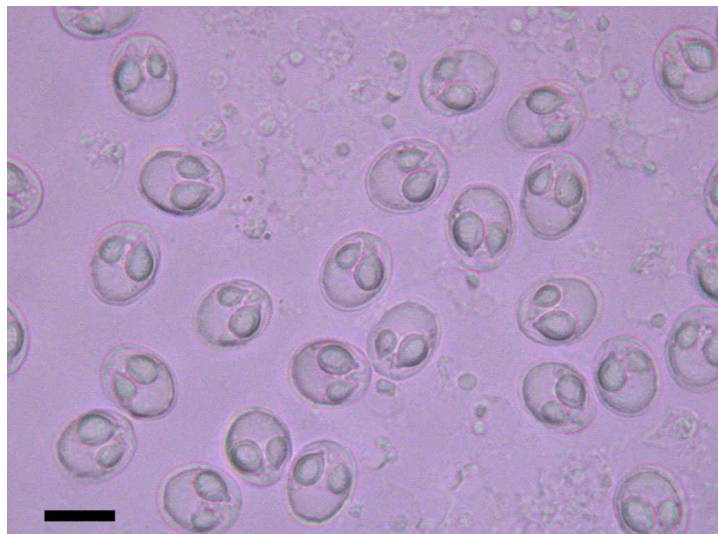
**5.1. táblázat** Összehasonlító táblázat a *Myxobolus pavlovskii* aktinosporájának (vastagon szedett) (n=16) és a korábban leírt echinactinomyxon típusú aktinosporák méreteivel. ST: spóratest; Ny: nyúlvány; MS: másodlagos sejtek száma; G: gerinctelen gazda; H: hossz; Sz: szélesség; S: sporoplazma; E: echinactinomyxon; L.sp.: *Limnodrilus* faj; T.t.: *Tubifex tubifex*; D.d.: *Dero digitata*; L.h.: *Limnodrilus hoffmeisteri*; Lum. v.: *Lumbriculus variegatus*; R.k.: *Rhyacodrilus komarovi*; I.L: nem ivarérett Lumbriculidae

Típus/faj	Referencia	ST H (min-max); Sz (min-max)	Ny H (min-max); SZ (min-max)	MS	G
<b>Echinactinomyxon</b>	<b>Marton és Eszterbauer, 2011</b>	<b>15,2 (12,4-19); 12,1 (10-14,6)</b>	<b>80,26 (70,5-88,9); 7,6 (5,8-11,0)</b>		<b>L. sp.</b>
E. radiatum	Janiszewska, 1957	H: 25-30	H: 100-125	32	T. t.
E. astilum	Marques, 1984	H: 25-35	6-10; 45-60	16	T. t.
E. major	Styer és mtsai., 1992	24; 13	138; 5		D. d.
E. minor		23; 19	76; 10		D. d.
E. radiatum-szerű		S: 25 (23-26); 16,5 (15,5-18)	90 (80-95); 7,5 (7-8)	16 / 32	T. t.
Echinactinomyxon A		14 (12,5-15); 9,5 (8,5-11)	75 (65-85); 5 (4-6)	8 / 16	L. h.
Echinactinomyxon B		12 (11,5-12,5); 9,5 (9-10,5)	50 (45-55); 5 (4-6)	8 / 16	L. h.
Echinactinomyxon C		13 (12-14); 10 (8,5-12)	83 (70-95); 5,5 (5-6)	16	L. h.
Echinactinomyxon D		16 (15-17); 11,5 (11-12,5)	100 (85-105); 6-7	16 / 32	L. h.
Echinactinomyxon E		12 (11,5-12,5); 9 (8-10)	90 (85-95); 5-6,5	8 / 16	L. h.
E. type 1		22,5 (18,2-23,4); 19,9 (14,7-20,8)	126 (117-143); 13,3 (13-15,6)	16	Lum. v.
E. type 2	Negredo és Mulcahy, 2001	19,6 (18,2-20,8); 13 (13-13)	82,2 (74,1-91); 8,4 (7,8-10,4)	25	Lum. v.
E. type 3		21,7 (16,9-26); 17,7 (15,6-18,2)	91 (91-91); 10,4 (10,4-10,4)	13	Lum. v.
Echinactinomyxon	Székely és mtsai., 2002	S: 24,3 (21,1-27,5); 18,5 (17,6-20,2)	99,1 (87,5-109,8); 8,9 (8,2-10,3)	16	R. k.
E. type 1		22,4 (20,8-23,4); 18,3 (18,2-19,7)	H: 114,9 (103,9-124,7)	64	Lum. v.
E. type 2		21,4 (20,7-23,3); 14,1 (12-15)	H: 96,2 (85-114)	64	T. t.
E. type 3		25,9 (24,9-28); 14,5 (14-15,6)	H: 93,3 (82,7-99,8)	16	T. t.
E. type 4	Özer és mtsai., 2002	27,3 (24,9-28,4); 15,5 (14-16,8)	H: 122,2 (106,8-135,7)	128	T. t.
E. type 5		11,2 (10-12); 8,1 (7-9)	58 (38-75); 3 (2,9-3,1)	8	Lum. v., T. t.
E. radiatum-szerű	Oumouna és mtsai., 2003	S: 28 ± 2; 15 ± 1 35 ± 3; 15 ± 2	H: 110 ± 5 H: 166 ± 16		
E. type 1					
Echinactinomyxon	Marcucci és mtsai., 2009	20,2 (12,5-30); 14,4 (10-20)	102,6 (90-125); 9,1 (7,5-12)	>12	I.L.



**5.2. ábra 1)** Nagy számú *M. pavlovskii* plazmódium (P) fehér busa ivadékok kopolyú lemezein. A lépték 100 µm-nek felel meg **2)** Egy *M. pavlovskii* ciszta (P) benne számos fejlődő myxospórával (nyílak). Natív preparátum. A lépték 50 µm-nek felel meg **3)** *M. pavlovskii*-val fertőzött kopolyúlemezek és a plazmódiumok (P) elhelyezkedése a kopolyún **4)** és *M. pavlovskii* ciszta (P) a kopolyúlemez hámljában, benne számos fejlődő myxospórával. 3-4) Szöveti metszet hematoxiilin-eozinnal (H&E) festve. A léptékek 50 µm-nek felelnek meg.

A molekuláris biológiai vizsgálatokban két különböző halból származó myxospóra mintát is megvizsgáltunk, és sikeresen felerősítettük és szekvenáltuk a teljes 18S rDNS-t. A két myxospóra minta szekvenciája teljesen megegyezett egymással valamint a vizsgált echinactinomyxon-típusú spóra szekvenciájával is, és csak egy nukleotid (0,13%) eltérés volt a génbankban található *M. pavlovskii* szekvenciához képest (AF507973). Sajnos a kísérletünk, hogy ezekkel a myxospórákkal fertőzzünk a laboratóriumi állományból származó kevéssertéjű férgeket, nem járt sikerrel. A myxospórákkal fertőzött féreg állományokat fél évig rendszeresen ellenőriztük, de nem találtunk aktinospórákat.



**5.3. ábra** *M. pavlovskii* szimmetrikus, kerekded myxospórái az eltérő méretű poláris kapszulákkal és nagyméretű interkapszuláris nyúlvánnyal. Natív preparátum. A lépték 10 µm-nek felel meg

**5.2.táblázat** A általunk talált (Marton és Eszterbauer 2011) és az Akhmerov által 1954-ben leírt *Myxobolus pavlovskii* myxospórák méreteinek összehasonlítása [Átlag ± SD (min-max) µm-ben]

	Spóra			Nagyobbik poláris kapszula		Kisebbik poláris kapszula	
	hossz	szélesség	vastagság	hossz	szélesség	hossz	szélesség
Marton és Eszterbauer, 2011 (n=41)	10,0 ± 0,92 (7,8-11,9)	8,4 ± 0,56 (7,3-9,4)	6,35 ± 0,36 (5,8-6,8)	4,2 ± 0,53 (3,4-5,6)	3,3 ± 0,51 (2,6-4,5)	2,8 ± 0,30 (2,3-3,4)	2,3 ± 0,30 (1,9-3,1)
Akhmerov, 1954	8,5-10	9,1-10	6-7	5-6	2,5-4,2	3-4	2,5-3

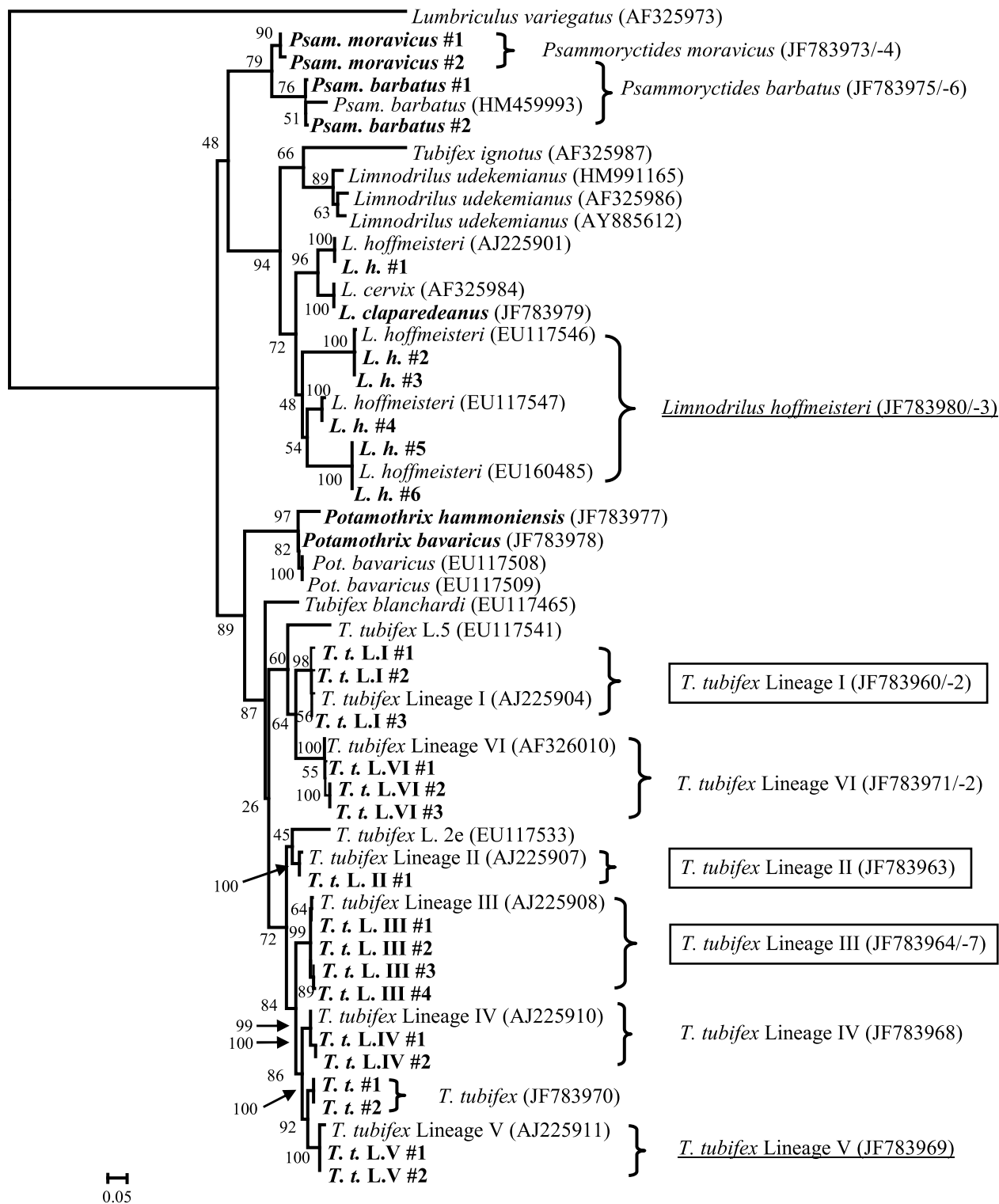
## 5.2. Kevéssertéjű férgek azonosítása

A négy kevéssertéjű féreg tenyészetből 156 egyed mt 16S rDNS szakaszát vizsgáltuk molekulárisan. A németországi állományból 68, a TEHAG halastavakból 38, a halágyból 27, kereskedelmi forgalomból származó tenyészetből 7 egyedet vizsgáltunk és 16 vizsgált egyed

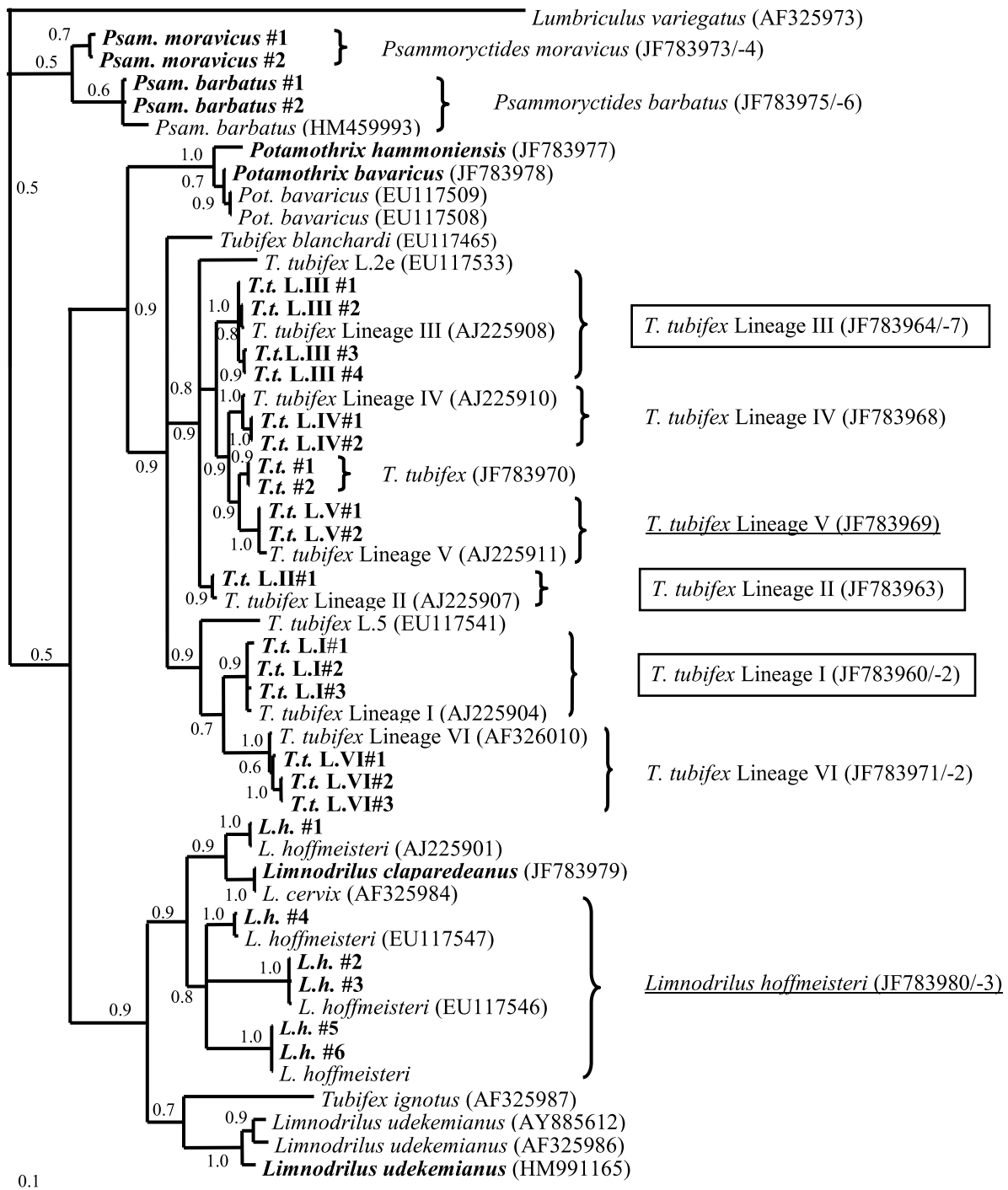
vegyes (németországi és halastavai) állományból származott. Morfológiailag 19 férégegyedet vizsgáltunk, ebből 7 *Tubifex tubifex*, 4 *Limnodrilus claparedeanus* Ratzel, 2 *Limnodrilus hoffmeisteri*, 2 *Psammoryctides barbatus* (Grube), *Psammoryctides moravicus* (Hrabe), 1 *Potamothenix bavaricus* (Öschmann) és egy *Potamothenix hammoniensis* (Michaelson) fajként volt azonosítható. A morfológiai azonosítás eredményei a legtöbb esetben alátámasztották a molekuláris eredményeinket, néhány esetben pedig pontosították azokat. A két molekulárisan *Psammoryctides* fajnak azonosított egyed morfológiai tulajdonságaik alapján *P. moravicus*-nak bizonyult, a *Potamothenix* faj pedig *P. hammoniensis*-nek. Egy esetben a molekuláris és morfológiai vizsgálatok eredményei ellentmondtak egymásnak: egy DNS szekvencia alapján *Limnodrilus cervix*-ként azonosított egyed a morfológiai vizsgálat alapján *L. claparedeanus*-nak bizonyult.

### **5.3. A kevéssertéjű férgek filogenetikai vizsgálatainak eredményei**

A vizsgált oligochaeták rokonsági viszonyai a 5.4. és 5.5. ábrán láthatóak. A két különböző módszerrel történt elemzések nagyon hasonló eredményt adtak. A mt 16S rDNS szekvencián alapuló maximum likelihood módszerrel történt filogenetikai elemzés alapján a *Psammoryctides* és *Limnodrilus* fajok egy csoportba kerültek, míg a *Tubifex tubifex* leszármazási vonalak és *Potamothenix* fajok egy másikba. A Bayesian statisztikával történt elemzés során a *Psammoryctides* fajok külön ágon helyeződtek. Mindkét módszer esetén a hat *T. tubifex* leszármazási vonal egyértelműen elkülönült egymástól, de az I-es és VI-os leszármazási vonalba tartozó minták közelebb voltak egymáshoz, a II-es, III-as, IV-es, V-ös leszármazási vonalak pedig egy másik csoportot alkottak. Két minta (génbanki azonosító: JF783970) a *T. tubifex* V-ös leszármazási vonalba tartozó minták közeli rokonának tűnik, ugyanakkor a szekvenciabeli hasonlóságuk csak 94,7-95,3% volt, így nem voltak az V-ös vonalba egyértelműen besorolhatóak. A filogenetikai fán a *M. pseudodispar*-ra fogékony és nem fogékony *T. tubifex* leszármazási vonalak nem különültek el egymástól. A leszármazási vonalak közti genetikai különbségek 6,6-15,0% között voltak, a leszármazási vonalakon belüli különbségeket a 5.3. táblázat mutatja. A *Limnodrilus hoffmeisteri* minták között jelentős genetikai különbségeket tapasztaltunk, a vizsgált 35 egyed esetén 15,5% volt a legnagyobb szekvenciabeli eltérés.



**5.4. ábra** A vizsgált kevéssertéjű férgek rokonsági viszonyai 335 bp hosszú mt 16S rDNS szakasz alapján maximum likelihood módszerrel vizsgálva. A bootstrap értékek az ág elágazásokban vannak feltüntetve, a lépték 5% különbségnek felel meg. Külcsoportként a *Lumbriculus variegatus*-t választottuk. A minták génbanki azonosítóit zárójelben tüntettük fel. Az általunk vizsgált és szekvenált mintákat kivastagítottuk, a *Myxobolus pseudodispar*-ra fogékony fajokat és típusokat bekereteztük, míg a lehetséges 'biológiai szűrő' fajokat aláhúztuk.



**5.5. ábra** A vizsgált kevésértéjű férgek rokonsági viszonyai 335bp hosszú mt 16S rDNS alapján Bayesian inference módszerrel vizsgálva. Az elágazásoknál az utólagos valószínűség értékek (posterior probability) vannak feltüntetve; a lépték 10% különbségnek felel meg. Külcsoportként a *Lumbriculus variegatus*-t választottuk. A minták génbanki azonosítóit zárójelben tüntettük fel. Az általunk vizsgált és szekvenált mintákat kivastagítottuk, a *Myxobolus pseudodispar*-ra fogékony fajokat és típusokat bekereteztük, míg a lehetséges 'biológiai szűrő' fajokat aláhúztuk.



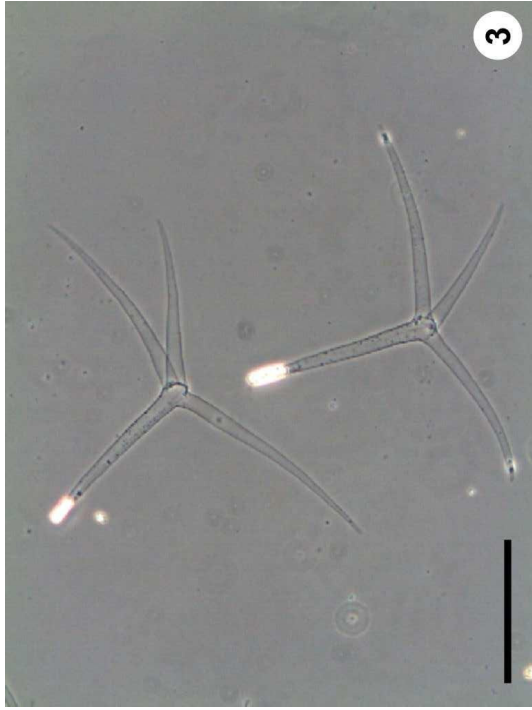
**5.3. táblázat** A tömeges és egyedi fertőzésekből származó kevésertéjű férgek morfológiai és molekuláris biológiai azonosításának eredményei, valamint a fajon vagy leszármazási vonalon belüli genetikai különbségek a férgek 16S rDNS szekvenciája alapján.

\*: csak egy egyed különbözőt genetikailag

Morfológiai azonosítás eredménye	Molekuláris azonosítás eredménye	Vizsgált egyedek száma	Leszármazási vonalakon/ fajon belüli különbségek	Génbanki azonosító
faj		leszármazási vonal		
<i>Tubifex tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	20	1,6%	JF783960/-2
<i>Tubifex tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	21	0%	JF783963
<i>Tubifex tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	36	1,7%	JF783964/-7
<i>Tubifex tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	3	0,3%	JF783968
<i>Tubifex tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	16	0,7%	JF783969
<i>Tubifex tubifex</i>	<i>Tubifex tubifex</i>	5	3,7%	JF783971/-2
<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	35	15,5%	JF783980/-3
<i>Limnodrilus claparedeanus</i>	<i>Limnodrilus cervix</i>	1	-	JF783979
	<i>Limnodrilus udekemianus</i>	1	-	HM991165
<i>Psammoryctides barbatus</i>	<i>Psammoryctides barbatus</i>	12	1,3% *	JF783975/-6
<i>Psammoryctides moravicus</i>	<i>Psammoryctides</i> sp.	2	1,5%	JF783973/-4
<i>Potamothrix bavaricus</i>	<i>Potamothrix bavaricus</i>	2	0,8%	JF783978
<i>Potamothrix hammoniensis</i>	<i>Potamothrix</i> sp.	1	-	JF783977

#### 5.4. A *M. pseudodispar* fertőzési kísérletek eredményei

A *M. pseudodispar* fejlődési ciklusának laboratóriumban történő fenntartása sikeres, és 2007 óta folyamatos. A fertőzésekben kifejlődött myxo- és aktinospórák *M. pseudodispar*-ra jellemző tipikus spóraalakokkal rendelkeznek (5.6. ábra). A fertőzési kísérletekben kifejlődött spóraalakok rendszeres molekuláris biológiai vizsgálata is megerősíti, hogy a *M. pseudodispar* fejlődési ciklusának fenntartása kontamináció-mentes a laboratóriumban. A tömeges és egyedi fertőzések parazita-specifikus PCR eredményei alapján a TEHAG-i halastavakból és Németországból származó oligochaeta állományok tűntek *M. pseudodispar*-ral legjobban fertőzhetőnek. A tömeges és egyedi fertőzési eredmények alapján számolt összevont fertőzési prevalencia 60,5% illetve 55,4% volt ennél a két állománynál. A TEHAG halágyból gyűjtött egyedeink voltak a legkevésbé fertőzhetőek 33,3%-os fertőzési prevalenciával. Az egyedi fertőzési kísérleteinkhez a két halgazdasági és a németországi állományokat használtuk. A fajösszetételüket és a fertőzési kísérletek eredményeit a 5.4. táblázatban foglaltuk össze. A németországi állományban a *T. tubifex* I-es és III-as leszármazási vonalba tartozó férgek voltak a legnagyobb számban jelen, és ezek voltak a legfogékonyabbak is. A halastavi állományból származó férgekkel végzett egyedi fertőzésekben a parazita-specifikus PCR eredményei alapján az összes féregegyed *M. pseudodispar*-pozitív volt, vagyis mindegyiket sikerült megfertőzni *M. pseudodispar*-ral (21-ből 21 egyed). Ezek közül a *T. tubifex* II-es leszármazási vonalba tartozó összes egyed (11-ből 11) és az V-ös leszármazási vonalba tartozó 8 *T. tubifex* közül 1 egyed termelt aktinospórákat. A TEHAG halágyból származó oligochaeták esetén az egyedi fertőzések során egy esetben sem találtunk aktinospóra termelő egyedeket, de a 17 vizsgált egyed közül 7 pozitív volt a *M. pseudodispar*-specifikus PCR-rel. A különböző leszármazási vonalba tartozó *T. tubifex* egyedek jelentősen eltértek *M. pseudodispar*-ra való fogékonyaságukban. A II-es leszármazási vonalba tartozó egyedek voltak a legfogékonyabbak a parazitára, a vizsgált egyedek 90,5%-a termelt TAM-ot (19/21). A *T. tubifex* III-as leszármazási vonalba tartozó egyedek 22,2%-a termelt aktinospórákat (8/36). Az V-ös leszármazási vonalba tartozó egyedek kevésbé tűntek fogékonyaknak, a vizsgált egyedeknek csak a 18,8%-a termelt aktinospórákat (3/16). A fertőzésekben a VI-os leszármazási vonalból nem találtunk aktinospóra termelő féreg egyedeket. A *P. barbatus* és *P. moravicus* egyedek szintén fertőzhetőnek bizonyultak *M. pseudodispar*-ral, amit a parazita-specifikus PCR mellett az egyedek aktinospóra termelése is bizonyított.



**5.6. ábra: 1) 2) *Myxobolus pseudodispar* myxospórák, a fajra jellemző aszimmetrikus spóralakkal és különböző méretű poláris kapszulákkal. Natív preparátum. A lépték 10 µm-nek felel meg. 3) 4) *M. pseudodispar* triactinomyxon (TAM) típusú aktinospórái. Natív preparátum. A lépték 100 µm-nek felel meg.**

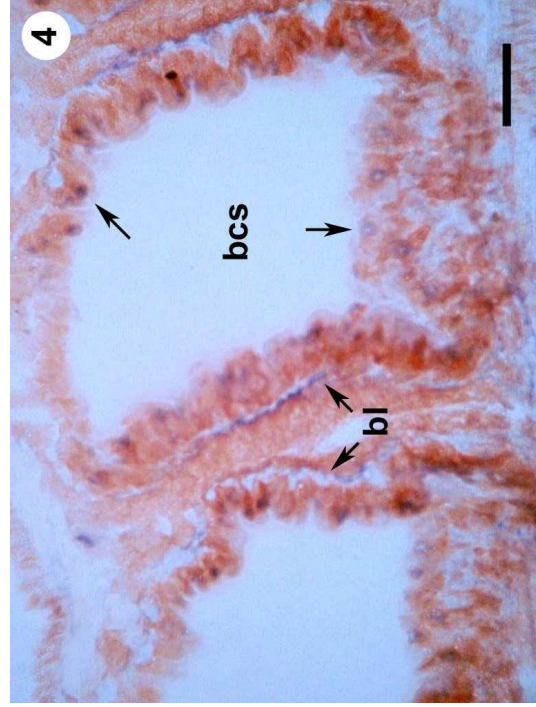
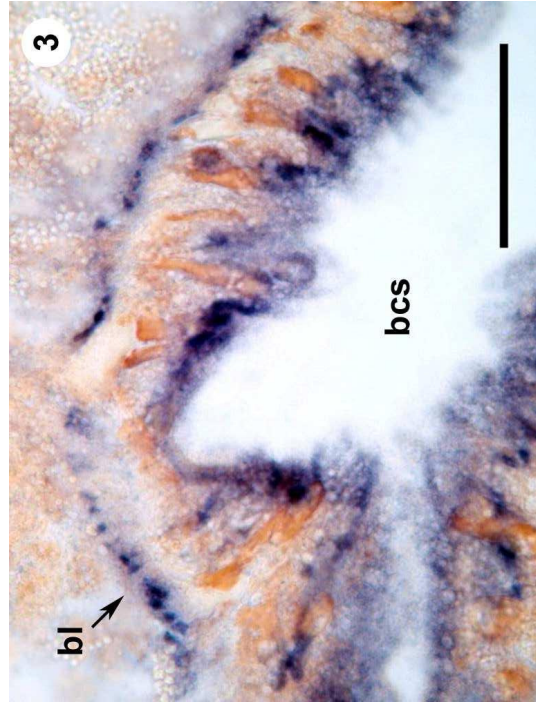
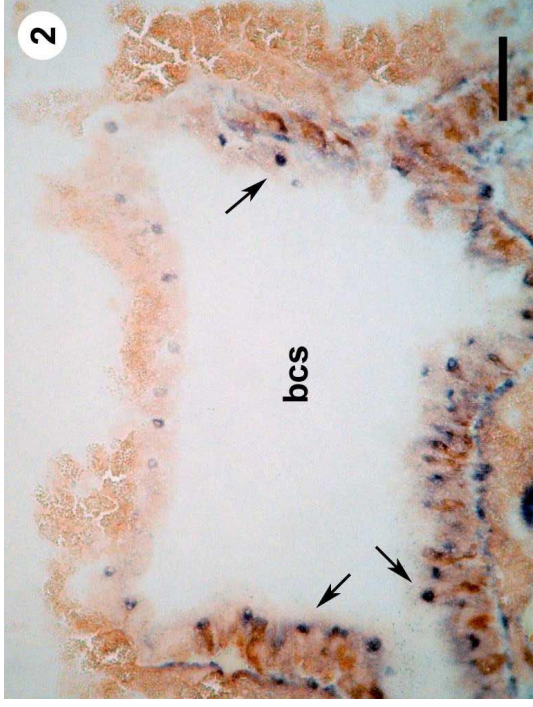
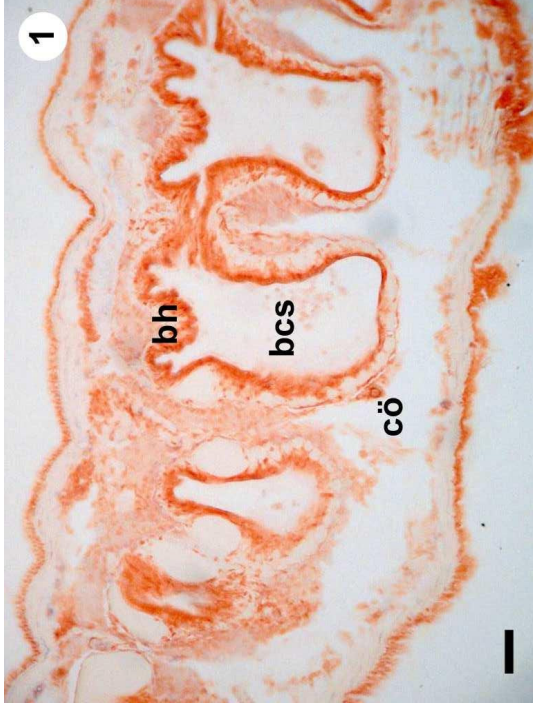


## 5.5. A *M. pseudodispar* kevéssertéjű férgen belüli fejlődése

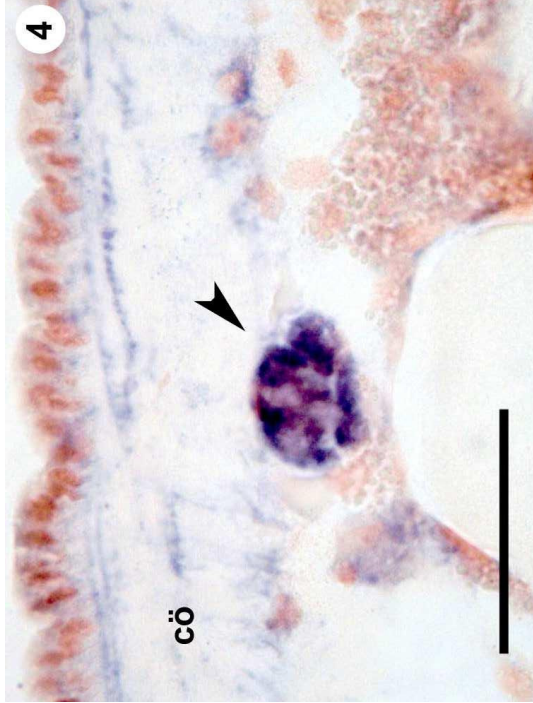
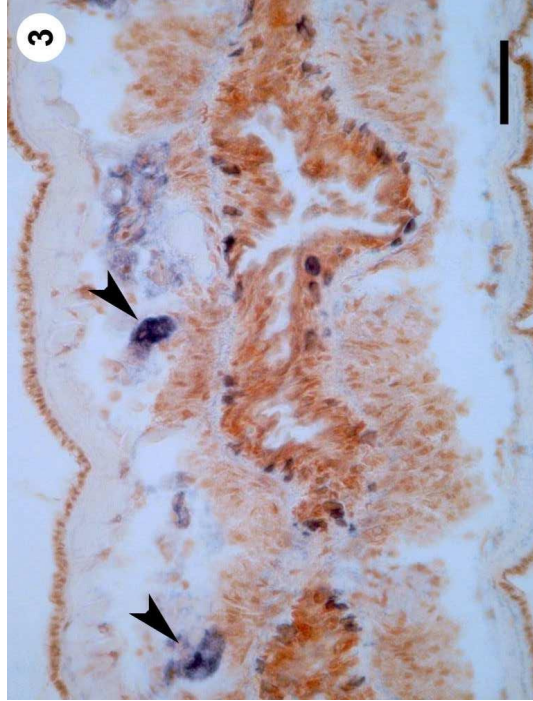
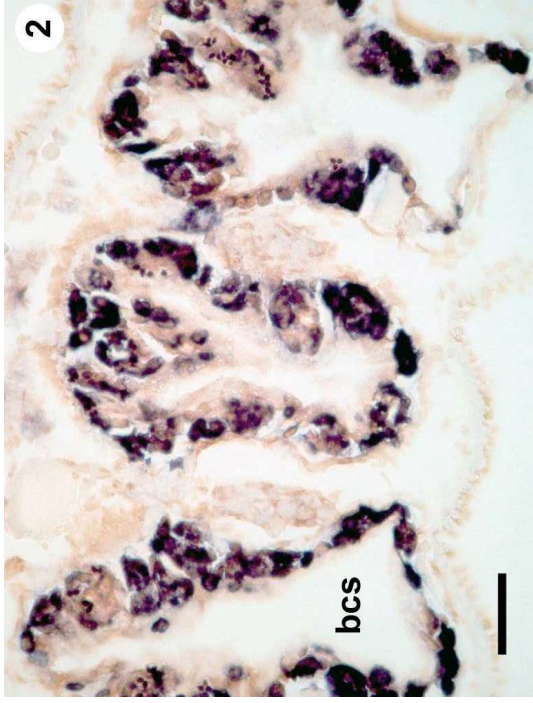
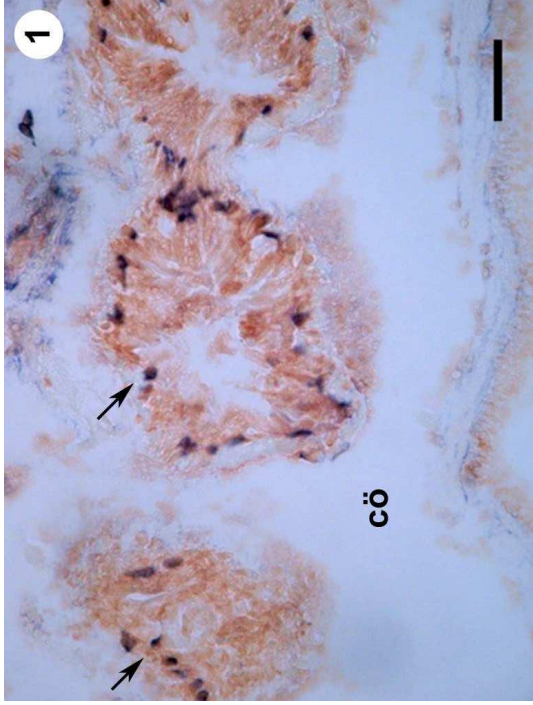
Az ISH vizsgálatainkban a mt 16S rDNS vizsgálatok alapján *T. tubifex* I-es, III-as és V-ös leszármazási vonalba tartozó valamint *Limnodrilus hoffmeisteri* egyedeket használtunk. Az *in situ* hibridizáció eredményeként a hosszanti metszetekben a kevéssertéjű féregegyedek szövetei világossárgára, míg a parazita sötétkéken festődött. A megfigyeléseink azt mutatták, hogy a *M. pseudodispar* a kevéssertéjű féreg bélhámjában fejlődik. Már néhány órával a fertőzést követően *M. pseudodispar* fejlődési alakokat lehetett kimutatni a bélhámban (5.7. ábra 2,3). A fejlődés első hetében a bélhámsejtek alapját képező sejten kívüli mátrixban, a 'bazális laminá'-ban is intenzív pozitív festődés volt tapasztalható (5.7. ábra 4). Egy hónappal a fertőzés után a parazita fejlődési alakok a bél egész hosszában megtalálhatóak voltak (5.8. ábra 1). Három hónappal a fertőzés után nagy számú, egyenként négy darab TAM-ot tartalmazó pánsporociszta volt látható a metszetekben (5.8. ábra 2). A fejlődés első néhány napjában a kevéssertéjű férgek cölómájában lévő fagocitáló sejtek, az amöbociták sötétkéken festődést mutattak a paraziták bekebelezése folytán (5.8. ábra 3, 4).

## 5.6. Az aktino- és myxospórák fluoreszcens festésének eredményei

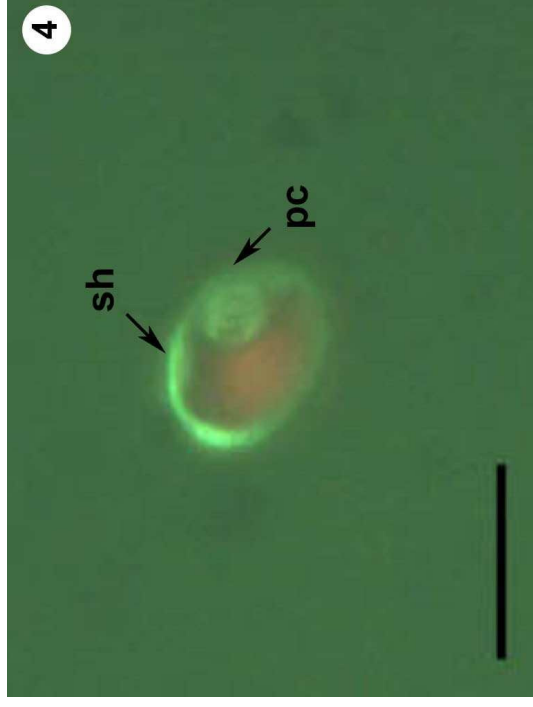
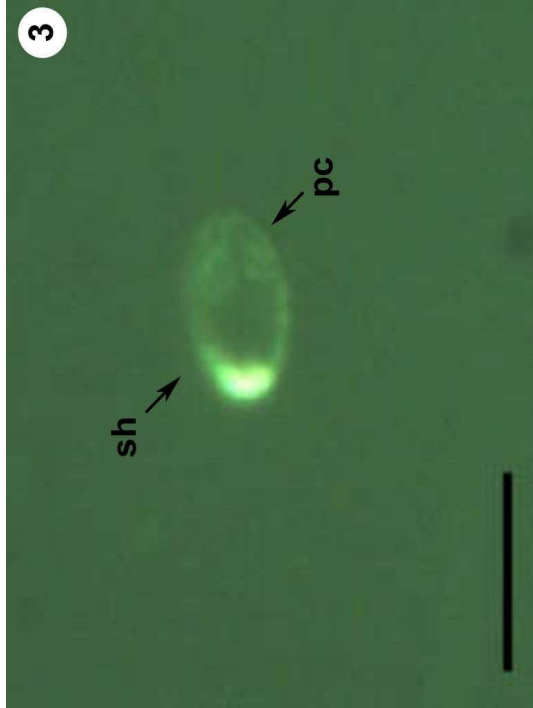
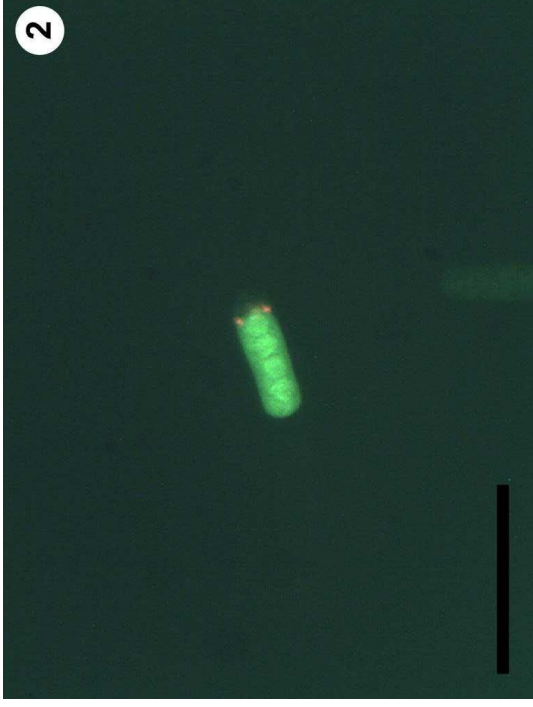
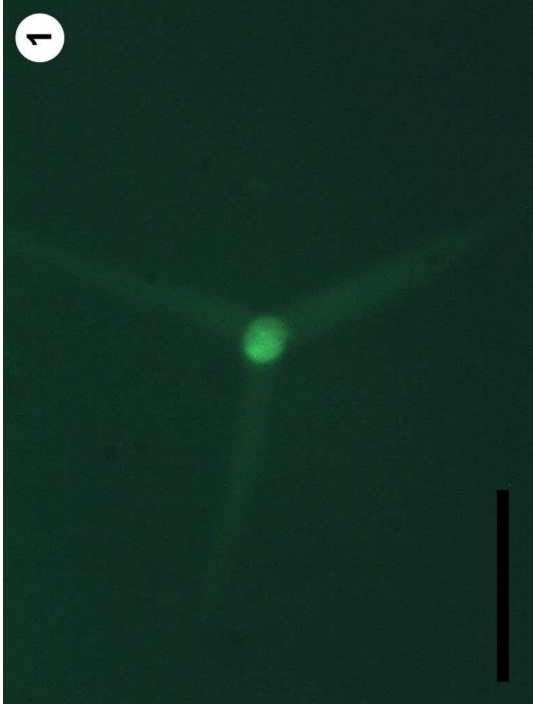
A fluoreszcens festés során a fluoreszcein-diacetát (FDA) az élő sejtekbe bejut, a sejt saját enzimeit hidrolizálják, és a keletkezett fluoreszcein felhalmozódva a sejteken belül azokat zöldre festi. Ezzel ellentétben a propidium-jodid (PI) a nem élő sejtek membránján képes csak átjutni, és azok sejtanyagait pirosra festi. A festési eljárás az aktinospórák esetében jól működött, azok sejtjeibe a festékek könnyen bejutottak, és rövid festődés (15 perc-1 óra) után már fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálhatóak voltak. (5.9. ábra 1, 2) A myxospórák esetén sajnos a festődés nem volt megfelelő, a spóra kompaktabb felépítése miatt a festék nem tudott megfelelő mennyiségben bejutni a sejtbe, és csak nagyon gyenge festődés volt tapasztalható. (5.9. ábra 3, 4), ami megakadályozta, hogy a parazita féregbe való bejutását így módon vizsgáljuk.



**5.7. ábra** *Myxobolus pseudodispar* kevésertéjű férgen belüli fejlődésének stádiumai faj-specifikus ISH módszer segítségével azonosítva. **1)** ISH negatív kontroll, jelölt próba hozzáadása nélküli ISH. **bcs:** bél csatorna, **bh:** bélhám, **cö:** cölóma **2)** néhány órával a fertőzés után, már kéken festődő *M. pseudodispar* fejlődési alakok (nyilak) fedezhetők fel kevésertéjű féreg bélhámjában **3)** néhány órával a fertőzés után jól látszik a bélhámsejtek alapját képező extracelluláris mátrix, a 'bazális lamina' festődése **4)** egy héttel a fertőzés után is látható a 'bazális lamina' festődése és a parazita fejlődési alakok (nyilak). ISH, a léptékek 50 µm-nek felelnek meg.



**5.8 ábra** *M. pseudodispar* specifikus ISH eredményei **1)** Egy hónappal a fertőzés után a bél egész hosszában kimutathatóak a parazita fejlődési alakok (nyilak). **2)** három hónappal a fertőzés után a bélhám jelentős része intenzíven fertőzött a kiürülés előtt álló aktinosporákkal. **3)** **4)** A kevéssertéjű férgek cöliómájában (cö) a sejtjes immunválaszában résztvevő fagocitáló sejtek, az amöbociták (nyíl fejek) a *M. pseudodispar* paraziták bekebelezése miatt sötétkéék festődést mutattak ISH, a léptékek 50 µm-nek felelnek meg.



**5.9. ábra** **1) 2)** Aktinospórák fluoreszcens festésének eredménye **1)** a *Myxobolus pavlovskii* echinactinomyxon típusú aktinospórája FDA-PI festés után, az élő sejtek zöldre festődtek **2)** *M. pseudodispar* triactinomyxonjának sporoplazmájában az élő másodlagos sejtek zölden festődtek, míg a poláris kapszulák sejtei már elhaltak, így pirosan festődtek. A léptékek 50 µm-nek felelnek meg. **3) 4)** A *Myxobolus pseudodispar* myxospórái FDA-PI festéssel. **3)** Erőteljesebben festődtek a spóranéj (sh) élő sejtei, a poláris kapszulák (pc) sejteinél már gyengébb fluoreszcenciát tapasztaltunk. **4)** Ennél a myxospóránál a sporoplazma sejtei már elhaltak, így ezek a PI-vel pirosan festődtek. A léptékek 10 µm-nek felelnek meg.



## 6. Megbeszélés

A doktori munka keretében elsősorban a nyálkaspórások kevésértéjű férgekben zajló fejlődését kívántuk követni a *M. pseudodispar* faj vizsgálatával, emellett a parazita gazdaspektrumának megállapítására összpontosítottunk. Továbbá a *M. pavlovskii*-val végzett kísérleteink során megcáfoltuk a fejlődési ciklusára vonatkozó korábbi eredményeket.

A TEHAG halastavaiból gyűjtött oligochaeta állományban természetes fertőzöttségként jelen lévő echinactinomyxon a vizsgálataink során a *Myxobolus pavlovskii* aktinospóra alakjának bizonyult. Ez a parazita a fehér és pettyes busa gyakori élősködője, és már számos korábbi munkában vizsgálták, melyekben elsősorban a halakban előforduló myxospóra stádiumokra koncentráltak (Molnár 1971, 1979b, 2002, Eszterbauer és mtsai 2002, Eszterbauer 2004). A nyálkaspórások aktinospóra alakjainak kimutatására számos felmérő vizsgálat történt Magyarországon (El-Mansy és mtsai 1998a,b, Eszterbauer és mtsai 2006). Ezek a természetes vizeink közül a Tiszában és a Balatonban, a halgazdaságok közül pedig a százhalombattai TEHAG-ban előforduló aktinospóra stádiumok leírására fókuszáltak, ahonnan a vizsgálatunk során az echinactinomyxon típusú spórákat termelő kevésértéjű férgek is származtak. A korábbi felmérő vizsgálatokban számos különböző típusú aktinospórát találtak, de echinactinomyxon típust eddig nem írtak le (El-Mansy és mtsai 1998a,b, Eszterbauer és mtsai 2006). Ez azért meglepő eredmény, mivel a *M. pavlovskii* fertőzést gyakran tapasztaltak ezekről a helyekről származó busákban (Molnár Kálmán, személyes közlés), így várható volt, hogy a parazita aktinospóra alakja is nagy számban előfordul az érintett vizekben. Magyarázat lehet erre az ellentmondásra, hogy több tanulmány szerint a kevésértéjű férgek aktinospóra termelése szezonalitást mutat, az év egyes időszakaiban nagy számban termelik a spórákat, míg máskor csak alig vagy egyáltalán nincs spóratermelés (El-Mansy és mtsai 1998a, Oumouna és mtsai 2003). Az általunk vizsgált oligochaeta populációban 2007 októberében találtunk először echinactinomyxon típusú spórákat, ami azt valószínűsíti, hogy a vizsgált területen a *M. pavlovskii* aktinospóra termelése ősszel történik. Az érintett halgazdaság egy korábbi vizsgálata során a mintagyűjtés csak kora őszig tartott (Eszterbauer és mtsai 2006), így a spóratermelés szezonalitása magyarázatul szolgálhat arra, eddig miért nem találtak echinactinomyxont ezen a területen. Míg más vizsgálatok esetén a mintagyűjtés nem terjedt ki azokra a tavakra, melyekben a fehér busa nevelés folyt (El-Mansy és mtsai 1998a). Az általunk talált echinactinomyxon 18S rDNS szekvenciája (génbanki azonosító: HM991164) megegyezett az Eszterbauer által 2004-ben publikált *M. pavlovskii* myxospóra szekvenciájával. A mostani DNS szekvencia körülbelül 500 bp-rel hosszabb, így több

információval szolgál a parazita genetikai azonosításához. Az a fehér busából gyűjtött myxospóra minta, amely 18S rDNS szekvenciájával az általunk talált echinactinomyxon szekvenciája megegyezett, ugyancsak a TEHAG-ból származott, mint az aktinospórát termelő férgek, csak a gyűjtés idejében volt eltérés. A myxospóra mintákat 1998 és 2001 között gyűjtötték, míg az echinactinomyxont 2007 őszén találtuk a halgazdaságból behozott féregtenyészetben. A molekuláris biológiai eredmények mellett a sikeres fertőzési kísérlet eredményei is megerősítették, hogy az általunk vizsgált echinactinomyxon a *M. pavlovskii* aktinospóra alakja. Emellett a szövettani eredményeink megegyeznek Molnár (2002) által leírtakkal: a sikeres fertőzési kísérlet után kifejlődő myxospórák a *M. pavlovskii* myxospórákra jellemzően, a kopoltyúlemezek hámjában képeztek cisztákat.

Megpróbáltuk a *M. pavlovskii* teljes fejlődési ciklusát kísérletesen reprodukálni. A természetes fertőzöttségéből származó echinactinomyxonokkal sikerült megfertőzni a parazitamentes fehér busákat, majd a halak kopoltyújáról gyűjtött myxospórákkal szintén parazitamentes oligochaetákat próbáltunk fertőzni. Ez a kísérlet sajnos nem járt sikerrel, a kevésértéjű férgeknel nem észleltünk aktinospóra termelést. A sikertelenség rávilágít arra a problémára, hogy a hasonló fertőzési kísérleteknél, amikor myxospórákkal szeretnénk megfertőzni kevésértéjű férgeseket, nagyon fontos befolyásoló tényező lehet a használt oligochaeta populáció faji összetétele. A mostani fertőzési kísérletünk sikertelenségének is valószínűleg az az oka, hogy a használt féregpopuláció összetétele már nem volt alkalmas a parazita kifejlődésére. Az echinactinomyxon termelő oligochaeta populáció faji összetételét megvizsgálva abban különböző *Tubifex tubifex* leszármazási vonalakat, *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Psammoryctides barbatus* és kis számban *Limnodrilus udekemianus* egyedeket tudtunk molekuláris módszerekkel és morfológiai alapon azonosítani. A *M. pavlovskii* gerinctelen gazdjaként a *L. udekemianus*-t azonosítottuk. A *Myxobolus pseudodispar* kevésértéjű férgekben zajló fejlődését célzó vizsgálataink során a későbbiekben is vizsgáltuk az oligochaeta tenyészetek fajösszetételét. Az eredmények azt sugallják, hogy a féregtenyészetek összetétele, talán a labor körülmények miatt is, idővel változik. A százhalombattai TEHAG halastavakból gyűjtött tenyészetben, amelyből a *M. pavlovskii* fertőzési kísérlethez használt oligochaeták is származtak, egy évvel a laborba kerülés után már nem tudtunk *L. udekemianus* egyedeket kimutatni. Ha a nyálkaspórások esetén a gerinces gazdákhöz hasonlóan a gerinctelen gazdáknál is jellemző a gazdaspecificitás, és a *L. udekemianus* az egyetlen fogékony oligochaeta gazdája a *M. pavlovskii*-nak, akkor ez megmagyarázza a fertőzési kísérletünk sikertelenségét. A fertőzés idejére a féregtenyészet fajösszetételében történt változás miatt egyszerűen nem állt rendelkezésre fogékony gazda, amelyben a parazita továbbfejlődhetett volna.

A nyálkaspórások életciklusának felderítését célzó kísérletes vizsgálatok számos nehézséggel járnak. Ezekben a fertőzési kísérletekben a negatív kontroll használata mellett

célszerű, ha a fertőzőendő halak és kevésertéjű férgek parazitamentes körülmények közül származnak. A parazitamentes állományok tenyésztése, nevelése és tartása körülményes és időigényes. A kevésertéjű férgenél tovább nehezíti a helyzetet, hogy a már megfertőződött oligochaeták akár egy évig is fertőzöttek maradhatnak, és termelhetik az atinospórákat (El-Matbouli és Hoffmann 1998, Hallett és mtsai 2005). Így biztosan parazitamentes féregállományhoz akkor juthatunk, ha kokonokról neveljük őket SPF körülmények között. De a fertőzési kísérlet még így is sikertelen lehet, mivel nem garantált, hogy a parazitára fogékony gazda képes szaporodni és fejlődni adott laboratóriumi körülmények között. Az eddigi kutatások szerint a nyálkaspórák gazda-specifikus élősködők, de fejlődési ciklusuk ma még csak részleteiben tisztázott, és a gerinctelen gazda a fajok többségénél nem ismert. Ezért a fertőzéshez használt oligochaeta állományok fajösszetétele, a fogékony gazdák esetleges hiánya miatt kritikus pontja lehet a kísérleteknek. Ezzel is magyarázható, hogy az eddig ismert több, mint 2100 nyálkaspórák közül csak 35 faj esetében sikerült az *in vivo* fejlődésüket kísérletesen reprodukálni. Lom és Dyková 2006-ban megjelent összefoglaló cikke 32 Myxozoa faj fejlődési ciklusáról tesz említést, míg három másik nyálkaspórák faj esetében azok fejlődését azóta írták le (Bartholomew és mtsai 2006, Kőie és mtsai 2007, Székely és mtsai 2009).

A *Myxobolus* fajok esetén a TAM a leggyakoribb aktinospóra típus (Lom és Dyková 2006), és csak kevés más típussal rendelkező faj fordul elő közöttük. Ilyen például a *M. cultus* (Yokoyama és mtsai 1995), a *M. dispar* (Molnár és mtsai 1999) és a *M. lentisuturalis* (Caffara és mtsai 2009). Ezek a fajok raabeia típusú aktinospórákkal rendelkeznek. A doktori dolgozat részét képező munkánk eredménye volt az első olyan fejlődési ciklus leírása, amelyben egy *Myxobolus* faj, a *M. pavlovskii* életciklusa során echinactinomyxon típusú spóra alakul ki (Marton és Eszterbauer 2011). Összefoglaló cikkek (Kent és mtsai 2001, Lom és Dyková 2006) echinactinomyxon típusú spórát említenek a *Sphaerospora truttae* (Özer és Wootten 2000) és egy *Zschokkella* faj (Yokoyama és mtsai 1991, 1993) fejlődési ciklusában. A *S. truttae* egy cölizoikus élősködő, amely filogenetikailag is távol helyezkedik el az édesvizekben előforduló szöveti nyálkaspórákuktól, mint amilyen a *M. pavlovskii* is. Emellett Holzer és mtsai-nak (2004) eredménye is megkérdőjelezi a korábban leírtakat, mivel a *S. truttae* aktinospóra stádiumának gondolt echinactinomyxon 18S rDNS szekvenciája csak 48,9%-ban volt hasonló a myxospóra szekvenciájával. Kent és mtsai (2001) valamint Lom és Dyková (2006) Yokoyama és mtsai 1991-es és 1993-as publikációira hivatkozva azt írják, hogy az aranyhal (*Carassius auratus*) epehólyagjában fejlődő *Zschokkella* faj aktinospóra alakja echinactinomyxon típusú. Ugyanakkor ezt a két hivatkozott cikket átolvasva semmilyen utalást nem találtunk erre az eredményre vonatkozólag.

A *Myxobolus pavlovskii* fejlődését már korábban vizsgálták Ruidish és mtsai (1991). Az ő eredményeik alapján a *M. pavlovskii* aktinospóra alakja hexactinomyxon típusnak bizonyult,

míg a saját eredményünk ennél a parazitánál echinactinomyxon típusú aktinospóra kialakulását bizonyította. Ruidish és mtsai munkájában a *M. pavlovskii* myxospórák természetes fertőzőttségű halakból származtak, emiatt fennállt a kontamináció lehetősége. Elképzelhető, hogy más nyálkaspórák fajjal is fertőztek voltak a busák, és ez a másik faj fejlődött tovább a kevésertéjű férgekben. Ez magyarázhatja az általuk kapott eltérő aktinospóra típust. Egy lehetséges faj a *Myxobolus drjagini*, amely a fehér busák fején a bőr alatti kötőszövetben fejlődik nagyméretű fehér cisztákat képezve. Ez a faj nagyon elterjedt az európai fehér busa populációkban, ezért lehetséges, hogy Ruidish és mtsai (1991) munkájában a boncoláskor, a *M. pavlovskii* myxospórák gyűjtése során a *M. drjagini* kontaminálta a fertőzéshez használt mintát. A fertőzési kísérleteinkben kapott myxospórák morfológiai tulajdonságai valamint a szövettani eredményeink is azt támasztják alá, hogy az általunk vizsgált nyálkaspórák a *M. pavlovskii*. Emellett Ruidish és mtsai munkájával ellentétben vizsgálatunkban molekuláris biológiai módszereket is használtunk az eredményeink megerősítésére. Ezen eredmények alapján úgy véljük, hogy a Ruidish és mtsai (1991) által leírt hexactinomyxon típusú aktinospóra kontamináció eredménye, és a *M. pavlovskii* valódi aktinospórája az általunk talált és leírt echinactinomyxon.

A doktori munka fő célja a nyálkaspórák kevésertéjű férgekben zajló fejlődésének és az ezzel összefüggő gazdafajlagosságnak a vizsgálata volt. Ehhez a pontyfélék gyakori élősködőjét a *Myxobolus pseudodispar*-t választottuk modellfajként. A rendelkezésünkre álló négy különböző eredetű oligochaeta állományból összesen 156 egyedet vizsgáltunk meg, hogy megállapíthassuk fogékonyságukat a *M. pseudodispar* fajra, és meghatározzuk a parazita oligochaeta gazdakörét. Emellett célunk volt a fertőzésre használt oligochaeta állományok faji összetételének megállapítása, és a jelen lévő férgek fajok és leszármazási vonalak parazitára való fogékonyságbeli különbségeinek detektálása. Vizsgáltuk, hogy a féregpopulációk faji összetétele hogyan befolyásolja a fertőzés kimenetelét. Valamint *in situ* hibridizációs vizsgálatokkal követtük a parazita fejlődésének útvonalát a kevésertéjű férgekben.

A már korábbi vizsgálatokban (Székely és mtsai 1999, 2001) megállapított gerinctelen gazdákön (*Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri*) kívül egyéb, a *M. pseudodispar*-ra fogékony oligochaeta fajokat sikerült azonosítanunk: a *Psammoryctides barbatus*-t és a *P. moravicus*-t. A *P. barbatus* egyedek között voltak olyanok, melyek amellet, hogy pozitív eredményt adtak a *M. pseudodispar*-specifikus PCR-rel, ürítették is a TAM típusú aktinospórákat. Sajnos csak két *P. moravicus* egyedet találtunk és vizsgáltunk munkánk során, de mindkettő pozitív volt a parazita-specifikus PCR-rel, és termeltek is aktinospórákat. Bár néhány oligochaeta faj esetében a vizsgált egyedszám alacsony volt, eredményeink azt sugallják, hogy a *M. pseudodispar* esetében hasonlóan a gerinces gazdaspektrumához a gerinctelen gazdák köre is széles. Számos oligochaeta faj játszhat szerepet a *M.*

*pseudodispar* életciklusában. Hasonlóan, a *M. cerebralis*-hoz a *T. tubifex* leszármazási vonalak közül az I-es és III-as leszármazási vonalba tartozó egyedek fogékonyak voltak a *M. pseudodispar*-ra is. Emellett a *T. tubifex* II-es leszármazási vonal egyedei is megfertőzhetőek voltak a *M. pseudodispar* myxospórákkal, és az aktinospórák is kifejlődtek bennük. A *T. tubifex* VI-os leszármazási vonalba tartozó kevésertéjű férgek sem a *M. cerebralis*, sem a *M. pseudodispar* esetében nem tűnnek fogékonyak. Ugyanakkor a *T. tubifex* IV-es, VI-os leszármazási vonalnál és a *P. hammoniensis* esetében sajnos csak néhány egyedet tudtunk vizsgálni, így eddigi eredményeinkből nem vonhatunk le messzemenő következtetéseket *M. pseudodispar*-ra való fogékonyaságukról. A fogékonyaság igazolásához további oligochaeta egyedek vizsgálata szükséges.

A fertőzési kísérletekben a *T. tubifex* V-ös leszármazási vonalba tartozó és a *Limnodrilus hoffmeisteri* egyedeknél sok esetben ki tudtuk mutatni a *M. pseudodispar* DNS-t az egyedekben, de a legtöbb esetben nem tapasztaltunk TAM termelést. Ezekben az esetekben a sporoplazma valószínűleg bejutott ugyan a kevésertéjű férgekbe, de a parazita fejlődése valahol megszakadt. Valószínűsíthető, hogy a féreg immunrendszere akadályozta meg a parazita fejlődését, így nem alakultak ki a halakat fertőzni képes aktinospóra alakok. Ezt a feltételezést megerősítik az ISH vizsgálataink eredményei is. A parazita DNS-hez specifikusan kötődő ISH próbák segítségével ugyanis kimutatható volt, hogy a kevésertéjű férgek sejtes immunválaszában résztvevő amöbociták bekebelezték a bejutó parazita sejteket. Ezek a kevésertéjű férgek tehát úgy tűnik, hogy képesek megszakítani a parazita fejlődési ciklusát. Ugyan fertőződnek a *M. pseudodispar*-ral, így csökkentve a fogékony oligochaetákra jutó myxospóra mennyiséget, ugyanakkor nem fejlődik ki bennük a halakat fertőzni képes aktinospóra stádium. Hasonló következtetésre jutottak Beauchamp és mtsai (2006) és Baxa és mtsai (2008) is, amikor a különböző kevésertéjű férgek fogékonyaságát vizsgálták a *M. cerebralis*-ra. Parazitára rezisztens és fogékony oligochaetákat együtt tartva, a fertőzésük után alacsonyabb triactinomyxon termelést tapasztaltak, mint a tiszta, csak fogékony egyedekből álló féregállományok fertőzése esetén. Eredményeik, összhangban saját eredményeinkkel azt mutatják, hogy a fertőzéshez használt féregállományok összetétele nagymértékben tudja befolyásolni a nyálkaspórák fertőzés kimenetelét.

A kevésertéjű férgek molekuláris azonosítása során kapott mt 16S rDNS szekvenciákat felhasználva megvizsgáltuk a tenyészetekben előforduló oligochaeták rokonsági viszonyait is. Ezek a filogenetikai eredmények egybevágóak a korábban közölt filogenetikai vizsgálatok eredményeivel. A *T. tubifex* minták szekvenciái a Sturmbauer és mtsai (1999) és Beauchamp és mtsai (2001) által már leírt csoportoknak megfelelően helyeződtek el a filogenetikai fákban. Az általuk is meghatározott hat leszármazási vonalba tartozó *T. tubifex*-eken kívül találtunk két olyan egyedet, melyek az V-ös leszármazási vonalba tartozó egyedekhez álltak a legközelebb, ugyanakkor 4,7-5,3%-os volt a mt 16S rDNS

szekvenciabeli eltérés. Ez sokkal nagyobb eltérés, mint amit a hat leszármazási vonalon belül eddig találtunk, emiatt feltételezhető, hogy még több leszármazási vonal létezhet az eddig leírtakon kívül is. Mivel a munkánk során csak két ilyen egyedet találtunk, további vizsgálatok szükségesek, hogy az újabb, különálló *T. tubifex* csoportok létezését bizonyosnak vehessük. A filogenetikai elemzések lehetőséget adtak a fogékony és nem fogékony féreg fajok rokonsági kapcsolatainak vizsgálatára is. A fogékony fajok és leszármazási vonalak nem különültek el a kevésbé fertőzhető csoportoktól a filogenetikai fákban. Eredményeink tehát azt mutatják, hogy nincs összefüggés a különböző oligochaeta fajok és leszármazási vonalak rokonsági viszonyai és *M. pseudodispar*-ra való fogékonyasága között.

Egy vizsgált féreg esetében, amelyet Crottini és mtsai (2008) által leírt csoportosítás szerint genetikailag a *T. tubifex* 4-es leszármazási vonalba volt besorolható, morfológiai alapon *Potamothrix bavaricus*-ként volt azonosítható. Ezt a hibás fajmeghatározást a cikk 2008-as megjelenése óta a szerzők is észrevették, és javították a génbanki leírásban. Más esetben is találtunk ellentmondást a molekuláris biológiai és a morfológiai eredmények között. Egy általunk vizsgált, morfológiailag *Limnodrilus claparedeanus*-nak meghatározott egyed a mt 16S rDNS szekvenciája alapján 100%-ban megegyezett egy korábbi molekuláris vizsgálatban (Beauchamp és mtsai 2001) *L. cervix*-ként azonosított oligochaeta mintával. Ezek az ellentmondások is azt mutatják, hogy a kevésertéjű férgek nehéz morfológiai határozása miatt számos rosszul azonosított oligochaeta szekvenciája lehet a génbankban így nehezítve a molekuláris alapon történő beazonosításukat.

Molekuláris és filogenetikai elemzéseink eredménye megerősíti, hogy a *Limnodrilus hoffmeisteri* gyűjtőfaj (Beauchamp és mtsai 2001). Az mt 16S rDNS szekvenciákban jelentős különbségek voltak tapasztalhatóak. A doktori munka során megvizsgált 35 *L. hoffmeisteri* minta között a legnagyobb genetikai különbség 15,5% volt, ami nagyon hasonló a génbankban elérhető *L. hoffmeisteri* szekvenciák közti 14,3%-os különbséghez. Úgy tűnik, hogy a kevésertéjű férgek között számos faj valójában gyűjtőfaj, így sem a bonyolult morfológiai meghatározás, sem a molekuláris módszerek alkalmazása önmagában nem ad biztos eredményt a fajok meghatározásánál. Emellett valószínűsíthető, hogy a *L. hoffmeisteri* esetében is eltérő lehet a különböző 'genotípusokba' tartozó egyedek *M. pseudodispar*-ra való fogékonyasága. Ez magyarázhatja azt, hogy a *L. hoffmeisteri* egyedek egy része fertőzhető volt *M. pseudodispar*-ral, másik része viszont nem. Ennek bizonyítására még alaposabb, és több féregegyedre kiterjedő vizsgálatok szükségesek.

*In situ* hibridizációval a nyálkaspórások közül eddig csak a *M. cerebralis* faj esetében vizsgálták a kevésertéjű férgen belüli fejlődés útvonalát (Antonio és mtsai 1998, 1999). A szerzők ISH módszert dolgoztak ki a parazita kimutatására a hal és az oligochaeta gazdában, amely alkalmasnak bizonyult a korai fejlődési stádiumok kimutatására is, és a

parazita megtalálására mindkét gazdában. Munkánk során a *M. pseudodispar* férgen belüli fejlődését kívántuk követni ISH-val. Eredményeink valószínűsítik, hogy a bél hámján keresztül jut be a parazita a kevéssertéjű féregbe, és fejlődése is nagyrészt a bélhámban zajlik. Ez egybevág El-Matbouli és Hoffmann (1998) *M. cerebralis* fejlődésének szövettani vizsgálatai során kapott eredményével. Kimutatták, hogy a parazita fejlődése a bélhám sejtei között zajlott, és az érett aktinospórák a bélen keresztül ürültek. Vizsgálataink során a férgek *M. pseudodispar*-ral való fertőzését követő első héten erős pozitív festődést tapasztaltunk a bélhám alapját képező extracelluláris mátrixban, ami valószínűsíti, hogy ez a réteg részt vesz a parazita hosszanti irányú terjedésében a bélhám mentén. Egy másik érdekes eredmény, hogy a kevéssertéjű férgek cölómában elhelyezkedő fagocitáló sejtei, az amöbociták egy része a fertőzést követő első héten erőteljes festődést mutatott. Ezek a sejtek a férgek sejt-immunválaszában játszanak szerepet, mégpedig az idegen testek és kórokozók bekebelezésével (Bilej és mtsai 2010). Vizsgálati eredményeink azt mutatják, hogy ezek az immunsejtek bekebelezik a nyálkaspórák parazitákat, tehát a kevéssertéjű férgek immunrendszere reagál az élősködőre. Sajnos az ISH során az egy időpontban vizsgált 5 féreg egyed együtt lett beágyazva, így a fogékony és nem fogékony egyedek elkülönítésére nem volt mód. Ezért sajnos a sejt-immunválaszbeli különbségeket nem sikerült vizsgálnunk a kétféle féregcsoportban.

Ez idáig csak nagyon kevesen tanulmányozták a nyálkaspórák gerinctelen gazdakörét, és gerinctelen gazdán belüli fejlődését. Az ilyen vizsgálatok ráadásul szinte csak a *M. cerebralis* esetében történtek. A doktori munka eredményei új információkat nyújtanak a *M. pseudodispar* gerinctelen gazdaköréről, a különböző kevéssertéjű féregfajok és leszármazási vonalak fogékonyágáról a *M. pseudodispar* fajra. Emellett rámutattunk arra is, hogy az oligochaeta tenyészet fajösszetétele jelentősen befolyásolhatja a nyálkaspórák fertőzés kimenetelét. A fogékony és kevésbé fogékony kevéssertéjű féreg gazdák filogenetikai vizsgálata, valamint a férgek belüli fejlődés útvonalának feltérképezése új adatokkal szolgálhat a nyálkaspórák fertőzések mechanizmusának megértéséhez. Továbbá megcáfoltuk a *Myxobolus pavlovskii* fejlődési ciklusáról korábban leírtakat. Megállapítottuk, és fertőzési kísérlettel és molekuláris módszerekkel is bizonyítottuk, hogy a *M. pavlovskii* aktinospóra alakja echinactinomyxon, és nem a korábban leírt hexactinomyxon típus.





## 7. Új tudományos eredmények és megállapítások

1. Cáfolva a korábbi eredményeket sikeres fertőzési kísérlettel kimutattuk, hogy a *Myxobolus pavlovskii* aktinospóra alakja echinactinomyxon típusú.
2. A fertőzési kísérlet eredményeit molekuláris módszerekkel is igazoltuk, és megszekvenáltuk a *M. pavlovskii* teljes 18S rDNS-ét.
3. Elsőként mutattunk ki olyan *Myxobolus* fajt, ami echinactinomyxon aktinospóra típussal rendelkezik. Valamint elsőként azonosítottuk a *M. pavlovskii* egyik kevésertéjű féreg gazdáját, a *Limnodrilus udekemianus*-t.
4. Elsőként vizsgáltuk a *Myxobolus pseudodispar* oligochaeta gazdakörét, és különítettünk el a *M. pseudodispar*-ra fogékony és kevésbé fogékony valamint biológiai szűrőként funkcionáló kevésertéjű féregfajokat és leszármazási vonalakat, és megállapítottuk, hogy a féregpopuláció fajösszetétele nagymértékben tudja befolyásolni a parazita fertőzés kimenetelét.
5. Elsőként igazoltuk, hogy a *Psammoryctides barbatus* és a *Psammoryctides moravicus* is fogékony a *M. pseudodispar* fajra. Valamint elsőként közöltünk mitokondriális 16S rDNS szekvenciákat *Psammoryctides moravicus*, *Potamothrix hammoniensis*, *Limnodrilus claparedeanus* kevésertéjű féregből.
6. A *M. pseudodispar* detektálásához faj-specifius PCR rendszert, az ISH-hoz pedig specifikus próbákat és egy rövid, 1 nap alatt kivitelezhető protokollt dolgoztunk ki és optimalizáltunk. Valamint elsőként vizsgáltuk a *M. pseudodispar* kevésertéjű férgen belüli fejlődésének útvonalát. Ennek során bizonyítottuk, hogy a parazita a bélhámon keresztül jut be az oligochaeta gazdába, és fejlődése is nagyrészt a bélhamban zajlik.
7. Az ISH vizsgálatok eredményei alapján feltételezzük, hogy a kevésertéjű férgek immunrendszere reagál a parazitára, mivel sejtes immunválaszban résztvevő amöbociták bekebelezik a bejutó parazitákat.



## 8. Irodalomjegyzék

- Abdel-Aal A.A., Badawy G.A., Gattas M.W.: **Light and electron microscopic studies on myxosporean parasites of some marine fishes with description of two new species**, Assiut Vet. Med. J., 44. 2115–2131, 2001.
- Akhmerov A.K.: **[On closely related species of a new myxosporean genus]**, Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 97. 1101–1103, 1954. (orosz nyelven)
- Antonio D.B., Andree K.B., McDowell T.S., Hedrick R.P.: **Defection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout and oligochaete tissues by using a nonradioactive *in situ* hybridization (ISH) protocol**, J. Aquat. Anim. Health, 10: 338–347, 1998.
- Antonio D.B., El-Matbouli M., Hedrick R.P.: **Detection of early developmental stages of *Myxobolus cerebralis* in fish and tubificid oligochaete hosts by *in situ* hybridization**, Parasitol. Res., 85, 942–944, 1999.
- Barta J.R., Martin D.S., Liberator P.A., Dashkevich M., Anderson J.W., Feighner S.D., Elbrecht A., Perkins-Barrow A., Jenkins M.C., Danforth H.D., Ruff M.D., Profous-Juchelka H.: **Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences**, J. Parasitol., 83. 262–271, 1997.
- Bartholomew J.L., Atkinson S.D., Hallett S.L.: **Involvement of *Manayunkia speciosa* (Annelida: Polychaeta: Sabellidae) in the life cycle of *Parvicapsula minibicornis*, a myxozoan parasite of Pacific salmon**, J. Parasitol., 92. 742–748, 2006.
- Bartholomew J.L., Atkinson S.D., Hallett S.L., Lowenstine L.J., Garner M.M., Gardiner C.H., Rideout B.A., Keel M.K., Brown J.D.: **Myxozoan parasitism in waterfowl**, Int. J. Parasitol., 38. 1199–1207, 2008.
- Baska F.: **Histological studies on the development of *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936 in the roach (*Rutilus rutilus*)**, Acta Vet. Hung., 35. 251–257, 1986.
- Baxa D.V., Kelley G.O., Mukkatira K.S., Beauchamp K.A., Rasmussen C., Hedrick R.P.: **Arrested development of the myxozoan parasite, *Myxobolus cerebralis*, in certain populations of mitochondrial 16S lineage III *Tubifex tubifex***, Parasitol. Res., 102. 219–228, 2008.
- Beauchamp K.A., Kathman R.D., McDowell T.S., Hedrick R.P.: **Molecular phylogeny of tubificid oligochaetes with special emphasis on *Tubifex tubifex* (Tubificidae)**, Mol. Phylogenet. Evol., 19. 216–224, 2001.
- Beauchamp K.A., Gay M., Kelley G.O., El-Matbouli M., Kathman R.D., Nehring R.B., Hedrick R.P.: **Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis*, and**

- genetic differences among populations of *Tubifex tubifex***, Dis. Aquat. Org., 51. 113–121, 2002.
- Beauchamp K.A., El-Matbouli M., Gay M., Georgiadis M.P., Nehring R.B., Hedrick R.P.: **The effect of cohabitation of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) populations on infections to *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa: Myxobolidae)**, J. Invertebr. Pathol., 91. 1–8, 2006.
- Bilej M., Procházková P., Šilerová M., Josková R.: **Earthworm Immunity**, In: Invertebrate Immunity. Szerk.: K. Söderhäll, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media. 2010. pp. 66–79.
- Boreham R.E., Hendrick S., O'Donoghue P.J., Stenzel D.J.: **Incidental finding of *Myxobolus* spores (Protozoa: Myxozoa) in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms**, J. Clin. Microbiol., 36. 3728–3730, 1998.
- Browne R.K., Scheltinga D.M., Pomeroy M., Mahony M.: **Testicular myxosporidiasis in anurans, with a description of *Myxobolus fallax* n. sp.**, Syst. Parasitol., 52. 97–110, 2002.
- Caffara M., Raimondi E., Florio D., Marcer F., Quaglio F., Fioravanti M.L.: **The life cycle of *Myxobolus lentisuturalis* (Myxozoa: Myxobolidae), from goldfish (*Carassius auratus auratus*), involves a Raabeia-type actinospore**, Folia Parasitol., 56. 6–12, 2009.
- Chapman P.M., Farrell M.A., Brinkhurst R.O.: **Relative tolerances of selected aquatic oligochaetes to individual pollutants and environmental factors**, Toxicology 2. 47–67, 1982.
- Chapman P.M., Brinkhurst R.O.: **Hair today gone tomorrow: induced chaetal changes in tubificid oligochaetes**, Hydrobiologia 155. 45–55, 1987.
- Corpet F.: **Multiple sequence alignment with hierarchical clustering**, Nucleic Acids Res., 16. 10881–10890, 1988.
- Crottini A., Marotta R., Barbuto M., Casiraghi M., Ferraguti M.: **The world in a river? A preliminary analysis of the 16S rDNA variability of *Tubifex* species (Clitellata: Tubificidae) from the Lambro River**, Mol. Phylogenet. Evol., 48. 1189–1203, 2008.
- Csaba Gy.: **An unidentifiable extracellular sporozoan parasite from the blood of the carp**, Parasitol. Hung., 9. 21–24, 1976.
- Duncan A.E., Garner M.M., Bartholomew J.L., Reichard T.A., Nordhausen R.W.: **Renal Myxosporidiasis in Asian Horned Frogs (*Megophrys nasuta*)**, J. Zoo Wildlife Med., 35. 381–386, 2004.
- Dyková I., Lom J.: **Review of pathogenic myxosporeans in intensive culture of carp (*Cyprinus carpio*) in Europe**, Folia Parasitol., 36. 289–307, 1988.

- Dyková I., Týmľ T., Fiala I., Lom J.: **New data on *Soricimyxum fegeti* (Myxozoa) including analysis of its phylogenetic position inferred from the SSU rRNA gene sequence**, Folia Parasitol., 54. 272–276, 2007.
- Eiras J.C., Molnár K., Lu Y.S.: **Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1982 (Myxozoa: Myxosporae: Myxobolidae)**, Syst. Parasitol., 61. 1–46, 2005.
- El-Mansy A., Székely Cs., Molnár K.: **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, 1998a.
- El-Mansy A., Székely Cs., Molnár K.: **Studies on the occurrence of actinosporean stages of myxosporeans in Lake Balaton, Hungary, with the description of triactinomyxon, raabeia, and aurantiactinomyxon types**, Acta Vet. Hung., 46. 437–450, 1998b.
- El-Matbouli M., Hoffmann R.W.: **Light and electron microscopic studies on the chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex***, Int. J. Parasitol., 28. 195–217, 1998.
- El-Matbouli M., Hoffmann R.W., Schoel H., McDowell T.S., Hedrick R.P.: **Whirling disease: host specificity and interaction between the actinosporean stage of *Myxobolus cerebralis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss***, Dis. Aquat. Org., 35. 1–12, 1999.
- Eszterbauer E.: **Halparazita nyálkaspórások (Myxosporae) morfológiai és molekuláris biológiai vizsgálata**. Doktori értekezés. ELTE TTK, Budapest, 2002.
- Eszterbauer E.: **Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporae) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity**, Dis. Aquat. Org., 58. 35–40, 2004.
- Eszterbauer E., Benkő M., Dán Á., Molnár K.: **Identification of fish parasitic *Myxobolus* (Myxosporae) species using a combined PCR-RFLP method**, Dis. Aquat. Org., 44. 35–39, 2001.
- Eszterbauer E., Benkő M., Molnár K.: **Differentiation of morphologically very similar gill parasite *Myxobolus* species (Myxosporae) by restriction fragment length polymorphism method (PCR -RFLP)**, Magy. Állatorv. Lapja, 124. 361–366, 2002.
- Eszterbauer E., Székely Cs.: **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, 2004.
- Eszterbauer E., Marton Sz., Rácz O.Z., Letenyey M., Molnár K.: **Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification**, Syst. Parasitol., 65. 97–114, 2006.

- Eszterbauer E., Kallert D.M., Grabner D., El-Matbouli M.: **Differentially expressed parasite genes involved in host recognition and invasion of the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa)**, *Parasitology*, 136. 367–77, 2009.
- Evans N.M., Holder M.T., Barbeitos M.S., Okamura B., Cartwright P.: **The phylogenetic position of Myxozoa: exploring conflicting signals in phylogenomic and ribosomal data sets**, *Mol. Biol. Evol.*, 27. 2733-2746, 2010.
- Fiala I.: **The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis**, *Int J Parasitol.*, 36.1521–34, 2006.
- Fiala I., Bartošová P.: **Myxozoan relationships among Metazoa: conflicting phylogenetic signals of ribosomal RNA genes and protein coding genes**, *Parassitologia*, 49. 149, 2007.
- Friedrich C., Ingolic E., Freitag B., Kastberger G., Hohmann V., Skofitsch G., Neumeister U., Kepka O.: **A myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole, *Talpa europaea* L., 1758 (Vertebrata, Mammalia)**, *Parasitology* 121. 483–92, 2000.
- Garner M.M., Bartholomew J.L., Whipps C.M., Nordhausen R.W., Raiti P.: **Renal Myxozoanosis in crowned river turtles *Hardella thurjii*: Description of the putative agent *Myxidium hardella* n. sp. by histopathology, electron microscopy, and DNA sequencing**, *Vet. Pathol.*, 42. 589–595, 2005.
- Grabner D.S., El-Matbouli M.: **Comparison of the susceptibility of brown trout (*Salmo trutta*) and four rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) strains to the myxozoan *Tetracapsuloides bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease (PKD)**, *Vet. Parasitol.*, 165. 200–206, 2009.
- Griffin M.J., Camus A.C., Wise D.J., Greenway T.E., Mauel M.J., Pote L.M.: **Variation in susceptibility to *Henneguya ictaluri* infection by two species of catfish and their hybrid cross**, *J. Aquat. Anim. Health*, 22. 21–35, 2010.
- Hall T.A.: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**, *Nucl. Acids Symp. Ser.*, 41. 95–98, 1999.
- Hallett S.L., Diamant A.: **Ultrastructure and small-subunit ribosomal DNA sequence of *Henneguya lesteri* n. sp. (Myxosporea), a parasite of sand whiting *Sillago analis* (Sillaginidae) from the coast of Queensland, Australia**, *Dis. Aquat. Org.*, 46. 197–212, 2001.
- Hallett S.L., Atkinson S.D., Erséus C., El-Matbouli M.: **Dissemination of triactinomyxons (Myxozoa) via oligochaetes used as live food for aquarium fishes**, *Dis. Aquat. Org.*, 65. 137–152, 2005.
- Hanelt B., Van Schyndel D., Adema C.M. Lewis L.A., Loker E.S.: **The phylogenetic position of *Rhopalura ophiocomae* (Orthonectida) based on 18S rDNA sequence analysis**, *Mol. Biol. Evol.*, 13. 1187–1191, 1996.

- Hartigan A., Phalen D.N., Slapeta J.: **Museum material reveals a frog parasite emergence after the invasion of the cane toad in Australia**, *Parasit.Vectors.*, 3. 50, 2010.
- Hartigan A., Fiala I., Dyková I., Jirků M., Okimoto B., Rose K., Phalen D.N., Šlapeta J.: **A suspected parasite spill-back of two novel *Myxidium* spp. (Myxosporea) causing disease in Australian endemic frogs found in the invasive Cane toad**, *PLoS One*. 6(4):e18871. 2011.
- Hedrick, R.P., McDowell T.S., Mukkatira K., Georgiadis M.P., MacConnell. E.: **Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease**, *J. Aquat. Anim. Health*, 11. 330–339, 1999a.
- Hedrick, R.P., McDowell T.S., Gay M., Marty G.D., Georgiadis M.P., MacConnell E.: **Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease**, *Dis. Aquat. Org.*, 37.173–183, 1999b.
- Hedrick R.P., McDowell T.S., Marty G.D., Fosgate G.T., Mukkatira K., Myklebust K., El-Matbouli M.: **Susceptibility of two strains of rainbow trout (one with suspected resistance to whirling disease) to *Myxobolus cerebralis* infection**, *Dis. Aquat. Org.*, 55. 37–44, 2003.
- Hessen E.M., Zamzame M.L.: ***Myxobolus* sp.: a possible new opportunistic parasite in immunocompromised patients in Ismailia**, *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 34. 925–930, 2004.
- Hillis D.M., Dixon T.: **Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference**, *Quart. Rev. Biol.*, 66. 411–453, 1991.
- Holland J.W., Okamura B., Hartikainen H., Secombes C.J.: **A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans**, *Proc. Biol. Sci.*, 278. 546-553, 2011.
- Holmquist C.: **What is *Tubifex tubifex* (O.F. Müller) (Oligochaeta, Tubificidae)?**, *Zool. Scr.* 12. 187–201, 1983.
- Holzer A.S., Sommerville C., Wootten R.: **Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences**, *Int. J. Parasitol.*, 34. 1099–1111, 2004.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F.: **MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees**, *Bioinformatics*, 17. 754–755, 2001.
- Janiszewska J.: **Actinomyxidia II : New systematics, sexual cycle, description of new genera and species**, *Zool. Pol.*, 8. 3–34, 1957.
- Jiménez-Guri E., Philippe H., Okamura B., Holland P.W.: ***Buddenbrockia* is a cnidarian worm**, *Science*, 317. 116–118, 2007.

- Jirků M., Bolek M.G., Whipps C.M., Janovy J. Jr., Kent M.L., Modrý D.: **A new species of *Myxidium* (Myxosporea: Myxidiidae), from the western chorus frog, *Pseudacris triseriata triseriata*, and Blanchard's cricket frog, *Acris crepitans blanchardi* (Hylidae), from eastern Nebraska: morphology, phylogeny, and critical comments on amphibian *Myxidium* taxonomy**, J. Parasitol., 92. 611–619, 2006.
- Jirků M., Bartošová P., Kodádková A., Mutschmann F.: **Another chloromyxid lineage: molecular phylogeny and redescription of *Chloromyxum careni* from the Asian horned frog *Megophrys nasuta***, J. Eukaryot. Microbiol., 58. 50–59, 2011.
- Kallert D.M., El-Matbouli M., Haas W.: **Polar filament discharge of *Myxobolus cerebralis* actinospores is triggered by combined non-specific mechanical and chemical cues**, Parasitology, 131. 609–616, 2005.
- Kallert D.M., Ponader S., Eszterbauer E., El-Matbouli M., Haas W.: **Myxozoan transmission via actinospores: new insights into mechanisms and adaptations for host invasion**, Parasitology, 134. 1741–1750, 2007.
- Kallert D.M., Eszterbauer E., Grabner D., El-Matbouli M.: ***In vivo* exposure of susceptible and non-susceptible fish species to *Myxobolus cerebralis* actinospores reveals non-specific invasion behaviour**, Dis. Aquat. Org., 84. 123–30, 2009.
- Kallert D.M., Bauer W., Haas W., El-Matbouli M.: **No shot in the dark: myxozoans chemically detect fresh fish**, Int. J. Parasitol., 41. 271–276, 2011.
- Katayama T., Wada H., Furuya H., Satoh N., Yamamoto M.: **Phylogenetic position of the dicyemid mesozoa inferred from 18S rDNA sequences**, Biol. Bull., 189. 81–90, 1995.
- Kent M.L., Andree K.B., Bartholomew J.L., El-Matbouli M., Desser S.S., Delvin S.H., Feist, S.W., Hedrick R.P., Hoffmann R.W., Khattra J., Hallett S.L., Lester R.J.G., Longshaw M., Pal enzuela O., Siddal M.E., Xiao C.: **Recent advances in our knowledge of Myxozoa**, J. Eukaryot. Microbiol., 48. 395–413, 2001.
- Kim J., Kim W., Cunningham C.W.: **A new perspective on lower metazoan relationships from 18S rDNA sequences**, Mol. Biol. Evol., 16. 423–427, 1999.
- Køie M., Karlsbakk E., Nylund A.: **A new genus *Gadimyxa* with three new species (Myxozoa, Parvicapsulidae) parasitic in marine fish (Gadidae) and the two-host life cycle of *Gadimyxa atlantica* n. sp.**, J. Parasitol., 93. 1459–1467, 2007.
- Kovács-Gayer É., Csaba Gy., Békési L., Bucsek M., Szokolcai J., Molnár K.: **Studies on the protozoan etiology of swimbladder inflammation in common carp fry**, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 2. 22–24, 1982.
- LaFont M.: **Oligochaete communities as biological descriptors of pollution in fine sediments of rivers**, Hydrobiologia 115. 127–129, 1984.



- Lom J., Dyková I.: **Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species**, Folia Parasitol., 53. 1–36. 2006.
- Lowenstine L.J., Rideout B.A., Gardner M., Busch M., Mace M., Bartholomew J., Gardiner C.H.: **Myxozoanosis in waterfowl: a new host record?**, Proc. Am. Soc. Zoo Vet., 2002: 86–87. 2002.
- Marcucci C., Caffara M., Goretti E.: **Occurrence of actinosporean stages (Myxozoa) in the Nera River system (Umbria, central Italy)**, Parasitol. Res., 105. 1517–1530, 2009.
- Markiw M.E.: **Experimentally induced whirling disease. I. Dose response of fry and adults of rainbow trout exposed to the triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis***, J. Aquat. Anim. Health., 4. 40–43, 1992.
- Marton Sz., Eszterbauer E.: **The development of *Myxobolus pavlovskii* (Myxozoa: Myxobolidae) includes an echinactinomyxon-type actinospore**, Folia Parasitol., 58. 157–63, 2011.
- Marques A.: **Contribution à la connaissance des Actinomyxides: ultrastructure, cycle biologique, systématique**, PhD. Thesis, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France, 218. pp. 1984.
- Milne I., Lindner D., Bayer M., Husmeier D., McGuire G., Marshall D., Wright F.: **TOPALI v2: a rich graphical interface for evolutionary analyses of multiple alignments on HPC clusters and multi-core desktops**, Bioinformatics 25. 126–127, 2009.
- Molnár K.: **Protozoan diseases of the fry of herbivorous fishes**, Acta Vet. Hung., 21. 1–14, 1971.
- Molnár K.: **Gill sphaerosporosis in the common carp and grasscarp**, Acta Vet. Sci. Hung., 27. 99–133, 1979a.
- Molnár K.: ***Myxobolus pavlovskii* (Achmerov, 1954) (Myxosporidia) infection in the silver carp and bighead**, Acta Vet. Sci. Hung., 27. 207–216, 1979b.
- Molnár K.: **Renal sphaerosporosis in the common carp *Cyprinus carpio* L.**, J. Fish Dis., 11. 489–498, 1980.
- Molnár K.: **Further evidence that C-blood protozoan of common carp are stages of *Sphaerospora renicola* Dyková and Lom, 1982**, Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 8. 3–4, 1988a.
- Molnár K.: **Presporogonic development of *Sphaerospora renicola* Dyková and Lom, 1982**, J. Fish Dis., 11. 489–498, 1988b.
- Molnár K.: **Site preference of myxosporeans in the gill**, Dis. Aquat. Org., 48. 197–207, 2002.
- Molnár K., Kovács-Gayer É.: **The pathogenicity and development within the host fish of *Myxobolus cyprini* Doflein, 1898**, Parasitology, 90. 549–555, 1985.

- Molnár K., El-Mansy A., Székely Cs., Baska F.: **Development of *Myxobolus dispar* (Myxosporea: Myxobolidae) in an oligochaete alternate host *Tubifex tubifex***, Folia Parasitol., 46. 15–21, 1999.
- Molnár K., Eszterbauer E., Székely Cs., Dán Á., Harrach B.: **Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish**, J. Fish Dis., 25. 643–652, 2002.
- Moncada L.I., Lopez M.C., Murcia M.I., Nichols S., Leon F., Guio O.L., Corredor A.: ***Myxobolus* sp. another opportunistic parasite in immunosuppressed patients?**, J. Clin. Microbiol., 39. 1938–1940, 2001.
- Monteiro A.S., Okamura B., Holland P.W.H.: **Orphan worm finds a home: *Buddenbrockia* is a myxozoan**, Mol. Biol. Evol., 19. 968–971, 2002.
- Mutschmann F.: **Pathological changes in African hyperoliid frogs due to a myxosporidian infection with a new species of *Hoferellus* (Myxozoa)**, Dis Aquat Org., 60. 215–222, 2004.
- Negredo C., Mulcahy M.F.: **Actinosporean infections in oligochaetes in a river system in southwest Ireland with descriptions of three new forms**, Dis. Aquat. Org., 47. 67–77, 2001.
- Néron B., Ménager H., Maufrais C., Joly N., Maupetit J., Letort S., Carrere S., Tuffery P., Letondal C.: **Mobylye: a new full web bioinformatics network**, Bioinformatics, 25. 3005–3011, 2009.
- Okamura B., Curry A., Wood T.S., Canning E.U.: **Ultrastructure of *Buddenbrockia* identifies it as a myxozoan and verifies the bilaterian origin of the Myxozoa**, Parasitology, 124. 215–223, 2002.
- Oumouna M., Hallett S.L., Hoffmann R.W., El-Matbouli M.: **Seasonal occurrence of actinosporeans (Myxozoa) and oligochaetes (Annelida) at a trout hatchery in Bavaria, Germany**, Dis. Aquat. Organ., 69. 213–225, 2003.
- Özer A., Wootten R.: **The life cycle of *Sphaerospora truttae* (Myxozoa: Myxosporea) and some features of the biology of both the actinosporean and myxosporean stages**, Dis. Aquat. Org., 40. 33–39, 2000.
- Özer A., Wootten R., Shinn A.P.: **Infection prevalence, seasonality and host specificity of actinosporean types (Myxozoa) in an Atlantic salmon fish farm located in Northern Scotland**, Folia Parasitol., 49. 263–268, 2002.
- Prunescu C.C., Prunescu P., Pucek Z., Lom J.: **The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegeati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha)**, Folia Parasitol., 54. 159–64, 2007.

- Rasmussen C., Zickovich J., Winton J.R., Kerans B.L.: **Variability in triactinomyxon production from *Tubifex tubifex* populations from the same mitochondrial DNA lineage infected with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease in salmonids**, J. Parasitol., 94. 700–708, 2008.
- Reda E.S.: ***Chloromyxum aegypticus* n. sp. (Myxozoa: Chloromyxidae) infecting the testicular tissue of the Egyptian toad, *Bufo regularis* (Amphibia: Bufonidae), and its pathogenicity**, Parasitol. Res., 107. 1299–1306, 2010.
- Reynoldson T.B., Thompson S.P., Bamsey J.L.: **A sediment bioassay using *Tubifex tubifex***, Environ. Toxicol. Chem., 10. 1061–1072, 1991.
- Ruidish S., El-Matbouli M., Hoffmann R.W.: **The role of tubificid worms as an intermediate host in the life cycle of *Myxobolus pavlovskii* (Akhmerov, 1954)**, Parasitol. Res., 77. 663–667, 1991.
- Schlegel M., Lom J., Stechmann A., Bernhard D., Leipe D., Dyková I., Sogin M.L.: **Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: Evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria**, Archiv für Protistenkunde, 147. 1–9, 1996.
- Shirakashi S., El-Matbouli M.: ***Myxobolus cerebralis* (Myxozoa), the causative agent of whirling disease, reduces fecundity and feeding activity of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta)**, Parasitology, 136. 603–613, 2009.
- Siddall M.E., Martin D.S., Bridge D., Desser S.S., Cone D.K.: **The demise of a phylum of protists: phylogeny of the Myxozoa and other parasitic Cnidaria**, J. Parasitol., 81. 961–967, 1995.
- Siddall M.E., Whiting M.F.: **Long-branch abstractions**, Cladistics, 15. 9–24, 1999.
- Smothers J.F., von Dohlen C.D., Smithe L.H.Jr., Spall R.D.: **Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans**, Science, 265. 1719–1721, 1994.
- Staden R.: **The Staden sequence analysis package**, Mol. Biotechnol., 5. 233–241, 1996.
- Steinbach Elwell L.C., Kerans B.L., Rasmussen C., Winton J.R.: **Interactions among two strains of *Tubifex tubifex* (Oligochaeta: Tubificidae) and *Myxobolus cerebralis* (Myxozoa)**, Dis. Aquat. Org., 68. 131–139, 2006.
- Sturmbauer C., Opadiya G.B., Niederstatter H., Riedmann A., Dallinger R.: **Mitochondrial DNA reveals cryptic oligochaete species differing in cadmium resistance**, Mol. Biol. Evol., 16. 967–974, 1999.
- Styer E.L., Harrison L.R., Burtle G.J.: **Six new species of actinomyxids from *Dero digitata*. International Workshop on Myxosporea, October 6–8, 1992, České Budějovice, Czech Republic (abstract). 1992.**

- Sundara Rajulu G., Radha R.S.P.: **A myxosporidian parasite *Symmetrula cochinealis* gen. et sp. nov. from an invertebrate host, *Dactylopius indicus* (a cochineal bug)**, Ann. Mag. Nat. Hist., 13. 167–171, 1966.
- Szczepaniak K., Tomczuk K., Studzińska M.: **Cutaneous myxosporidiasis in the Australian green tree frog (*Litoria caerulea*)**, Parasitol Res., 108. 489–92, 2011.
- Székely Cs., Molnár K., Eszterbauer E., Baska F.: **Experimental detection of the actinospores of *Myxobolus pseudodispar* (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts**, Dis. Aquat. Org., 38. 219–224, 1999.
- Székely Cs., Molnár K., Rácz O.: **Complete developmental cycle of *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova) (Myxosporea: Myxobolidae)**, J. Fish Dis., 24. 461–468, 2001.
- Székely Cs., Urawa S., Yokoyama H.: **Occurrence of actinosporean stages of myxosporeans in an inflow brook of a salmon hatchery in the Mena River System, Hokkaido, Japan**, Dis. Aquat. Organ., 49.153–160, 2002
- Székely Cs., Hallett S.L., Atkinson S.D., Molnár K.: **Complete life cycle of *Myxobolus rotundus* (Myxosporea: Myxobolidae), a gill myxozoan of common bream *Abramis brama***, Dis. Aquat. Org., 85. 147–155, 2009.
- Székely Cs., Cech G., Ostoros G., Gubányi A.: **First occurrence of myxozoan parasites in small mammals (*Sorex araneus* and *S. minutus*) in Hungary**, 15th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 12-16 September, 2011 Split, Croatia p. 436.
- Thelohan P.: **Recherches sur les Myxosporidies**, Bull. Sci. Fr. Belg., 26. 100–394, 1895.
- Thompson K.G.; Nehring R.B.; Bowden D.C.; Wygant T.: **Field exposure of seven species or subspecies of salmonids to *Myxobolus cerebralis* in the Colorado River, Middle Park, Colorado**, J. Aquat. Anim. Health, 11. 312-329, 1999.
- Upton S.J., Freed P.S., Freed D.A., McAllister C.T., Goldberg S.R.: **Testicular myxosporidiasis in the flat-backed toad, *Bufo maculatus* (Amphibia: Bufonidae), from Cameroon, Africa**, J Wildl Dis., 28. 326–9, 1992.
- Weill, R.: **L'interpretation des Cnidosporidies et la valeur taxonomyque de leur cnidome. Leur cycle compare a la phase larvaire des narcomeduses Cuninides**, Travaux de la Station Zoologique de Wimereux 13. 727–744, 1938.
- Whipps C.M., Adlard R.D., Bryant M.S., Lester R.J.G., Findlay V., Kent M.L.: **First report of three *Kudoa* species from eastern Australia: *Kudoa thyrsites* from mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyrsites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*)**, J. Eukaryot. Microbiol., 50. 215–219, 2003.
- Xiao C., Dessler S.S.: **Actinosporean stages of myxozoan parasites of oligochaetes from Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario: new forms of echinactinomyxon**,

- neoactinomyxon, aurantiactinomyxon, guyenotia, synactinomyxon, and antonactinomyxon**, J. Parasitol., 84. 1010–1019, 1998.
- Yokoyama H., Ogawa K., Wakabayashi H.: **A new collection method of actinosporeans – a probable infective stage of myxosporeans to fishes– from tubificids and experimental infection of goldfish with the actinosporean, Raabeia sp.**, Fish Pathol., 26. 133–138, 1991.
- Yokoyama H., Ogawa K., Wakabayashi H.: **Some biological characteristics of actinosporeans from the oligochaete *Branchiura sowerbyi***, Dis. Aquat. Org., 17. 223–228, 1993.
- Yokoyama H., Ogawa K., Wakabayashi H.: ***Myxobolus cultus* n. sp. (Myxosporea: Myxobolidae) in the goldfish *Carassius auratus* transformed from the actinosporean stage in the oligochaete *Branchiura sowerbyi***, J. Parasitol., 81. 446–451, 1995.
- Yokoyama H., Danjo T., Ogawa, K., Wakabayashi H.: **A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of viability of myxosporean and actinosporean spores**, J. Fish Dis., 20. 281–286, 1997.
- Yokoyama H., Masuda K.: ***Kudoa* sp. (Myxozoa) causing a post-mortem myoliquefaction of North-Pacific octopus *Paroctopus dofleini* (Cephalopoda: Octopodidae)**, Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol., 21. 266–268, 2001.
- Zrzavý J., Mihulka S., Kepka P., Bezdek A., Tietz D.: **Phylogeny of the Metazoa based on morphological and 18S ribosomal DNA evidence**, Cladistics, 14. 249–285, 1998.
- Zrzavý J., Hypša V.: ***Myxozoa, Polypodium*, and the origin of the Bilateria: The phylogenetic position of “Endocnidozoa” in light of the rediscovery of *Buddenbrockia***, Cladistics, 19. 164-169, 2003.



## 9. Tudományos publikációk

### 9.1. Lektorált, impakt faktorral rendelkező tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

1. Marton Sz., Eszterbauer E.: **The development of *Myxobolus pavlovskii* (Myxozoa: Myxobolidae) includes an echinactinomyxon-type actinospore**, Folia Parasitol., 58. 157–63, 2011. IF: 1,533
2. Marton Sz., Eszterbauer E.: **The susceptibility of diverse species of cultured oligochaetes for the fish parasite *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, (Myxozoa)**, J. Fish Dis., (megjelenés alatt) IF: 1,603
3. Marton Sz., Eszterbauer E.: **Hazai és nemzetközi eredmények a halparazita nyálkaspórássok (Myxozoa) gazdafajlagosságának kísérletes vizsgálatában**, Magy. Állatorv. Lapja, (megjelenés alatt) IF:0,300

### 9.2. Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztrakt vagy proceeding

1. Marton Sz., Kallert D., Eszterbauer E.: **The susceptibility of diverse species of cultured oligochaetes for the fish parasite, *Myxobolus pseudodispar***. 15th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 12-16th September 2011, Split, Croatia. Abstract No. O-068.
2. Eszterbauer E., Marton Sz.: **The intraoligochaete development of *Myxobolus pseudodispar* (Ph: Myxozoa)**. 15th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 12-16th September 2011, Split, Croatia. Abstract No. P-269.
3. Marton Sz., Eszterbauer E.: **The life cycle of *Myxobolus pavlovskii* (Myxozoa): a *Myxobolus* species with echinactinomyxon type actinospore**. 14th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 14-19th September 2009, Prague, Czech Republic. p. 081.

### 9.3. A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

#### 9.3.1. Lektorált folyóiratban megjelent tudományos közlemények

1. Molnár K., Marton Sz., Székely Cs., Eszterbauer E.: **Differentiation of *Myxobolus* spp. (Myxozoa: Myxobolidae) infecting roach (*Rutilus rutilus*) in Hungary**, Parasitol. Res., 107. 1137–1150, 2010. IF: 1,812
2. Bahri S., Marton Sz., Marques A., Eszterbauer E.: ***Henneguya tunisiensis* n. sp. (Myxosporidia: Bivalvulida), a new gill parasite of *Symphodus tinca* (L.) (Teleostei: Labridae) off Tunisia**, Syst. Parasitol., 76. 93–101, 2010. IF: 1,056
3. Baska F., Voronin V.N., Eszterbauer E., Müller L., Marton Sz., Molnár K.: **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, 2009. IF: 1,721
4. Molnár K., Eszterbauer E., Marton Sz., Cech G., Székely Cs.: ***Myxobolus erythrophthalmi* sp. n. and *Myxobolus shaharomae* sp. n. (Myxozoa: Myxobolidae) from the inner organs of rudd, *Scardinius erythrophthalmus* (L.) and bleak, *Alburnus alburnus* (L.)**, J. Fish Dis., 32. 219–231, 2009. IF: 1,697
5. Molnár K., Marton Sz., Eszterbauer E., Székely Cs.: **Description of *Myxobolus gayerae* sp. n. and re-description of *Myxobolus leuciscini* infecting the European chub from the Hungarian stretch of the river Danube**, Dis. Aquat. Org., 78. 147–153, 2007. IF: 1,598
6. Szénási Zs., Marton Sz., Kucsera I., Tánzos B., Horváth K., Orosz E., Lukács Z., Szeidemann Z.: **Preliminary investigation of the prevalence and genotype distribution of *Giardia intestinalis* in dogs in Hungary**, Parasitol. Res., 101. 145–152, 2007. IF: 1,512
7. Molnár K., Marton Sz., Eszterbauer E., Székely Cs.: **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, 2006. IF: 1,509
8. Eszterbauer E., Marton Sz., Rácz O.Z., Letenyi M., Molnár, K.: **Morphological and genetic differences among actinosporean stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification**, Syst. Parasitol., 65. 97–114, 2006. IF: 0,856

#### 9.3.2. Nemzetközi konferencia absztraktok

1. Eszterbauer E., Rónai Zs., Marton Sz., Ursu K., Baska F., Láng M.: **Dissemination of *Mycobacterium* spp. via commercial fish food**. 15th EAAP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, 12-16 September 2011, Split, Croatia. Abstract No. P-126.



2. Marton Sz., Eszterbauer E., Székely Cs., Molnár K.: **Morphological and phylogenetic studies on *Myxobolus* spp. infecting chub in Hungary.** *4th Croatian Congress of Microbiology with International Participation*, 24th-27th of September 2008, Zadar, Croatia.
3. Marton Sz., Eszterbauer E., Székely Cs., Molnár K.: **Comparative morphological and phylogenetic studies on *Myxobolus* spp. infecting chub.** *ISFP7*, 24th-28th of September 2007, Viterbo, Italy. *Parassitologia*, 49, Suppl.2:160.
4. Eszterbauer E., Marton Sz., Letenyei M., Rácz O., Molnár K.: **Morphological and genetic differences among actinosporean developmental stages of fish-parasitic myxosporeans (Myxozoa): difficulties of species identification.** *EMOP IX*, 18-23 July, 2004. Valencia, Spain. Abstract No. 1120.



## 10. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek dr. Eszterbauer Editnek, hogy mindvégig segítette és irányította a munkámat. Köszönöm Dr. Benkő Máriának, Dr. Harrach Balázsnak és Dr. Molnár Kálmánnak, hogy bármikor fordulhattam hozzájuk a felmerülő problémákkal.

Szeretnék köszönetet mondani a dinnyési halgazdaság vezetőjének Szabó Krisztiánnak, hogy ellátott minket az SPF halállományainkhoz szükséges ikrákkal és zseggel, dr. Tarmo Timmnek, az oligochaeták nemzetközileg elismert szakértőjének, hogy segítséget nyújtott a kevéssertéjű férgek morfológiai meghatározásában, és lehetővé tette, hogy én is betekinthessek az oligochaeta határozás rejtelseibe, valamint Mészáros Ágnesnek az oligochaeták paraffin blokkba történő beágyazásában nyújtott segítségével.

Köszönöm a Hal-parazitológia, a Molekuláris Virologia és Összehasonlító Virologia csoport munkatársainak és szakdolgozóinak, hogy mindig számíthattam a segítségükre, és baráti légkört teremtettek a munkámhoz. Szeretném megköszönni Kovács Endrének az évek során 'nyelvi lektorként' nyújtott segítségét, valamint dr. Papp Tibornak dolgozatom lelkes és lelkiismeretes átnézését. Köszönöm Bacskó Tibornak, hogy ügyes-bajos dolgaimmal mindig fordulhattam hozzá, és biztosította a vidám hangulatot az Állatházban is.

Külön köszönöm Ballmann Mónikának, Forró Barbarának, Illés Ildikónak, Tóth Renátának és Doszpoly Andornak, hogy nemcsak munkatársaim, hanem barátaim is lettek.