

OTKA F45908

Vezető kutató: Eszterbauer Edit

Molekuláris biológiai vizsgálatok halparazita nyálkaspórák
(Myxosporea) fajokon különös tekintettel a *Myxobolus* és
Sphaerospora genusok tagjaira

Zárójelentés

Budapest, 2008. február 25.

1. Előzmények és célkitűzések

A nyálkaspórások halakban előforduló myxospóra és férgekben kialakuló aktinospóra fejlődési alakjainak molekuláris taxonómiai és filogenetikai vizsgálata az MTA Állatorvostudományi Kutatóintézetében évek óta zajlik. Az eddigi eredmények közel egy tucat, referált folyóiratban megjelent közlemény formájában kerültek publikálásra. Ezt az eredményes munkát kívántuk folytatni a nyálkaspórások rokonsági viszonyainak megértése céljából. A korábbiakban kidolgozott molekuláris biológiai módszerek alkalmazásával újabb izolátumok bevonásával kívántuk a 18S rRNS gén fajon belüli változékonyságát meghatározni, segítve ezzel a genetikai fajhatárok körvonalazását. Az eddig nem tanulmányozott fajok vizsgálatával pedig a fajok közötti rokonsági kapcsolatok illetve az azokat befolyásoló különféle tényezők megismerését, jobb megértését tűztük ki célul.

Az eddig használt molekuláris biológiai módszereken kívül (PCR, RFLP, DNS szekvenciák filogenetikai elemzése stb.) az *in situ* hibridizáció (ISH) módszerének alkalmazásával kívántuk egy, a klasszikus morfológiai és szövettani technikák “felbontóképességét” és specificitását meghaladó eljárást kidolgozni a parazita fejlődési alakok gazdán belüli kimutatására. Vizsgálataink ezen része a pontyok úszóhólyaggyulladását okozó, *Sphaerospora renicola* halon belüli fejlődése részleteinek megismerését célozta.

2. A tervezett kutatás főbb lépései

A három évre tervezett munka egyes részeit a következőképpen terveztük kivitelezni:

Első év:

- spórák gyűjtése filogenetikai vizsgálatokhoz és fertőzött gazdaszövetek fixálása ISH-hoz a különböző parazita fajok évszak szerinti előfordulásának megfelelő időszakban
- a begyűjtött fajok 18S rDNS-ének felerősítése PCR-rel, a kapott DNS fragmentumok közvetlen szekvenálása, szükség esetén klónozása
- a *Sphaerospora* genus fajainak felerősítésére PCR rendszer kidolgozása
- a kapott szekvenciák alapján specifikus primerek tervezése ISH-hoz

Második év:

- további spórák gyűjtése filogenetikai vizsgálatokhoz és fertőzött gazdaszövetek fixálása ISH-hoz

- ISH módszerének adaptálása a *Sphaerospora* fajokra és az esetlegesen vizsgálandó kopoltyú- és izomparazita *Myxobolus* fajokra; a módszer optimalizálása a megfelelő specifitás elérése érdekében
- újabb *Myxobolus*, *Thelohanellus*, *Henneguya* fajok szekvencia szintű vizsgálata

Harmadik év:

- a kapott eredmények összesítése
- szükséges vizsgálatok ismétlése, finomítása
- a vizsgált fajok 18S rDNS szekvenciái alapján filogenetikai fa készítése, a rokonsági kapcsolatok alapján következtetések levonása
- az eredmények publikálásra való előkészítése.

3. Személyi változások és eltérések a kutatás időzítésében

A Kutatási megbízási szerződésben rögzítetteknek megfelelően, 2004 végéig Tarján Zoltán László, biológus hallgató segítette a kutatómunkát. Azonban egyetemi és egyéb elfoglaltságai miatt a továbbiakban nem tudott részt venni a laboratóriumi munkákban, ezért helyette Marton Szilvia, zoológus kapcsolódott be a kutatásba 2005 januárjában.

2005 őszén a projekt vezető kutatója egyéves Alexander von Humboldt kutatási ösztöndíjat nyert el, mely lehetővé tette, hogy a müncheni egyetem zoológiai intézetében, Prof. M. El-Matbouli Kutatócsoportjában végezzen funkcionális genomikai vizsgálatokat a pisztrángok kergekórját okozó *Myxobolus cerebralis* fajon. Erre az időre az OTKA kutatás ideiglenes felfüggesztését kérte. Az OTKA Iroda 2006. január 1-től 2006. december 31-ig terjedő időszakra megadta az engedélyt a projekt felfüggesztésére.

2005 őszén Marton Szilvia is elhagyta Intézetünket, majd 2006 szeptemberétől ismét munkába állt az Intézet Molekuláris Virologia Témacsoportjában. 2007. január 1-től az újonnan megalakult Hal-parazitológia Kutatócsoportban folytatja munkáját tudományos segédmunkatársként, 2007 szeptembere óta pedig Ph.D. hallgatóként.

A nyálkaspórási kutatásban nemzetközi szinten megfigyelhető az a tendencia, hogy míg 2003-ban, a projekt tervezésekor a fejlődéstani vizsgálatok képezték a kutatások fő irányvonalát, addig a hangsúly egy-két évvel később a filogenetikai és molekuláris taxonómiai kutatásokra tevődött át. Ennek oka elsősorban az, hogy a nyálkaspórási vizsgálatok a 2000-es évek közepére jutottak arra a szintre, hogy elegendő számú 18S riboszomális DNS szekvencia állt rendelkezésre a vizsgált nyálkaspórási fajok molekuláris jellemzésére és filogenetikai elemzéséhez. A nyálkaspórási kutatásában körvonalazódott új molekuláris taxonómiai irányvonal, a projekt során begyűjtött

parazita minták nagy száma, változatossága, és az időközben létrejött német–magyar együttműködés biztató eredményei miatt a DNS szekvencia szintű vizsgálatok kerültek előtérbe az OTKA projektben is a fejlődéstani vizsgálatokhoz képest.

A német Humboldt ösztöndíj miatti elfoglaltságok (rendszeres személyes kapcsolattartás a müncheni kutatócsoporttal, előadások tartása, eredmények publikálásra való előkészítése) az OTKA projekt eredményeinek publikálását a tervekhez képest lelassították. Az eddig megjelent 5 folyóiratcikken túl további két közlemény megjelenése várható, melyből a *Henneguya* fajok rokonsági viszonyait elemző kézirat közvetlenül benyújtás előtt áll.

4. Eredmények

***Henneguya nuesslini* vizsgálata (Kallert és mtsai, 2005a)**

A szöveti élősködő nyálkaspórák közül a *Henneguya nuesslini* fejlődési ciklusát vizsgáltuk két pisztráng fajban és ponty ivadéokban. Kísérleti körülmények között parazita-mentes sebes pisztrángot (*Salmo trutta*), pataki szajblingot (*Salvelinus fontinalis*) és pontyot (*Cyprinus carpio*) fertőztünk *Tubifex tubifex* férgékből származó triactinomyxon típusú aktinospórákkal. Az élősködő 102 nappal a fertőzést követően érett cisztát képezett a két pisztrángféle kötőszövetében. Pontyban parazita ciszták jelenléte nem volt kimutatható. A halban fejlődő myxospórákat és a férgékből kiszabaduló aktinospórákat morfológiai és molekuláris módszerek segítségével jellemeztük. A 18S rDNS 1417 bp hosszú szakaszának vizsgálata a két fejlődési alak genetikai azonosságát igazolta. Vizsgálatunk bizonyította, hogy egy *Henneguya* faj az eddig ismert aurantiactinomyxon fejlődési alak helyett triactinomyxon típusú spóraelakot is felvehet fejlődése során. Ez utóbbi a *H. nuesslini* faj közeli rokonságát is jelzi a *Myxobolus* genus tagjaival, melyek jellemzően triactinomyxon fejlődési alakkal rendelkeznek.

***Henneguya* fajok filogenetikai elemzése (Eszterbauer és mtsai, 2005b)**

A tengeri és édesvízi *Henneguya* fajok filogenetikai vizsgálatával a fajok közötti rokonsági viszonyokat és azok lehetséges hátterét kívántuk feltérképezni. Hat *Henneguya* fajt (*H. psorospermica*, *H. creplini*, *H. cutanea*, *H. nuesslini*, *H. basifilamentalis* and *H. mystusia*) gyűjtöttünk Magyarországon, Németországban és Malajziában. A specifikus PCR-rel felerősített kb. 1400 bp hosszú 18S DNS szakaszokat plazmid vektorba klónoztuk, majd szekvenáltuk. A génbanki és az általunk vizsgált DNS szekvenciák illesztése után maximum parszimónia és „maximum likelihood” módszerrel filogenetikai elemzést végeztünk. A

Henneguya fajok filogenetikai elhelyezkedése összefüggésben volt a spórák morfológiájával. A kerekded spóratestű *H. cutanea*, melynek alakja emlékeztet a *Myxobolus* fajok jellegzetes kerek formájára, az édesvízi élősködők csoportján belül a kopolyúparazita *Myxobolus* fajok mellett helyezkedett el. A hasonló morfológiájú *H. zschokkei*-*H. salminicola*-*H. nuesslini* csoport a *Myxobolus cerebralis*-sal egy ágon volt megtalálható, közel a legtöbb édesvízi *Myxobolus* fajhoz. A *Henneguya* fajok azon csoportja, melyek megnyúlt orsószerű spóratesttel rendelkeznek a filogenetikai fa másik nagy ágán helyeződtek, a *Myxidium lieberkuehni*-*Myxobolus lentisuturalis*-*M. cultus* csoport mellett. Eredményeink azt mutatják, hogy a *Henneguya* genus tagjai két eltérő származási vonalat képviselnek. A kerekded alakú fajok nagy valószínűséggel az édesvízi *Myxobolus* fajokkal közös őstől származnak, míg az orsószerű formát mutató fajok feltehetően önállóan, a *Myxobolus*-októl elkülönülten fejlődtek.

***Myxobolus parviformis* faj leírása (Kallert és mtsai, 2005)**

Kísérletesen vizsgáltuk a *Myxobolus parviformis* faj kétgazdás fejlődési ciklusát. A dévérkeszeg (*Abramis brama*) kopolyúján cisztát képező közel egy tucat nyálkaspórák faj közül a kopolyúredők elülső-középső részén kisméretű cisztákban fejlődő myxospórákat izoláltuk. Ezekkel fertőztünk kevéssertéjű férgeseket. A kétkörös kísérlet során minden parazita stádiumot morfológiai és DNS vizsgálatokkal azonosítottunk. Minden aktinospóra és myxospóra alak 18S rDNS szekvenciája azonos volt. Az 1586 bp hosszú 18S rDNS szekvencia összehasonlítása az adatbázisokban elérhető szekvenciákkal, valamint a fejlődési stádiumok morfológiai és morfometriai jellemzői megerősítették az új faj leírásának jogosságát.

Úszonyparazita *Myxobolus* fajok molekuláris taxonómiája (Tarján, 2006)

Hazai halfajok úszóin élősködő nyálkaspórák fajok összehasonlító molekuláris biológiai vizsgálatát végeztük egy diplomamunka keretében, a vizsgálatba bevont paraziták genetikai azonosítása és a köztük meglévő rokonsági viszonyok meghatározása céljából. A morfológiailag előzetesen azonosított *Myxobolus* fajok molekuláris biológiai vizsgálata során öt halfajból (angolna - *Anguilla anguilla*, szélhajtó kűsz - *Alburnus alburnus*, bodorka - *Rutilus rutilus*, márna - *Barbus barbus* és fenékjáró küllő - *Gobio gobio*) származó négy parazita (*Myxobolus portucalensis*, *M. alburni*, *M. caudatus*, *M. gobiiorum*) faji szinten került meghatározásra, míg három mintát *Myxobolus* sp-ként tudtunk azonosítani. Az utóbbi három minta közül kettő 18S rDNS szekvenciája 99,7%-os hasonlóságot mutatott, ezért valószínűsíthetően azonos parazita fajtól származott. A harmadik, szélhajtó kűszből származó minta számottevő eltérést (több mint 3%) mutatott a többi, kűszből elkülönített mintától, ezért

valószínű, hogy ebben az esetben is egy eddig még le nem írt faj került begyűjtésre. Bár a *M. alburni*, *M. gobiorum* és a *M. caudatus* fajok myxospóra alakjaik morfológiai szempontból jól ismertek, molekuláris vizsgálatukat elsőként e diplomamunka keretében végeztük.

A vizsgálatba bevont minták a filogenetikai fán két fő csoportban helyezkedtek el. Az egyik csoportba tartoztak a márnából, szélhajtó kűszből, bodorkából és fenékjáró küllőből izolált minták, amelyek a kopolyúparazita nyálkaspórások között találhatóak. A másik csoportban helyezkedett el az angolnából származó *M. portucalensis*. A távolsági mátrix analízissel kapott filogenetikai fa megerősíteni látszik korábbi elképzelésünket, mely szerint a nyálkaspórások és halgazdáik evolúciójának során a paraziták között kialakult genetikai különbségek sokkal inkább azok szöveti és szerv tropizmusával állnak összefüggésben, mint magával a gazda fajjal.

Domolykó *Myxobolus* fajainak összehasonlító morfológiai és molekuláris vizsgálata (Molnár és mtsai, 2006, 2007)

Dunai domolykó (*Leuciscus cephalus*) állomány parazitológiai vizsgálata során 8 *Myxobolus* faj előfordulását sikerült kimutatni. Ezek közül 5 fajt (*M. cycloides*, *M. ellipsoides*, *M. dujardini*, *M. muelleri*, *M. pseudodispar*) ismert fajokkal azonosítottunk, a *M. muellericus* és *M. gayerae* új fajként került leírásra. A *M. leuciscini* faj eredeti leírását pontosítva és DNS szekvencia adatokkal kiegészítve közöltük le. A vizsgált fajok többségének szervi elhelyezkedése specifikus. A *M. cycloides* nagy, kerek plazmódiumait a halak úszóhólyagján találtuk meg, a *M. ellipsoides* ugyancsak kerek plazmódiumai az uszonyokon foglaltak helyet. A kopolyún négy *Myxobolus* faj fejlődött. Közülük a *M. dujardini* nagy, lebenyes plazmódiumai a kopolyúlemezek többrétegű hámszélén alakultak ki, s jellegzetes körte alakú spórái a többi fajétól jól elkülönültek. A kopolyúlemezek afferens artériáiban két *Myxobolus* faj hozott létre nagy, megnyúlt plazmódiumokat. Közülük a *M. muelleri* az egyik legrégebben ismert faj, a lemezartériák apikális szakaszán volt megtalálható, míg a *M. leuciscini* az artéria bázisához közeli szakaszon formált plazmódiumokat. A morfológiailag hasonló spórák az interkapszuláris nyúlványok jelenléte ill. hiánya alapján biztosan elkülöníthetők. Ugyanakkor nehezen voltak elkülöníthetők a *M. muelleri* fajtól, a kopolyúredőkben kis plazmódiumokat képező *M. muellericus* faj spórái. Ezt a fajt jellegzetes redőlokációja alapján különítettük el az előbbi fajtól, de ezt az elkülönítést molekuláris adatok is alátámasztották. A *Myxobolus gayerae* spórái, melyek a bélfalban jelentős méretű gömbölyded alakú cisztákat képeznek, emlékeztetnek a *M. cycloides* spóráira, de azoknál nagyobbak, és 18S rDNS szekvenciájuk is eltérő. A talált fajok közötti morfológiai különbségeket molekuláris vizsgálataink eredményei

is megerősítették. Eredményeink azt bizonyítják, hogy egyetlen halfajon is nagyszámú szövet- és szerv-specifikus *Myxobolus* faj élőszködik, s ezek a vizsgálatok alapot szolgáltatnak arra, hogy más halfajok *Myxobolus* fertőzöttségének hasonló módszerekkel történő vizsgálata révén adatokat kapjunk a gazda-fajlagosságot illetően.

Pontyfélék kopolytú-élőszködő *Myxobolus* fajainak összehasonlító vizsgálata (Marton és mtsai, 2008)

A *Myxobolus* fajok feltételezett fajlagosságát néhány pontyféle kopolytújáról gyűjtött myxospóra 18S rDNS szekvenciáinak összehasonlításával vizsgáltuk. Munkánk eredményeként közel húsz minta DNS szekvenciáját vizsgáltuk, és négy hazai kopolytúélőszködő fajt tudtunk elkülöníteni bodorka (*Rutilus rutilus*), paduc (*Chondrostoma nasus*) és márna (*Barbus barbus*) gazdákból. Ezek közül három új *Myxobolus* faj leírása várható, míg egy minta a *M. muelleri*-vel mutat nagy genetikai hasonlóságot. Ezenkívül sikerült azonosítanunk egy új myxospóra-aktinospóra párt. A bodorkából származó *M. diversicapsularis* 18S rDNS szekvencia 99,4%-ban azonos a Hallett és mtsai. (2005., DAO 65: 137-152) által leírt *Triactinomyxon* 3-as típusú aktinospórával.

Filogenetikai vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy mind a spóra morfológia mind a szöveti lokalizáció eltérései megmutatkoznak a DNS szekvencia adatok különbségében, ezért ezeket fontos figyelembe venni a *Myxobolus* fajok elkülönítésénél.

Két hazai *Sphaerospora* faj molekuláris vizsgálata (Eszterbauer & Székely, 2004)

Munkánk során két, a halgazda vesecsatornáiban spórát képező *Sphaerospora* faj genetikai rokonságát vizsgáltuk. A *Sphaerospora renicola* (AY735410), a pontyok (*Cyprinus carpio*) úszóhólyag-gyulladását okozó nyálkaspórák parazita morfológiai vizsgálatok alapján nem volt elkülöníthető az aranyhalból (*Carassius auratus auratus*) származó ezidáig nem azonosított *Sphaerospora* fajtól (génbanki azonosító: AY735411). A 18S rDNS kb. 1400 bázispár hosszú szakaszának szekvencia szintű összehasonlítása alapján a két vizsgált *Sphaerospora* faj egyértelmű genetikai különbséget mutatott, mivel DNS szekvenciájuk csupán 71,9 %-ban volt azonos. A PHYLIP programcsomag segítségével készített parszimónia és „maximum likelihood” elemzések a genetikai különbségeket megerősítették. Az aranyhalból származó *Sphaerospora* faj a *Myxidium truttae*-vel (AJ582061) együtt a cölizoikus édesvízi parazita fajok csoportjában helyezkedett el. A *Sphaerospora renicola* a *S. molnari*-vel (AF378345) mutatott legközelebbi rokonságot és érdekes módon az édesvízi szöveti élőszködőkkel alkotott csoportot a filogenetikai fán. Az ezidáig molekulárisan vizsgált hat *Sphaerospora* faj filogenetikai fán való elhelyezkedése azt mutatja, hogy a

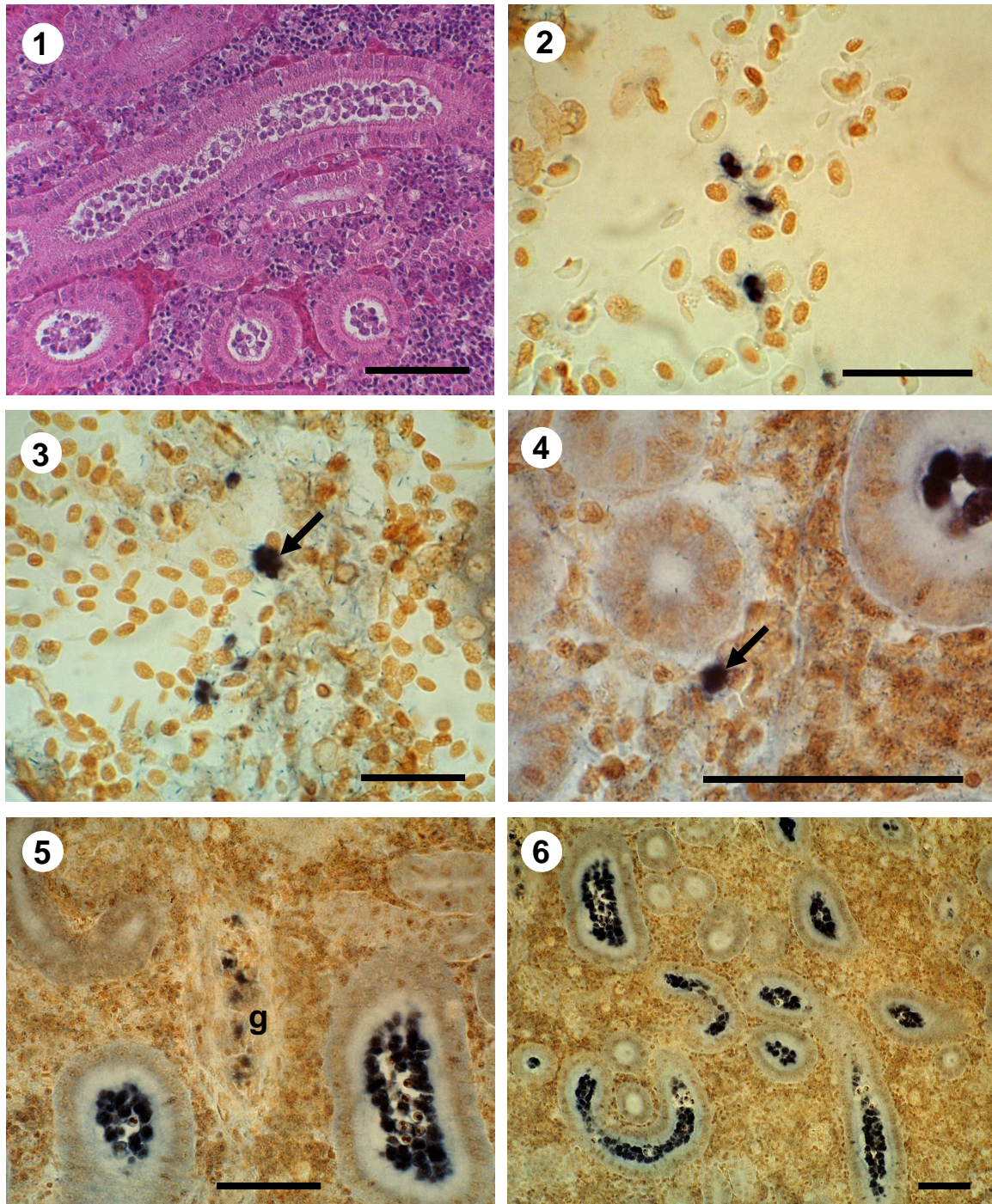
spóramorfológia nincs összefüggésben a taxonon belüli genetikai rokonsági viszonyokkal, ami valószínűsíti a *Sphaerospora* genus polifiletikus eredetét.

***S. renicola* halon belüli fejlődésének nyomon követése ISH-val (1-6. ábra)**

2004-ben és 2005-ben kétheti gyakorisággal gyűjtöttünk *Sphaerospora renicolá*-val fertőzött ponty ivadékokat. A mintavételezésbe egyéb pontyféléket (aranyhal, vörösszárnyú keszeg, bodorka) is bevontunk, melyekben *Sphaerospora* fajok előfordulása volt várható. A mintagyűjtés helyszínéül azokat a halgazdaságokat választottuk, melyekben az pontyok úszóhólyag-gyulladását okozó *S. renicola* évek óta előfordul. A gyűjtött mintákat fixáltuk molekuláris és szövettani/ISH vizsgálatokhoz. A paraffin blokkba beágyazott 2-4 cm-es ponty ivadékokból majd a későbbiekben a 5-7 cm hosszú elsőnyaras pontyok bizonyos szerveiből (szem, úszóhólyag, vese) hosszanti metszeteket készítettünk.

A molekuláris vizsgálatok eredményeként azonosított 18S rDNS alapján, specifikus próbákat terveztünk a *S. renicola* faj pontyban zajló fejlődésének nyomon követésére. Az ISH rendszer optimalizálása során erős kötőszöveti háttérfestődés volt tapasztalható a ponty bizonyos szerveiben (pl. kopolytú), ezért újabb próbák tervezését kezdtük meg a projekt harmadik évében, 2007 elején. Az új próbák specificitásának és érzékenységének tesztelése pozitív eredménnyel zárult, a begyűjtött minták ISH vizsgálata során nem-specifikus háttérfestődés nem volt tapasztalható. A DIG-jelölt próbákkal végzett 2-3 napot igénybe vevő ISH mellett egy jóval kevésbé időigényes ISH módszert is kidolgoztunk a begyűjtött minták tömeges vizsgálatára. A biotinnal jelölt 22 bp hosszú oligonukleotidok alkalmazása a módszer specificitását és érzékenységét nem csökkentette, viszont 1 napra rövidítette a vizsgálat idejét.

Az eredmények összesítése és publikálásra való előkészítése a zárójelentés írásának ideje alatt zajlik. Az eddig kiértékelt preparátumok azt mutatják, hogy a ponty ivadékokban a *S. renicolá*-val fertőzött tóba való kihelyezés után 1 héttel már kimutatható a parazita jelenléte elsősorban véralakok („C-stádiumok”) formájában (2. ábra). Az ivadékok kihelyezését követő 1 hónappal megtalálhatók az úszóhólyag kapillárisaiban a „K-stádiumok” (3. ábra) heveny úszóhólyag-gyulladás kíséretében. Mindeközben a vese glomerulusaiban a kisebb véralakok nagyszámú előfordulása figyelhető meg (5. ábra). Másfél hónappal a fertőzést követően a vesecsatornákat a fejlődő spórák tömege tölti ki (1., 4. és 6. ábra). A spórák nagy többsége a fertőződés után kb. 2 hónappal válik éretté, majd az érett spórák a húgyvezetéken, húgyhólyagon keresztül a külvilágba ürülnek. A paraziták 1-2%-a visszamarad a vesecsatornákban, illetve véralakok formájában a szem kapillárisaiban.



1-6. ábra. (1) Érett *Sphaerospora renicola* spórák ponty ivadék vesecsatornáiban. Szöveti metszet, H&E festés. (2) *S. renicola* vérstádium („C-protozoon”). ISH preparátum. (3) *S. renicola* „K-stádium” (nyíl). ISH preparátum. (4) *S. renicola* fejlődési alakok: Vérstádium ponty vese parenchymában lévő kapillárisban (nyíl); és fejlődő spórák a vesecsatornában. ISH preparátum. (5) *S. renicola* fejlődési alakok: vérstádiumok vese glomerulusban (g); és fejlődő spórák a vesecsatornában. ISH preparátum. (6) Intenzív *S. renicola* fertőzöttség ponty ivadék vesecsatornáiban. ISH preparátum. Lépték: 50 μ m.

5. OTKA kutatáshoz kapcsolódó eddig megjelent közlemények

- Eszterbauer E. & Székely Cs. (2004): Molecular phylogeny of the kidney-parasitic *Sphaerospora renicola* from common carp (*Cyprinus carpio*) and *Sphaerospora* sp. from goldfish (*Carassius auratus auratus*). Acta Veterinaria Hungarica 52:469-478.
- Eszterbauer, E., Kallert, D.M., Székely, Cs. and Molnár, K. (2005): The phylogeny of the genus *Henneguya* (Myxosporea: Bivalvulida) on the basis of 18S rDNA sequences. 12th EAFP International Conference on 'Diseases of Fish and Shellfish', 11th – 16th September 2005, Copenhagen, Denmark.
- Kallert, D. M., Eszterbauer, E., El-Matbouli, M., Erséus, C. & Haas, W. (2005a): The life cycle of *Henneguya nuesslini* Schuberg & Schröder 1905 (Myxozoa) involves a triactinomyxon-type actinospore. J. Fish Dis. 28:71-79.
- Kallert, D. M., Eszterbauer, E., Erséus, C., Haas, W., El-Matbouli, M. (2005b): Life cycle studies of *Myxobolus parviformis* sp. n. (Myxozoa, Myxobolidae) from bream. Diseases of Aquatic Organisms 66:233-243.
- Molnár, K., Marton, Sz., Eszterbauer, E., Székely, Cs. (2006): Comparative morphological and molecular studies on *Myxobolus* spp. infecting chub from the River Danube, Hungary, and description of *Myxobolus muellericus* sp. n. Diseases of Aquatic Organisms 73:49-61.
- Tarján Zoltán László (2006): Hazai halfajok úszóin élősködő nyálkaspórások (Myxosporea: Myxobolidae) összehasonlító molekuláris biológiai vizsgálata, Szakdolgozat. ELTE TTK, Budapest.
- Molnár, K., Marton, Sz., Eszterbauer, E., Székely, Cs. (2007): Description of *Myxobolus gayerae* sp. n. and re-description of *Myxobolus leuciscini* infecting the European chub from the Hungarian stretch of the river Danube. Diseases of Aquatic Organisms 78:147-153.
- Marton, Sz., Eszterbauer, E., Székely, Cs., Molnár, K. (2008): Pontyfélék kopolyú-élősködő *Myxobolus* fajainak összehasonlító vizsgálata. Akadémiai Beszámoló, 2008. január 23., Budapest.