

*A Batrachochytrium dendrobatidis kétéltű-kórokozó
varangymérgekkel szembeni érzékenységének vizsgálata*

37. OTDK Biológia Szekció



Tóth Gábor Ábris
Állatorvostudományi Egyetem, Biológia alapszak, 3. évfolyam

Állatorvostudományi egyetem, Zoológiai Tanszék
HUN-REN ATK NÖVI, Evolúciós Ökológiai Osztály

Témavezetők:

Dr. Ujszegi János
(tudományos munkatárs, HUN-REN ATK NÖVI, Evolúciós Ökológiai Osztály)

Balogh Emese
(PhD hallgató, Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék)

2024

Tartalom

1	Fontosabb rövidítések jegyzéke	3
2	Bevezetés.....	4
2.1	Szakirodalmi áttekintés	4
3	Célkitűzés.....	11
4	Anyag és módszer.....	12
4.1	A barna varangy (<i>Bufo bufo</i> s.l.) mint modellállat.....	12
4.2	A méregminták gyűjtése és előkészítése	13
4.3	Bd izolálása és a tenyészetek fenntartása	15
4.4	In vitro kísérlet.....	17
4.5	Statisztikai elemzés	18
4.5.1	A méregminták földrajzi változatosságát jellemző elemzések	18
4.5.2	Az OD adatok transzformálása	19
4.5.3	Exploratív elemzések.....	20
4.5.4	Összetett modellek	21
5	Eredmények.....	22
5.1	A méregmintákon elvégzett elemzések eredményei	22
5.2	Az in vitro kísérlet eredményei.....	28
6	Diszkusszió.....	31
7	Köszönetnyilvánítás.....	36
8	Irodalomjegyzék	37

1 Fontosabb rövidítések jegyzéke

Bd – *Batrachochytrium dendrobatidis*

BdGPL – Bd global panzootic lineage = globális pánzootikus Bd-vonal

TBQ – total bufadienolide quantity = a mintában található bufadienolidok mennyisége

NBC – number of bufadienolide compounds = a mintában található bufadienolid komponensek száma

OD – optikai denzitás

EC50 – effective concentration 50% = a maximális gátlás 50%-ához szükséges toxinkoncentráció

H – magyarországi származás

U – angliai származás

C – svájci származás

E – spanyolországi származás

S – svédországi származás

TK – tápfolyadékos kontroll

PK – pozitív kontroll

NK – negatív kontroll

2 Bevezetés

A kétéltűek napjaink leginkább veszélyeztetett gerinces osztálya[1], populációik egyedszámai világszerte csökkenő tendenciát mutatnak. Az IUCN Vörös Listája a kétéltűfajok 41%-át a fenyegetett kategóriába sorolja[1]. Számos tényező veszélyezteti őket, legjelentősebbek az élőhelyek és szaporodóhelyek beszűkülése és eltűnése, illetve a járványos fertőző betegségek terjedése[2]. A legfontosabb fertőző kétéltűbetegség a kitridiomikózis, nevű gombabetegség, melyet a *Batrachochytrium* genusba tartozó rajzóspórás gombák okoznak. Ez a betegség legalább 501 faj egyedszám-csökkenésében játszott szerepet az elmúlt fél évszázadban, ebből 90 faj feltételezhetően ki is pusztult[3]. Ez a valaha dokumentált legnagyobb, kórokozóhoz köthető biodiverzitás-veszteség[3].

A kétéltű-populációk egyedszámcsökkenéseit olyan biodiverzitás-hotspotokon, mint Közép-Amerika vagy Ausztrália, már a 20. század utolsó évtizedeiben megfigyelték a herpetológusok, és sejtették is, hogy valamilyen fertőzés állhat a pusztulás hátterében[4, 5]. Végül Berger és mtsai 1998-ban tárták fel, hogy egy rajzóspórás gomba által okozott betegség, a kitridiomikózis okozza a kétéltűek elhullását[5]. Ez meglepő volt, hiszen ez volt az első ismert példa arra, hogy egy rajzóspórás gomba négylábú gerinces állatot parazitáljon[5]. A Chytridiomycota törzsnek addig csak szaprotróf, illetve alga-, gomba-, edényes növény-, kerekeshéreg-, fonálféreg-, rovar- és halparazita fajai voltak ismertek[5]. Az ekkor leírt *Batrachochytrium dendrobatidis* (a továbbiakban Bd) 15 évig a genus egyetlen fájának számított. A második fajt 2013-ban írták le, *Batrachochytrium salamandrivorans* néven, miután foltos szalamandrák (*Salamandra salamandra*) tömeges elhullását tapasztalták a faj nyugat-európai populációiban[6]. Ez a gombafaj csak farkos kétéltűekben okoz megbetegedést, míg a Bd mindhárom kétéltűrend fajaiban[7].

A kitridiomikózis okozta károk mérséklése érdekében a konzervációbiológusok számos természetvédelmi intézkedést, stratégiát és lehetséges gyógymódot felvetettek már, vakcinázástól hő- és vegyi kezelésem át a probiotikus kezelésig [8–11]. Annak megértéséhez, hogy milyen módon érdemes beavatkozni a gazda-kórokozó kölcsönhatásokba a kitridiomikózis által okozott károk minimalizálásához, kulcsfontosságú ezeknek a kölcsönhatásoknak, és a járványok tér- és időbeli mintázatainak minél pontosabb megismerése.

2.1 Szakirodalmi áttekintés

Jelen kutatás fókuszában a Bd és a Bd okozta kitridiomikózis áll, így a következőkben ennek a gombafajnak a bemutatására szorítkozom. A Bd-re az aszexuális reprodukció jellemző, szexuális szaporodása nem ismert[7, 12]. Ostorral aktívan mozgó, vízben terjedő zoospórái a

kétéltűek bőrének hámsejtjein tapadnak meg. Ezután a spóra elveszti ostorát, és kitines sejtfal szintetizálásával cisztát képez. A ciszta tartalma egy tubulus segítségével bejut a mélyebben fekvő rétegek hámsejtjeibe, majd a sejten belül létrejött tallusz újabb tubulusokkal egyre mélyebb sejtrétegekbe vándorol. A tallusz mérete folyamatosan nő, végül a stratum germinativum sejtjeinek egyikében sporangiummá alakul, és aszexuális szaporodással, mitózisok sorozatával zoospórákat hoz létre. Ezek éppen akkor érnek meg, és ürülnek a külvilágba, amikor a sporangiumok a differenciálódó epidermiszsejtekkel a bőrfelszínre kerülnek. Mivel a sporangiumok érése a hámsejtek differenciálódásával és felszínre kerülésével összehangoltan történik, a Bd csak az elszarusodó hámsejtekben képes növekedni[7, 12]. Mivel az ebihalak bőre nem szarusodik el, ezért a Bd egyedül a keratinizált szájképletükön tud megtelepedni, és átalakuláskor képes csak szétterjedni az egész testfelületen. Ennek következménye, hogy ilyenkor jelentősen megnő a fertőzésintenzitás, ráadásul a metamorfózis nagy energiabefektetést igényel, és alatta az egyedek jellemzően immunszuppresszált állapotban vannak, így nem meglepő, hogy a mortalitás az átalakuláskor a legnagyobb[13, 14].

A fertőzés okozta strukturális károsodások a bőr áteresztőképességének megváltozásával, így az állat víz- és sóháztartásának tönkretételével járnak. A kétéltűek esetében a bőr az elsődleges ozmoregulációért felelős szerv, így az ozmoregulációs képesség sérülése miatt felborulhat a testfolyadékok ion-homeosztázisa, ami súlyos esetben a szív leállásához vezethet. A bőr integritásának sérülésével az állat továbbá rendkívül kitett lesz a bakteriális felülfertőződésnek, valamint a károsodások a természetes ellenségek (mikrobák élősködők és ragadozók) elleni kémiai védekezés komponenseinek mennyiségét is csökkenthetik[7, 15]. A betegség klinikai tünetei sokfélék lehetnek, jellemző a rendellenes vedlés, a hiperkeratózis, a bőr elszíneződése és a fekélyesedés[7].

A Bd-nek a túléléshez vizes, nedves közegre van szüksége, a zoospórák a kiszáradástól gyorsan elpusztulnak[7]. Továbbá a Bd hőmérsékleti optimuma viszonylag alacsony, 17 és 25 °C között található, a tartós 30 fok fölötti hőmérséklet már letális számára [16]. A kétéltűek vízhez való kötöttségük és változó testhőmérsékletük miatt alkalmas gazdaszervezetei a rajzóspórás gombáknak[7].

A fertőzés elleni védekezés, illetve a növekedés, szaporodóképesség és egyéb fitness-jellemzők között jellemzően negatív kapcsolat (trade-off) áll fenn[13]. A fertőzés megelőzése és/vagy kontrollálása energiabefektetést jelent, tehát kevesebb allokálható forrás marad a fitnesskomponensek fenntartására, ami miatt az állat kevésbé sikeres a fejlődésben, növekedésben és a test integritásának fenntartásában. Ezek kulcsfontosságúak a sikeres túléléshez, így az állat túlélési esélye még akkor is csökkenhet, ha legyőzi a fertőzést, és

kigyógyul a betegségből[13, 17]. Ha egy fajnál nem tapasztalunk tömeges elhullást, a szubletális hatások felgyülemése akkor is hosszantartó negatív hatással lehet a populációira[18].

A Bd-nek hat fő leszármazási vonala ismert, ezek közül a legvirulensebb a legszélesebb körben elterjedt a global panzootic lineage (GPL)[19]. Ismert, hogy a már elvált leszármazási vonalak képesek rekombinálódni. Ennek sejtbiológiai mechanizmusa még felderítetlen, de feltehetően nem meiotikus rekombinációval, hanem gametogámia nélkül, paraszexuális úton történik[19, 20]. Európában a BdGPL vonal a legelterjedtebb, de megtalálták a kontinensen az eredetileg Dél-Afrikában leírt BdCAPE, és a többitől genetikailag nagyon távol álló, először Svájcban izolált BdCH vonalat is. Egy 2018-as tanulmány 177 világszerte gyűjtött Bd-izolátum genomjának szekvenálásával és összehasonlításával derítette fel a fajon belüli pontos leszármazási viszonyokat. Úgy találták, hogy egy újonnan leírt, a Koreai-félszigeten őshonos, hiperdiverz vonal, a BdASIA-1 állhat a legközelebb a többi leszármazási vonal őséhez[20]. Ebbe a bazális kládba illeszkedik bele a BdCH izolátum is[20]. A BdASIA-1 fertőzés a megfigyelések szerint nem okoz klinikai tünetekkel járó megbetegedést. A többi Bd-vonal divergenciája a 20. század elejére tehető, a hipervirulens BdGPL valószínűleg 50-120 éve vált el a többi vonaltól, azóta terjedt el és okozott járványokat világszerte[20].

A Bd térhódítása tehát jelen tudásunk szerint Délkelet-Ázsiából indult, és főleg a kétéltűek fogyasztási és hobbicélú kereskedelmének köszönhető. Különösen nagy szerepe volt ebben az amerikai ökörbékának (*Lithobates catesbeianus*) és az afrikai karmosbékának (*Xenopus laevis*) [7, 21]. Előbbivel főleg az élelmiszeripari, utóbbival a labor- és hobbiállatként való felhasználása miatt kereskedtek. Mindkét fajt könnyen megfertőzi a Bd, ám ellenállóak a betegséggel szemben, nem okozza az elhullásukat, így közvetítésükkel a Bd könnyen és észrevétlenül terjedhetett el. A Bd mára minden olyan kontinensen jelen van, ahol kétéltűek előfordulnak, és Délkelet-Ázsián kívül, ahol stabil koegzisztencia figyelhető meg a kétéltűek és kitridgombák között, mindenhol jelentős hatása van a kétéltűekre[20]. A pusztulás mértéke azonban nem mindenhol ugyanakkora[3], a járványok súlyosságában Európán belül is viszonylag nagy különbségeket tapasztalunk. Nyugat-Európában több kétéltűfajnál is tömeges elhullásokat és nagymértékű állománycsökkenést figyeltek meg[22], Közép- és Kelet-Európában viszont, bár széleskörűen előfordul a kórokozó, nem dokumentáltak még tömeges elhullásokat. Bd-hez köthető fokozott pusztulást a régióban először Magyarországon, a Mátra hegységben, Parád közelében figyeltek meg, sárgahasú unka (*Bombina variegata*) populációban[23]. Hozzá kell tenni azonban, hogy a frissen átalakult, betegség következtében elhullott egyedek tetemei nagyon aprók és gyorsan bomlanak, ezért az ilyen átalakuláskor

tapasztalt tömeges pusztulásokat rendkívül nehéz detektálni, így a veszteség a tapasztaltnál nagyobb mértékű is lehet[23].

A kitridiomikózis-járványok súlyosságában látható földrajzi variancia mögött három fő ok állhat. Egyrészt az élőhely klimatikus viszonyai hatással lehetnek a betegség és a járvány súlyosságára[24]. Másrészt a különböző régiókban előforduló Bd-vonalak eltérő virulenciája és patogenitása is állhat a különbségek hátterében[25]. Harmadrészt számos in situ megfigyelés és laborkísérlet bizonyítja, hogy nemcsak kételtűfajok között[26], de fajon belül, a populációk között is lehetnek eltérések a Bd-re való érzékenységekben[27–29], tehát a gazda oldaláról az inter- és intraspecifikus változatosságnak is szerepe lehet a járványok földrajzi varianciájában. Emellett a Bd-nek ellenálló kételtűpopulációk a kórokozó rezervoárjaiként funkcionálhatnak, segítve ezzel a kórokozó fennmaradását és az esetlegesen felépülő érzékenyebb populációk újrafertőződését. Egy másik elmélet szerint viszont éppen ezek a populációk tudják biztosítani a faj felépülését és az élőhelyek rekolonizációját egy járvány után[29]. A kételtűfajok különböző populációinak és a Bd különböző törzseinek vizsgálata segítségünkre lehet a járványok dinamikájának, a kiváltott adaptív válaszok kialakulásának és a betegség hatására történő evolúciós folyamatoknak megismerésében.

A Bd-t aszexuális szaporodása miatt sokáig genetikailag igen homogén fajnak gondolták, ám mára bebizonyosodott, hogy ez egyáltalán nincs így[30]. A kórokozó gyors globális elterjedésének, klonális expanziójának ellenére jelentős genetikai és fenotípusos variancia fedezhető fel nemcsak a fő leszármazási vonalak között, de azokon belül is[31, 32]. Egy tanulmányban Dang és mtsai Észak-Amerika négy különböző régiójából származó BdGPL-izolátumokkal fertőzték meg három békafaj egyedeit, és közülük az egyik faj (*Anaxyrus boreas*) esetében szignifikáns különbséget találtak a Bd-törzsek virulenciája között[33]. Egy másik tanulmányban Fisher és mtsai Európa különböző pontjain izolált BdGPL-törzseket hasonlítottak össze, és úgy találták, hogy jelentősen különböznek fertőzőképességben és bizonyos, a fertőzőképességgel összefüggő tulajdonságokban, például a sporangium méretében[30]. A különböző törzsek genomjának és proteomjának összehasonlításával beazonosítottak olyan géneket, melyek meghatározzák a törzsek fertőzőképességét. Refsnider és mtsai leírták, hogy kételtűbőrön való tenyésztés során a fokozott génműködés mértéke szignifikáns pozitív kapcsolatot mutat a génben található nukleotid-polimorfizmusok számával[34]. A kórokozó tehát genomi és fenotípusos szinten is igen dinamikus változatosságot mutat, mely nagy adaptív potenciált biztosít számára. A virulencia-shift, azaz a fertőzőképesség gyors megváltozása is jellemző a Bd-re[34], ennek genetikai hátterében valószínűleg a kromoszómakópia-szám (chromosomal copy number -

CCN) megváltozása áll. A CCN pozitívan korrelál a fertőzőképességgel, fenntartása viszont valószínűleg költséges, hiszen azt figyelték meg, hogy mesterséges tenyészetben tartva, szelekciós nyomás híján a CCN lecsökken, s így lecsökken a virulencia is, ami a törzs attenuációját okozza. Ennek gyakorlati jelentősége, hogy egy ilyen, sokáig mesterséges körülmények között tartott, sok átvitelén áttesett, attenuálódott törzs használata a valóságot nem tükröző eredményekhez vezethet a laborkísérletekben. Ha azonban fagyasztva tárolt (cryopreserved) vagy frissen izolált Bd-t használunk, vagy ha a kísérlet előtt a használni kívánt törzzsel megfertőzünk egy állatot, majd a fertőzött állatról újraizoláljuk a kórokozót, azzal kiküszöbölhetjük az attenuációt[35]. Jelen tudásunk szerint tehát a kórokozó a virulencia-asszociált gének és a CCN megváltozásával[34], valamint az egymástól elvált leszármazási vonalak rekombinációjával gyors adaptációra képes, ami kulcsfontosságú abban, hogy ilyen változatos élőhelyeken és ilyen sok gazdafajban előfordul[36]. Hogy jobban megértsük, milyen mechanizmusok állnak a patogén virulenciája mögött, vizsgálnunk kell a különböző Bd-törzsek közötti genetikai és fenotípusos különbségeket, valamint azt, hogy ezek a különbségek hogyan befolyásolják a gazda-patogén kölcsönhatásokat[30, 32, 37].

A kórokozó mellett fontos szót ejteni a gazda védekezéséről. A kételtűek kitridgomba elleni védekezésében mind a természetes, mind az adaptív immunválasz szerepet játszik[28, 38]. Az adaptív immunválasz szerepe a kitridiomikózis elleni védekezésben jóval nagyobb, mint azt korábban gondolták, és bizonyított, hogy bizonyos MHC-konformációk elterjedése a populációban együtt jár a Bd-vel szembeni ellenállóképesség növekedésével[28]. Mégis a bőr a kételtűek első védvonal a fertőzésekkel szemben, és a bőrfelületre elválasztott kémiai anyagok jelentette természetes védelem kiemelten fontos részét képezi a kételtűek immunrendszerének – sokszor önmagában elegendő a Bd-fertőzés leküzdéséhez[7, 38]. Ezek a vegyületek állandóan termelődnek, ám termelésük bizonyos határok között változtatható a külső és belső hatások függvényében[39]. A termelt anyagok lehetnek antimikrobiális peptidek (AMP-k), sejtfalbontó lizozimek, a Bufonidae családba tartozó fajoknál pedig az alkaloidok és a szteránvázis bufadienolid vegyületek jellemzők[7, 40]. Számos tanulmány eredménye bizonyította már, hogy az AMP-knek fontos szerepük van a Bd-fertőzés kontrollálásában vagy legyőzésében[41], a lizozimek, alkaloidok és bufadienolidok Bd elleni hatékonyságáról azonban sokáig egyáltalán nem volt adatunk.

Ahogy fent is említettem, a kételtűek kémiai védekezéséről ismert, hogy bizonyos fokú fenotípusos plaszticitás érvényesül benne[39], és az is, hogy a bőr funkcióinak károsodásával járó kitridiomikózis negatívan befolyásolja az állatok méregtermelését[15]. A kitridiomikózissal kapcsolatban azonban arra is megfigyeltek már példát, hogy Bd-fertőzésen

átesett egyedek nagyobb mennyiségben termelnek mérget, mint naiv fajtársaik[42]. Arról azonban, hogy a Bd-vel való koegzisztencia okozza-e egy populációban a kémiai védekezés hatékonyabbá válását a termelt méregkeverék összetételének megváltozásán keresztül, nem sokat tudunk. Egy 2018-as tanulmány Bd fertőzés következtében összeomlott, majd felépülő trópusi békapopulációkat vizsgált, és azt találta, hogy a felépülés nem a kórokozó attenuációja, hanem a békapopulációk rezisztensebbé válása miatt történik[43]. A kémiai védekezés megváltozásának vizsgálatához Bd-járványon még nem, illetve Bd-járványon már átesett populációk egyedeinek bőrváladékát gyűjtötték össze, és vizsgálták ezeknek a szekrétumoknak a Bd-gátló hatását. Úgy találták, hogy a Bd-vel érintkezett populációk egyedeinek bőrváladéka szignifikánsan hatékonyabb a Bd ellen. Ez a tanulmány azonban AMP-ket termelő kételtűeket vizsgált, ilyen adaptációra bufadienolidokat termelő varangyok esetében még nem találtak bizonyítékot. Arról, hogy a kételtűek kémiai védekezésével szemben ki tud-e alakulni adaptáció a Bd-törzsekben, és eltérő lehet-e különböző Bd-törzsek érzékenysége, egyelőre szinte semmit sem tudunk. Fisher és mtsai egy fent már említett tanulmányukban egy általános gombaölő szerrel (caspofungin) szemben vizsgálták különböző Bd-izolátumok érzékenységét, és nem találtak szignifikáns különbséget az izolátumok között[30].

Bufadienolidok sokfelé megtalálhatóak a természetben, a varangyokon kívül növényekben is előfordulnak. Ilyen vegyületek felelősek például a korallvirág növény mérgezőségéért[44]. Toxikus hatásukat a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ enzim blokkolásával fejtik ki[44]. A varangyfélék családjába tartozó kételtűfajok de novo állítják elő ezeket a szteránváz vegyületeket[44]. Amellett, hogy a ragadozók és versenytársak elleni védekezésben bizonyítottan szerepet játszanak, antimikrobiális hatásuk is bizonyított[44]. Ennek a mechanizmusa ugyan még nem ismert, de már jó ideje leírták különféle baktériumok és élesztőgomba esetében[44, 45]. Felmerül tehát a gyanú, hogy ezek az antimikrobiális hatással is rendelkező vegyületek tölthetik be az AMP-k kórokozók elleni szerepét a varangyokban[42]. A bufadienolidokban a szteránváz 17. szénatomjához egy két kettős kötést tartalmazó, hat szénatomos laktongyűrű, egy α -piron csoport kapcsolódik. Ehhez az alapvázhoz sokszor különféle oldalláncok kapcsolódnak, melyek befolyásolják a vegyület kémiai tulajdonságait. Azokat a bufadienolidokat, amelyekben a szteránváz harmadik szénatomján szabad hidroxilcsoport található, a bufageninek közé soroljuk. A bufotoxin-típusú vegyületeknél ezzel szemben az alapváz észterkötéssel konjugálódik egy szulfáthoz vagy dikarbonsavhoz, utóbbihoz pedig általában egy aminosav oldallánc kapcsolódik[46]. Ezek a nagyobb molekulatömegű bufadienolidok általában kevésbé potens toxinok, mint a bufageninek[44]. A bufadienolidok bioszintézise koleszterinből indul ki. A szintézis pontos útja és az átalakítást

végző enzimrendszer még nincs pontosan felderítve[44, 47], azonban úgy fest, hogy a varangyok zömében a kevésbé veszélyes és vízben is jobban oldódó bufotoxinok formájában állítják elő és tárolják a toxinokat, és csak a kiválasztás során hidrolizálódnak ezek a vegyületek bufotoxin-hidroláz enzimek hatására[44, 47].

A bufadienolidokkal foglalkozó tanulmányok zöme humán orvosi perspektívából vizsgálja ezeket a vegyületeket, például rák elleni szerként vagy antibiotikumok helyettesítésének céljából[48, 49]. Az egyetlen ismert tanulmányban, ami a bufadienolidok Bd elleni aktivitásával foglalkozik, azt találták, hogy az arenobufagin, gamabufotalin és telocinobufagin nevű bufadienolid vegyületek rendelkeznek Bd elleni gátló hatással[42]. A három általuk vizsgált vegyület esetén a maximális gátlás 41,9%, 47,0%, illetve 52,5% volt, és ez 12-50 μM -os toxinkoncentrációnál jelentkezett. A vizsgált vegyületek nem azonos hatékonysággal gátolták a Bd növekedését, így felmerül, hogy az eltérő bufadienolidok eltérő Bd-gátló aktivitással rendelkezhetnek. Azt már számos kutatás kimutatta, hogy az eltérő szerkezetű bufadienolidok eltérő citotoxikus aktivitással rendelkeznek rákos emlősejtekre nézve[44], így feltételezhető, hogy a Bd ellen sem ugyanolyan gátlóképességgel rendelkeznek a különböző bufadienolidok. A vegyületek eltérő oldalláncai eltérő hatékonyságot eredményezhetnek egy-egy ragadozó, versenytárs vagy kórokozó ellen, és az is valószínű, hogy egy sokkomponensű mérge szélesebb spektrumon nyújt védelmet az egyednek [44, 50]. A kutatók a mérge összetételének diverzifikációjában egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a bőrön és a fültőmirigyben élő mikroorganizmusoknak, hiszen ezek a baktériumok és egysejtű gombák biotranszformációval, a vegyületek átalakításával jelentős hatással lehetnek a toxinkeverék összetételére [44, 50]. Egy tanulmány szerint lehetséges, hogy mikrobióta különbözősége okozza a mérgetermelésben tapasztalt különbségeket az óriásvarangy (*Rhinella marina*) ausztráliai és dél-amerikai populációi között[50]. A mikrobiótának a fertőzések dinamikájában is fontos szerepe van, hiszen a patogénnel való kompetíciótól, Bd-ellenes metabolitok termelésén át a másodlagos fertőzések okozásáig igen sokféleképpen befolyásolhatja azt. Ugyanakkor a kémiai védekezéssel az egyed is befolyásolhatja a mikrobióta összetételét, így a termelt vegyületek indirekt módon is hathatnak a fertőzés kimenetelére[41].

3 Célkitűzés

Tanulmányunkban arra kerestük a választ, hogy a varangyfélék bufadienolid vegyületekből álló mérge gátolja-e, s ha igen, milyen koncentrációban a Bd növekedését. Továbbá azt is vizsgáltuk, hogy van-e különbség a különböző földrajzi eredetű BdGPL-izolátumok bufadienolidokkal szembeni érzékenységiében, illetve egy varangyfajon belül a különböző populációk által termelt mérgek Bd elleni hatékonyságában.

Arra is kíváncsiak voltunk, eltérő-e a Bd-izolátumok érzékenysége az azonos, illetve más európai régiókból származó bufadienolid-szekréumokkal szemben. Mivel a koegzisztencia során elképzelhető, hogy szelekciós nyomás alá kerül a gazda védekezése, ill. a kórokozó ellenállóképessége, ezért azt vizsgáltuk, hogy megfigyelhető-e valamiféle lokális adaptáció a varangyok méregtermelésében, ami a varangypopulációval egy helyen előforduló Bd-vonal ellen leghatékonyabb méreg termelését okozza, vagy éppen a Bd adaptációja miatt a lokális varangypopuláció mérge a legkevésbé hatékony a helyi Bd-vonal ellen.

4 Anyag és módszer

4.1 A barna varangy (*Bufo bufo* s.l.) mint modellállat

Kutatásunkban a barna varangyot (*Bufo bufo* s.l.) választottuk modellállatnak a kémiai védekezés földrajzi változatosságának felderítéséhez, és annak vizsgálatához, hogy ez a változatosság kapcsolatban áll-e a lokálisan elterjedt Bd-vonalak bufadienolidokkal szembeni érzékenységgel. A barna varangy fajkomplex egy Európában széleskörűen elterjedt, közeli rokon fajokat tömörítő fajcsoport. Magyarországon védett, az IUCN listáján nem fenyegetettként (LC) szerepel[1]. Szinte az egész kontinensen jelen van, csak néhány szigetről és északi régióból hiányzik. Elterjedésének keleti határát Nyugat-Szibériában és Kazahsztán északkeleti részén éri el, valamint Észak-Afrikában és a pontokaspikus régióban is találhatóak állományai[51]. Hagyományosan egy fajnak tekintették, és a törzsalak mellett három alfaját különböztetik meg, melyek közül a *Bufo bufo spinosus* és a *Bufo bufo verrucosissimus* alfajokat mára már az új filogenetikai tanulmányok alapján külön fajként kezeljük[52]. Jelenlegi tudásunk szerint Franciaország nyugati és déli részén, az Ibériai-félszigeten és Észak-Afrikában az így elkülönített *B. spinosus* faj fordul elő, a barna varangy (*B. bufo*) nem[52]. A rokon fajok közös őse a késő-közép miocénban, kb. 12 millió évvel ezelőtt az Anatóliai-félszigetről indulva kolonizálhatta Európát, a *Bufo spinosus* faj leválása 7-8 millió évvel ezelőtt történt, ebben feltehetően a glaciális időszakok alatti eltérő refugiumokba való visszahúzódás és a Pireneusok jelentette barrier játszottak kulcsszerepet[52]. Bár a két faj ivardeterminációs mechanizmusa különböző (a *Bufo bufo* a ZW ivari kromoszóma rendszer, míg a *Bufo spinosus* az XY rendszer jellemző), mégis képesek hibridizációra, van is hibridzónájuk Franciaország délkeleti részén[53]. Morfológiai alapú megkülönböztetésük a hibridzónában problémás, genetikai módszerekkel viszont elkülöníthető a két közeli rokon faj[52].

Széles elterjedése miatt a barna varangy fajkomplex ideális modell a kémiai védekezésnek és a Bd-varangyméreg kölcsönhatásoknak földrajzi változatosságát vizsgáló kutatásunkban. A faj filogeográfiája viszonylag jól ismert [52, 54], illetve Európa nagy részén találhatóak Bd-vel együtt élő populációi, viszont a különböző régiók populációiból gyűjtött egyedeknél eltérő érzékenységet figyeltek meg a fertőzőes labor kísérletekben[17]. Annak ellenére, hogy csoportos pusztulást eddig egyedül Spanyolországban dokumentáltak náluk[55], a populációk egyedszámai számos helyen csökkenő tendenciát mutatnak, a csökkenés hátterében pedig akár a kitridiomikózis szubletális, indirekt negatív hatásai, vagy kitridiomikózis okozta rejtett mortalitás is állhatnak. A Bd-fertőzés indirekt negatív hatását a fitneszre több tanulmány is kimutatta már a faj esetében.[13, 17]. Kémiai védekezésüket a

bufadienolidok termelése jelenti, ez a bőr granuláris mirigyeiben történik, melyekből különösen sok van a nagyméretű fültőmirigyekben. Egy korábbi tanulmány 22 különböző bufadienolid vegyület előfordulását mutatta ki a szekrétumban[15]. A faj méregtermelése földrajzi változatosságot mutat, egy korábbi vizsgálat szerint ugyanarról az élőhelyről gyűjtött ebihalak méregtermelése jobban hasonlít egymásra, mint más élőhelyek egyedeinek méregtermelésére, ennek hátterében lokális adaptáció állhat[56].

4.2 A méregminták gyűjtése és előkészítése

A méregminták gyűjtése 2023 tavaszán történt Európa öt egymástól távoli régiójában, öt országban (Egyesült Királyság, Magyarország, Svájc, Svédország és Spanyolország), barna varangy (*Bufo bufo* és Spanyolországban *B. spinosus*) populációkból. A régiók állományaira a továbbiakban „földrajzi populációk”-ként hivatkozom. Mind az öt országban, tehát minden földrajzi populáció esetén 3-3 varangypopulációt mintáztunk meg. Ez alól kivételt képez a svájci földrajzi populáció, mert ott 4 különböző populációból voltak mintáink. A mintavétel során feljegyeztük az állatok ivarát, tömegét, a lábak nélküli testhosszt (az orr és kloáka távolsága - snout to vent length, SVL), valamint a fültőmirigy hosszát és szélességét. Az állatok bal fültőmirigyéből laboratóriumi papírkendőkbe nyomtuk ki a váladékot, majd a kendőket etanollal feltöltött üvegekben szállítottuk a HUN-REN ATK NÖVI Julianna majori kísérleti telepére, ahol az előkészítésig -20 °C-on tároltuk a mintákat. A mintázás helyszíneit az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: A méregminták gyűjtésének helyszínei és a mintázott egyedek száma

	helyszínek	mintázott egyedek száma
Svájci földrajzi populáció	Itingen (N47,45962°; E7,78322°),	1
	Herzogenmatt (N47,53533°; E7,55138°),	3
	Pratteln (N47,50692°; E7,68561°),	12
	Tenniken (N47,43529°; E7,82367°)	9
Svédországi földrajzi populáció	Kindbäcksmåla (N56,50681°; E15,75408°),	15
	Stjärnamo (N56,75688°; E16,06369°),	15
	Runtorp (N56,60855°; E15,95862°)	12
Spanyolországi földrajzi populáció	Laguna Grande (N40,83977°; W-3,95715°),	10
	Laguna de los pajaros (N40,86024°; W-3,94766°),	3
	Laguna Ercina (N43,26603°; W-4,98162°)	6

Angliai földrajzi populáció	Newport Canal (N52,77545°; E2,37186°), Granville Country Park (N52, 70671°; E2,41909°), Wrekin Reservoir (N52,68061°; E2,53816°)	15 15 15
Magyarországi földrajzi populáció	Apátkút-Pisztrángos (N47,76706°; E18,98153°), János-tó (N47,71371°; E19,01957°), Felső-Hosszúrét (N47,72682°; E19,01652°)	15 14 15

A méregminták előkészítésében és a mérések kivitelezésében Móricz M. Ágnes (HUN-REN, ATK, NÖVI) volt segítségemre. A mintákat tartalmazó üvegcséket kézzel, majd ultrahangos szonikátorral (TeslaUC005AJ1) ráztuk. Ezután ismert tömegű lombikba pipettáztuk a lehető legtöbb folyadékot az üvegcséből. 5 ml metanolt mértünk bele az üvegcsébe, majd újra ultrahangos szonikálást alkalmaztunk. Ismét átpipettáztuk a lombikba a lehető legtöbb folyadékot az üvegcséből. A kendőből steril csipeszek segítségével minél több folyadékot kinyomkodtunk, majd a kendőt kivettük az üvegcséből, belehelyeztük egy fecskendőbe, és a fecskendő segítségével a kendőben lévő maradék folyadékot a lombikba facsartuk. Ezután az eredeti üvegcséből az összes folyadékot átpipettáztuk a lombikba. A lombik tartalmát desztilláló készülék segítségével (Büchi Rotavapor R-134) bepároltuk. A lombikok tömegét (bennük a visszamaradt szárazanyaggal) lemértük. A lombikban visszamaradt szárazanyaghoz 1 ml metanolt adtunk, és ismét ultrahangos szonikálásnak vetettük alá. Végül a lehető legtöbb folyadékot felpipettáztuk, és egy 0,22 µm-es pórusméretű szűrőn keresztül 2 cm³ térfogatú barna üvegcsébe fecskendeztük.

Az ily módon előkészített minták bufadienolid-tartalmát nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával és tömegspektrometriával (HPLC-DAD-MS) határoztuk meg. Az általunk használt műszer (Shimadzu LC-MS 2020) bináris gradiens pumpából, vákuumos gázmentesítőből, termosztált automata mintaadagolóból, fűthető oszloptérből, diódasoros detektorból és elektroporlasztásos ionizációval működő egyszeres quadrupol tömeganalizátorból (ESI-MS) állt. A kromatogramon a vegyületek UV-spektruma alapján azonosítottuk be bufadienolid-csúcsokat. Jellegzetesen 297 nm-nél (vagy ahhoz nagyon közel) találjuk az abszorbancia-maximumot ezeknél a vegyületeknél[50]. Összehasonlítottuk továbbá a tömegspektrumot és a retenciós időt nyolc ismert és párhuzamosan futtatott bufadienolid standard adataival (marinobufotoxin, bufotalin, cinobufotalin, bufalin, bufogenin, cinobufagin, telocinobufagin és arenobufagin). Így ismeretlen bufadienolid vegyületeket is tudtunk detektálni, illetve az m/z érték (tömeg-töltés hányados, gyakorlatilag a molekulatömeget jelenti) és a retenciós idő alapján el is tudtuk őket különíteni egymástól.

A kromatográfiás elválasztást 35 °C-on, Reprospher 100 C18-DE oszlopon (150 mm hossz, 3 mm belső átmérő, 5 µm szemcseméret, Dr. Maisch, Ammerbuch, Németország) végeztük, 3 µl minta injektálásával. Az analízishez acetonitrilt 0,1% hangyasavval (B) alkalmaztunk a következő gradiens programmal: 0–9 perc: 25–30% B; 9–13,5 perc: 30–55% B; 13,5–14 perc: 55–100% B; 14–17 perc: 100% B; 17–17,2 perc: 100–25% B; 17,2–20 perc: 25% B. Az áramlási sebesség 0,8 ml/perc volt. A tömegspektrométert pozitív módban, ESI forrással használtuk az alábbi beállításokkal: kapilláris (DL) hőmérséklet: 250 °C; porlasztási hőmérséklet: 400 °C; szárító N₂ gáz áram: 15 l/perc; porlasztó N₂ gáz áram: 1,5 l/perc. A rendszer vezérlését és a mérések mennyiségi értékelését LabSolution (Shimadzu, Kiotó, Japán) szoftverrel végeztük külső kalibráció alkalmazásával.

A standardok segítségével meg lehet becsülni adott bufadienolid-komponens relatív mennyiségét és koncentrációját a mintákban. A bemért anyag mennyisége és a kromatogramon látható jel erőssége (vagyis a vegyületnek tulajdonítható csúcs alatti terület) egyenesen arányosak egymással, így az ismert mennyiségben, hígítási sor szerint bemért standardokra ki tudtuk számolni az arányossági tényezőiket. Mivel ezek kis mértékben eltérhetnek egymástól, ezért a mintákban talált bufadienolid komponensek mennyiségének meghatározásához a mintákban legnagyobb mennyiségben és leggyakrabban előforduló standard, a marinobufotoxin arányossági tényezőjét használtuk.

Ezután az egyes populációkból származó mintákat összeöntöttük, majd ezeken az összeöntött mintákon megismételtük a HPLC-MS analízist, ezekben is meghatároztuk az egyes komponensek koncentrációját. Ezután az oldatokat 1,25 mg/ml-es összkoncentrációra hígítottuk, majd országonként összeöntöttük, így az adott földrajzi populációkra jellemző bufadienolid-poolokat kaptunk. Ezeket használtuk fel a kísérletekben.

4.3 Bd izolálása és a tenyészetek fenntartása

A Bd-t 2023-ban ugyanazokban a régiókban izoláltuk, ahonnan a méregminták is származnak. Az izoláláshoz minden helyszínen annak a kétéltűfajnak az egyedeiből vettünk szövetmintát, amely a legnagyobb valószínűséggel hordozza a Bd-t, vagyis amelyből az izolálás a legnagyobb hatékonysággal kivitelezhető. Mivel ezek a kétéltűfajok együtt élnek a barna varangyokkal, ezért a rajtuk elforduló Bd-törzsekkel nagy eséllyel a varangyok is találkoznak az élőhelyeken. Az izolálás helyszíneit és legfontosabb paramétereit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A Bd izolálásának helyszínei és fontosabb paraméterei

helyszín	mintázott kételtűfaj	mintázott egyedek száma	izolálás sikeressége
Svájc: Itingen (N47,45962°; E7,78322°), Herzogenmatt: (N47,53533°; E7,55138°)	<i>Ichthyosaura alpestris</i> , <i>Alytes obstetricans</i>	15 I.a. és 10 A.o.	sikeres (A.o.-ból)
Svédország: Hosmo (N56,63905°; E16,24667°)	<i>Pelophylax sp.</i>	44	sikertelen
Spanyolország: Laguna Grande (N40,83977°; W-3,95715°) Laguna Ercina (N43,26603°; W-4,98162°)	<i>Salamandra salamandra</i>	30	sikeres
Egyesült Királyság: Canterbury (Nem érkezett be az adat a leadásig)	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	3	sikertelen
Magyarország: Parád (N47.88646°; E20.00799°)	<i>Bombina variegata</i>	55	sikeres

Az állatokból vett szövetmintákat antibiotikum (penicillin-G és sztreptomycin-szulfát 200-200 mg/l koncentrációban) tartalmú szilárd TGhL táptalajban (8 g tripton, 2 g zselatin-hidrolizátum és 4 g laktóz 1 liter desztillált vízben; + 10g agar) forgatva tisztítottuk, mely fizikailag eltávolította és elpusztította a szövetek felületén található mikroorganizmusokat, ám a hámsejtek belsejében található Bd-sporangiumokat nem. A szállításhoz a mintákat antibiotikum tartalmú folyékony tápoldatba (8 g tripton, 2 g zselatin-hidrolizátum és 4 g laktóz 1 liter desztillált vízben; mTGhL) helyeztük, majd a laborban steril táptalajra (agaros mTGhL) helyeztük át a szövetdarabokat és 20 °C-on tároltuk. Néhány nap elteltével fénymikroszkóppal 100×-os nagyítás mellett kerestük a szövetminta körül a mozgó zoospórákat. Az így izolált Bd-törzseket aztán 25 cm³-es flaskákban 10 ml folyékony táplevesbe oltottuk, további egy hétig 20 °C-on tartottuk, és szemmel látható növekedés esetén 4 °C-ra helyeztük. Ezeket a kultúrákat 3 havonta oltottuk át újabb steril mTGhL-be. Az izolálás és a kísérlet között mindössze 2-3 átoltásra volt szükség. A kísérletben a H30 (magyar), SW14 (svájci) és E5 (spanyol) jelű izolátumainkat használtuk. Mivel a Bd izolálása az angliai és svédországi élőhelyekről származó szövetmintákból nem sikerült, így korábban ugyanott izolált törzseket használtunk a kísérletekben. Az SE248 (svéd) és U199 (angol) izolátumokat Dr. Matthew Fisher (Imperial

College London, Egyesült Királyság) törzsgyűjteményéből kaptuk, előbbi zöld varangyból (*Bufo viridis*) lett izolálva 2016-ban, utóbbi alpesi götéből (*Ichthyosaura alpestris*) 2014-ben.

A kísérlet kezdete előtt két héttel a tenyészetekből 2 ml-t 25 cm³-es flasksban 10 ml folyékony TGhL táplevesbe oltottunk, és 20 °C-on tároltuk. Az így felszaporított tenyészetekből 400 µl-t 9 mm átmérőjű Petri-csészébe, 10% agar tartalmú szilárd TGhL táptalajra oltottuk ki, majd újabb egy hétig 20 °C-on inkubáltuk. A kísérlet napján a Petri-csészéket 1%-os tripton oldattal (10 g tripton 1 l desztillált vízben) árasztottuk el, majd fél óra elteltével összegyűjtöttük a zoospórákat tartalmazó felülúszót. A zoospóra-koncentrációt Bürker-kamra segítségével becsültük, majd 10⁶ zoospóra/ml egységkoncentrációra hígítottuk, és ezt használtuk fel a kísérletekben.

4.4 In vitro kísérlet

Az in vitro kísérletet 96 well-es microplate-eken végeztük. A gátlási görbe megállapításához szükséges koncentráció-tartomány meghatározásához előkísérleteket végeztünk, melyeknek eredményeképpen a következő protokollt alkalmaztuk. A hétagú hígítási sor 500 µg/ml koncentrációról indult, és felező hígítást követett 7,81 µg/ml-ig. A mérlegmintákból előkészített 1,25 mg/ml koncentrációjú törzsoldatokból a hígítási tagoknak megfelelő, egyre csökkenő mennyiségeket pipettával felvittük a plate-re, majd hagytuk, hogy a metanol elpárologjon a wellékből. Ezután a wellékhez 100 µl, 10⁶ zoospóra/ml koncentrációjú folyékony Bd tenyészetet adtunk. Pozitív kontrollnak kezeletlen Bd tenyészetet, negatív kontrollnak a teszteléshez használt tenyészetből kivett, hővel elölt Bd-t használtunk (80 °C 30 percen keresztül). Mivel egyes tanulmányok szerint a metanolnak még a látszólagos elpárolgás ellenére is lehet hatása a Bd növekedésére[42], ezért mindkét kontrollból csináltunk olyan ismétléseket is, amelyek wellébe előzőleg metanolt tettünk, amit a tenyészet hozzáadását megelőzően a hígítási sorokhoz hasonlóan lepároltunk. Voltak olyan wellék is, amelyek csak 1% triptonos tápoldatot tartalmaztak, hogy megmérjük, mekkora optikai denzitása van magának a plate anyagának és a benne lévő steril tápoldatnak. A plate-ek összeállítását az 1. ábra szemlélteti. Egy plate-en belül csak egyféle Bd-izolátumot vizsgáltunk, hogy elkerüljük a kereszt-kontaminációt. Minden Bd-izolátumhoz két plate-et állítottunk össze, így minden izolátum–méreg kombinációban koncentrációként 4, összesen 28 ismétlésünk volt.

	U 1	H 2	C 3	E 4	S 5	U 6	H 7	C 8	E 9	S 10	MK 11	K 12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

1. ábra: A plate-ek elrendezése. Az U, H, C, E, S oszlopnevek a mérégminták származását jelölik. Az angliai származást „U”, a svájci „C”, a svédországit „S”, a spanyolországit „E”, a magyarországit „H” betű jelzi. A legfelső welllekbe került a legtoximegybb toxin. MK a metanolos, K a metanol nélküli kontrollok oszlopa. TK jelöli a tápfolyadékot, Ü a nem használt wellleket.

A Bd növekedésének mértékét a folyadékkultúrák optikai denzitásának (OD) mérésével vizsgáltuk. Ezt Multiskan MS 352 microplate reader segítségével mértük le, először közvetlenül a plate összerakásakor, majd egy egyhetes inkubációt követően még egyszer. Az inkubáció alatt a plate-eket 20 °C-on tartottuk. Az összeállítást követően mért adatokat csupán arra használtuk, hogy megbizonyosodjunk róla, nem történt-e hiba a plate összeállítása során, a statisztikai elemzésekben az egy hét elteltével mért adatokat használtuk.

4.5 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést az RStudio programban, r környezetben[57] végeztem.

4.5.1 A mérégminták földrajzi változatosságát jellemző elemzések

Az egyenként begyűjtött mérégmintákra kiszámoltuk az összes bufadienolid mennyiségét (TBQ = total bufadienolide quantity) és a bufadienolid komponensek számát (NBC = number of bufadienolide compounds), illetve kiszámoltuk a testtömegre korrigált TBQ-t is, majd anova, ill. Kruskal–Wallis tesztekkel megvizsgáltuk, vannak-e különbségek a különböző országokból származó minták átlagos TBQ-jában, testtömegre korrigált TBQ-jában és NBC-jében. Vizsgáltuk azt is, van-e korreláció a testtömeg és a TBQ, ill. NBC között. A

minták minőségi összetételének összehasonlításához nonmetrikus többdimenziós skálázást (NMDS) alkalmaztunk, ehhez a vegan csomag metaMDS függvényét használtuk. Ez a távolságalapú ordinációs módszer a minták közti különbségekre fókuszál, eredményeként olyan ábrát kapunk, melyen annál közelebb helyezkedik el két adatpont, minél kisebb köztük a távolság az eredeti változók szerinti n-dimenziós térben. A leképezés dimenzióinak számát 2-re állítottuk be. Annál pontosabb a leképezés, minél kisebb az ún. stresszérték. Kíváncsiak voltunk rá, hogy elkülönülnek-e egymástól a méregminták aszerint, hogy melyik országból származnak. Készítettünk olyan ábrát, amin csak az adatpontok láthatóak, és olyat is, amin csak az egyes bufadienolid-komponensek is szerepelnek, ezek annál közelebb esnek a méregmintákhoz, minél többet tartalmaznak a minták az adott komponensből. Azt is megnéztük, hogy az egyes földrajzi populációkon belül elkülönülnek-e egymástól a különböző populációkból gyűjtött minták.

Az országokként összeöntött keverékekre is kiszámoltuk a TBQ-t és NBC-t, illetve a bennük található komponensek átlagos m/z értékét is.

4.5.2 Az OD adatok transzformálása

A folyadékkultúra optikai denzitása (OD) egyenesen arányos a wellben található gombasejtek számával, melyre a vizsgálat ideje alatt korlátlan populációnövekedési modellt feltételezünk, tehát $N(t) = k \cdot e^{rt}$, ahol k a kezdeti sejtszám, t az eltelt idő, r a növekedési ráta, és $N(t)$ a sejtek száma t idő elteltével. Az adatok transzformálásakor először az összes mért OD értékből (mérget és Bd-t is tartalmazó wellek, pozitív kontroll wellek, negatív kontroll wellek) kivontuk az 1% trypton-tápfolyadékos kontrollok (TK) átlagos OD értékét, hogy megkapjuk a Bd jelentette OD-t. Mivel negatív kontrollnak (NK) hővel előlt Bd-t használtunk, amely nem tudott szaporodni ($r = 0$), ezért a negatív kontroll wellekben a sejtek száma a kiindulási érték (k) maradt. Így, mivel az OD egyenesen arányos a sejtszámmal, a szaporodóképes Bd-t tartalmazó wellek OD értékeit a megfelelő Bd-izolátum negatív kontrolljainak átlagos OD értékével elosztva és a hányadosnak logaritmusát véve megkapjuk a szaporodási ráta és az eltelt idő szorzatát. A pozitív kontroll (PK) wellekben a szaporodás elméletileg akadálytalan volt, így azokban maximális szaporodási rátával ($r_{\max}$) számolunk. A méreggel kezelt Bd-t tartalmazó wellek adatait a megfelelő Bd-izolátum pozitív kontrolljainak átlagával osztva tehát megkapjuk a ténylegesen megfigyelt szaporodási ráta és a maximális szaporodási ráta hányadosát. Ez lett a célváltozónk, hiszen ez megmutatja, hogy milyen ütemben szaporodott a Bd a maximális szaporodáshoz képest, vagyis hogy mennyire gátolta a méreg a Bd-izolátum szaporodását. A transzformáció lényegét az 1. egyenlet mutatja be.

$$\frac{\ln\left(\frac{OD - \text{mean}(TK)}{\text{mean}(NK) - \text{mean}(TK)}\right)}{\ln\left(\frac{\text{mean}(PK) - \text{mean}(TK)}{\text{mean}(NK) - \text{mean}(TK)}\right)} = \frac{\ln\left(\frac{k * e^{rt}}{k * e^{0t}}\right)}{\ln\left(\frac{k * e^{r_{\max}t}}{k * e^{0t}}\right)} = \frac{r * t}{r_{\max} * t} = \frac{r}{r_{\max}}$$

1. egyenlet: Az OD adatok transzformálása. A paraméterek jelentései a fenti bekezdésben olvashatók.

A dózis-hatás összefüggés törvényszerűségei szerint a célváltozónk nemlineárisan, logisztikus (szigmoidális) függvény szerint változik a gátlószer koncentrációjának logaritmusaival[58], így elemzésünkben a mérge koncentrációjának (c) kettes alapú logaritmusaát használtuk folytonos magyarázó változónak. Az illesztett logisztikus görbe felső aszimptótája 1, hiszen ha nincs jelen mérge, azaz a mérge koncentrációja 0, akkor $r/r_{\max} = 1$. Az alsó aszimptóta (p1 paraméter) értéke a maximális gátlás mértékét mutatja meg, tehát azt, hogy legföljebb az $r_{\max}$ hányad részére csökkenthető a Bd szaporodási rátája a mérge koncentrációjának növelésével. A görbének ezeken kívül még két paramétere van, p3 az inflexiós pontnál lévő meredekséget, p4 az inflexiós pont x koordinátáját határozza meg. Ez utóbbi paraméter egyben az EC50 (effective concentration 50%) érték logaritmusaát is megadja, mely érték azt jelzi, hogy milyen koncentrációban gátolja a mérgeominta a maximális gátlás 50%-ával a Bd növekedését[59].

További két magyarázó változónk a Bd-izolátum származása és a mérge származása voltak, mindkettő ötszintű faktor. Kíváncsiak voltunk arra, hogy befolyásolják-e ezek a faktorváltozók az illesztett logisztikus görbe lefutását, vagyis a Bd növekedésének mérgekonzentrációtól való függését. Ezt az EC50 érték segítségével tudtuk legjobban vizsgálni, így elemzésünkben főként az inflexiós pont koordinátájára koncentráltunk[60].

4.5.3 Exploratív elemzések

20 db adatpontot a plate összeállítása során történt kontamináció miatt ki kellett zárnom az elemzésből. Az exploratív elemzésekhez ábrázoltam az $r/r_{\max}$ adatokat a koncentráció logaritmusaának függvényében, ezt az ábrát elkészítettem a két származásváltozó (a mérge származását a „country”, a Bd származását a „bd” változó mutatja, az angliai származást „U”, a svájcit „C”, a svédországit „S”, a spanyolországit „E”, a magyarországit „H” betű jelzi) szintjeinek mind a 25 kombinációjára (4. ábra). Ehhez a faktorok kombinációi szerint szétválogattam az adatokat, így 25 adatsorom lett. Mindegyik adatsorra logisztikus görbét illesztettem a minpack.lm csomag nlsLM függvényével az $r/r_{\max} \sim p1 + (1 - p1) / (1 + \exp(-p3 * (\log c - p4)))$ formula szerint. A görbéket 95%-os megbízhatóságú konfidenciasávval ábrázoltam (4. ábra). A görbék illesztése során további 10 db műtermék eredetű torzító adatpontot detektáltam, melyek akadályozták az iteratív görbeillesztést. Ezeket kizártam a

további elemzésből. A 25 modell paraméterbecsléseit a kiindulási paraméterértékek becsléséhez használtam fel a további modellek készítésénél.

4.5.4 Összetett modellek

Az egyes magyarázó változók szignifikanciájának vizsgálatához komplexebb modellekre volt szükség. A 25 különválogatott, torzító pontoktól megfosztott adatsort újra összeillesztettem egy adattáblába, majd erre illesztettem különféle modelleket. Az első modellt a legegyszerűbb formula szerint illesztettem ($r/r_{\max} \sim p1 + (1 - p1) / (1 + \exp(-p3 * (\log c - p4)))$), majd egyre bővítettem a faktorváltozókkal, melyeket dummy (csak 1 és 0 értékeket felvevő) változóvá alakítottam, hogy beleépíthessem a modellekbe. Hogy az együttélés hatását vizsgáljam, létrehoztam egy olyan dummy változót is („szimpatrikus” változó), amely azoknál az adatpontoknál kapott 1-es értéket, ahol a Bd származása és a méreg származása megegyezett.

A második modellben ($r/r_{\max} \sim p1 + (1 - p1) / (1 + \exp(-p3 * (\log c - (p4 + p5 * \text{countryH} + p6 * \text{countryC} + p7 * \text{countryE} + p8 * \text{countryU}))))$) feltételeztem a $\log(\text{EC50})$ érték függését csak a méreg származásától, a harmadikban csak a Bd származásától. A negyedik illesztett modell $r/r_{\max} \sim p1 + (1 - p1) / (1 + \exp(-p3 * (\log c - (p4 + p5 * \text{countryH} + p6 * \text{countryC} + p7 * \text{countryE} + p8 * \text{countryU} + p9 * \text{bdh} + p10 * \text{bdc} + p11 * \text{bde} + p12 * \text{bdu}))))$ formulával rendelkezett, ebben már mindkettő származásváltozó benne volt, ezzel ezen változók egyes szintjeinek egy megválasztott alapszinthez képesti hatását tudtam vizsgálni az inflexiós pont helyzetére. Ezek mellett készítettem olyan modellt is, ahol az utóbbi modellhez hozzáadtam a „szimpatrikus” változót ($r/r_{\max} \sim p1 + (1 - p1) / (1 + \exp(-p3 * (\log c - (p4 + p5 * \text{countryH} + p6 * \text{countryC} + p7 * \text{countryE} + p8 * \text{countryU} + p9 * \text{bdh} + p10 * \text{bdc} + p11 * \text{bde} + p12 * \text{bdu} + p13 * \text{szimpatrikus}))))$). Ezzel azt is vizsgálni tudtam, hogy van-e interakció a szimpatrikus méreg-izolátum párok között, mely ezekben az esetekben a méreg általános gátlóképessége és az izolátum általános érzékenysége mellett befolyásolja a gátlás hatékonyságát. A fenti formulában a svédországi földrajzi populációból származó méreg és a Svédországban izolált Bd az alapkombináció, de átparamétereztem a modellt többféle alapszintre, hogy megtudjam, van-e páronként szignifikáns különbség a mérgek, illetve Bd-izolátumok között. A többszörös összehasonlítások miatt p-érték korrekciót végeztem, ehhez a p.adjust függvényt használtam FDR módszerrel[61]. A modelleket az AIC értékeik segítségével hasonlítottam össze.

Az egyéb gyűjtött adatokat, mint a szekrétrum preparálás során mért száraztömege, SVL, fültömirigy méretei és ivar, későbbi elemzésekben fogjuk felhasználni, amelyek nem képezik a jelen dolgozat részét.

5 Eredmények

5.1 A méregmintákon elvégzett elemzések eredményei

A HPLC-DAD-MS elemzés segítségével a 175 mintánkból összesen 59 különböző bufadienolid vegyületet tudtunk kimutatni. Ezek közül nyolcat meg is tudunk nevezni, hiszen a mért adataik megegyeznek az általunk ismert standardok adataival. Ezek a marinobufotoxin, bufotalin, cinobufotalin, bufalin, bufogenin, cinobufagin, telocinobufagin és arenobufagin voltak. A többi 51 komponensre csak ismeretlen bufadienolid vegyületként tudunk hivatkozni. A kimutatott bufadienolidok analitikai tulajdonságait és gyakoriságukat a mintákban a 3. táblázatban foglaltam össze. A vegyületek 68%-a mind az öt földrajzi populáció mintáiban előfordult. Csak három olyan bufadienolidot tudtunk kimutatni, amelyek exkluzívak voltak egy-egy földrajzi populációra, tehát csak annak a mintáiban fordultak elő. Ezek közül a C16 jelű és C26 jelű ismeretlen komponensek csak a spanyolországi, a C19 jelű ismeretlen komponens csak a svájci mintákban fordult elő. Négy olyan bufadienolidot mutattunk ki, amelyek 2-2 földrajzi populációra voltak exkluzívak, ez a két földrajzi populáció mind a négy vegyület esetén a svájci és a spanyolországi voltak.

3. táblázat: A bufadienolid vegyületek analitikai tulajdonságai és előfordulásuk a különböző földrajzi populációk mintáiban. C a komponens nevét, RT a retenciós időt jelenti. Az m/z érték a tömeg/töltés hányadost adja meg, mely gyakorlatilag a molekulatömeget jelenti. Az AB rövidítés az arenobufagint, a MBT a marinobufotoxint, a TCB a telocinobufagint, a BT a bufotalint, a CBT a cinobufotalint, a B a bufalint, a BG a bufogenint, a CB a cinobufagint jelenti.

C	RT (perc)	m/z érték	gyakoriság az angliai mintákban	gyakoriság az svédországi mintákban	gyakoriság a magyarországi mintákban	gyakoriság a spanyolországi mintákban	gyakoriság a svájci mintákban
C1	2,08	475,00	100%	45%	86%	100%	100%
C2	2,13	687,00	9%	29%	43%	26%	0%
C3	2,20	647,00	13%	100%	73%	42%	52%
C4	2,23	701,00	31%	48%	50%	37%	20%
C5	3,00	701,00	9%	29%	45%	37%	0%
C6	3,01	715,00	47%	83%	75%	5%	64%
C7	3,40	731,00	51%	88%	82%	11%	76%
C8	3,73	713,00	7%	69%	59%	0%	36%
C9	3,85	643,00	53%	100%	80%	53%	92%
C10	4,13	729,00	98%	100%	100%	68%	96%
C11	4,28	715,00	11%	26%	41%	21%	0%
C12	4,45	685,00	49%	38%	23%	58%	80%
C13	4,47	687,00	24%	17%	5%	47%	24%
C14	4,78	685,00	51%	14%	39%	26%	60%
C15	4,78	663,00	47%	100%	80%	58%	92%
C16	4,85	743,00	0%	0%	0%	74%	0%

C17	5,10	701,00	49%	36%	61%	0%	12%
AB	5,11	417,00	20%	100%	89%	37%	96%
C18	5,13	727	96%	100%	100%	32%	96%
C19	5,30	403	0%	0%	0%	0%	16%
C20	5,31	785	0%	0%	0%	68%	4%
C21	5,60	651	22%	93%	20%	42%	72%
C22	6,00	715	24%	0%	9%	0%	40%
C23	6,01	683	7%	40%	36%	47%	56%
C24	6,30	699	78%	43%	68%	26%	76%
C25	6,31	729	96%	100%	100%	100%	88%
C26	6,51	741	0%	0%	0%	63%	0%
C27	6,78	651	91%	100%	93%	95%	92%
C28	7,16	715	100%	100%	100%	79%	96%
C29	7,16	415	2%	88%	59%	5%	68%
C30	8,20	627	73%	100%	84%	32%	92%
C31	8,27	649	91%	100%	93%	63%	92%
MBT	8,60	713	100%	90%	98%	68%	96%
C32	8,62	743	96%	100%	98%	84%	92%
C33	8,77	771	0%	2%	0%	89%	4%
C34	8,87	671	100%	100%	100%	100%	92%
TCB	9,68	403	9%	38%	34%	0%	36%
C35	10,45	647	9%	55%	16%	11%	52%
C36	10,70	711	11%	7%	34%	0%	44%
C37	10,83	755	64%	55%	55%	0%	36%
C38	11,10	671	96%	100%	98%	100%	92%
BT	11,11	445	42%	100%	98%	79%	96%
C39	11,12	486	29%	98%	73%	68%	96%
C40	11,15	757	100%	100%	100%	95%	96%
C41	11,25	779	98%	100%	100%	68%	96%
C42	11,47	669	96%	100%	100%	100%	92%
C43	11,70	727	2%	0%	0%	100%	4%
C44	12,17	635	78%	100%	95%	84%	88%
C45	12,17	401	20%	52%	66%	11%	96%
CBT	12,20	459	0%	0%	0%	47%	4%
C46	12,22	699	98%	86%	100%	58%	84%
C47	12,27	771	80%	74%	68%	0%	84%
C48	12,40	741	80%	31%	61%	84%	56%
C49	12,82	633	47%	100%	95%	84%	72%
C50	12,85	697	69%	83%	93%	68%	56%
B	13,50	387	31%	100%	91%	79%	96%
C51	14,58	529	0%	0%	0%	95%	4%
BG	14,70	443	0%	0%	0%	63%	4%
CB	14,90	385	16%	95%	91%	53%	84%

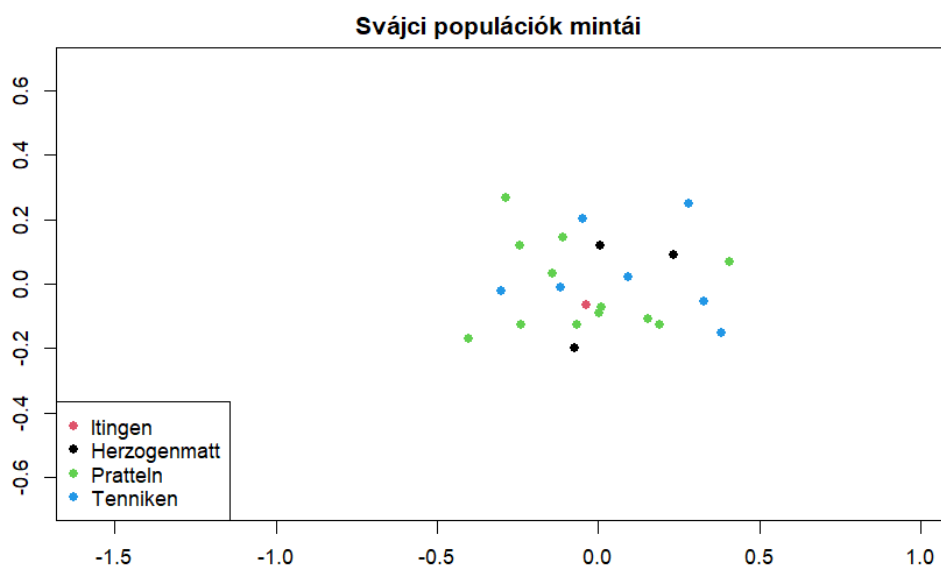
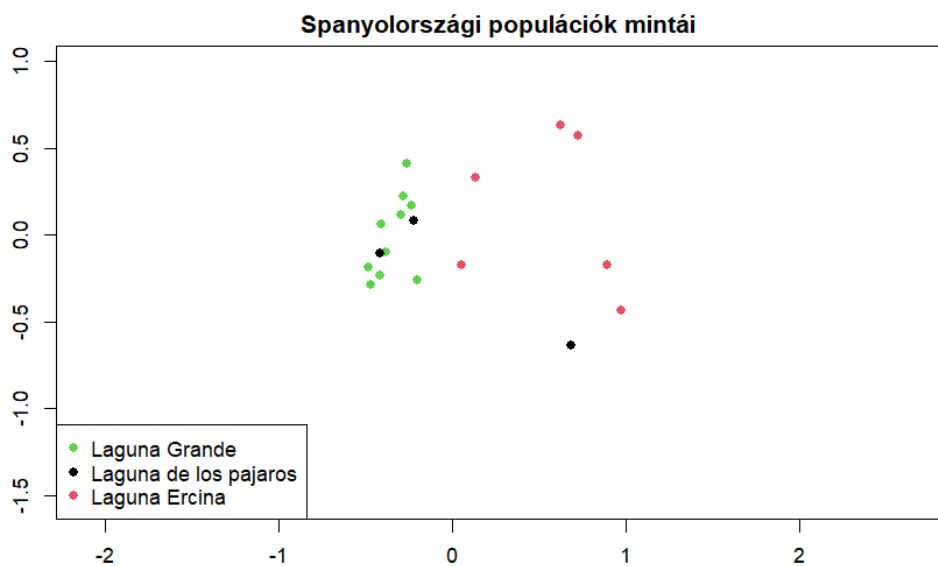
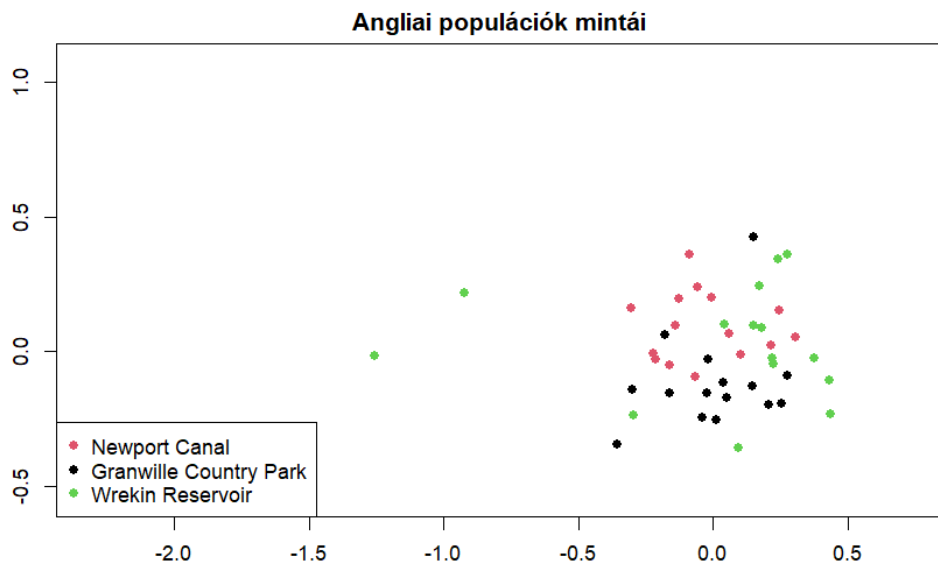
A földrajzi populációk szerinti átlagos TBQ, NBC, illetve testtömegre korrigált TBQ adatokat a 4. táblázat tartalmazza. Mindhárom változó esetében szignifikáns lett az anova-teszt, ám a modell által megkövetelt szóráshomogenitás egyedül az NBC-t vizsgáló modellnél teljesült ($R^2 = 0,29$, $p < 0.0001$), így a másik két változóra nemparaméteres Kruskal–Wallis próbát végeztünk, amely ugyancsak szignifikáns lett mindkét változó esetén ($p < 0.0001$ mindkét esetben).

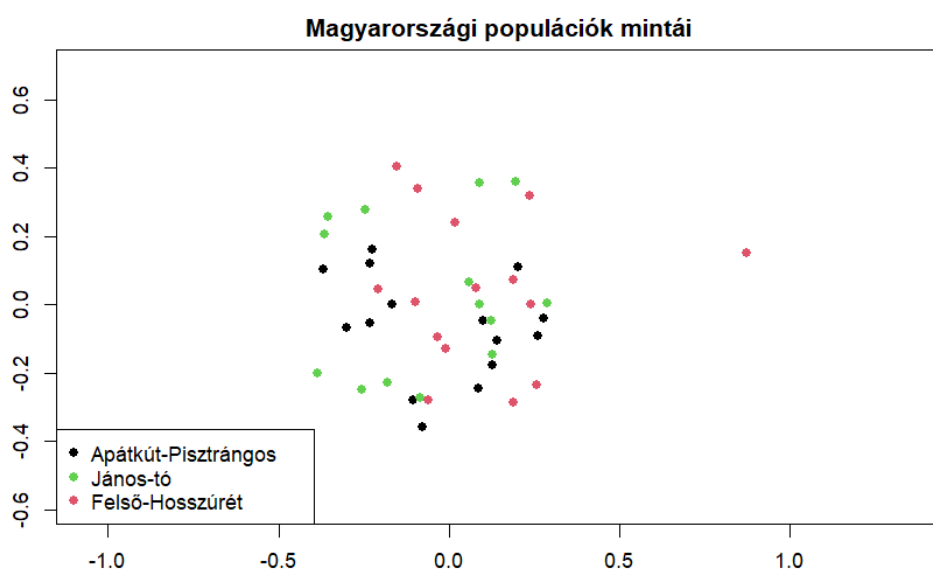
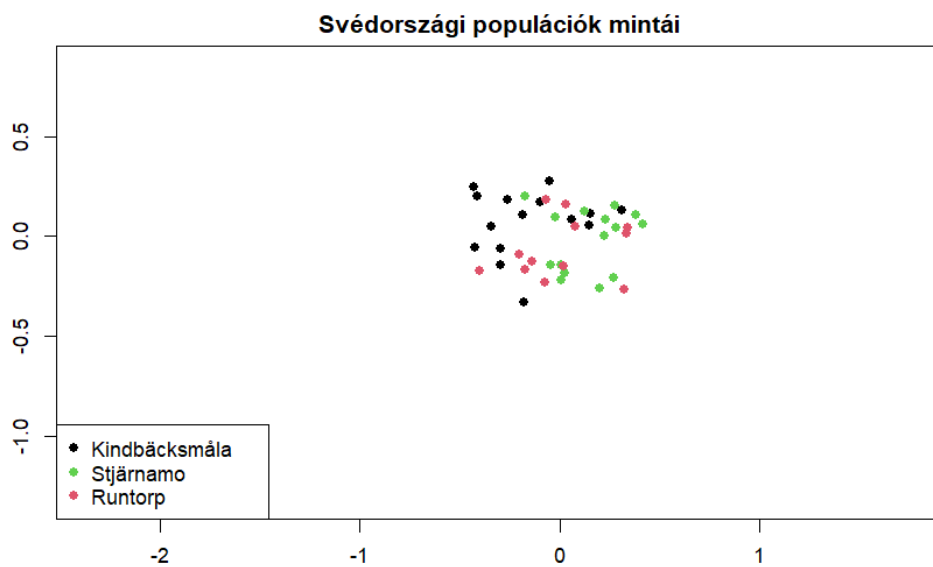
4. táblázat: A földrajzi populációk szerinti átlagos TBQ, NBC és testtömegre korrigált TBQ

	átlagos TBQ (mg) $\pm$ SD	átlagos NBC $\pm$ SD	átlagos TBQ/testtömeg (mg/g) $\pm$ SD
S	16,8 $\pm$ 6,0	36,5 $\pm$ 5,3	0,24 $\pm$ 0,2
H	28,6 $\pm$ 15,7	35,6 $\pm$ 6,5	1,40 $\pm$ 0,8
C	9,7 $\pm$ 5,3	36,8 $\pm$ 6,8	0,27 $\pm$ 0,2
E	35,3 $\pm$ 26,0	30,4 $\pm$ 5,9	0,63 $\pm$ 0,3
U	3,7 $\pm$ 3,1	27,2 $\pm$ 6,1	0,11 $\pm$ 0,1

Meglepő módon sem az NBC, sem a TBQ nem korrelált szignifikánsan a testtömeggel ($r = 0,086$, $p = 0,257$, ill. $r = -0,016$, $p = 0,836$), tehát a nagyobb tömegű állatokból nem tudunk sem szignifikánsan több, sem szignifikánsan diverzebb toxint kinyerni, mint a kisebb tömegű fajtársakból.

Az NMDS elemzésből három kiugró, feltehetően műtermék eredetű adatpontot ki kellett zárni, mert nagyon eltértek a többi adattól, így akadályozták a valódi mintázatokat megmutató ábrák készítését. Az összes adatot tartalmazó elemzésnél a stresszérték 0,148 volt, ami elfogadhatónak számít. A 2. ábra A paneljén csak az adatpontok szerepelnek, aszerint színezve, hogy melyik országból származott a minta. Jól látható, hogy a spanyolországi földrajzi populációból származó minták markánsan elkülönültek a többitől, de a magyarországi- és az angliai földrajzi populáció mintái is elkülönültek valamelyest. A 2. ábra B panelén az egyes bufadienolid-komponensek is szerepelnek, ezeken megfigyelhető, hogy mely komponensek asszociálódnak egyes földrajzi populációkkal. A 3. ábra minden földrajzi populáció esetén a három-három (svájcinál négy) populáció mintáit hasonlítja össze. Ezeken látszik, hogy a minták egyik földrajzi populáció esetében sem különültek el egyértelműen populációk szerint. A földrajzi populációnkénti elemzések esetén a stresszértékek 0,163 és 0,099 között voltak.





3. ábra: A földrajzi populációk mintáit külön vizsgáló NMDS elemzések ábrái. Az adatpontok minden földrajzi populáció esetén aszerint vannak színezve, hogy melyik populációból származnak.

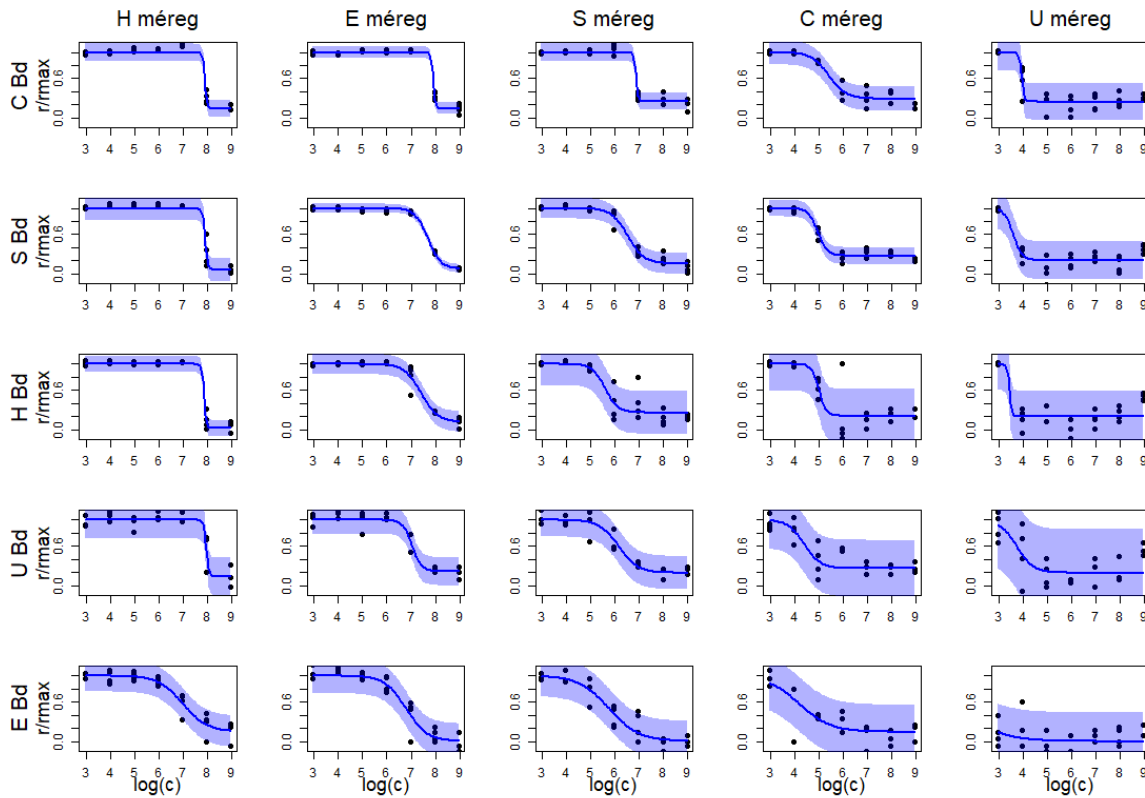
A földrajzi populációnként összeöntött mintákban már csak 52 bufadienolid komponens volt jelen detektálható mennyiségben. A bufadienolid komponensek száma (NBC) a spanyolországi földrajzi populációból származó összeöntött mintában 36, a magyarországi földrajzi populációból származó összeöntött mintában 30, a svédországi földrajzi populációból származó összeöntött mintában 26, a svájci földrajzi populációból származó összeöntött mintában 36, az angliai földrajzi populációból származó összeöntött mintában 26 volt. Az egyes keverékekben található komponensek átlagos m/z értéke a spanyolországi földrajzi populációból származó összeöntött mintában 710, a magyarországi földrajzi populációból származó összeöntött mintában 719, a svédországi földrajzi populációból származó összeöntött mintában 702, a svájci földrajzi populációból származó összeöntött mintában 705, az angliai földrajzi populációból származó összeöntött mintában 731 volt.

5.2 Az in vitro kísérlet eredményei

A metanolos és metanol nélküli kontrollok között nem találtunk számottevő különbséget (anova teszt, $p = 0,33$), így a kétféle kontroll adatokat egyben kezelve használtuk az adatok transzformálásánál. A microplate-eken végzett tesztjeink jól mutatták, hogy mindegyik méreg rendelkezett gátló hatással mindegyik Bd-izolátummal szemben. A két faktor szintjeinek mind a 25 kombinációja esetén sikeres volt a logisztikus görbék illesztése az adatokra, ezen modellek segítségével pedig meg tudtuk becsülni a görbe paramétereinek értékét a specifikus párosítások esetén. Már a görbék lefutásának összehasonlításánál is látható volt, hogy különbségek vannak a mérgek gátlóképességében és a Bd-izolátumok ellenállóképességében. A 25 kombinációra illesztett gátlási görbéket a 4. ábra mutatja. A 25 kombináció esetén becsült EC50 ($\mu\text{g/ml}$) értékeket az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat: EC50 becslések a 25 kombinációban ($\mu\text{g/ml}$)

	H méreg	E méreg	S méreg	C méreg	U méreg
C Bd	239,03	240,31	116,66	42,68	15,48
S Bd	240,88	207,59	92,55	31,07	12,16
H Bd	233,57	170,63	48,37	32,00	10,95
U Bd	248,88	131,89	71,40	21,05	13,52
E Bd	128,99	111,34	54,33	18,35	2,75



4. ábra: Gátlási görbék a faktorváltozók szintjeinek 25 kombinációjára. Az r/r_{max} a tapasztalt és maximális növekedési ráta hányadosát, a $\log(c)$ a toxinkoncentráció ($\mu\text{g/ml}$) kettes alapú logaritmusát jelenti. A görbék köré 95%-os konfidenciasávot ábrázoltam.

A teljes adatsorra illesztett, a faktorváltozókat tartalmazó modell AIC értéke -565,98 volt és jobban illeszkedett az adatokra, mint a csak a méreg származását (AIC -374,35), csak a Bd származását (AIC 305,37), vagy egyik faktort sem tartalmazó (AIC 337,15) modellek. Ha a két ötszintű faktor mellé a szimpatikus változót is bevettem a modellbe, a modell illeszkedése javult az AIC érték (-592,81) alapján. Ez a modell és a szimpatikus változót nem tartalmazó modell is szignifikáns különbséget mutatott ki a $\log(\text{EC}_{50})$ -re gyakorolt hatásban páronként majdnem az összes méreg, illetve a legtöbb Bd-izolátum között, a bővebb modellben ezek mellett a szimpatikus változó hatása is szignifikáns lett. A mérgekre és izolátumokra vonatkozó páronkénti különbségek és a szimpatikus változó hatásának becsléseit a 6. táblázat tartalmazza. A p_1 paraméterre adott becslés $0,19 \pm 0,01$ -nek, a p_3 paraméterre $-3,93 \pm 0,36$ -nak adódott. A svédországi méreg–svédországi Bd párosításban a $\log(\text{EC}_{50})$ értéket 6,45-nek becsülte a modell, ami 87,43 $\mu\text{g/ml}$ -es EC_{50} értéknek felel meg. A modell alapján tehát mind a varangyméreg, mind a Bd-izolátum származása, és az együttélés is hatással van arra, hogy milyen koncentrációnál kezdi jelentősen gátolni a méreg a Bd növekedését.

6. táblázat: A mérgekre és izolátumokra vonatkozó páronkénti különbségek hatásainak és a szimpatikus változó hatásának becslései

	$\Delta\log(\text{EC}_{50})$ becslése $\pm$ SE	p-érték (FDR módszerrel korrigálva)
H mérég – S mérég	$+1,41 \pm 0,09$	$<0,00001^*$
C mérég – S mérég	$-1,19 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
E mérég – S mérég	$+1,24 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
U mérég – S mérég	$-2,57 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
C mérég – H mérég	$-2,60 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
E mérég – H mérég	$-0,17 \pm 0,09$	0,056469
U mérég – H mérég	$-3,98 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
E mérég – C mérég	$+2,43 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
U mérég – C mérég	$-1,38 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
U mérég – E mérég	$-3,81 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
H Bd – S Bd	$-0,26 \pm 0,08$	0,00168*
C Bd – S Bd	$+0,23 \pm 0,08$	0,00727*
E Bd – S Bd	$-1,03 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
U Bd – S Bd	$-0,18 \pm 0,08$	0,03542*
C Bd – H Bd	$+0,48 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
E Bd – H Bd	$-0,78 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
U Bd – H Bd	$+0,08 \pm 0,08$	0,29538
E Bd – C Bd	$-1,26 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
U Bd – C Bd	$-0,40 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
U Bd – E Bd	$+0,86 \pm 0,08$	$<0,00001^*$
szimpatikus	$+0,23 \pm 0,07$	0,00187*

6 Diszkusszió

Az eredményeink igazolják, hogy a bufadienolid toxinok gátolják a Bd növekedését, hiszen vizsgált koncentrációtartományon belül az összes földrajzi populáció mérge hatékonyan gátolta az összes Bd-izolátum növekedését. Az AMP-kkel végzett kísérletekkel összehasonlítva a hatékony gátlás hasonló koncentrációtartományban jelentkezett[62], így arra következtethetünk, hogy a bufadienolidok sikeresen tölthetik be az AMP-k szerepét a varangyfélék Bd elleni kémiai védekezésében.

Nem tapasztaltuk, hogy az adott földrajzi populációból származó mérge az ugyanonnan izolált Bd-vel szemben rendre hatékonyabb lenne, mint a máshonnan származó izolátumokkal szemben, és azt sem tapasztaltuk, hogy a Bd-izolátumok növekedését rendre az ugyanonnan származó mérge gátolná a legkevésbé. Kimutattuk viszont, hogy a különböző földrajzi populációkból gyűjtött varangymérgek gátlóképessége jelentősen eltér egymástól. Az angliai földrajzi populációból gyűjtött mérge volt a leghatékonyabb, ezt a svájci földrajzi populáció mérge, a svédországi földrajzi populáció mérge és a spanyolországi földrajzi populáció mérge követte, a legkevésbé hatékony a magyarországi földrajzi populáció mérge volt. A leghatékonyabb mérge esetén körülbelül tizenhatod akkora koncentráció kellett a maximális gátlás 50%-ához, mint a legkevésbé hatékony mérge esetén ($\Delta\log(\text{EC}_{50}) = -3,98$; 6. táblázat). A Bd-izolátumok érzékenységében is jelentős különbségeket mutattunk ki. A leginkább ellenálló a svájci izolátum volt, ezt a svédországi izolátum, a magyarországi izolátum, majd az angliai izolátum követte, a leginkább érzékeny a spanyolországi izolátum volt. A maximális gátlás 50%-ához a svájci izolátum esetén több mint kétszer akkora toxinkoncentráció kellett, mint a spanyol izolátum esetén ($\Delta\log(\text{EC}_{50}) = 1,26$; 6. táblázat). A szimpatrikus változót tartalmazó modellből az is kiderült, hogy a maximális gátlás 50%-ához kb. 1,17-szer akkora toxinkoncentráció kellett az azonos származású mérge-Bd párosítások esetén, mint az allopatrikus párosításoknál ($\Delta\log(\text{EC}_{50}) = 0,23$; 6. táblázat). Ez a hatás kisebb, mint a mérgek, ill. izolátumok közti különbségek hatásainak legtöbbje, mégis érdekes eredmény, hogy szignifikánsnak mutatkozott. Ez azt mutatja, hogy bár a mérge gátlóképessége és a Bd-izolátum tűrőképessége nagymértékben meghatározta, hogy milyen koncentrációnál jelentkezik a gátlás, a szimpatrikus kombinációk esetén a gátlás mégis csak kicsivel (de szignifikánsan) nagyobb koncentrációnál jelentkezett, mint amire csupán a mérge általános gátlóképessége és az izolátum általános tűrőképessége alapján következtethetnénk. Mindezek alapján fölmerül a kérdés, hogy mi állhat a mérgek gátlóképességében és az izolátumok érzékenységében tapasztalt különbségek, illetve a szimpatrikus kombinációk esetén megfigyelt kevésbé hatékony gátlás evolúciós ökológiai és élettani-biokémiai hátterében.

Mivel a mérgeket egységes toxinkoncentrációra való hígítás után használtuk fel a kísérletekben, ezért csak a minőségi összetételükben különbözhetnek. Ez alapján kijelenthető, hogy a toxinkeverék minőségi összetétele nagy hatással van a keverék gátlóképességére, ez pedig megerősíti azt a feltételezésünket, hogy variancia van az egyes bufadienolid komponensek gátlóképességében. A variancia okainak felderítéséhez fontos lenne ismernünk a bufadienolidok antimikrobiális hatásának mechanizmusát, erről azonban szinte semmit sem tudunk. Állati sejtekben ezek a vegyületek a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ enzimet blokkolják, ez pedig depolarizációhoz, emelkedett sejten belüli Na^+ koncentrációhoz vezet[44]. Ezt kompenzálандó $\text{Ca}^{2+}\text{-Na}^+$ -antiporterek kapcsolnak be, melyek működése miatt a sejten belüli Ca^{2+} -szint megemelkedik, mely aztán további folyamatokat indít el a sejtben. Ez a mechanizmus a felelős a kardiotonikus szteroidok szívre gyakorolt hatásáért, valamint egyesek szerint a bufadienolidok rákos sejtekre gyakorolt osztódásgátló, apoptózist indukáló hatásáért is[63]. Mások szerint a bufadienolidok egy másik, Na^+ -tól független jelpályán keresztül fejtik ki citotoxikus hatásukat, ahol a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ szignál transzduktorként funkcionál, és a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ gátlásának mértéke nem korrelál a citotoxikus hatás mértékével[64–66].

A legtöbb eukarióta sejtnek szüksége van a sejt plazma ionkoncentrációját és a sejt és a külvilág közti elektrokémiai gradienst szabályozó enzimekre, így nem lenne meglepő, ha a Bd is rendelkezne valamiféle analóg kationpumpával[67], melyhez a bufadienolidok kötődni képesek, és az enzim gátlása vagy sejten belüli folyamatok elindítása révén a sejt halálát vagy szaporodóképtelenségét okozzák. Ha feltételezzük, hogy a bufadienolidok az állati sejtekhez hasonlóan a Bd ellen is valamely enzimhez való kötődésen keresztül fejtik ki gátló hatásukat[44], akkor azok a méregkomponensek járulnak hozzá leginkább a hatékony gátláshoz, melyek ehhez az enzimhez minél nagyobb affinitással képesek kötődni. Lehetséges, hogy vannak strukturális jellemzők, melyek (a rákos sejtek ellen megfigyelt citotoxikus aktivitáshoz hasonlóan) a bufadienolidok általános aktivitását befolyásolják, és lehetnek olyan módosítások is, melyek specifikusan a Bd enzim-konformációihoz biztosítanak erősebb kötődést. A Bd részéről ez esetben adaptívak lehetnek az olyan konformációváltozással járó mutációk, amely nem okozza az enzim funkciójának sérülését, de az összes bufadienolid vagy specifikus bufadienolidok kevésbé hatékony kötődését eredményezi. Állatok esetén ismert, hogy a különböző $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ változatokhoz eltérő mértékben kötődnek a bufadienolidok, ezzel magyarázható például az, hogy bizonyos kételtű- ill. ragadozófajok érzékenyebbek, míg mások rezisztensebbek, vagy akár immunisak a bufadienolid mérgekre (pl. vízisikló, *Natrix natrix*)[44, 68]. Az is ismert, hogy a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPáz}$ aminosavszekvenciájának mely régiójában bekövetkezett változás képes rezisztenciát okozni a bufadienolid toxinokkal szemben[44, 68].

Elképzelhető tehát, hogy ehhez hasonló mutációk állnak a Bd-izolátumok eltérő tűrőképességének hátterében, és lehetséges, hogy annak hátterében is, hogy a gátlás kevésbé volt hatékony a szimpatrikus kombinációk esetén. Tudjuk, hogy a Bd változékony genommal rendelkezik, a generációs ideje napokban, míg a varangyoké években mérhető, és egy Bd sporangium több tucat zoospórát is képes létrehozni. A varangyok méregtermelése bár mennyiség tekintetében mutat fenotípusos plaszticitást[39], de a bufadienolid-készlet valószínűleg csak jóval lassabban képes megváltozni, mint a Bd fehérjéi, és a kórokozók mellett a kompetitorok és ragadozók jelenléte is szelekciós nyomást gyakorol rá. Így nem meglepő, hogy arra mutató jeleket találtunk, hogy a kölcsönös evolúciós fegyverkezési versenyben a Bd-vonalak jobban adaptálódtak specifikusan a szimpatrikus varangypopulációk mérgeének eltűrésére, mint a varangyok méregtermelése specifikusan a szimpatrikus Bd gátlására.

Érdekes mintázat, hogy azon földrajzi populációk mérget találtunk hatékonyabbnak a Bd ellen, melyek egyedeiből kevesebb bufadienolidot tudtunk kinyerni, tehát alacsonyabb volt a minták TBQ-ja. Bár a fültőmirigyből való méreggyűjtés hatékonysága némileg eltérhetett az egyedek között, mégis olyan nagy különbségeket tapasztaltunk (csaknem tízszeres a spanyolországi és angliai, csaknem nyolcszoros a magyarországi és angliai földrajzi populáció között), hogy ez alapján feltételezhető valamiféle negatív kapcsolat a termelt méreg mennyisége és hatékonysága között. Felmerül a gyanú, hogy vannak bufadienolidok, melyek hatékonyabbak a gátlásban, de nagyobb költséget is jelent a termelésük, így ezekből csak kevesebbet képes termelni az egyed anélkül, hogy a trade-off miatt jelentős fitnessvesztést szenvedjen el. Ebben az esetben a nagy mennyiségű, de kevésbé hatékony összetételű méregkeverék, illetve a kisebb mennyiségű, de minőségi összetételéből kifolyólag hatékonyabb méregkeverék termelése eltérő allokációs stratégiák lehetnek. Ez összevág azzal az elképzeléssel, miszerint a toxinkeverékeken belül eltérhet egymástól a különböző vegyületek előállítási költsége, így a költséghatékonyságuk és termelésük fiziológiai limitációi is[47]. Az eddigi tanulmányok kifejtett barna varangy egyedeknél és más varangyfajoknál is találtak bizonyítékot trade-offra a méregtermelés és a növekedés, ill. reprodukciós siker között[69, 70]. Arról viszont, hogy vannak-e különbségek az egyes bufadienolid vegyületek szintézisének fiziológiai költségében, semmit sem tudunk[44]. Fontos lenne látni, hogy hol helyezkednek el a különböző bufadienolid vegyületek a bioszintetikus útvonalon, és mekkora különbségek vannak a szintézisük költségei között. Szem előtt kell tartanunk azonban azt is, hogy a bufadienolidok a varangyoknál nemcsak a kórokozók elleni védekezést, hanem a ragadozók és versenytársak elleni küzdelmet is szolgálják[39, 71], így csupán a Bd ellen tapasztalt gátló hatásuk alapján nem vonhatunk le túlzottan messzemenő következtetéseket. Az sem kizárható,

hogy eltérő komponensek szolgálják hatékonyan ezeket a különböző célokat, és trade-off áll fenn a méregkeverék kórokozó-, versenytárs-, és ragadozóellenes hatékonysága között. Érdekes lenne megvizsgálni, gerincesekre nézve is mérgezőbbek-e a Bd ellen nagyobb gátlóképességet mutató mérgek, mint a Bd-vel szemben kevésbé potens keverékek.

A méregminták minőségi összetételének vizsgálatára készített NMDS elemzés eredményéből látszik, hogy a spanyolországi földrajzi populáció varangyainak mérge jelentősen különbözik összetételében a többi földrajzi populáció mérgétől. A többi földrajzi populáció mintái kevésbé különültek el egymástól, bár megfigyelhető, hogy a magyarországi földrajzi populáció mintái és az angliai földrajzi populáció mintái valamelyest jobban elkülönülnek a svájci és svéd minták halmazaitól. A spanyolországi földrajzi populáció egyedei a *B. spinosus* fajba tartoznak, míg a többi földrajzi populáció egyedei a *B. bufo*-ba, így nem meglepő, hogy bufadienolid-termelésük jelentősen különbözik. A *B. bufo* földrajzi populációk pontthalmazai közötti távolságok viszont nem tükrözik egyértelműen sem a köztük lévő filogenetikai, sem a földrajzi távolságokat[54]. Lehetséges, hogy a különböző régiók populációira különböző mértékű nyomást fejt ki a versenytársak, ragadozók és Bd jelentette fenyegetés, és ezekre az eltérő körülményekre adott eltérő lokális adaptációk állnak a mérgeik közötti mennyiségi és minőségi, ill. Bd elleni hatékonyságbeli különbségek hátterében[56]. A varangyok eltérő méregtermelése mellett a mikrobióta különbözőségének is lehet szerepe a mérgek összetételében tapasztalt különbségekben, hiszen a varangyok fültőmirigyében található baktériumok biotranszformáció útján hozzájárulhattak a méregkészlet diverzifikálásához[44]. Erről sajnos nincsen adatunk, érdekes lenne vizsgálni a különböző populációk egyedeinek mikrobiótáját, és a tapasztalt mintázatot összehasonlítani a méregminták között tapasztalt különbségekkel.

A varangypopulációk mérgeinek hatékonyságában tapasztalt markáns különbségek mindenesetre alátámasztják, hogy jelentős eltérések lehetnek akár fajon belül is a kémiai védekezés Bd elleni hatékonyságában, ami összefügghet a populációk kitridiomikózissal szembeni eltérő érzékenységgel. Mivel nem tapasztaltuk, hogy a nyugat-európai Bd-vonalak rezisztensebbek lennének, sem azt, hogy a nyugat-európai földrajzi populációk mérge kevésbé hatékony lenne, megállapíthatjuk, hogy egyedül a méreg–Bd kölcsönhatások nem magyarázzák azt, hogy miért figyelhetünk meg Nyugat-Európában súlyosabb kitridiomikózis-járványokat, mint Európa más részein, és az ottani populációl egyedeivel végzett laborkísérletekben nagyobb mortalitást, mint a más populációk egyedeivel végzett kísérletekben[17, 30, 55]. Kutatócsoportunkban jelenleg zajlik egy kísérlet, melyben ugyanebből az öt régióból gyűjtött varangyokat fertőztünk meg ugyanezzel az öt izolátummal, és vizsgáljuk, hogy milyen hatással

van a fertőzés a mortalitásra és bizonyos életmenet-változókra a különböző kombinációkban. A két kísérlet eredményeinek összehasonlítása fontos támpontot adhat majd a kitridiomikózis járványok földrajzi variációjának további vizsgálatához.

Az NMDS ábrán a magyarországi- és az angliai földrajzi populáció elkülönülése érdekes mintázat, hiszen tükrözheti a két földrajzi populáció mérgének gátlóképessége közötti óriási, kb. 16-szoros különbséget. A méregminták hatékonyságát és NBC-jét ill. a bennük található komponensek átlagos m/z értékét összehasonlítva azonban sem az NBC sem az átlagos m/z érték nem mutatott összefüggést a Bd elleni hatékonysággal. Az angliai méregben volt a legkevesebb az NBC és legnagyobb a komponensek átlagos m/z értéke. Ez egyrészt arra enged következtetni, hogy a Bd ellen (egy bizonyos komponensszám fölött legalábbis) nem feltétlenül jelent előnyt a nagyobb komponensszám, másrészt arra, hogy nem csak az határozza meg a bufadienolidok Bd-gátló hatását, hogy konjugált bufotoxinról, vagy szabad bufageninről van-e szó, hanem szerepük lehet az egyéb kémiai modifikációknak is. Arról azonban, hogy van-e különbség a bufageninek és bufotoxinok Bd elleni gátlóképességében, ennyiből még nem vonhatunk le következtetést, mivel nem tudjuk, a keverékekben mely komponensek mennyire járultak hozzá a gátlás hatékonyságához.

A jövőben tervezzük, hogy HPLC segítségével elválasztjuk egymástól a méregkeverékek bufadienolid-komponenseit, és vizsgáljuk, hogy külön-külön mennyire gátolják a Bd növekedését, illetve találunk-e különbségeket az egyes Bd-izolátumok között az adott komponensre való érzékenységekben. Ha sikerül beazonosítani a hatékony gátlásért felelős komponenseket, akkor tömegspektroszkópiával meghatározhatjuk szerkezetüket. és megvizsgálhatjuk, milyen strukturális jellemzőktől függ a gátlóképesség. Ezeket az eredményeket az emlőssejtek ellen tapasztalt citotoxicitást meghatározó jellemzőkkel összehasonlítva közelebb kerülhetünk a bufadienolidok Bd-gátló hatásának mechanizmusának, és a mérgek összetételében és hatékonyságában tapasztalt különbségek evolúciós ökológiai hátterének megértéséhez is.

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, Balogh Emesének és Dr. Ujszegi Jánosnak a rengeteg segítséget és támogatást, amit a munkám során nyújtottak nekem. Nagyon hálás vagyok továbbá kutatócsoportunk összes tagjának azért, hogy bármikor számíthattam rájuk, és hogy mindig jó hangulat fogadott az intézetben. Köszönöm Móricz Ágnesnek és a Növényi Kórélettani Osztály munkatársainak, hogy lehetővé tették a méregminták HPLC-s elemzését, és hogy bármikor hozzájuk fordulhattam, ha kérdésem volt a minták előkészítése során. Köszönöm Petrának, édesanyámnak és édesapámnak a végtelen türelmet és bátorítást, amivel tartották bennem a lelket a dolgozat írása során.

Tanulmányom a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-6 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

8 Irodalomjegyzék

1. The IUCN Red List of Threatened Species. In: IUCN Red List of Threatened Species. <https://www.iucnredlist.org/en>. Accessed 14 Oct 2024
2. Sodhi NS, Bickford D, Diesmos AC, Lee TM, Koh LP, Brook BW, Sekercioglu CH, Bradshaw CJA (2008) Measuring the Meltdown: Drivers of Global Amphibian Extinction and Decline. *PLOS ONE* 3:e1636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001636>
3. Scheele BC, Pasmans F, Skerratt LF, Berger L, Martel A, Beukema W, Acevedo AA, Burrowes PA, Carvalho T, Catenazzi A, De La Riva I, Fisher MC, Flechas SV, Foster CN, Frías-Álvarez P, Garner TWJ, Gratwicke B, Guayasamin JM, Hirschfeld M, Kolby JE, Kosch TA, La Marca E, Lindenmayer DB, Lips KR, Longo AV, Maneyro R, McDonald CA, Mendelson J, Palacios-Rodriguez P, Parra-Olea G, Richards-Zawacki CL, Rödel M-O, Rovito SM, Soto-Azat C, Toledo LF, Voyles J, Weldon C, Whitfield SM, Wilkinson M, Zamudio KR, Canessa S (2019) Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science* 363:1459–1463. <https://doi.org/10.1126/science.aav0379>
4. Richards SJ, McDonald KR, Alford RA (1994) Declines in populations of Australia's endemic tropical rainforest frogs. *Pac Conserv Biol* 1:66–77. <https://doi.org/10.1071/pc930066>
5. Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, Slocumbe R, Ragan MA, Hyatt AD, McDonald KR, Hines HB, Lips KR, Marantelli G, Parkes H (1998) Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9031–9036. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.9031>
6. Martel A, Spitzen-van der Sluijs A, Blooi M, Bert W, Ducatelle R, Fisher MC, Woeltjes A, Bosman W, Chiers K, Bossuyt F, Pasmans F (2013) *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:15325–15329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307356110>
7. Van Rooij P, Martel A, Haesebrouck F, Pasmans F (2015) Amphibian chytridiomycosis: a review with focus on fungus-host interactions. *Vet Res* 46:137. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0266-0>
8. Cashins SD, Grogan LF, McFadden M, Hunter D, Harlow PS, Berger L, Skerratt LF (2013) Prior Infection Does Not Improve Survival against the Amphibian Disease Chytridiomycosis. *PLOS ONE* 8:e56747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056747>
9. Hettyey A, Ujszegi J, Herczeg D, Holly D, Vörös J, Schmidt BR, Bosch J (2019) Mitigating Disease Impacts in Amphibian Populations: Capitalizing on the Thermal Optimum Mismatch Between a Pathogen and Its Host. *Front Ecol Evol* 7:. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00254>
10. Martel A, Van Rooij P, Vercauteren G, Baert K, Van Waeyenberghe L, Debacker P, Garner TWJ, Woeltjes T, Ducatelle R, Haesebrouck F, Pasmans F (2011) Developing a safe antifungal treatment protocol to eliminate *Batrachochytrium dendrobatidis* from amphibians. *Medical Mycology* 49:143–149. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.508185>
11. Becker MH, Harris RN, Minbiole KPC, Schwantes CR, Rollins-Smith LA, Reinert LK, Brucker RM, Domangue RJ, Gratwicke B (2011) Towards a Better Understanding of the Use of Probiotics for Preventing Chytridiomycosis in Panamanian Golden Frogs. *EcoHealth* 8:501–506. <https://doi.org/10.1007/s10393-012-0743-0>
12. Berger L, Hyatt A, Speare R, Longcore J (2005) Life cycle stages of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Dis Aquat Org* 68:51–63. <https://doi.org/10.3354/dao068051>
13. Kásler A, Ujszegi J, Holly D, Üveges B, Móricz ÁM, Herczeg D, Hettyey A (2022) Metamorphic common toads keep chytrid infection under control, but at a cost. *Journal of Zoology* 317:159–169. <https://doi.org/10.1111/jzo.12974>
14. Humphries JE, Lanctôt CM, McCallum HI, Newell DA, Grogan LF (2024) Chytridiomycosis causes high amphibian mortality prior to the completion of metamorphosis. *Environmental Research* 247:118249. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118249>
15. Ujszegi J, Ludányi K, Móricz ÁM, Krüzselyi D, Drahos L, Drexler T, Németh MZ, Vörös J, Garner TWJ, Hettyey A (2021) Exposure to *Batrachochytrium dendrobatidis* affects chemical defences in two anuran amphibians, *Rana dalmatina* and *Bufo bufo*. *BMC Ecol Evo* 21:135. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01867-w>
16. Kásler A, Ujszegi J, Holly D, Jaloveczki B, Gál Z, Hettyey A (2022) In vitro thermal tolerance of a hypervirulent lineage of *Batrachochytrium dendrobatidis*: Growth arrestment by elevated temperature and recovery following thermal treatment. *Mycologia* 114:661–669. <https://doi.org/10.1080/00275514.2022.2065443>
17. Garner TWJ, Walker S, Bosch J, Leech S, Marcus Rowcliffe J, Cunningham AA, Fisher MC (2009) Life history tradeoffs influence mortality associated with the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Oikos* 118:783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17202.x>

18. Campbell L, Bower DS, Clulow S, Stockwell M, Clulow J, Mahony M (2019) Interaction between temperature and sublethal infection with the amphibian chytrid fungus impacts a susceptible frog species. *Sci Rep* 9:83. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35874-7>
19. Fisher MC, Garner TWJ (2020) Chytrid fungi and global amphibian declines. *Nat Rev Microbiol* 18:332–343. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0335-x>
20. O’Hanlon SJ, Rieux A, Farrer RA, Rosa GM, Waldman B, Bataille A, Kosch TA, Murray KA, Brankovics B, Fumagalli M, Martin MD, Wales N, Alvarado-Rybak M, Bates KA, Berger L, Böll S, Brookes L, Clare F, Courtois EA, Cunningham AA, Doherty-Bone TM, Ghosh P, Gower DJ, Hintz WE, Höglund J, Jenkinson TS, Lin C-F, Laurila A, Loyau A, Martel A, Meurling S, Miaud C, Minting P, Pasmans F, Schmeller DS, Schmidt BR, Shelton JMG, Skerratt LF, Smith F, Soto-Azat C, Spagnoletti M, Tessa G, Toledo LF, Valenzuela-Sánchez A, Verster R, Vörös J, Webb RJ, Wierzbicki C, Wombwell E, Zamudio KR, Aanensen DM, James TY, Gilbert MTP, Weldon C, Bosch J, Balloux F, Garner TWJ, Fisher MC (2018) Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines. *Science* 360:621–627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
21. Garner TWJ, Perkins MW, Govindarajulu P, Seglie D, Walker S, Cunningham AA, Fisher MC (2006) The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Biol Lett* 2:455–459. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0494>
22. Bosch J, Martínez-Solano I, García-París M (2001) Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biological Conservation* 97:331–337. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(00\)00132-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(00)00132-4)
23. Harnos K, Bosch J, Thumsová B, Martínez-Silvestre A, Velarde R, Vörös J Amphibian mortality associated with chytridiomycosis in central Eastern Europe
24. Kärveemo S, Meurling S, Berger D, Höglund J, Laurila A (2018) Effects of host species and environmental factors on the prevalence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in northern Europe. *PLOS ONE* 13:e0199852. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199852>
25. Belasen AM, Russell ID, Zamudio KR, Bletz MC (2022) Endemic Lineages of *Batrachochytrium dendrobatidis* Are Associated With Reduced Chytridiomycosis-Induced Mortality in Amphibians: Evidence From a Meta-Analysis of Experimental Infection Studies. *Front Vet Sci* 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.756686>
26. Searle CL, Gervasi SS, Hua J, Hammond JI, Relyea RA, Olson DH, Blaustein AR (2011) Differential Host Susceptibility to *Batrachochytrium dendrobatidis*, an Emerging Amphibian Pathogen. *Conservation Biology* 25:965–974. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01708.x>
27. Tennessen JA, Woodhams DC, Chaurand P, Reinert LK, Billheimer D, Shyr Y, Caprioli RM, Blouin MS, Rollins-Smith LA (2009) Variations in the expressed antimicrobial peptide repertoire of northern leopard frog (*Rana pipiens*) populations suggest intraspecific differences in resistance to pathogens. *Developmental & Comparative Immunology* 33:1247–1257. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.07.004>
28. Savage AE, Zamudio KR (2011) MHC genotypes associate with resistance to a frog-killing fungus. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:16705–16710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106893108>
29. Bradley PW, Gervasi SS, Hua J, Cothran RD, Relyea RA, Olson DH, Blaustein AR (2015) Differences in sensitivity to the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* among amphibian populations. *Conservation Biology* 29:1347–1356. <https://doi.org/10.1111/cobi.12566>
30. Fisher MC, Bosch J, Yin Z, Stead DA, Walker J, Selway L, Brown AJP, Walker LA, Gow NAR, Stajich JE, Garner TWJ (2009) Proteomic and phenotypic profiling of the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* shows that genotype is linked to virulence. *Molecular Ecology* 18:415–429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.04041.x>
31. Greener MS, Verbrugghe E, Kelly M, Blooi M, Beukema W, Canessa S, Carranza S, Croubels S, De Troyer N, Fernandez-Giberteau D, Goethals P, Lens L, Li Z, Stegen G, Strubbe D, Van Leeuwenberg R, Van Praet S, Vila-Escale M, Vervaeke M, Pasmans F, Martel A (2020) Presence of low virulence chytrid fungi could protect European amphibians from more deadly strains. *Nat Commun* 11:5393. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19241-7>
32. Becker CG, Greenspan SE, Tracy KE, Dash JA, Lambertini C, Jenkinson TS, Leite DS, Toledo LF, Longcore JE, James TY, Zamudio KR (2017) Variation in phenotype and virulence among enzootic and panzootic amphibian chytrid lineages. *Fungal Ecology* 26:45–50. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2016.11.007>
33. Dang T, Searle C, Blaustein A (2017) Virulence variation among strains of the emerging infectious fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) in multiple amphibian host species. *Dis Aquat Org* 124:233–239. <https://doi.org/10.3354/dao03125>
34. Refsnider JM, Poorten TJ, Langhammer PF, Burrowes PA, Rosenblum EB (2015) Genomic Correlates of Virulence Attenuation in the Deadly Amphibian Chytrid Fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *G3 Genes|Genomes|Genetics* 5:2291–2298. <https://doi.org/10.1534/g3.115.021808>

35. Brem FMR, Parris MJ, Padgett-Flohr GE (2013) Re-Isolating *Batrachochytrium dendrobatidis* from an Amphibian Host Increases Pathogenicity in a Subsequent Exposure. *PLoS ONE* 8:e61260. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061260>
36. Farrer RA, Henk DA, Garner TWJ, Balloux F, Woodhams DC, Fisher MC (2013) Chromosomal Copy Number Variation, Selection and Uneven Rates of Recombination Reveal Cryptic Genome Diversity Linked to Pathogenicity. *PLoS Genet* 9:e1003703. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003703>
37. James TY, Toledo LF, Rödder D, Da Silva Leite D, Belasen AM, Betancourt-Román CM, Jenkinson TS, Soto-Azat C, Lambertini C, Longo AV, Ruggeri J, Collins JP, Burrowes PA, Lips KR, Zamudio KR, Longcore JE (2015) Disentangling host, pathogen, and environmental determinants of a recently emerged wildlife disease: lessons from the first 15 years of amphibian chytridiomycosis research. *Ecology and Evolution* 5:4079–4097. <https://doi.org/10.1002/ece3.1672>
38. Grogan LF, Humphries JE, Robert J, Lanctôt CM, Nock CJ, Newell DA, McCallum HI (2020) Immunological Aspects of Chytridiomycosis. *JoF* 6:234. <https://doi.org/10.3390/jof6040234>
39. Hettyey A, Üveges B, Móricz ÁM, Drahos L, Capon RJ, Van Buskirk J, Tóth Z, Bókony V (2019) Predator-induced changes in the chemical defence of a vertebrate. *Journal of Animal Ecology* 88:1925–1935. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13083>
40. Knepper J, Lüddecke T, Preißler K, Vences M, Schulz S (2019) Isolation and Identification of Alkaloids from Poisons of Fire Salamanders (*Salamandra salamandra*). *Journal of Natural Products* 82:. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00065>
41. Myers JM, Ramsey JP, Blackman AL, Nichols AE, Minbirole KPC, Harris RN (2012) Synergistic Inhibition of the Lethal Fungal Pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*: The Combined Effect of Symbiotic Bacterial Metabolites and Antimicrobial Peptides of the Frog *Rana muscosa*. *J Chem Ecol* 38:958–965. <https://doi.org/10.1007/s10886-012-0170-2>
42. Barnhart K, Forman ME, Umile TP, Kueneman J, McKenzie V, Salinas I, Minbirole KPC, Woodhams DC (2017) Identification of Bufadienolides from the Boreal Toad, *Anaxyrus boreas*, Active Against a Fungal Pathogen. *Microb Ecol* 74:990–1000. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0997-8>
43. Voyles J, Woodhams DC, Saenz V, Byrne AQ, Perez R, Rios-Sotelo G, Ryan MJ, Bletz MC, Sobell FA, McLetchie S, Reinert L, Rosenblum EB, Rollins-Smith LA, Ibáñez R, Ray JM, Griffith EJ, Ross H, Richards-Zawacki CL (2018) Shifts in disease dynamics in a tropical amphibian assemblage are not due to pathogen attenuation. *Science* 359:1517–1519. <https://doi.org/10.1126/science.aao4806>
44. Kamalakkannan V (2014) Cane toad toxins: mystery revealed. PhD Thesis, The University of Queensland
45. Preusser H-J, Habermehl G, Sablofski M, Schmall-Haury D (1975) Antimicrobial activity of alkaloids from amphibian venoms and effects on the ultrastructure of yeast cells. *Toxicon* 13:285–288. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(75\)90135-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(75)90135-X)
46. Chen KK, Chen AL (1933) Similarity and Dis-Similarity of Bufagins, Bufotoxins, and Digitaloid Glucosides. *J Pharmacol Exp Ther* 49:561–579
47. Tóth Z, Kurali A, Móricz ÁM, Hettyey A (2019) Changes in Toxin Quantities Following Experimental Manipulation of Toxin Reserves in *Bufo bufo* Tadpoles. *J Chem Ecol* 45:253–263. <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01045-9>
48. Cunha Filho GA, Schwartz CA, Resck IS, Murta MM, Lemos SS, Castro MS, Kyaw C, Pires OR, Leite JRS, Bloch C, Schwartz EF (2005) Antimicrobial activity of the bufadienolides marinobufagin and telocinobufagin isolated as major components from skin secretion of the toad *Bufo rubescens*. *Toxicon* 45:777–782. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.017>
49. Sousa LQD, Machado KDC, Oliveira SFDC, Araújo LDS, Monção-Filho EDS, Melo-Cavalcante AADC, Vieira-Júnior GM, Ferreira PMP (2017) Bufadienolides from amphibians: A promising source of anticancer prototypes for radical innovation, apoptosis triggering and Na⁺/K⁺-ATPase inhibition. *Toxicon* 127:63–76. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.01.004>
50. Hayes RA, Piggott AM, Dalle K, Capon RJ (2009) Microbial biotransformation as a source of chemical diversity in cane toad steroid toxins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19:1790–1792. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.01.064>
51. (2016) Barna varangy. In: Magyar Madártani és Természetvédelmi Egyesület. <https://mme.hu/keteltuek-es-hullok/barna-varangy>. Accessed 28 Sep 2024
52. Recuero E, Canestrelli D, Vörös J, Szabó K, Poyarkov NA, Arntzen JW, Crnobrnja-Isailovic J, Kidov AA, Cogălniceanu D, Caputo FP, Nascetti G, Martínez-Solano I (2012) Multilocus species tree analyses resolve the radiation of the widespread *Bufo bufo* species group (Anura, Bufonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62:71–86. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.09.008>
53. Dufresnes C, Litvinchuk SN, Rozenblut-Kościsty B, Rodrigues N, Perrin N, Crochet P-A, Jeffries DL (2020) Hybridization and introgression between toads with different sex chromosome systems. *Evol Lett* 4:444–456. <https://doi.org/10.1002/evl3.191>

54. Garcia-Porta J, Litvinchuk SN, Crochet PA, Romano A, Geniez PH, Lo-Valvo M, Lymberakis P, Carranza S (2012) Molecular phylogenetics and historical biogeography of the west-palearctic common toads (*Bufo bufo* species complex). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:113–130. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2011.12.019>
55. Bosch J, Martínez-Solano I (2006) Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. *Oryx* 40:84–89. <https://doi.org/10.1017/S0030605306000093>
56. Bókony V, Mórícz ÁM, Tóth Z, Gál Z, Kurali A, Mikó Z, Pásztor K, Szederkényi M, Tóth Z, Ujszegi J, Üveges B, Krüzselyi D, Capon RJ, Hoi H, Hettyey A (2016) Variation in Chemical Defense Among Natural Populations of Common Toad, *Bufo bufo*, Tadpoles: the Role of Environmental Factors. *J Chem Ecol* 42:329–338. <https://doi.org/10.1007/s10886-016-0690-2>
57. R: The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>. Accessed 14 Oct 2024
58. Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015) Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* 10:e0146021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146021>
59. MarÉchal E (2011) Measuring Bioactivity: KI, IC50 and EC50. In: MARECHAL E, Roy S, Lafanechère L (eds) *Chemogenomics and Chemical Genetics: A User's Introduction for Biologists, Chemists and Informaticians*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp 55–65
60. Sebaugh JL (2011) Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharmaceutical Statistics* 10:128–134. <https://doi.org/10.1002/pst.426>
61. Pike N (2011) Using false discovery rates for multiple comparisons in ecology and evolution. *Methods Ecol Evol* 2:278–282. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00061.x>
62. Holden WM, Reinert LK, Hanlon SM, Parris MJ, Rollins-Smith LA (2015) Development of antimicrobial peptide defenses of southern leopard frogs, *Rana sphenocephala*, against the pathogenic chytrid fungus, *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Developmental & Comparative Immunology* 48:65–75. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.09.003>
63. Felipe Gonçalves-de-Albuquerque C, Ribeiro Silva A, Ignácio da Silva C, Caire Castro-Faria-Neto H, Burth P (2017) Na/K Pump and Beyond: Na/K-ATPase as a Modulator of Apoptosis and Autophagy. *Molecules* 22:578. <https://doi.org/10.3390/molecules22040578>
64. Akimova OA, Bagrov AY, Lopina OD, Kamernitsky AV, Tremblay J, Hamet P, Orlov SN (2005) Cardiotonic Steroids Differentially Affect Intracellular Na⁺ and [Na⁺]_i/[K⁺]_i-independent Signaling in C7-MDCK Cells*. *Journal of Biological Chemistry* 280:832–839. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411011200>
65. Xu Y, Liu X, Schwarz S, Hu L, Guo D, Gu Q, Schwarz W (2016) Inhibitory efficacy of bufadienolides on Na⁺,K⁺-pump activity versus cell proliferation. *Biochemistry and Biophysics Reports* 6:158–164. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.03.015>
66. Xie Z, Askari A (2002) Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry* 269:2434–2439. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02910.x>
67. Rodríguez-Navarro A, Benito B (2010) Sodium or potassium efflux ATPase: A fungal, bryophyte, and protozoal ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1798:1841–1853. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.07.009>
68. Mohammadi S, Gompert Z, Gonzalez J, Takeuchi H, Mori A, Savitzky AH (2016) Toxin-resistant isoforms of Na⁺/K⁺-ATPase in snakes do not closely track dietary specialization on toads. *Proc Biol Sci* 283:20162111. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2111>
69. Bókony V, Üveges B, Verebélyi V, Ujhegyi N, Mórícz ÁM (2019) Toads phenotypically adjust their chemical defences to anthropogenic habitat change. *Sci Rep* 9:3163. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39587-3>
70. Blennerhassett RA, Bell-Anderson K, Shine R, Brown GP (2019) The cost of chemical defence: the impact of toxin depletion on growth and behaviour of cane toads (*Rhinella marina*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286:20190867. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0867>
71. Bókony V, Üveges B, Mórícz ÁM, Hettyey A (2018) Competition induces increased toxin production in toad larvae without allelopathic effects on heterospecific tadpoles. *Functional Ecology* 32:667–675. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12994>