

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Nyálkaspórák (Myxozoa) halparaziták
gazdafajlagosságának kísérletes és molekuláris vizsgálata

Doktori értekezés tézisei

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

Marton Szilvia

Bevezetés

A nyálkaspórások (Myxozoa) a halak gyakori élősködői, eddig 62 nembe tartozó több mint 2000 nyálkaspórás faj ismert, melyek közül számos faj jelentős gazdasági károkat okoz. Az egyik legjobban kutatott nyálkaspórás faj a pisztrángok kergekórját okozó *Myxobolus cerebralis*, ami jelentős elhullást idéz elő az amerikai és nyugat-európai halgazdaságokban és természetes vízi pisztráng állományokban. A nyálkaspórások sok 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*, a *Sphaerospora molnari*, amely a kopoltyú-sphaerosporosis okozója, valamint a *Sphaerospora renicola*, mely az úszóhólyag-gyulladás kiváltója. A busa-fajok kopoltyúján fejlődő *M. pavlovskii* és a fehér busa feji kötőszöveteinek *M. drjagini* bántalma szintén gyakori hazánkban. A nyálkaspórás kutatások a kórtani vizsgálatok mellett elsősorban a fajok fejlődési ciklusára, valamint taxonómiai és filogenetikai csoportosítására irányulnak. A nyálkaspórásokra jellemző kétgazdás fejlődésmenet, ami egy gerinctelen (általában kevésértéjű 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, és kevés figyelmet fordítottak a myxospóra stádiumok bejutásának és fejlődésének vizsgálatára a kevésértéjű 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. A férgeket fertőző myxospórák esetében ilyen vizsgálatok ezideig nem történtek, ezért a doktori munka keretében elsősorban a nyálkaspórások kevésértéjű férgekben zajló fejlődését kívántuk vizsgálni kísérletes és molekuláris módszerek alkalmazásával. A munkához a Magyarországon gyakori bodorkából (*Rutilus rutilus*) származó *Myxobolus pseudodispar* nyálkaspórás parazitát választottuk, és kísérleti rendszerben kevésértéjű férgeket fertőztünk vele. Vizsgáltuk a kevésértéjű 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.

Anyagok és módszerek

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. Négy különböző eredetű oligochaeta állományt használtunk a kísérleteinkben. Közülük kettőt az azóta megszűnt Százhalombattai Temperált Vízű Halgazdaságban (TEHAG) gyűjtöttünk, halastavakból, illetve egy halágyból. Egy állomány a németországi Aufseß-ben lévő pisztrángos halgazdaság közelében lévő csatornákból származott. Valamint a munka során egy élő haleleségként kereskedelmi forgalomban kapható állományt is használtunk. A laborba behozott oligochaeta állományok vizét a természetes fertőzöttségük megállapítására rendszeres időközönként 20 µm-es hálószöveten szűrtük. 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.

A *Myxobolus pseudodispar* laborunkban történő fenntartásához a következőképpen végeztük a fertőzéseket: 5 literes, aljatként kb. 5 cm vastag rétegben autoklávozott iszapot és homokot tartalmazó vízzel telt műanyag dobozokba körülbelül 10 g férget helyeztünk, és az egyes fertőzési edényekben tartott férgeket 10^5 - 10^6 db myxospórával fertőztük. A fertőzött oligochaeta populációknál a fertőzést követő hatodik héttől kezdve rendszeresen ellenőriztük az aktinospóra termelést. A talált spórákról a mikroszkópra szerelt digitális kamera segítségével készítettünk felvételeket, és meghatároztuk a spórák méreteit. A molekuláris biológiai vizsgálatokhoz az aktinospórákat 1,5 ml-es centrifugacsövekbe gyűjtöttünk, és – 20°C-on tároltuk a további vizsgálatokig.

Az SPF bodorkák fertőzése előtt a laboratóriumban fertőzött férgek által termelt aktinospórákat mikroszkóppal ellenőriztük, és megbecsültük a számukat. A fertőzés után körülbelül 3 hónap alatt a halak izomzatában kifejlődtek a *M. pseudodispar* myxospórák. A halak izomzatából kigyűjtött myxospórákkal újabb oligochaeta populációkat fertőztünk a fertőzési ciklus fenntartásához.

Fertőzési kísérletek

Myxobolus pavlovskii fertőzési kísérletek

A fertőzési kísérlethez nyolc SPF fehér busa (*Hypophthalmichthys molitrix*) ivadékot használtunk. A 3-4 cm méretű halakat a fertőzéshez 2 hétig együtt tartottuk az aktinospórák termelő oligochaeta állománnyal. Ezután 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 ágyaztuk, és körülbelül 5 µm vastagságú hosszanti metszeteket készítettünk, amelyeket hematoxilinnal és eozinnal festettünk a szövettani vizsgálatokhoz. A talált plazmódiumokat legyűjtöttük, és a myxospórákat morfológiai és molekuláris biológiai módszerekkel vizsgáltuk.

A fertőzött fehér busák kopoltyújáról gyűjtött myxospórákkal oligochaetákat is fertőztünk. A fertőzés a *M. pseudodispar* életciklusának laborban való fenntartásánál leírt módon történt. A fertőzéshez körülbelül 10^6 db *M. pavlovskii* myxospórát használtunk. A fertőzést követő egy hónaptól fél éven keresztül a fertőzött féregpopulációk valamint a kontrollként szolgáló törzsállományok vizében rendszeresen ellenőriztük az aktinospórák jelenlétét.

Myxobolus pseudodispar fertőzési kísérletek

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 fertőztük a férgeket.

Az oligochaeta fajok fogékonyságának részletes vizsgálatára egyedi fertőzési kísérleteket végeztünk. Egy-egy féreg egyed fertőzése körülbelül 10^3 - 10^4 db myxospórával történt, körülbelül 1,5 ml-nyi, myxospórákkal összekevert iszapot tartalmazó 2 ml-es centrifugacsövekben. A fertőzést követően 1, 4, 8, 24 óra, 1, 4 hét, 3 hónap múlva mintát vettünk, mintavételi időpontonként 5-5 oligochaeta egyedet. Az egyedek fertőzöttségének megállapítására fénymikroszkópos vizsgálattal kerestük a kiszabaduló aktinospórákat valamint a későbbiekben *M. pseudodispar*-specifikus PCR-t is végeztünk. Az oligochaeta egyedek farki végéből egy kis darabot lefagyasztottunk a férgek fajának molekuláris azonosításához. A férgek elülső végét morfológiai és *in situ* hibridizációs (ISH) vizsgálatokhoz fixáltuk 10%-os pufferolt formalinban

Molekuláris biológiai vizsgálatok

A nyálkaspórák paraziták (myxospórák és aktinospórák) 18S riboszomális RNS gén (18S rDNS) 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 és SphR primereket alkalmaztuk. *Myxobolus pavlovskii* minták esetén a közel teljes 18S rDNS felerősítéséhez az ERI-B1 - MB3 valamint Myx4rF - ERIB-10 primerkombinációkat alkalmaztuk. A *Myxobolus pseudodispar* kimutatására faj-specifikus PCR-t dolgoztunk ki. Az oligochaeták azonosítására a mt 16S rDNS egy rövid szakaszát erősítettük fel a Tub16SF - Tub16SR

primerek alkalmazásával. A PCR termékek nukleotidsorrendjét DNS szekvenálással határoztuk meg.

Filogenetikai vizsgálatok

Az oligochaeták rokonsági viszonyainak vizsgálatához a filogenetikai számításokat legnagyobb valószínűség (maximum likelihood) becslési módszerrel valamint Bayesian statisztikával végeztük.

***In situ* hibridizáció (ISH)**

A *Myxobolus pseudodispar* fejlődési útvonalát az oligochaeta gazdában *in situ* hibridizáció (ISH) alkalmazásával vizsgáltuk. Az ISH-hoz a 10%-os pufferolt formalinban fixált oligochaeta mintákat paraffinba ágyaztuk és 5 µm-es hosszanti metszeteket készítettünk belőlük. A vizsgálatokhoz a *M. pseudodispar*-specifikus PCR-hez használt MpF1 és PseudoR primerek mellett a szintén fajspecifikus MpR és PseudoF primereket jelöltettük biotinnal. A parazita DNS-hez specifikusan kötődő biotin-streptavidin – alkáli-foszfataz – BCIP/NBT komplex sötétkéék elszíneződéssel jelezte a parazita fejlődési alakok jelenlétét a féreg szöveteiben. A fejlődés különböző időpontjában fixált metszeteken a parazita elhelyezkedését fénymikroszkóppal vizsgáltuk, és digitális kamerával készítettünk felvételeket.

Fluoreszcens festés

A parazita kevéssertéjű féregbe való bejutását, és a spórák életképességét vitális festési eljárás segítségével kívántuk vizsgálni. A festéshez fluoreszcein-diacetát (FDA) és propidium-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.

Eredmények

***A Myxobolus pavlovskii* fejlődési ciklusa**

A TEHAG-i halastavakból származó tenyészetben természetes fertőzöttségként echinactinomyxon típusú aktinospórákat találtunk. A megvizsgált kevéssertéjű férgek közül csak kettő echinactinomyxon típusú aktinospórát termelő féregedet találtunk, melyek közül az egyik a vizsgálat során elpusztult. A másik egyed a morfológiai vizsgálat során *Limnodrilus* fajként soroltuk be. 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 tudtunk megszámolni (n=6). 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.

A molekuláris biológiai vizsgálatokban az echinactinomyxon teljes, 2004 bázispár (bp) hosszú 18S rDNS szekvenciáját is sikerült meghatároznunk (génbanki azonosító: HM991164). Ez 99,87%-ban volt hasonló a génbankba már korábban benyújtott 1578 bp hosszú, részleges *M. pavlovskii* szekvenciával (AF507973). A echinactinomyxonnal sikeresen megfertőzött halak mindegyikében erős fertőzést tapasztaltunk. A kopolyúlemezek hámjában elhelyezkedő plazmódiomok a boncolás során könnyen leválaszthatóak voltak.

A talált myxospórák morfológiailag nagyon hasonlóak voltak az Akhmerov által 1954-ben leírt *M. pavlovskii* spórákhoz, a spóraméreteken csak minimális eltérések voltak.

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 tapasztalható a génbankban található *M. pavlovskii* szekvenciához képest (AF507973). Sajnos a kísérletünk, hogy ezekkel a myxospórákkal fertőzzünk a laboratóriumi állományból származó kevéssertéjű férgek, nem járt sikerrel. A myxospórákkal fertőzött féreg állományokat fél évig rendszeresen ellenőriztük, de nem találtunk aktinospórákat.

Kevéssertéjű férgek azonosítása

A négy kevéssertéjű féreg tenyészetből 156 egyed mt 16S rDNS szakaszát vizsgáltuk molekulárisan. Morfológiailag 19 féregegyedet vizsgáltunk, ebből 7 *Tubifex tubifex*, 4 *Limnodrilus claparedeanus*, 2 *Limnodrilus hoffmeisteri*, 2 *Psammoryctides barbatus*, *Psammoryctides moravicus*, 1 *Potamothrix bavaricus* és egy *Potamothrix hammoniensis* 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 *Potamothrix* 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.

A kevéssertéjű férgek filogenetikai vizsgálatának eredményei

A két különböző módszerrel történt elemzések nagyon hasonló eredményt adtak. A mt 16S rDNS szekvencián alapuló maximum likelihood módszerrel történt filogenetikai elemzések alapján a *Psammoryctides* és *Limnodrilus* fajok egy csoportba kerültek, míg a *Tubifex tubifex* leszármazási vonalak és *Potamothrix* 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 *Limnodrilus hoffmeisteri* minták között jelentős genetikai különbségeket tapasztaltunk, a vizsgált 35 egyed között 15,5% volt a legnagyobb szekvenciabeli eltérés.

A *M. pseudodispar* fertőzési kísérletek eredményei

A *M. pseudodispar* fejlődési ciklusának laboratóriumban történő fenntartása sikeres, és 2007 óta folyamatos. A tömeges és egyedi fertőzések parazita-specifikus PCR eredményei alapján a TEHAG-i halastavakból és Németországból származó oligochaeta állományok tűntek a legjobban fertőzhetőnek *M. pseudodispar*-ral. 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. A különböző leszármazási vonalba tartozó *T. tubifex* egyedek jelentősen eltértek *M. pseudodispar*-ra való fogékonyágukban. A II-es leszármazási vonalba tartozó egyedek voltak a legfogékonyabbak a parazitára, a vizsgált egyedek 90,5%-a termelt TAM-ot. A *T. tubifex* III-as leszármazási vonalba tartozó egyedek 22,2%-a termelt aktinospórát. Az V-ös leszármazási vonalba tartozó egyedek kevésbé tűntek fogékonyaknak, a vizsgált egyedeknek csak a 18,8%-a termelt aktinospórát. 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 bizonyítást nyert.

A *M. pseudodispar* kevésertéjű férgen belüli fejlődése

Az ISH vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a *M. pseudodispar* fejlődése elsősorban a bélhámhoz kötődik. Már néhány órával a fertőzést követően *M. pseudodispar* fejlődési alakokat lehetett kimutatni a bélhámiban. A fejlődés első hetében a bélhámsejtek alapját képező sejten kívüli mátrixban is intenzív pozitív festődés volt tapasztalható. Egy hónappal a fertőzés után a parazita fejlődési alakok a bél egész hosszában megtalálhatóak voltak. Három hónappal a fertőzés után számos 4 triactinomyxont tartalmazó nagy számú pánsporociszta volt látható a metszetekben. Érdekes megfigyelés volt, hogy a fejlődés első néhány napjában a kevésertéjű férgek folyadékkal telt testüregében, a cölómában előforduló fagocitáló sejtek, az amöbociták sötétkék festődést mutattak, ami a paraziták bekebelezésére utalt.

Az aktino- és myxospórák fluoreszcens festésének eredményei

A festési eljárás az aktinospórák esetében jól működött, azok sejtjeibe a festékek könnyen bejutottak, és rövid, 10-15 perces festődés után már fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálhatóak voltak. 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, ami megakadályozta, hogy a parazita féregbe való bejutását ily módon vizsgáljuk.

Megbeszélés

Vizsgálataink során a TEHAG halastavaiból gyűjtött oligochaeta állományban természetes fertőzőtséggént jelen lévő echinactinomyxonok a fehér és pettyes busa élősködőjének, a *Myxobolus pavlovskii* aktinospóra alakjának bizonyultak. Az általunk talált echinactinomyxon 18S rDNS szekvenciája (génbanki azonosító: HM991164) 1 nukleotid kivételével megegyezett a korábban publikált *M. pavlovskii* myxospóra szekvenciájával. Bár a *M. pavlovskii* gyakran előforduló halparazita, érdekes módon az aktinospóra alakok kimutatását célzó korábbi vizsgálatok során eddig nem írtak le echinactinomyxon típust Magyarországról. A *Myxobolus pavlovskii* fejlődését már korábban német kutatók is vizsgálták. Eredményeik alapján e parazita aktinospóra alakja hexactinomyxon típusnak bizonyult, szemben az általunk leírt echinactinomyxonnal. Azonban a fertőzési kísérletek során kapott myxospórák morfológiai jellemzői, 18S rDNS szekvencia adatok valamint a szövettani eredmények is megerősítik, hogy az általunk vizsgált nyálkaspórák faj a *M. pavlovskii*, és cáfolják a korábbi, német kutatók által kapott eredményeket.

Az echinactinomyxonnal fertőzött fehér busák kopoltyúján kifejlődött myxospórákkal parazitamentes oligochaetákat próbáltunk megfertőzni, hogy a *M. pavlovskii* teljes fejlődési

ciklusát reprodukáljuk. A férgek kísérletes visszafertőzése azonban nem járt sikerrel. Ez a sikertelenség rávilágít arra a problémára, hogy a hasonló fertőzési kísérleteknél nagyon fontos befolyásoló tényező lehet a használt oligochaeta populáció faji összetétele. Eredményeink azt sugallják, hogy oligochaeta tenyészetek fajösszetétele idővel változik. Így a kísérlet sikertelenségét magyarázhatja, hogy a fertőzés idejére a féregtenyészet fajösszetételében történt változás miatt egyszerűen nem állt rendelkezésre fogékony gazda, amelyben a parazita továbbfejlődhetett volna. A fertőzéshez használt oligochaeta állományok fajösszetétele a fogékony gazdák esetleges hiánya miatt kritikus pontja lehet a nyálkaspórák fertőzési kísérleteknek.

A doktori munka fő célja a nyálkaspórák kevéssertéjű férgekben zajló fejlődésének és az ezzel összefüggő gazdafajlagosságnak a vizsgálata volt. Ehhez a pontyfélék gyakori élősködőjét a *Myxobolus pseudodispar*-t választottuk modellfajként. A már korábbi vizsgálatokban megállapított gerinctelen gazdákon (*Tubifex tubifex*, *Limnodrilus hoffmeisteri*) kívül további *M. pseudodispar*-ra fogékony oligochaeta fajokat sikerült azonosítanunk: a *Psammoryctides barbatus*-t és a *P. moravicus*-t. Bár néhány oligochaeta faj esetében a vizsgált egyedszám alacsony volt, eredményeink azt sugallják, hogy a *M. pseudodispar* esetében a gerinces gazda spektrumához hasonlóan a gerinctelen gazdák köre is széles.

A kevéssertéjű féregfajok és leszármazási vonalak *M. pseudodispar*-ra való fogékonyágát célzó vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy hasonlóan, a *M. cerebralis*-hoz a *T. tubifex* leszármazási vonalak közül az I-es és III-as leszármazási vonalba tartozó egyedek voltak fogékonyak 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 kevéssertéjű férgek a *M. pseudodispar* fajra sem tűntek fogékonyak, hasonlóan a korábbi *M. cerebralis*-on végzett vizsgálatok eredményéhez. Ugyanakkor a *T. tubifex* IV-es, VI-os leszármazási vonalnál és a *P. hammoniensis* esetében sajnos csak néhány egyedet tudtunk vizsgálni, ezért fogékonyág 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 a férgekben, de a legtöbb esetben nem tapasztaltunk TAM termelést. Ezekben az esetekben a sporoplazma valószínűleg bejutott ugyan a kevéssertéjű 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. Azt tapasztaltuk, hogy a kevéssertéjű férgek sejtes immunválaszában résztvevő amöbociták bekebelezték a bejutó paraziták egy részét. Úgy tűnik tehát, hogy vannak olyan kevéssertéjű féregfajok, melyek képesek megszakítani a parazita fejlődési ciklusát, és biológiai szűrőként funkcionálnak. A

különböző féregtenyészetekkel végzett fertőzési kísérleteink eredményei azt mutatják, hogy a fertőzéshez használt féregállományok összetétele, a fogékony, rezisztens és biológiai szűrő fajok aránya nagymértékben tudja befolyásolni a nyálkaspórák fertőzés kimenetelét.

A kevésertéjű féregfajok molekuláris azonosítása során kapott mt 16S rDNS szekvenciákat felhasználva vizsgáltuk az oligochaeták rokonsági viszonyait is. A kapott eredmények egybevágóak a korábban közölt filogenetikai vizsgálatok eredményeivel. A vizsgált minták DNS szekvenciái a fajoknak és leszármazási vonalaknak megfelelően csoportosultak a filogenetikai fákban. A korábban 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 a genetikai eltérés miatt valószínűleg egy új, különálló leszármazási vonal tagjai. A kapott filogenetikai eredmények alapján látható továbbá, hogy nincs összefüggés a különböző oligochaeta fajok és leszármazási vonalak rokonsági viszonyai és azok *M. pseudodispar*-ra való fogékonyasága között.

A parazita fejlődésének útvonalát a kevésertéjű férgen belül *in situ* hibridizációval vizsgáltuk. Vizsgálataink eredményei azt valószínűsítik, hogy a bél hámban keresztül jut be a parazita a kevésertéjű féregbe, és fejlődése is nagyrészt a bélhámban zajlik. Ez egybevág a korábban a *M. cerebralis* fejlődésének szövettani vizsgálatai során kapott eredményekkel. 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 kevésertéjű férgek cölómában elhelyezkedő fagocitáló sejtjei, az amöbociták egy része a fertőzést követő első héten erőteljes festődést mutatott. Mivel ezek a sejtek a férgek sejt-immunválaszában játszanak szerepet, vizsgálati eredményeink azt mutatják, hogy a kevésertéjű férgek immunrendszere reagál az élősködőre.

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 információkkal szolgálnak a *M. pseudodispar* gerinctelen gazdaköréről, valamint a különböző kevésertéjű féregfajok és leszármazási vonalak fogékonyaságáról erre a fajra. Emellett rámutattunk arra is, hogy az oligochaeta tenyészet fajösszetétele jelentősen befolyásolhatja a nyálkaspórák fertőzés kimenetelét. A *M. pseudodispar* kevésertéjű férgek belüli fejlődési útvonalának feltérképezése új adatokkal szolgál a nyálkaspórák fertőzések mechanizmusának megértéséhez. Továbbá megcáfoltuk a *Myxobolus pavlovskii* fejlődési ciklusáról korábban leírtakat. Megállapítottuk, majd fertőzési kísérlettel, szövettani és molekuláris módszerekkel bizonyítottuk, hogy a *M. pavlovskii* aktinospóra alakja echinactinomyxon típusú.

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 férgekben.
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.

Tudományos publikációk

Lektorált, impakt faktoralal 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 nyálkaspórások (Myxozoa) gazdafajlagosságának kísérletes vizsgálatában**, Magy. Állatorv. Lapja (megjelenés alatt) IF: 0.300

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.

A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

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. (Myxosporea: 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., Tánczos 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., 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. IF: 0,856**

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 EAFP 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., Letenyey 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.**