



Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Biológia Intézet
Ökológiai Tanszék

KITRIDIOMIKÓZIS VIZSGÁLATA EGY MAGAS-BAKONYI VIZES ÉLŐHELY KÉTÉLTŰKÖZÖSSÉGÉN



Írta:

Gál Júlia Tünde

Témavezető:

Dr. Vörös Judit

Magyar Természettudományi Múzeum, Kétéltű- és Hüllőgyűjtemény

Budapest

2011

Tartalomjegyzék

1. Bevezető	3
1.1 A <i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> jellemzése	3
1.2 A <i>Bd</i> globális elterjedése	5
1.3 Elméletek a <i>Bd</i> eredetét illetően	7
1.4 A <i>Bd</i> elterjedése és hatása az európai kétéltűfaunára	8
1.5 A <i>Bd</i> elterjedése Magyarországon, előzetes vizsgálatok	9
2. Célkitűzés	10
3. Anyag és módszer.....	11
3.1 Az iharkúti élőhely jellemzése.....	11
3.2 A területen előforduló kétéltűfajok jellemzése	13
3.3 Terepi módszerek.....	16
3.4 Laboratóriumi módszerek	19
3.5 Statisztikai módszerek	20
4. Eredmények és értékelésük	21
4.1 Terepi mintavételezés	21
4.2 Laboratóriumi feldolgozás	21
4.3 Statisztikai elemzés: prevalencia, intenzitás és abundancia	23
4.4 A két faj (<i>Bombina variegata</i> és <i>Pelophylax sp.</i>) fertőzöttségének összehasonlítása	24
4.5 A <i>Bombina variegata</i> fertőzöttségének elemzése.....	25
4.6 Az eredmények értékelése	28
5. Összefoglalás	32
6. Irodalom	34
7. Köszönetnyilvánítás	40

1. Bevezető

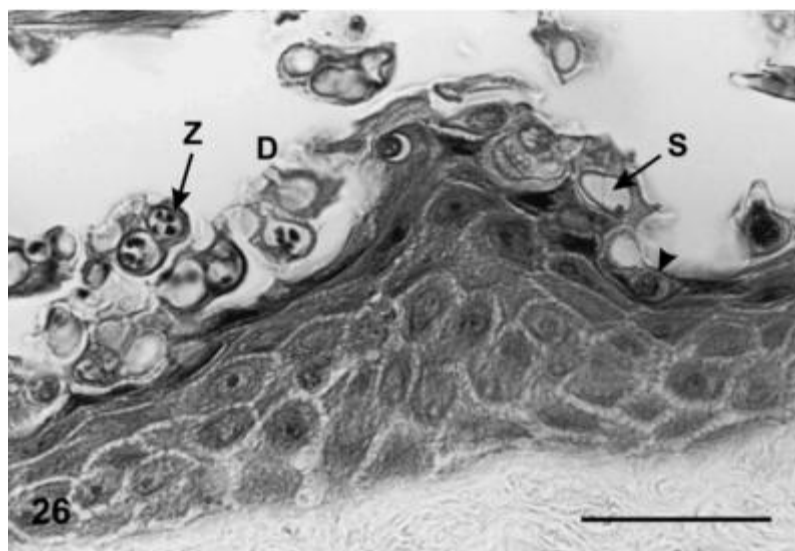
1.1 A *Batrachochytrium dendrobatidis* jellemzése

A 1980-as, 90-es években, Ausztráliában és Közép-Amerikában olyan kétéltű állományok hirtelen csökkenését figyelték meg kutatók, amelyek védett, illetve ember által érintetlen helyeken éltek. Az érintett fajok élőhelyei patakok menti, magasabban fekvő területek voltak. A drámai csökkenést a vizsgálatok alapján nem indokolta környezeti faktorok változása, így az eredmények egy vízhez kötött, magas virulenciájú, eddig ismeretlen patogén jelenlétére mutattak (Laurance 1996, Lips 1998).

Berger és munkatársai 1998-ban le is írták ezt a kórokozót, amely a rajzospóras gombák közé tartozik, de egyedülálló módon, egyéb kitrid gombákkal ellentétben gerinceseket, pontosabban kétéltűeket fertőz meg. A csoportba tartozó fajok jellemzően talaj- vagy vízlakó szervezetek, melyek a környezetükben található kitint, keratint, növényi detrituszt fogyasztják és elsődleges lebontóként, szaprofitaként fontos szerepet töltenek be az ökoszisztémában. Egyes taxonok megtalálhatók gombák, edényes növények, férgek vagy rovarok parazitáiként is, gerincesek élősködőiként viszont még soha nem írták le őket ezelőtt.

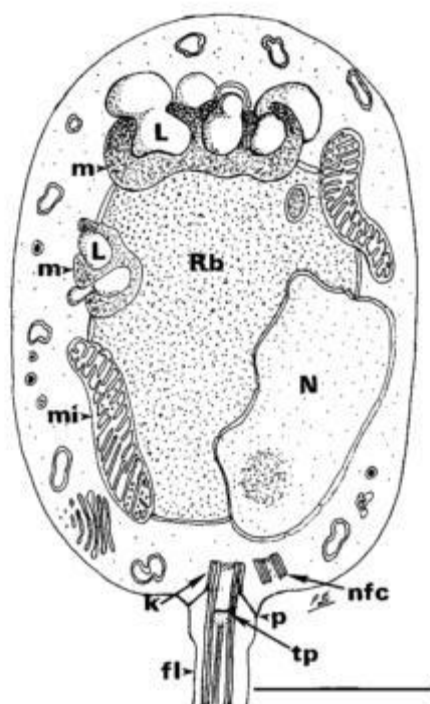
Az ultrastrukturális taxonómiai vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy jelen esetben új fajról és egyben új genuszról van szó. Besorolása: phylum Chytridiomycota, classis Chytridiomycetes, ordo Chytridiales (Longcore, 1999). A faj a *Batrachochytrium dendrobatidis* (későbbiekben: *Bd*) nevet kapta, a békafaj után, melyről izolálták (*Dendrobates azureus* – kék nyílméregbéka). A genusz név görög eredetű, jelentése: *batracho* = béka, *chytr* = agyag edény. A *B. dendrobatidis* sporangiumok kör- illetve ovális alakúak, a kétéltűek epidermiszében találhatók meg. A fertőzés kizárólag a stratum corneum, stratum granulosum rétegekre korlátozódik, így a tünetek is többnyire csak a kültakarón láthatóak. Ezek a következők lehetnek: az epidermisz intenzív hámlása, bőrleválás, esetleges fekélyek (Berger et al., 1998). Egyéb viselkedésbeli tünetek jelentkeznek a fertőzés utolsó stádiumában, például az állatok mozdulatlanul és védtelenül ülnek, letargikusak, étvágytalanok. A halál általában pár nappal az említett tünetek megjelenése után következik be (Berger et al., 1999).

Maga a sporangium kör alakú, rajta egy kivezető csatorna található, melyen keresztül a zoospórák távoznak a külvilágba (1. ábra).



1. ábra: *B. dendrobatidis* egy *Litoria caerulea* egyed bőrében. A még éretlen sporangiumok a bőr mélyebb rétegeiben helyezkednek el (nyílhegygel jelölve). Az érettek sötét zoospórákat (Z) tartalmaznak vagy már üresek és kivezető csöveik nyitva vannak (D). Forrás: Berger et al. 2005.

A zoospórák hosszúság, ovális alakúak és egy ostorral rendelkeznek (Berger et al., 1998), 2. ábra.



2. ábra: A *B. dendrobatidis* zoospóra hosszmetsete Berger 1998-as cikke alapján (Rb = riboszómális terület, N = nukleusz, L = lipidszemcse, m = mikrotest, mi = mitokondrium, k = kinetoszóma, fl = flagellum)

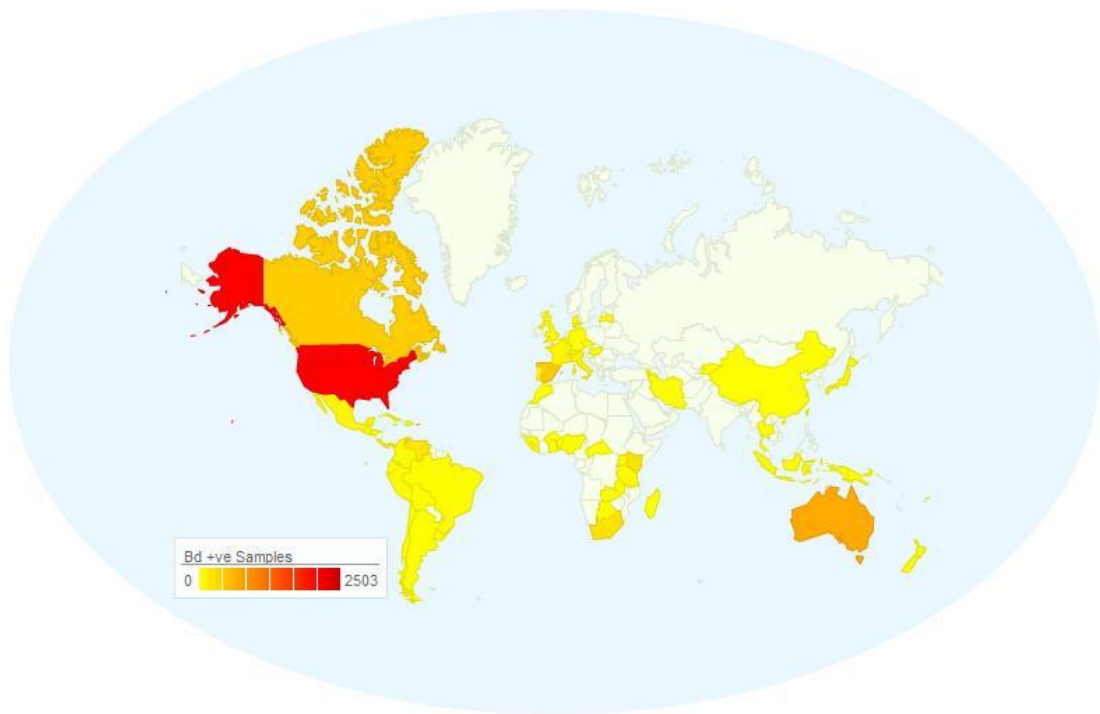
A kivezető csövön keresztül távozott zoospórák kemotaxissal találnak rá a gazdaállatokra és az epidermiszbe jutást követő 4-5 napban érett sporangiumokká fejlődnek (Longcore, 1999).

Itt a kifejllett állatok bőrében található keratint fogyasztják. Lárvák esetében csak a szájrész keratinizált, így a gomba csak ott található meg, ezért a fertőzés nem okoz halált. A szájképlet szerkezetének megváltozása azonban negatívan befolyásolja az ebihalak táplálékfelvételi képességét, így rátermettségük csökkenhet. A metamorfózist követően viszont, mikor a keratinizáció kiterjed az egész testre, a fiatal állatok nagymértékű elhullása figyelhető meg (Berger et al., 1998).

Arra a kérdésre, hogy a gomba hogyan képes a kétéltűek halálát okozni úgy, hogy csupán az epidermiszben van jelen, több alternatív magyarázat létezik. Egy vizsgálat szerint lehetséges, hogy a *Bd* halálos toxinokat termel a fertőzés előtt vagy után (Blaustein et al., 2005). Mások úgy gondolják, hogy a vízfelvételt zavarja az állatokban és így kiszáradás következtében pusztulnak el (Berger et al., 1998). A legvalószínűbb magyarázat viszont az, hogy a kétéltűek szervezetében a fertőzés felborítja az ozmotikus egyensúlyt, ami a vízháztartás szabályozásának felborulásához és neurológiai zavarokhoz vezet (Voyles et al., 2007).

1.2 A *Bd* globális elterjedése

Ma már az Antarktisz kivételével minden földrészen megtalálható a *B. dendrobatidis* gombafaj, összesen több mint 350 kétéltűfajt fertőzve meg. Ezek közül 200 faj állományának csökkenésében kiemelt szerepe van (Skerratt et al., 2007). Néhány esetben a kórokozó az adott faj összes ismert populációjának kihalását okozta. Ilyen például a gyomorköltő békák nemzetsége (*Rheobatrachus* sp.), a panamai csonkaujjú béka (*Atelopus zeteki*) és a *Taudactylus acutirostris* (Fisher et al. 2009).



3. ábra: *B. dendrobatidis* pozitív minták száma az egyes országokban.

Forrás: <http://www.spatalepidemiology.net/bd-maps/>

A legkorábbi adat *Bd*-vel fertőzött kétéltű egyedről 1938-ból származik (Weldon et al., 2004). A kutatók úgy vélik, hogy a kitridiomikózis egy stabil, endemikus fertőzés volt Afrikán belül évtizedeken keresztül, majd az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) nemzetközi kereskedelme által kezdett elterjedni világszerte.

A terjedés módja egyelőre nem teljesen tisztázott. Az állatkereskedelmen kívül számos úton mehetett végbe a térhódítás. Johnson és munkatársai 2005-ben *in vitro* körülmények között kimutatták, hogy a *Bd* három hónapig életben maradhat steril, nedves homokban, így a kétéltű élőhelyeken előforduló egyéb állatfajok, melyek a vizes talajra lépnek, terjeszthetik a gombát. Továbbá azt is bebizonyították, hogy madarak tollán a gomba 1-3 órát is túlélhet, ami felveti annak a lehetőségét, hogy vízi madarak a kitridet egyik kétéltű-élőhelyről a másikra viszik (Johnson and Speare, 2005). Nagy szerepet játszhatott a fertőzés terjesztésében maga az ember, még mielőtt a patogént felfedezték volna. A terepi felszerelésen, ruházaton fertőtlenítés, megfelelő kiszáritás hiányában a *Bd* túlélhetett.

A gomba rendkívül gyors terjedéssel a következő sorrendben érte el az egyes földrészeket és országokat: 1961. Észak-Amerika (Ouellet et al., 2005), 1978. Ausztrália (Skerratt et al., 2007), 1980. Dél-Amerika (Lips et al. 2008), 1983. Közép-Amerika (Hale et al. 2005), 1997. Európa, Spanyolország (Bosch, 2001), 1999. Óceánia (Waldman, 2001), 2007. Indonézia (Kusrini et al. 2008), 2008. Japán (Goka, 2009). Mára már 45 országban van jelen, elterjedése a 3. ábrán látható.

Ugyanakkor a vizsgálatok azt mutatják, hogy a *B. dendrobatidis* fertőzés nem egyformán hat az egyes gazdafajokra. Ennek egyik oka klimatikus és földrajzi tényezők összessége. A gomba jelenléte egy adott élőhelyen nagyban függ annak hőmérsékletétől, évi csapadékmennyiségétől, fajgazdagságától, biomjától (Olson et al., unpublished data) és tengerszint feletti magasságától (Berger and Speare, 1998). Laboratóriumi körülmények között a *Bd* 4°C és 25°C között nő és szaporodik, növekedési maximuma pedig 17°C és 25°C között van (Piotrowski et al., 2004). Viszont 27°C felett a fertőzésnek kitett állatok fele már életben marad. Ezeket a kísérleteket alátámasztják a természetben megfigyelt és dokumentált esetek is: a hidegebb évszakban gyakoribb a súlyos kitridiomikózis előfordulása (Berger et al., 2004).

A másik ok a fajok közötti, egyelőre nem pontosan ismert anatómiai- és élettani különbségek, melyek egyes fajokat érzékenyvé tesznek a fertőzés szempontjából, másokat pedig nem. Ausztráliában például számos *Litoria*-faj és a *Taudactylus acutirostris* állományában okozott csökkenést a betegség (Berger et al., 1998). Panamában békák és szalamandrák nyolc családja szenvedett el tömeges pusztulást (Lips et al., 2006). Észak-Amerikában több a *Rana* és a *Bufo* nemzetséghez tartozó fajt érintett érzékenyen a *B. dendrobatidis* okozta fertőzés (Daszak et al., 1999). Azonban több kutató talált bizonyítékot arra is, hogy a kitridiomikózis jelenléte egy kétélűpopulációban nem feltétlenül jár az egyedek pusztulásával. Az Ausztráliában vizsgált *Litoria wilcoxii* faj egyedein például megtalálták a gombát, de állománycsökkenésnek nem látták jelét (Kriger et al., 2006). Az Európába és az amerikai kontinensre is behurcolt ökörbéka (*Lithobates catesbeianus*, korábban *Rana catesbeiana*) pedig úgy tűnik, csupán hordozza a fertőzést, potenciális vektorként szolgálva ezzel a *Bd*-nek számos országban (Hanselmann 2004, P. Daszak et al. 2004, Garner et al. 2006, Schloegel et al. 2010).

1.3 Elméletek a *Bd* eredetét illetően

Alapvetően két elmélet létezik a *Batrachochytrium dendrobatidis* származására: a „novel pathogen hypothesis”, röviden NPH (új kórokozó hipotézis) és az „endemic pathogen hypothesis” vagy EPH (endemikus kórokozó hipotézis).

Az új kórokozó hipotézis szerint a *Bd* Afrikából származik, onnan többek között az afrikai karmosbéka (*Xenopus laevis*) globális kereskedelme által terjedhetett el, manapság pedig az ökörbéka is potenciális terjesztőként játszik szerepet a folyamatban (Rachowicz et al., 2005). A naív populációkba való hirtelen bekerülése után a magas virulenciájú kórokozó hatalmas pusztítást okozott számos területen. Ezt az elméletet támasztja alá, hogy a *Bd*

elterjedése foltos, mozaikos. Ausztráliában, Közép- és Dél-Amerikában a járvány terjedési frontjait egyértelműen meg lehetett határozni (Laurance, 1996, Lips et al., 2006). Valamint a már említett kételtű vektorok a kereskedelemben, illetve a természetes élőhelyeken való jelenléte is ezt a hipotézist igazolja (Fisher, 2007, Garner et al., 2006).

Az endemikus kórokozó hipotézis szerint a *B. dendrobatidis* széles körben elterjedten együtt élt a kételtűekkel és valamilyen környezeti változás következtében borult fel a gazdaparazita egyensúly, ami globális kételtű-pusztulásokhoz vezetett. Ezt az elméletet igazolja, hogy a gomba évtizedekkel a populáció csökkenések előtt már jelen volt az állatokon (Weldon et al., 2004) és hogy a patogén, illetve a kitridiomikózis felbukkanása egy adott élőhelyen bizonyos mértékben környezeti változóktól függ. Továbbá kimutatható összefüggés van a globális felmelegedés, a kételtűek állapota és a kitridiomikózis, mint betegség kialakulása között (Pounds, 2006, Bosch et al., 2007).

A gomba populáció- és filogenetikai vizsgálatai, amelyek igen alacsony genetikai diverzitást mutattak és tulajdonképpen egy genetikai vonalra vezették vissza a *Bd* eredetét, alátámasztják, hogy a gomba Dél-Afrikából származik, és egy rendkívül gyors radiáció során terjedt szét a világban (James et al., 2009). Az alacsony diverzitás, a gazda-specifikusság hiánya, a gyenge korreláció a genotípus és a földrajzi elterjedés között, az egyetlen genotípusú gomba általi lokális pusztítás mind emberhez kötött térhódítást feltételez, tehát a NPH-t támogatja.

Ugyanakkor a kutatók a másik teória igazolására is találtak bizonyítékokat: helyi skálán felfedeztek már diverz, rekombináldó populációt (Morgan et al., 2007). Tehát önmagában egyik elmélet sem fedi teljes mértékben a valóságot, a témában további vizsgálatokra, elemzésekre van szükség.

1.4 A *Bd* elterjedése és hatása az európai kételtűfaunára

A *Batrachochytrium dendrobatidis*-t 1997-ben fedezték fel az európai kontinensen, Spanyolországban, ahol rendkívül éles állománycsökkenést okozott a közönséges dajkabéka (*Alytes obstetricans*) Peñalara Nemzeti Parkbeli populációiban (Bosch, 2001). Azóta az *A. obstetricans* majdnem teljesen kipusztult erről az élőhelyről, a fertőzés pedig továbbterjedt a foltos szalamandra (*Salamandra salamandra*) és a barna varangy (*Bufo bufo*) helyi populációira is, előbbinél szintén jelentős állománycsökkenést okozva (Bosch, 2006).

Németországban és Belgiumban először importált *Dendrobates* egyedeken találták meg a gombát, majd más fogságban szaporított fajokon is (Mutschmann et al., 2000). Olaszországban 2001-ben dokumentálták az első kitridgomba fertőzést: Bologna közelében

beteg *Bombina pachypus* példányokat fedeztek fel a kutatók (Stagni et al. 2002). Később kecskebékáknál (*Pelophylax kl. esculentus*) is kimutatták a *B. dendrobatidis*-t és felmerült a gyanú, hogy ezek a kételtűek is szerepet játszhatnak rezervoárként a kitridiomikózis terjesztésében (Simoncelli et al., 2005). Dél-Szardínián a veszélyeztetett csukafejű gőte (*Euproctus platycephalus*) rendkívül érzékenyen reagált a fertőzésre, állományai jelentős mértékben csökkentek (Bovero et al., 2008).

Svájcban is megtalálták ugyan a gombát, de itt nem tapasztaltak a kutatók különösebb változást a kételtűközösségekben, annak ellenére, hogy az itteni fajokból izolált *B. dendrobatidis* minták mennyisége megegyezett a spanyolországi mintákéval. Nagy-Britanniában őshonos fajokon nem észleltek fertőzést, a behurcolt ökörbékán (*Lithobates catesbeianus*) viszont igen (Garner et al., 2005). Az említett faj hordozza a gombát, de nem betegszik meg (Garner et al., 2006).

Hazánkhoz legközelebb Lengyelországban találtak *B. dendrobatidis*-szal fertőzött egyedeket, melyek mind a *Pelophylax* genuszhoz tartoztak (Sura et al., 2010).

1.5 A *Bd* elterjedése Magyarországon, előzetes vizsgálatok

Hazánkban Vörös és munkatársai vizsgálják a kitridgomba előfordulását. Ez idáig hat területről mutatták ki a *Bd* jelenlétét: az Őrségből, a Kőszegi-hegységből, a Pilisből, a Bakonyból, a Mátrából és a Zemplénből (Vörös et al. 2009, Vörös, unpublished). Ezen populációk közül a 2008-as évben a Magas-Bakonyban található Iharkúton volt a legmagasabb a fertőzöttségi arány, 36 juvenilis sárgahasú unka (*Bombina variegata*) egyedből 18 volt fertőzött, tehát 50% volt a prevalencia (Vörös et al., 2009). Ezen kívül az Őrségben találtak még fertőzött *B. variegata* egyedeket, a Pilisben pedig gyepi béka (*Rana temporaria*) példányokon találták meg a gombát.

Egy laboratóriumi körülmények között tartott *Xenopus laevis* kolóniát is tanulmányoztak a kutatók és az 58 egyedből 17-nél kimutatták a *B. dendrobatidis* jelenlétét (Vörös et al. 2009).

Eddig a magyarországi élőhelyeken nem figyeltek meg állománycsökkenést. Viszont a legtöbb vizsgálatot kontinensünkön Nyugat-Európában végezték el, Közép-Európából nagyon kevés publikáció található a témában. Mivel a klíma jelentősen különbözik a két területen, ezért rendkívül fontosnak tartottuk, hogy egy magyarországi kételtűközösséget alaposan megvizsgáljunk, ezáltal képet kapva a *Bd* ökológiájáról, virulenciájáról egy közép-európai élőhelyen.

2. Célkitűzés

Vörös és munkatársai több hazai élőhelyen kimutatták a kitrid gomba jelenlétét, de a Magas-Bakonyban található iharkúti bauxitbánya melletti tóban megmintázott sárgahasú unkaállomány (*Bombina variegata*) mutatta a legmagasabb fertőzöttségi arányt (Vörös et al. 2009).

Szakdolgozatom célja az volt, hogy ezt az élőhelyet alaposan megvizsgálva, minden az élőhelyen előforduló fajból mintát véve teljesebb képet kapjunk az állomány fertőzöttségéről. Szeretnénk azon kérdésekre is választ kapni, hogy a kételtűek mely fajai, illetve mely stádiumai a legérzékenyebbek a fertőzésre. Számos tudományos vizsgálat azt mutatta, hogy a fajok nem egyformán reagálnak a kórokozóra, és hogy egy adott élőhely mikroklímája nagy hatással van a gomba virulenciájára. Fontosnak tartjuk ezért, hogy megismerjük a gomba viselkedését, ökológiáját, hazai klimatikus viszonyok között és hogy megállapítsuk, milyen hatással van a Magyarországon előforduló kételtűfajokra.

Vizsgálataink hosszú távú megfigyelések alapját képezhetik a *B. dendrobatidis* gombafaj hazai kételtűekre kifejtett hatásáról, és fontos szerepet játszhatnak természetvédelmi intézkedések tekintetében is.

3. Anyag és módszer

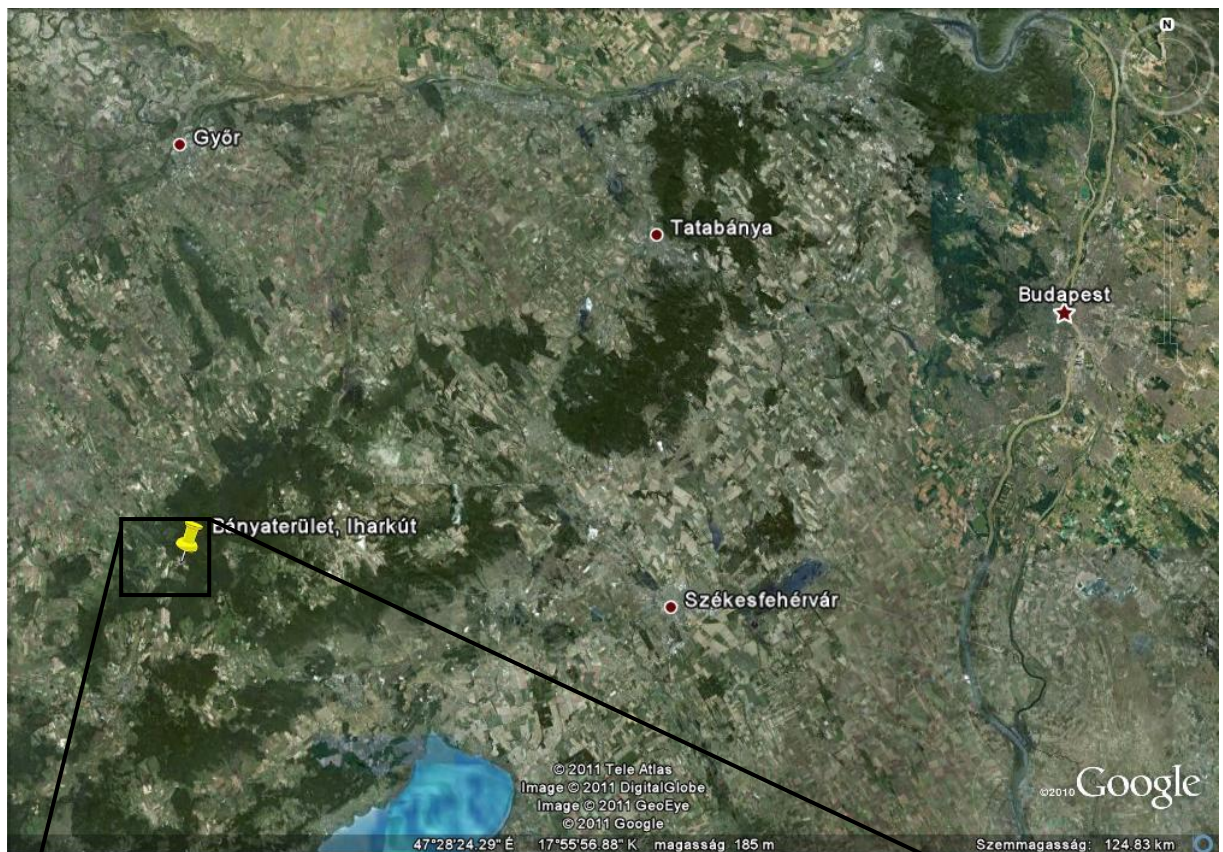
3.1 Az iharkúti élőhely jellemzése

Vizsgálataink helyszínét az Iharkúton található bauxitbánya környéke képezte. Iharkút egy Veszprém megyében található község volt, nem messze Németbányától és Bakonyjákótól (földrajzi koordináták: 47° 14' 7,67" É, 17° 38' 29,90" K). Az 1979-ben megkezdődött bauxit-kitermelést követően fokozatosan csökkent a település lakossága, így 1981-ben elvesztette önállóságát és Bakonyjákóhoz csatolták. Az Iharkút helyén létrejött hatalmas külszíni fejtések néhol 50-60 méter vastagságban tártak fel Kréta-kori szárazföldi rétegeket, melyeket az MTM Őslénytárának és az ELTE Őslénytani Tanszékének munkatársai vizsgálnak. Egy teljes középidőből származó, szárazföldi gerinces fauna vált ismertté erről a Magyarországon egyedülálló lelőhelyről 2000 óta.

(Forrás: <http://hu.wikipedia.org/wiki/Ihark%C3%BAt>)

Jelenleg már nem folyik bauxit-kitermelés ezen a területen, így a bánya aljában és a felhordott földutak között összegyűlik az eső- és talajvíz. A bányát pedig erdő veszi körül, ami így együtt kiváló élőhelyet biztosít kételtűek számára. Az uralkodó fatársulás a gyertyános-bükkös, kőriszel, szillel, juharral elegyedve.

Összesen négy víztest található a vizsgált területen: 1. a bányató, 2. a földút mellett kialakult tó, 3. egy kisebb, állandó vizű pocsolya a földút mellett, 4. egy hosszabb árok a földút mellett (4. ábra).



4. ábra: az iharkúti élőhely és az itt található víztestek elhelyezkedése.

3.2 A területen előforduló kétéltűfajok jellemzése

Az élőhelyen nyolc kétéltűfaj fordul elő. Ezek közül a pettyes gőtét rendszertanilag a gerincesek törzsébe, a kétéltűek osztályába és farkos kétéltűek rendjébe sorolják (*Vertebrata* / *Amphibia* / *Caudata*), míg a békák a farkatlan kétéltűek rendjéhez tartoznak (*Anura*). Hazánkban minden kétéltűfaj védett.

Lissotriton vulgaris – pettyes göte

Az egyetlen általunk vizsgált *Caudata* faj, amely a szalamandrafélék családjába (*Salamandridae*) tartozik. Karcsú, törekeny állat, a kifejlett példányok 10-11 cm nagyságúra nőnek meg. Háta és oldala szürkés barna alapon fekete foltos, hasoldalának alapszíne a sárga. A hímek csipkés vagy hullámos taraja a szemektől egészen a farok végéig tart, megszakítás nélkül. Tavak, mocsarak, patakok mentén épp úgy megtalálható, mint út menti keréknyomokban. Téli rejtékhelyéről igen korán, akár már február végén előjöhethet. Szaporodásuk áprilisban kezdődik, de akár júniusig is elhúzódhat. Peterakás után az állatok szárazföldi életmódra térnek vissza, nappal kövek, gyökerek alatt rejtőznek és csak sötétedés után aktívak. Egyelőre nincs publikált adat arról, hogy ez a faj hordozná a kitrid gombát.

Bombina variegata – sárgahasú unka

A sárgahasú unka és a vöröshasú unka az unkafélék családjához tartozik (*Bombinatoridae*). Mindkét faj bőre mérgező váladékot termel, melyet az állatok védekezésre használnak, a jól ismert unkareflex-szel együtt. A *B. variegata* háta szürkészöld és rajta szaruszemölcsök találhatók, melyek tüskések, hegyesek. Hasoldalán citromsárga vagy halványsárga összefüggő foltok vannak. Testfelépítése robosztusabb, mint a vöröshasú unkáé, hívóhangja viszont jóval halkabb, a hanghólyag hiánya miatt. A kifejlett állat mérete 40-60 mm között mozog, míg lárvája 31-54 mm-re nő meg. Elsősorban a hegyvidéki vizes élőhelyeket kedveli, megtalálható tavakban, patakok mentén, de előnyben részesíti a kisméretű, időszakos pocsolyákat is. A sárgahasú unka főként éjjel aktív, a téli hibernációt követően áprilisban jön elő, amikor a pocsolyák vize már 10°C fölé melegszik. Párzása és peterakása egész nyáron eltarthat, mely során az állatok végig a vízben tartózkodnak, ezért fozozottan ki vannak téve a *B. dendrobatidis* fertőzésnek.

Iharkúton ez az egyik leggyakoribb faj. Elsősorban a földút mellett kialakult tóban (2-es élőhely) és az állandó vízű pocsolyában (3-as élőhely) fordul elő. Májustól szeptember elejéig végeztünk mintavételt ezen a fajon.

Horvátországban végeznek kísérleteket *Bd*-vel mesterségesen fertőzött sárgahasú unkákkal, de ezek eredményét egyelőre nem lehet tudni.

Bombina bombina – vöröshasú unka

Hátoldala szürke színű és lekerekített szemölcsök borítják. Hasa alapvetően fekete színű, rajta narancssárgától sötétpirosig terjedő színárnyalatú, jól elkülönülő foltok találhatóak. A kifejlett egyedek 35-50 mm-re, lárvájuk 15-38 mm-re nő meg. Március végén jön elő szárazföldi bűvőhelyéről, általában a nagyobb, állandó vizeket kedveli. A párzás és a peterakás akár egész nyáron eltarthat, mely során az állatok végig a vízben tartózkodnak, ugyanúgy, mint a sárgahasú unka. Ilyen szempontból külföldi kutatók eddig még nem vizsgálták ezt a fajt.

Iharkúton eddig egyetlen példánya került elő, hiszen az élőhely és a klíma elsősorban a sárgahasú unkanak kedvez. Mivel a terület közel esik a két faj hibridizációs zónájához (Vörös, 2006), elképzelhető, hogy minimális szintű keveredés ezt a régiót sem kerüli el.

Rana dalmatina – erdei béka

Az erdei békát a valódibéka-félék családjához sorolják (*Ranidae*). Közepes termetű, karcsú, hegyes orrúbéka. Hátoldala barnás színezetű, esetleges foltokkal, márványozással. Jellegzetes a sötét kantár- és halántéksáv, hátsó lábain pedig a kb. 10 darab sötét keresztsáv. A hazai tölgy- és bükkerdőkben szinte mindenütt megtalálható, közönséges faj. Az iharkúti tóban található békafajok közül az erdei béka jön elő legelőször a téli hibernáció után. Szinte rögtön hóolvadás után, február végén, március elején jelennek meg és éjjel aktívak. Párzásuk áprilisig tart, ezután elhagyják a vizet. A *Bd* hatása nem ismert erre a fajra.

Iharkúton tömegesen fordulnak elő kora tavasszal (a 2-es, 3-as és 4-es élőhelyen, valamint a szárazföldön is), így ekkor végeztünk mintavételt ezen a fajon.

Bufo bufo – barna varangy

A barna varangy (*Bufo bufo*) és a zöld varangy (*Bufo viridis*) a varangyfélék családjába tartoznak (*Bufonidae*). Mindkét faj igen erőteljes testfelépítésű, a felnőtt egyedek akár a 10-12 cm-t is elérhetik. Pupillájuk vízszintes, tojásdad alakú, fültőmirigyeik fejlettek. A barna varangy bőrét gömbölyded dudorok fedik, színe szürkés, barnás, szivárványhártyája aranybarna, narancssárgás színű. Elsősorban erdőtársulásokhoz kötődik, szinte mindenhol előfordul, ahol szaporodásához szükséges víztér található. Párzási időszaka március közepétől április közepéig tart. A hímek jóval korábban érkeznek a szaporodási helyre és több időt töltenek a vízben, mint a nőstények. A hímek a nőstényeket az úgynevezett amplexusban hónalj tájékán átkarolják. 7000-10000 petéjüket, több méter hosszúságú dupla zsinórban

rakják le. Spanyolországban és az Egyesült Királyságban már találtak *Bd*-pozitív *Bufo bufo* példányokat (Garner et al., 2005, Bosch, 2006).

A vizsgált területen mind a négy víztestben előfordul és a szárazföldön is.

Bufo viridis – zöld varangy

A zöld varangy alapszíne sárgás, olívdzöld, melyen jól elkülönülő, határozott körvonalú zöld foltok sorakoznak, helyenként vörös pettyekkel. Rendkívül változatos élőhelyeken fordul elő, hazánkban főként sík, homokos talajú területeken található meg, de bolygatott és városi élőhelyeken is jól érzi magát. Igen jól viseli a kiszáradást, többnyire nappal aktív. Magyarországon április-május hónapban szaporodik és a peterakást követően elhagyja a vizet. Ez idáig még nem találtak a kutatók *Bd*-vel fertőzött példányokat.

Iharkúton a párzási időszakban a bányatóban (1-es élőhely) fordul elő tömegesen.

Hyla arborea – zöld levelibéka

A levelibéka-félék családjába (*Hylidae*) tartozó zöld levelibéka karcsú testű, törékeny megjelenésű faj. Háta zöld színű, míg hasoldala sárgás-fehéres és szemcsézett. Maximálisan 5 cm-re nő meg. Oldalán orrától kezdődően vékony, fehér színnel szegélyezett fekete sáv húzódik végig, melynek lefutása, formája egyedi azonosítást tesz lehetővé. Hazánkban szinte mindenütt előfordul, a sík-, domb- és hegyvidékeken egyaránt. Kedveli a nedves, bokros, ligeterdős élőhelyeket, de lakott területeken is megtalálja életfeltételeit. Általában április-május környékén szaporodnak, de ezt az időjárási viszonyok nagyban módosíthatják. Ilyenkor hallatják jellegzetes, érdes hívóhangjukat. Spanyolországban már találtak *Bd*-pozitív egyedeket ebből a fajból (Walker et al., unpublished data).

Iharkúton egy példány került csak elő a 2-es víztestből.

Pelophylax sp. – „zöld békák”

A valódibéka-félék családjába (*Ranidae*) sorolt zöldbékák több, egymáshoz sok szempontból hasonló fajt foglalnak magukba. Ezek a nagy tavibéka (*Pelophylax ridibundus*), a kis tavibéka (*Pelophylax lessonae*) és a kecskebéka (*Pelophylax* kl. *esculentus*). Mind a három vízhez kötött, alapvetően zöld hátszínű faj. Közülük a nagy tavibéka rendelkezik a legnagyobb testmérettel, ami lábak nélkül elérheti a 15 cm-t is. Gerincvonalán világos csík található, mellette sötét foltokkal. Hasa piszkosfehér. A nagy kiterjedésű, nyílt felszínű víztesteket kedveli, nagyobb folyóink mentén is előfordul. Kora tavasztól nyár végéig megtalálhatók a vízben.

A kis tavibéka testhossza mindössze a 6-7 cm-t éri el, de színezete hasonló az előbb említett fajéhoz. Hasoldala tiszta fehér. Kevésbé kötődik a vízhez, mint a *P. ridibundus*, párzás után gyakran elhagyják a szaporodó helyet és félig szárazföldi életmódra vált.

A kecskebéka a csoport két másik fajának állandósult és szaporodóképes hibridje, valójában nem tekinthető külön fajnak. Genusz és faj neve között a „kl.” rövidítés a görög *klepton* (tolvaj) szóra utal, mivel hibridogenetikus szaporodása során géneket „lop” szülőfajaitól. Méretében és színezetében is átmenetet mutat a nagy és kis tavibéka között. Hátoldala változatos mintázatú, sötét foltok és lécek tarkítják. Élőhelyválasztás tekintetében igénytelenebb, mint szülőfajai: természetes vizeink mellett előfordul csatornáknban, lecsapoló árkokban és halastavakban is. Számos európai országban találtak már *B. dendrobatidis*-szal fertőzött zöldbékát, de a vizsgálatok nem mutattak állománycsökkenést vagy jelentős mortalitást, így feltételezik, hogy ezek a fajok csupán hordozzák a gombát (Garner et al., 2005, Simoncelli et al., 2005, Adams et al., 2008, Scalera et al., 2008).

Az iharkúti élőhelyen mind a négy víztestben előfordulnak, nyáron tömegesen.

(Forrás: <http://www.khvsz.mme.hu>)

3.3 Terepi módszerek

Mivel vizsgálatunk helyszíne, az iharkúti bauxitbánya magánterület, a szükséges engedélyek beszerzésével kezdtük terepi munkánkat (ügyiratszám: 12-35/2010). Hazánkban minden kétéltűfaj védett, ezért megfogásuk, tanulmányozásuk bármilyen célból szintén engedélyhez kötött.

Rendkívül fontos volt, hogy ügyeljünk a terepi felszerelés megfelelő kiszárítására, fertőtlenítésére minden alkalommal, amikor erre a helyszínre jöttünk vagy innen más vizes élőhelyekre mentünk. Sajnos nagyon valószínű, hogy a gomba többek között az emberrel terjedt el sok védett területen, hiszen a *Bd* adott esetben a csizmatalpba ragadt nedves földben is túlélhet. A fertőtlenítést Virkon® gombaölő szerrel (Dupont) végeztük, amit mind a csizmákra, mind a kétéltűek megfogására használt hálókra alkalmaztunk.

A felszerelésünkbe a következők tartoztak: egy gumicsónak, három darab merítőháló, három darab mellescsizma, nejlon zacskók, gumikesztyűk, faunadobozok az ebihalak számára, steril mintavevő pálcák (Biolab).

Az eredeti ütemtervhez mérten március közepétől szeptember közepéig végeztünk mintavételezést szakaszosan, hiszen a különböző fajok szaporodási ideje eltér. Kifejlett, adult erdei békákat március közepén, barna varangyokat március végén, zöld varangyokat április közepén, unkákat és zöld békákat pedig májustól fogtunk. Lárvákat május végétől

mintáztunk, fiatal, juvenilis egyedeket pedig június végétől.

A helyszínen a tavakból és a pocsolyából kézzel, illetve nejlon zacskóval fogtuk meg a kétéltűeket. A zacskók használata azért volt fontos, mert így minden egyedet elkülönítve tarthattunk a mintavételig, elkerülve az esetleges kontaminációt. A mintavétel közben is magával a nejlon zacskóval tartottuk az állatokat és steril mintavevő pálcával minden egyed hátát, hasát, oldalát, combjának belső felét és hátsó lábának úszóhártyáit egységesen ötször dörzsöltük végig (5. ábra). Így a kétéltűek bőrén jelenlévő *Bd* DNS a mintavevő pálcák végén lévő vattacsomóra került. A lárvák keratinizált szájrészéről egy kisebb mintavevő pálcával (Medical Wire and Equipment) vettünk DNS-t (6. ábra), de ebben az esetben nem volt lehetséges az egységes mintavétel. Minden információt felvezettünk a terepi naplóba: egyedi azonosító számot (például IH01, IH02, stb.), fajt, nemet vagy fejlődési stádiumot, dátumot és hogy az élőhelynek pontosan mely részén fogtuk az adott példányt. A *Bombina variegata* esetében lehetséges volt az egyedi azonosítás, mivel e faj minden egyede csak rá jellemző hasi mintázattal bír (7. ábra). Ezt a mintázatot minden esetben digitális fényképezőgéppel (Canon) rögzítettük és következő alkalommal egy nyomtatott katalógusban magunkkal vittük. Az új egyedeket összevetettük a fényképekkel, így elkerülhetővé vált, hogy egy példányról többször is mintát vegyünk. Más fajoknál egy alkalommal, csak egy nemhez tartozó állatok befogásával zártuk ki a visszafogás lehetőségét. Összesen 358 állatról vettünk mintát.

A mintavételt követően az állatokat sértetlenül visszaengedtük a vízbe. A mintákat a feldolgozásig hűtőszekrényben tároltuk 4°C-on.



5. ábra: A mintavétel folyamata.



6. ábra: Mintavétel ebihal szájszervéről.



7. ábra: Sárgahasú unkák egyedi azonosítása.

3.4 Laboratóriumi módszerek

A *Batrachochytrium dendrobatidis* minták feldolgozását alapvetően Boyle és munkatársai (2004) cikke alapján végeztük a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumában, az Országos Állategészségügyi Intézetben és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetében.

A gomba DNS-minták a steril mintavevő pálcák végén elhelyezkedő apró vattacsomón voltak. Ezeket a feldolgozás első fázisában steril szikével levágtuk és 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük. Ehhez 60 µl PrepMan Ultra (Applied Biosystems) pufferoldatot és 3-4 gramm zirconium/silica golyócskát adtunk az izolálás folyamatában. A csövek tartalmát ezután a protokoll szerint 1 percig homogenizáltuk (TissueLyser II, Qiagen), 30 másodpercig centrifugáltuk (Eppendorf 5417 R), majd ezt újból megismételtük. Ezt 10 perces 100°C-os vízfürdő követte. Végül pedig újból lecentrifugáltuk a mintákat. A felülúszót (20 µl) egy új, steril Eppendorf csőbe pipettáztuk át és a további feldolgozásig 4°C-os hűtőszekrényben tároltuk.

Célunk az volt, hogy a *B. dendrobatidis* genom 5.8 S riboszomális DNS és ITS (internal transcribed spacer) szakaszait amplifikáljuk valós-idejű PCR segítségével. Ehhez Taqman rendszert használtunk. Minden PCR-csőbe 25 µl reakcióelegy került: Taqman Master Mix (Applied Biosystems), forward és reverse primerek, MGB próba és a templát DNS tízszeres hígításban. Minden mintát háromszor ismételtünk, ezek közül egy belső pozitív kontrollt (internal positive control) is tartalmazott. Ennek jelentősége abban áll, hogy megmutatja, sikeresen lezajlott-e a PCR reakció, nem történt-e esetleg inhibíció. Azonban ez az érték nem vehető figyelembe az elemzés során, mivel nem az adott minta DNS tartalmát mutatja. Minden „plate” tartalmazott továbbá két-két ismétlést standard, ismert zoospóra koncentrációjú (100, 10, 1, 0,1 GE – genom ekvivalens, *Bd* genomnak megfelelő mennyiségű DNS) mintákból, illetve negatív kontrollt, amelybe nem tettünk DNS-t. Ez jelezte számunkra, hogy a reakcióban előfordult-e keresztszenyeződés.

Az amplifikációhoz két típusú gépet használtunk (Rotorgene-3000, Corbett Research és Step One, Applied Biosystems). A program 2 percig 50°C, 10 percig 95°C majd 15 másodperc 95°C és 1 percig 60°C 50 cikluson keresztül futott.

A program lefutása után a PCR-gép szoftvere meghatározta a küszöbértéket, amely alapján megállapítottuk, hogy melyik reakcióban történt DNS-amplifikáció. Amennyiben a belső pozitív kontrollt (IPC) tartalmazó reakció negatív eredményt hozott, az azt jelentette, hogy a mintában valamilyen gátló, inhibitáló anyag volt, ami miatt a reakció nem tudott végbemenni. Erre a problémára megoldást jelenthet, ha a minta DNS-t százszoros hígításban

használjuk és így ismétljük meg a folyamatot, mivel így a szennyező anyag is felhígul, ezért elképzelhető, hogy csökken az inhibíció és felamplifikálható lesz a DNS (Stockwell et al., 2010). Munkám során csak az inhibált *Bombina variegata* mintákkal végeztem el ezt az eljárást.

Abban az esetben tekintettünk egy mintát értékelhetőnek, ha annak mindhárom ismételése sikeres amplifikációt mutatott.

Olyan esetekben, amikor a három ismételés közül csak kettő pozitív és ezek közül az egyik az IPC-t tartalmazó reakció, az eredményt „single positive”-nak mondjuk. Ilyenkor meg kell ismételni az amplifikációt.

Egy mintát akkor tekintettünk negatívnak, ha kizárólag az IPC-t tartalmazó reakció lépte át a küszöbértéket a folyamat során.

A standardok értékeinek segítségével a vizsgált minták futásaira kalibrációs egyenest készítettünk, amely lehetővé tette a mennyiségi kimutatást, tehát megtudhattuk, hogy egy adott mintában milyen koncentrációban volt jelen a *B. dendrobatidis*. Egy mintát abban az esetben értékeltünk pozitívnak, ha annak mindkét, belső kontrollt nem tartalmazó futásából származó GE értéke az amplifikáció során átlépte a világszerte elfogadott standard 0,05 küszöbértéket. Mivel a minta DNS-t tízszeres hígításban használtuk fel a reakciók során, a kapott értékeket a folyamat végén tízzel megszorozva kaptuk meg a valódi genom ekvivalens értékeket. A két értékelhető futás eredményét átlagoltuk, és kiszámoltuk a szórást. Csak abban az esetben számoltunk tovább az adott mintával, ha a szórás nem haladta meg az átlag GE értéket, és ezt figyelembe véve az eredmény még mindig a 0,05 küszöbérték felett volt..

3.5 Statisztikai módszerek

Az állatok parazitáltságának mérőszámait (prevalencia, átlag és medián intenzitás, átlagos abundancia) és ezek 95%-os konfidencia-intervallumait Quantitative Parasitology 3.0 statisztikai szoftverrel elemeztük (Rózsa et al., 2000). A fajok, fejlődési alakok, illetve mintavételi időpontok és élőhelyek értékeinek összehasonlítását is ezzel a szoftverrel végeztük.

A populációk prevalenciáját Sterne-féle egzakt módszerrel számoltuk ki, illetve „unconditional exact” teszttel hasonlítottuk össze. Az átlag intenzitás és az átlag abundancia értékeket bootstrap t-próbával elemeztük. A medián intenzitást pedig Mood-féle medián próbával számoltuk ki.

4. Eredmények és értékelésük

4.1 Terepi mintavételezés

Összesen 358 kételtű egyedet fogtunk és mintáztunk meg munkánk során. Ezek közül 71 lárva stádiumú példányt nem tudtunk sem a helyszínen, sem később fényképről meghatározni, ezért ezeket kihagytuk a további vizsgálatokból. A fogott fajok egyedszámát és az adott fejlődési alakokat az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Faj	Adult	Juvenilis	Lárva	Összes egyed
<i>Bombina variegata</i>	39	39	11	89
<i>Rana dalmatina</i>	45	1	15	61
<i>Bufo bufo</i>	54	0	0	54
<i>Bufo viridis</i>	22	17	0	39
<i>Lissotriton vulgaris</i>	5	0	9	14
<i>Pelophylax sp.</i>	2	21	4	27
<i>Hyla arborea</i>	0	0	1	1
<i>Bombina bombina</i>	1	0	0	1
Határozatlan	0	1	71	72
Összesen	168	79	111	358

1. táblázat: Fogott fajok fejlődési alakjainak mintaszáma.

4.2 Laboratóriumi feldolgozás

A fenti egyedek közül összesen 24-en mutattuk ki a *Batrachochytrium dendrobatidis* gombát, 20 *Bombina variegata* és 4 *Pelophylax* példányon (2. táblázat), de közülük egyik sem mutatta a kitridiomikózis klinikai tüneteit.

Faj	Adult	Juvenilis	Lárva	Összes fertőzött
<i>Bombina variegata</i>	10	10	0	20
<i>Rana dalmatina</i>	0	0	0	0
<i>Bufo bufo</i>	0	0	0	0
<i>Bufo viridis</i>	0	0	0	0
<i>Lissotriton vulgaris</i>	0	0	0	0
<i>Pelophylax sp.</i>	1	3	0	4
<i>Hyla arborea</i>	0	0	0	0
<i>Bombina bombina</i>	0	0	0	0
Határozatlan	0	0	0	0
Összesen	11	13	0	24

2. táblázat: Fertőzött egyedek száma fajonként és stádiumonként.

Ezen eredmények tartalmazzák az inhibitált, PCR reakcióban gátolt *Bombina variegata* minták százszoros hígításban történt ismétlését, valamint 13 „single positive” minta újrafuttatását.

A 24 pozitív minta részletes eredményeit a 3. táblázatban foglaltuk össze.

Minta neve	GE	StdDev GE	Faj	Dátum	Nem	Élőhely
IH104	2,15	0,4949	<i>Pelophylax ridibundus</i>	2010-04-03	juv	2
IH126	22	11,14	<i>Bombina variegata</i>	2010-04-17	M	2
IH130	0,0739	0,01166	<i>Bombina variegata</i>	2010-04-17	M	4
IH135	8,89	9,3	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	juv	2
IH136	164,3	8,26	<i>Pelophylax ridibundus</i>	2010-05-07	juv	2
IH138	0,151	0,07695	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	M	2
IH139	4,63	2,98	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	M	2
IH141	42,7	19,09	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	juv	2
IH146	0,05	0,004909	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	juv	2
IH148	12,5	8,29	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	juv	2
IH152	210,3	9,35	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	juv	2
IH161	6,78	0,269	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-07	juv	2
IH163	5,9	1,13137	<i>Pelophylax ridibundus</i>	2010-05-07	juv	1
IH174	0,061019	0,015096	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-29	A	2
IH176	4,93158	0,56215	<i>Bombina variegata</i>	2010-05-29	A	2
IH208	0,159307	0,035312	<i>Bombina variegata</i>	2010-06-25	F	2
IH210	13,3	3,65	<i>Bombina variegata</i>	2010-06-25	M	2
IH214	5,42	4,2	<i>Bombina variegata</i>	2010-06-25	M	2
IH306	0,09	0,01	<i>Bombina variegata</i>	2010-07-29	M	3
IH333	1,6	0,282842	<i>Bombina variegata</i>	2010-09-12	juv	3
IH337	0,15	0,07071	<i>Bombina variegata</i>	2010-09-12	juv	3
IH345	17,5	0,07071	<i>Bombina variegata</i>	2010-09-12	juv	3
IH349	0,17	0,08	<i>Bombina variegata</i>	2010-09-12	juv	3
IH354	100	0	<i>Pelophylax ridibundus</i>	2010-09-12	A	3

3. táblázat: *Bd* pozitív minták részletes eredményei. GE = átlag genom ekvivalens értékek, StdevGE = a genom ekvivalens értékek szórása. Élőhelyek: 1 = bányató, 2 = tó, 3 = kis pocsolya, 4 = csatorna.

A táblázat „Nem” oszlopában a rövidítések jelentése a következő: M = hím, F = nőstény, A = adult (az állat ivara nem volt meghatározható), juv = juvenilis egyed.

4.3 Statisztikai elemzés: prevalencia, intenzitás és abundancia

A taxonómiailag határozatlan és a PCR reakcióban gátolt mintákat (a *B. variegata*-k kivételével) kihagytuk a vizsgálat, illetve az elemzés további folyamataiból, így a tényleges mintaelemszám 215 egyedre csökkent.

A kétéltűközösség egészében a Sterne-féle egzakt módszert alkalmazva 0,112-es prevalencia-értéket állapítottunk meg (95%-os konfidencia-intervallum: 0,0747-0,1621). Az átlag intenzitás 25,99 (10,62-58,04), a medián intenzitás 5,2 (itt a konfidencia-intervallum számítására a mintaelemszám minden esetben túl kicsi volt) és az abundancia 2,90 (1,11-7,1) volt a Bootstrap analízis eredménye szerint.

A két fertőzött faj egyedein talált *B. dendrobatidis* zoospórák mennyiségét a 4. táblázat foglalja össze. Itt is a fentebb már leírt statisztikai módszereket használtuk.

<i>Bombina variegata</i>				
	összes (ebihalak, juvenilisok, adultok)	adult	juvenilis	adult + juvenilis
Prevalencia	0,290 (0,194-0,408)	0,303 (0,161-0,485)	0,370 (0,202-0,570)	0,333 (0,223-0,466)
Átlag intenzitás	17,57 (6,00-58,27)	5,8 (1,96-10,65)	30,06 (7,29-108,99)	17,57 (5,78-58,56)
Medián intenzitás	4,8*	2,4*	7,8*	4,8*
Abundancia	5,09 (1,56-18,30)	1,54 (0,48-3,85)	11,13 (2,39-41,63)	5,86 (1,80-19,37)
<i>Pelophylax sp.</i>				
	összes (ebihalak, juvenilisok, adultok)	adult	juvenilis	adult + juvenilis
Prevalencia	0,167 (0,059-0,372)	0,50 (0,025-0,975)	0,143 (0,040-0,354)	0,200 (0,071-0,424)
Átlag intenzitás	68,09 (3,09-132,15)	100	57,45 (3,40-164,3)	68,09 (3,09- 132,15)
Medián intenzitás	53,0*	100*	5,9*	53,0*
Abundancia	11,35 (0,34-35,81)	50	8,21 (0,20-39,50)	13,62 (0,40-43,15)

4. táblázat: A *B. variegata* és a *Pelophylax* fajok részletes eredményei, az átlagos genom-ekvivalens értékekkel.

Kiemelve a sárgahasú unkáknál talált legmagasabb értékek. Zárójelben a 95%-os konfidencia-intervallum látható, csillaggal jelöltük azokat az eredményeket, ahol a mintaelemszám túl alacsony volt az érték pontos meghatározásához.

Az adult *Pelophylax* egyedeknél meg kell említeni, hogy mindössze két állatot fogtunk, így az ezekre vonatkozó statisztika inkább csak tájékoztató jellegű.

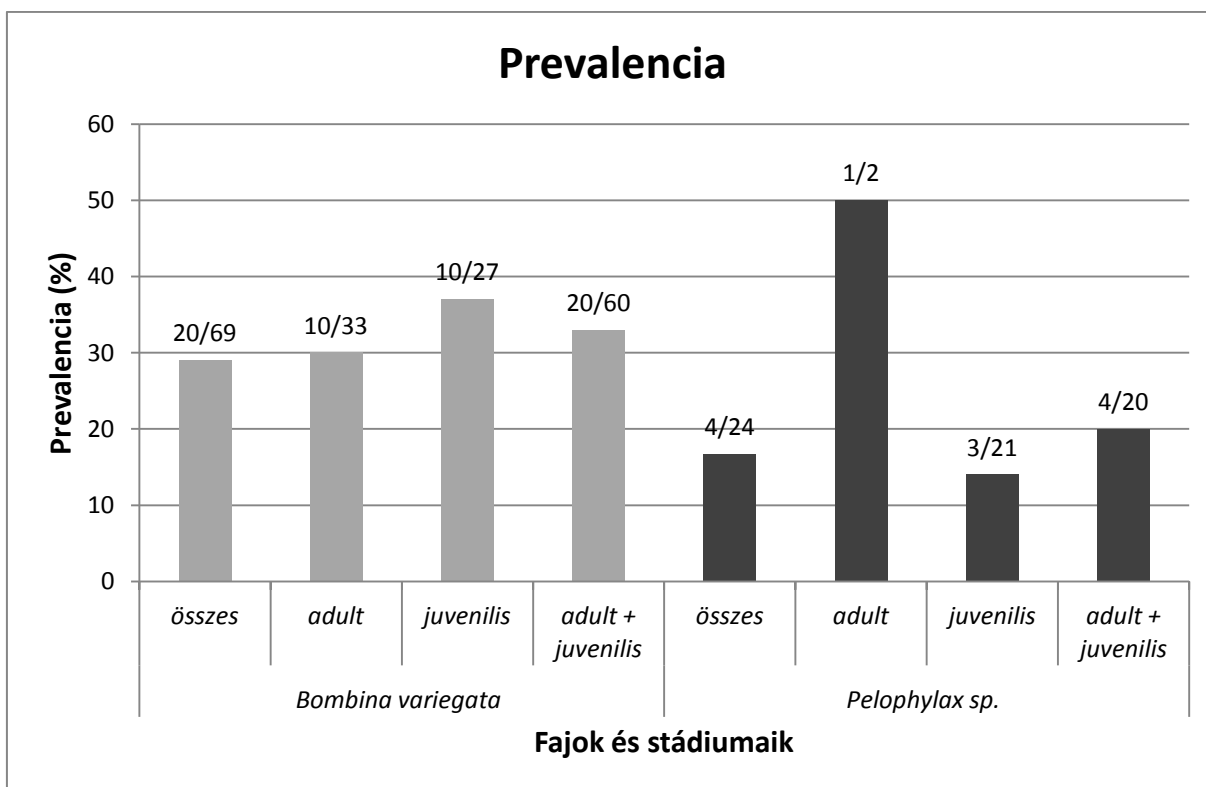
4.4 A két faj (*Bombina variegata* és *Pelophylax sp.*) fertőzöttségének összehasonlítása

A következő táblázatban összehasonlítottuk a két faj kapott prevalencia, intenzitás és abundancia értékeit. A prevalenciát unconditional exact teszttel, az átlag intenzitást és az átlag abundanciát 2-mintás bootstrap t-teszttel, a medián intenzitást pedig Mood-féle próbával vizsgáltuk (5. táblázat).

Összehasonlítás	Prevalencia	Átlag intenzitás	Medián intenzitás	Abundancia
<i>Bombina</i> – <i>Pelophylax</i>	p=0,264	p=0,279	p=0,590	p=0,478
<i>Bombina</i> – <i>Pelophylax</i> juv&adult	p=0,289	p=0,272	p=0,590	p=0,480
<i>Bombina</i> – <i>Pelophylax</i> adult	p=1,000	p=1,000	p=0,455	p=0,478
<i>Bombina</i> – <i>Pelophylax</i> juv	p=0,088	p=0,579	p=1,000	p=0,7985
<i>Bombina</i> juv és adult	p=1,000	p=0,396	p=0,656	p=0,385
<i>Pelophylax</i> juv és adult	p=0,1791	p=1,000	p=1,000	p=0,502

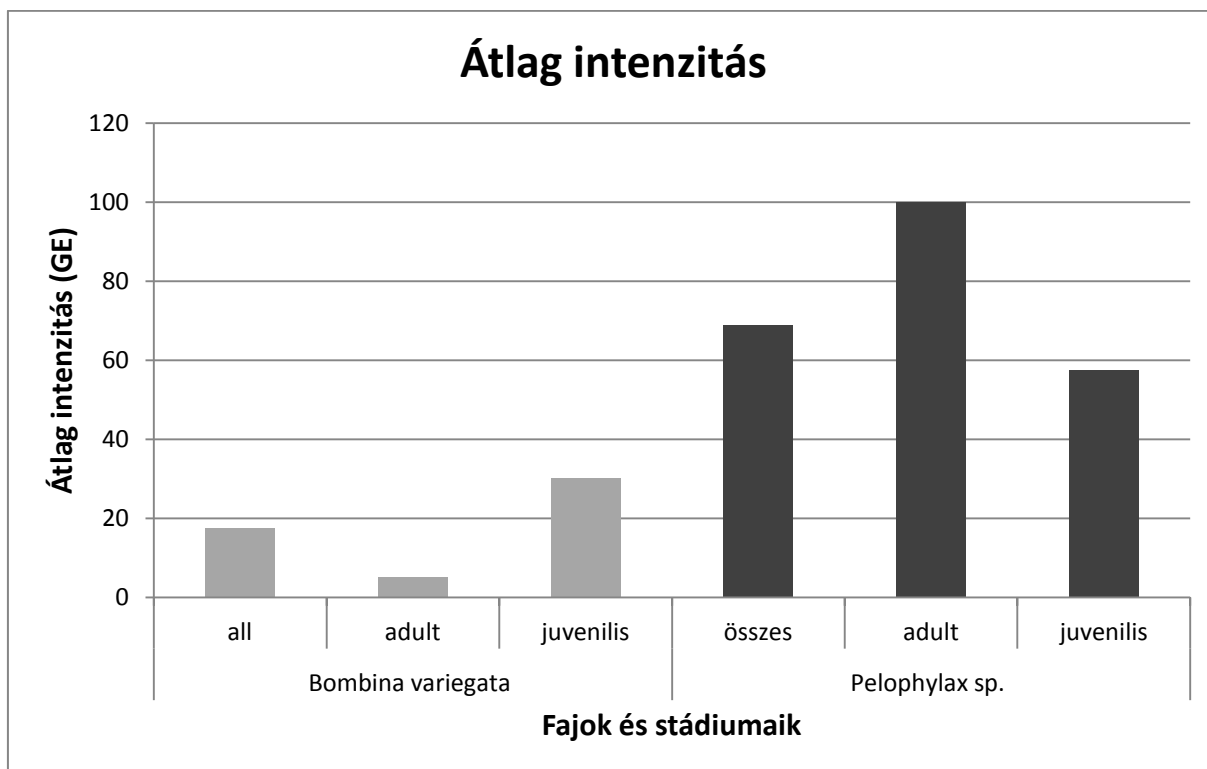
5. táblázat: Fajok és fejlődési alakok összehasonlítása. Szignifikancia szint: p=0,05.

Látható, hogy a *Bombina variegata* és a *Pelophylax* fajok juvenilis egyedeinek prevalencia-értékei között közel szignifikáns különbség van. Ez jól látszik a *B. variegata* és a *Pelophylax* sp. különböző fejlődési stádiumainak prevalencia-összehasonlításán is (8. ábra).



8. ábra: Hisztogram a *B. variegata* és a *Pelophylax* fajok prevalencia-értékeiről. Az oszlopok felett látható a Bd-pozitív és az összes vizsgált egyed aránya.

Habár a két faj egyedein mért átlag intenzitás nem különbözik szignifikánsan, azért a 9. ábrán látható egyfajta trend, miszerint a „zöld békákon” jelentősen több zoospóra volt kimutatható.



9. ábra: a *B. variegata* és a *Pelophylax* fajok átlag intenzitása.

4.5 A *Bombina variegata* fertőzöttségének elemzése

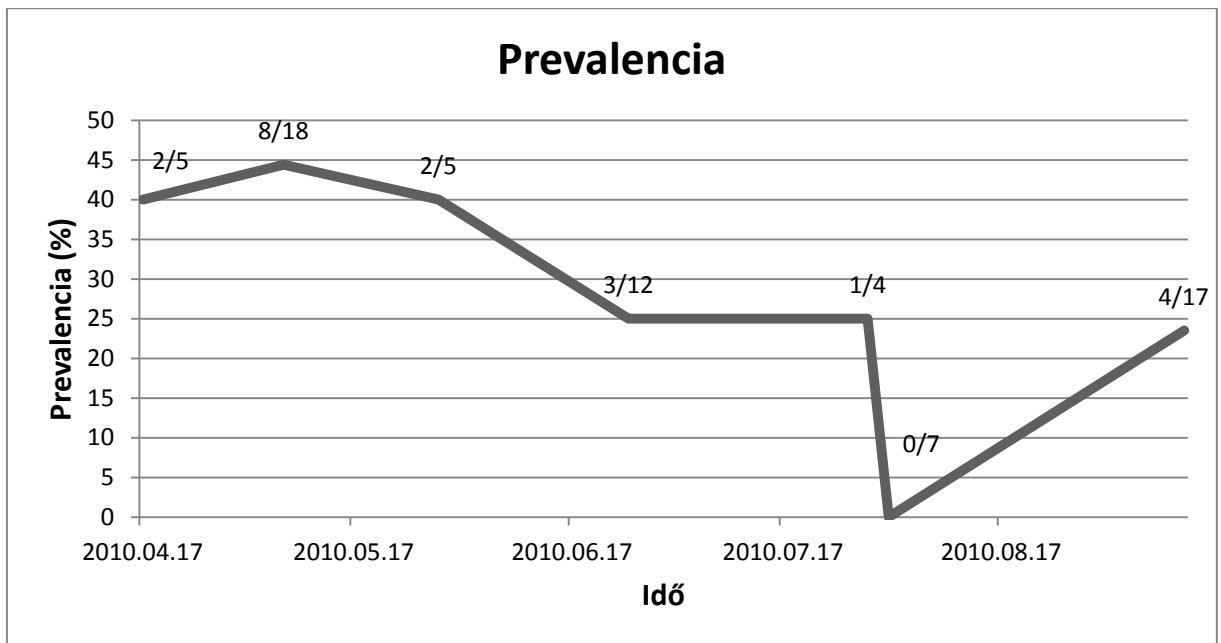
Mivel a *B. variegata* faj egyedei közül számos fertőzöttnek bizonyult, ezekkel tudtunk részletesebb elemzéseket folytatni. Összehasonlítottuk a tavasszal és nyáron fogott egyedek értékeit, melynek eredményét a 6. táblázatban foglaltuk össze.

Tavaszi			
	összes	juvenilis	adult
Prevalencia	0,429 (0,258-0,619)	0,545 (0,265-0,800)	0,353 (0,166-0,594)
Átlag intenzitás	26,09 (6,85-92,26)	46,87 (9,14-143,76)	5,31 (0,91-15,50)
Medián intenzitás	5,9*	10,7*	2,4*
Abundancia	11,18 (2,77-42,06)	25,57 (4,51-88,12)	1,87 (0,31-6,31)
Nyári			
	összes	juvenilis	adult
Prevalencia	0,195 (0,092-0,340)	0,250 (0,090-0,500)	0,250 (0,090-0,500)
Átlag intenzitás	4,80 (1,34-10,78)	4,86 (0,16-13,52)	4,74 (0,12-11,33)
Medián intenzitás	0,9*	0,9*	2,8*
Abundancia	0,94 (0,22-2,66)	1,21 (0,03-4,78)	1,19 (0,02-4,01)
Összehasonlítások			
	tavaszi-nyári összes	tavaszi-nyári juvenilis	tavaszi-nyári adult
Prevalencia	p=0,038	p=0,1324	p=0,585
Átlag intenzitás	p=0,395 (t=-1,231)	p=0,392 (t=-1,254)	p=0,921 (t=-0,121)
Medián intenzitás	p=0,650	p=0,524	p=1,000
Abundancia	p=0,370 (t=-1,349)	p=0,359 (t=-1,289)	p=0,676 (t=-0,436)

6. táblázat: *Bombina variegata* tavasszal és nyáron fogott egyedeinek genom-ekvivalens értékei. Zárójelben a 95%-os konfidencia-intervallum látható, csillaggal jelöltük azokat az értékeket, ahol a pontos intervallum nem volt megállapítható az alacsony mintaelemszám miatt. Az összehasonlítás a fent leírt módszerekkel történt, a szignifikáns eredményt vastag betűtípussal jelöltük.

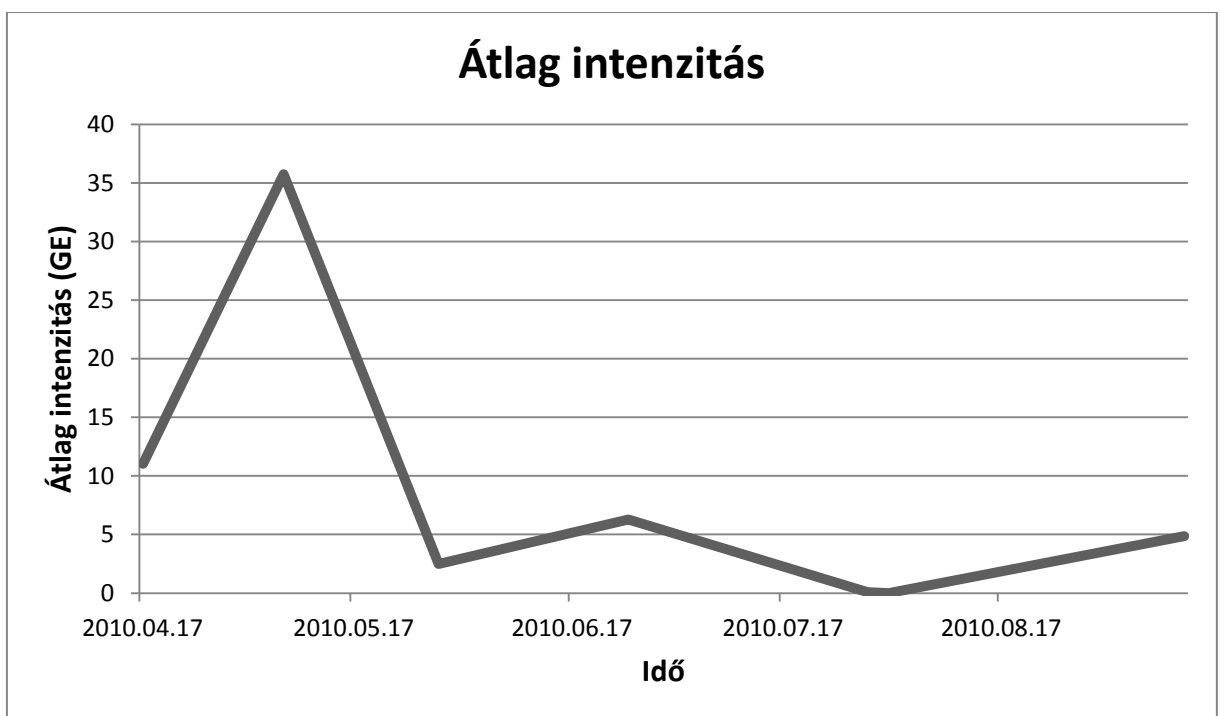
Egyetlen esetben – az összes állatra számolt prevalenciában - tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a tavasszal és nyáron fogott egyedek között.

Jól látható, hogy az egyedek fertőzöttségi aránya jelentősen ingadozott, de megállapíthatjuk, hogy összességében tavasszal magasabb volt, mint nyáron és ősszel (10. ábra).



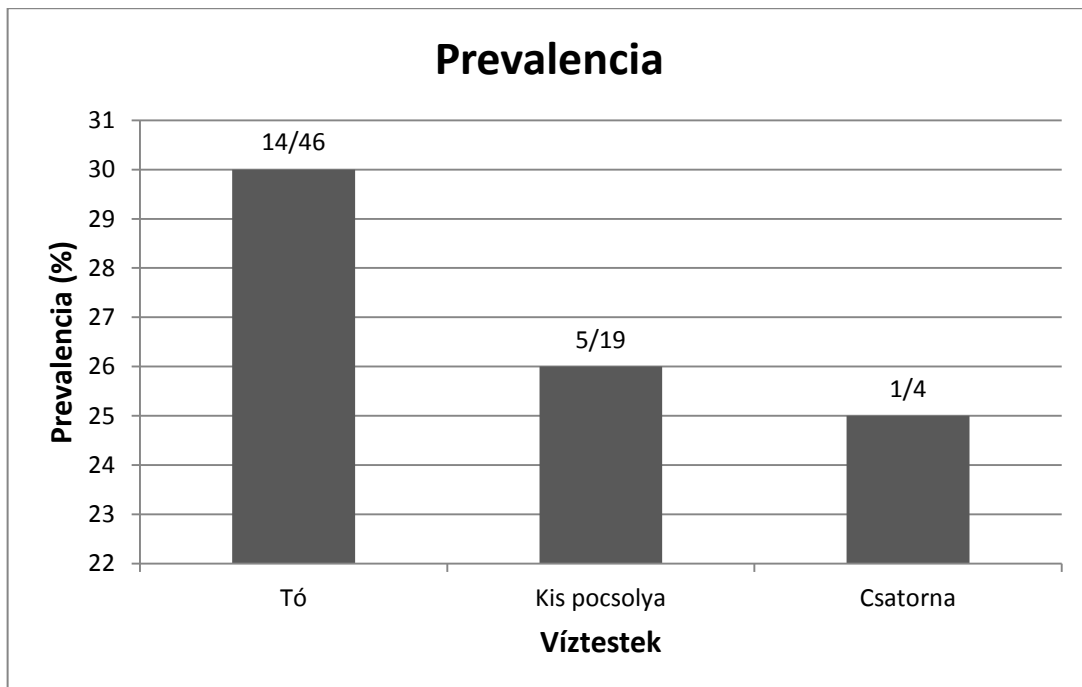
10. ábra: A *B. variegata* populáción belüli prevalencia változása időben.

Az intenzitás értékek, vagyis az egyedeken található átlagos genom-ekvivalens értékek tavasszal voltak a legmagasabbak, a zoospórák mennyisége az idő előrehaladtával folyamatosan csökkent (11. ábra).



11. ábra: Az intenzitás változása időben, a *B. variegata* populáción belül.

Összehasonlítottuk továbbá azt a három élőhelyet is, ahol fertőzött sárgahasú unkákat találtunk (12. ábra).



12. ábra: A három élőhely prevalencia értékei.

A különbség ugyan nem szignifikáns (Fisher-féle egzakt próba, $p=1,000$), de látszik, hogy a tóban volt a legmagasabb a fertőzöttségi arány. Különösképpen, ha figyelembe vesszük, hogy a csatornában mindössze négy unkat fogtunk és közülük csupán egy lett fertőzött.

4.6 Az eredmények értékelése

Vörös és munkatársai 2008-ban kimutatták a *Batrachochytrium dendrobatidis* jelenlétét vizsgálataink helyszínén, az iharkúti élőhelyen. Akkor a sárgahasú unkapopuláció juvenilis egyedeinek fertőzöttségi aránya 0,5 volt (Vörös et al., 2009). Így feltételeztük, hogy a *B. variegata* egyedeken vizsgálataink során továbbra is megtaláljuk majd a gombát. Elemzéseink folyamán feltételeztük, hogy a külföldi eredményekhez hasonlóan, hazánkban, ezen a magas-bakonyi élőhelyen is fertőzöttek lesznek a *Pelophylax*-fajok. Továbbá feltételeztük, hogy több fiatal egyeden találjuk majd meg a patogén zoospóráit, mint felnőtt állaton vagy lárván. Ennek oka, hogy a metamorfózist követően az állatok teljes testfelületén kiterjed a keratinizált bőrréteg és ezzel együtt a kórokozó is (Berger et al., 1998). Úgy gondoltuk továbbá, hogy különbséget találhatunk a tavasszal és nyáron fogott egyedek között, mivel a hőmérséklet nagyban befolyásolja a kitrid gomba fiziológiáját.

Várakozásainknak megfelelően a nyolc vizsgált kétélűtaxon közül az egyik fertőzött valóban a *Pelophylax*-fajcsoport volt. A másik érintett faj pedig a sárgahasú unka (*Bombina variegata*), melyről eddig még nem közöltek ilyen jellegű adatokat más országból. Mindkét

faj hosszan tartózkodik a vízben, szaporodási időszakuk elnyújtott és párzás után sem térnek vissza rögtön szárazföldi rejtekükbe. Ez a tény különösen fogékonyá teszi őket a *Bd* iránt, hiszen így nagyobb eséllyel fertőződnek meg, mint azok a fajok, melyek mindössze 1-2 hetet töltenek a víztestekben. Ugyanakkor mintavételeink helyszínén nem találtunk elhullott egyedeket és szemmel láthatóan a megfogott állatok sem voltak betegek. Így feltételezhetjük, hogy mind a „zöld békák”, mind pedig a sárgahasú unka a kitridiomikózis megjelenése nélkül hordozzák a patogént és ezzel szerepet játszhatnak annak terjesztésében, illetve rezervoárként szolgálhatnak számára.

A *B. variegata* faj esetében a juvenilis egyedek fertőzöttségi aránya 0,37 volt, az adultaké 0,30, összességében az egész populációé pedig 0,29 (lárva nélkül számítva 0,33). Ezek a prevalencia értékek még mindig elég magasak, de nem érik el a három évvel ezelőtti 0,5-ös értéket. Különös eredmény, hogy egyetlen ebihalon sem találtuk meg a gombát, sem a sárgahasú unka, sem pedig más faj példányain.

A teljes *Pelophylax* populáció prevalenciája 0,16 volt vizsgálataink szerint (0,20 lárva nélkül), a juvenilis példányoké pedig 0,14. Mivel csak két felnőtt egyedet fogtunk és közülük az egyiken megtaláltuk a *Bd*-t, ez 0,5-ös fertőzöttségi arányt jelentene, de ilyen kicsi mintaelemszámnál, ez az eredmény inkább csak tájékoztató jellegű.

Elmondhatjuk tehát, hogy valóban a fiatal egyedek között találtuk a legtöbb fertőzöttet. A sárgahasú unkáknál továbbá minden egyéb érték is a juvenilis példányokon volt a legmagasabb (intenzitás, abundancia). Ez alátámasztja azokat a vizsgálatokat, mely szerint a frissen átalakult, fiatal példányok a leginkább veszélyeztetettek a kitridiomikózissal szemben (Berger et al., 1998). A „zöld békáknál” nehéz bármilyen következtetést levonni, hiszen mindössze négy állaton mutattuk ki a gomba jelenlétét. Mindenesetre az látszik az eredményeken, hogy ezen taxon fertőzöttségi aránya alacsonyabb, mint a *B. variegata* esetében, bár statisztikailag nem szignifikáns a különbség. Az intenzitási és abundancia értékek viszont a *Pelophylax* egyedeken voltak látszólag magasabbak. Közel szignifikáns különbséget tudunk viszont kimutatni a két faj juvenilis egyedeinek prevalencia értékei között ($p=0,088$). Elmondhatjuk tehát, hogy a sárgahasú unka fiatal egyedeinek fertőzöttségi aránya magasabb volt, mint a „zöld békák” fiataljaié. Úgy tűnik, hogy míg a *Bombina* egyedek nagyobb százalékban, nagyobb valószínűséggel hordozzák a gombát, a *Pelophylax* egyedek intenzívebb fertőzöttséget mutatnak. Ismert jelenség, hogy a kitrid gomba eltérő mértékben fertőzi és betegíti meg a különböző kétélűfajokat (Kriger and Hero, 2006, Garner et al. 2006, Lips et al., 2006). Ennek számos oka lehet. Egyik lehetséges ok a békák bőrén előforduló szimbióta baktériumok hatása. A vöröshátú szalamandra (*Plethodon cinereus*) bőréről izolált *Janthinobacterium lividum* például gombaölő metabolitokat termel olyan

koncentrációban, amely halálos dózis a *Bd* számára (Brucker et al., 2008). Ezért ez a faj ellenálló a *B. dendrobatidis*-szal szemben, ami a faj hosszútávú fennmaradásának titkát jelentheti. A *Bombina* és *Pelophylax*-fajok bőrén található baktériumokat ugyan még nem vizsgálták, elképzelhető, hogy a *Bombina*-fajok bőrén termelődő méreganyag csökkenti a gomba hatását.

A mintaelemszám a *Bombina variegata* esetében volt elegendő ahhoz, hogy további elemzéseket végezzünk. Kíváncsiak voltunk arra, van-e valamilyen különbség a különböző évszakokban fogott állatok fertőzöttsége között. Feltételeztük, hogy tavasszal, amikor a legtöbb faj szaporodik, az élőhelyen lévő magasabb egyedsűrűség miatt könnyebben átadják az állatok egymásnak a fertőzést, mint nyáron és ősszel, amikor az sárgahasú unkák és a „zöld békák” kivételével minden faj elhagyta már a vizet. Eredményeink is ezt igazolják: szignifikáns különbség mutatható ki a tavasszal és nyáron mintázott egyedek fertőzöttségi aránya között, vagyis több példány hordozta a gombát tavasszal, mint nyáron. ($p=0,038$). Intenzitás- és abundanciabeli különbséget vizsgálataink nem igazoltak, bár a 6. ábrán jól látható, hogy tavasszal volt magasabb az átlag intenzitás, nyáron és ősszel pedig egyre csökkent.

Hazánkban a tavaszi klíma valószínűleg kedvezőbb a gomba terjedésének, hiszen a növekedési optimuma 25-27 °C körül mozog, e felett kevésbé növekszik és szaporodik, 30 °C felett pedig elpusztul (Piotrowski et al., 2004). Ugyan a hazai viszonyok nem jelentenek extrém alacsony vagy magas hőmérsékleti körülményeket a *Bd* gomba számára, a tavaszi és őszi prevalencia-értékek összehasonlításából látszik, hogy a tavaszi hónapok jobban kedveznek a gomba populáción belüli terjedésének. Számos élőhelyen kimutatták már, hogy a gomba transzmissziója abundancia-függő, tehát a népesebb populációkban könnyebben átadódik a fizikai közelség és érintkezés miatt, mint a kis létszámú populációkban. Briggs és munkatársai (2010) egyenes arányú összefüggést talált a tóban található békák egyedszáma és a gomba növekedése között, míg negatív korrelációt talált az egyedszám és az egyedek pusztulásához szükséges idő között. Az iharkúti tóban tavasszal párzanak az unkák és a zöldbékák is, amikor a víz hőmérséklete optimális a gomba növekedéséhez. Ezért magasabb arányban fertőzik meg egymást az egyedek, mint a nyári vagy őszi hónapokban, amikor ugyan a vízben vannak, viszont egymással nem vagy kevésbé érintkeznek.

A gomba intenzitásának szezonális változása is a helyi hőmérsékleti viszonyokkal magyarázható. A tó vize nyárra jóval alacsonyabb és sekélyebb lesz, vagyis könnyebben felmelegszik, ami nem kedvez a gomba szaporodásának. A csatorna vize és a kis pocsolya nyáron rövid időszakokra ki is száradnak, ami szintén hátrányos lehet a gomba fennmaradása, növekedése szempontjából.

Az Iharkút területén fekvő négy élőhely közül háromban fordultak elő *B. variegata* egyedek: a tóban (2. élőhely), a kis, állandó vizű pocsolyában (3.) és a földút melletti csatornában (4.). E víztestek fertőzöttségi értékeit is összehasonlítottuk és azt az eredményt kaptuk, hogy a prevalencia a 2-es élőhelyen, azaz a tóban volt a legmagasabb. Itt volt a legmagasabb a sárgahasú unkákat egyedszáma is és mivel ez a tó elég mély és állandó vizű, a kétélűeknek itt van lehetőségük a vízi növényzetre helyezni petéiket, főleg itt szaporodnak. Ezzel szemben a kis pocsolya és a csatorna kevesebb egyedet lát el élő- és szaporodóhellyel, továbbá mindkét víztest kiszáradhat a nyár folyamán, ami csökkenti a *Bd* előfordulásának valószínűségét a vízzel való feltöltődés után is.

Vizsgálataink elsőként adnak átfogó képet a *Batrachochytrium dendrobatidis* egy magyarországi élőhely kétélűközösségére gyakorolt hatásáról. Számos taxont vizsgálva megtudhattuk, hogy közép-európai klimatikus viszonyok között mely fajokat érinti a fertőzés. Kimutattuk, hogy ilyen körülmények között, a vizsgált fajok közül egyik sem érzékeny annyira a gombára, hogy mortalitás vagy klinikai tünetek legyenek tapasztalhatók. Habár ez jó hír a magyar kétélűfaunára nézve, fontos megtenni a szükséges óvintézkedéseket annak érdekében, hogy a gomba ne terjedhessen tovább a hordozó fajokkal és az emberrel.

Kutatók az ország számos más területén is tanulmányozzák a kórokozó előfordulását és a jövőben mi is szeretnénk tovább vizsgálni és megfigyelni az iharkúti kétélűközösséget, hogy teljesebb képet kaphassunk a *Bd* ezen állatokra gyakorolt hatásáról és ennek időbeli változásáról.

5. Összefoglalás

Szakdolgozatom célja az volt, hogy képet kapjunk a *Batrachochytrium dendrobatidis* nevű kétéltűeket fertőző rajzospórák gomba hatásáról egy magyarországi kétéltűközösségben. Egy 2008-as vizsgálat alapján a Magas-Bakonyban található iharkúti élőhelyet választottuk tanulmányaink helyszínéül, mivel itt Vörös és munkatársai már kimutatták a *Bd* jelenlétét sárgahasú unkákon. Eddig még Közép-, Kelet-Európa más részeiről nem nagyon született ilyen jellegű publikáció, ezért nagyon fontos volt, hogy részletes információhoz jussunk a kórokozó itteni klimatikus viszonyok közötti virulenciájáról. Választ kerestünk arra, hogy mely fajokat valamint fejlődési stádiumokat érinti a fertőzés és hogy van-e különbség a különböző évszakokban fogott kétéltűek fertőzöttsége között.

Összesen 215 egyedet vizsgáltunk meg, melyek a következő taxonokhoz tartoztak: pettyes göte (*Lissotriton vulgaris*), sárgahasú unka (*Bombina variegata*), vöröshasú unka (*Bombina bombina*), erdei béka (*Rana dalmatina*), barna varangy (*Bufo bufo*), zöld varangy (*Bufo viridis*), zöld levelibéka (*Hyla arborea*), „zöld békák” (*Pelophylax* sp.). A mintavételt 2010 márciusától szeptemberig végeztük szakaszosan, fajnak és fejlődési stádiumnak megfelelően. Terepi munkánk során a fertőtlenítésre nagy gondot fordítottunk (Virkon®) és a kontaminációt elkerülendő gumikesztyűket és nejlon zacskókat használtunk a kétéltűek megfogására. Steril mintavevő pálcával minden egyed hátát, hasát, oldalát, combjának belső felét és hátsó lábának úszóhártyáit egységesen ötször dörzsöltük végig, hogy később eredményeink standardok legyenek.

A feldolgozást Boyle et al. 2004-es cikke alapján végeztük, ami jelenleg a világszerte elfogadott molekuláris eljárás a *Bd* fertőzöttség kimutatására és kvantifikálására. Célunk a gomba genom 5.8 S riboszomális DNS és ITS (internal transcribed spacer) szakaszainak felamplifikálása volt, Real-Time PCR segítségével. Ehhez Taqman rendszert használtunk és a futtatást tripletekben végeztük: ez három ismétlést tartalmazott az adott mintából, melyek közül egybe belső pozitív kontrollt helyeztünk, ami jelezte az esetleges inhibíciót. A reakcióban gátolt *B. variegata* mintákat százszoros hígításban újfuttattuk, illetve az egyszeresen pozitív („single positive”) mintákat is megismételtük. Az amplifikáció végén a 0,05 genom ekvivalens érték feletti eredményeket tekintettük pozitívnak. A statisztikai elemzést Quantitative Parasitology 3.0 szoftverrel végeztük.

A kétéltűközösségben 24 egyeden találtuk meg a kitridgombát. Várakozásainknak megfelelően közülük 20 példány a sárgahasú unka fajhoz tartozott, 4 pedig a „zöld békákhoz”. A teljes populációban a fertőzöttségi arány 0,112 volt. Megállapítottuk a fajokhoz, különböző stádiumaikhoz, illetve az évszakokhoz tartozó prevalencia, intenzitás és

abundancia értékeket is, majd ezeket össze is hasonlítottuk. Közel szignifikáns prevalenciabeli különbséget állapítottunk meg a *B. variegata* és a *Pelophylax sp.* juvenilis egyedeinek fertőzöttsége között: a sárgahasú unák fiatal egyedeinek fertőzöttségi aránya magasabb volt. Továbbá kimutatható eltérés volt a tavasszal, illetve nyáron fogott *B. variegata* és *Pelophylax sp.* példányok prevalenciája között, a tavaszi állatok javára. Összességében elmondható, hogy tavasszal a sárgahasú unka populációban mind a fertőzöttségi arány, mind pedig az átlag intenzitás jóval magasabb volt, mint nyáron és ősz elején.

Eredményeink azt mutatják, hogy magyarországi körülmények között, a vizsgált fajok közül egyik sem érzékeny annyira a *Batrachochytrium dendrobatidis* gombára, hogy mortalitás vagy klinikai tünetek legyenek tapasztalhatók. Hazánkban mindkét faj, melyen megtaláltuk a patogént csupán csak hordozza a fertőzést, de nem betegszik meg, nem alakul ki náluk kitridiomikózis. Ehhez hozzájárulhatnak az itteni klimatikus viszonyok is, melyek valószínűleg nem kedveznek a *Bd* virulenciájának.

6. Irodalom

ADAMS M. J., GALVAN S., SCALERA R., GRIECO C., SINACO R. 2008: *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations in Italy. In: *Herpetological Review*. 39. 3. p. 324 – 326.

BERGER L., SPEARE R., DASZAK P., GREEN D. E., CUNNINGHAM A. A., GOGGIN C. L., SLOCOMBE R., RAGAN M. A., HYATT A. D., MCDONALD K. R., HINES H. B., LIPS K. R., MARANTELLI G., PARKES H. 1998: Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95. p. 9031-9036.

BERGER L., SPEARE R., HINES H. B., MARANTELLI G., HYATT A. D., MCDONALD K. R., SKERRATT L. F., OLSEN V., CLARKE J. M., GILLESPIE G., MAHONY M., SHEPPARD N., WILLIAMS C., TYLER M. J. 2004: Effect of season and temperature on mortality in amphibians due to chytridiomycosis. In: *Australian Veterinary Journal*. 82. 07. p. 31-36

BERGER L., SPEARE R., HYATT A. D. 1999: Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: *Tropical Medicine*. p. 23-33.

BLAUSTEIN A. R., ROMANSIC J. M., SCHEESSELE E. A., HAN B. A., PESSIER A. P. 2005: Interspecific Variation in Susceptibility of Frog Tadpoles to the Pathogenic Fungus. In: *Conservation Biology*. 19.5. p. 1-9.

BOSCH J., CARRASCAL L. M., DURÁN L., WALKER S., FISHER M. C. 2007: Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link?. In: *Proceedings of the Royal Society B*. 274. p. 253-260.

BOSCH J. 2006: Chytrid fungus infection related to unusual mortalities of *Salamandra salamandra* and *Bufo bufo* in the Peñalara Natural Park, Spain. In: *Oryx*. 40. 1. p. 84-89.

BOSCH J. 2001: Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. In: *Biological Conservation*, 97. p. 331-337.

- BOVERO S., SOTGIU G., ANGELINI C., DOGLIO S., GAZZANIGA E., CUNNINGHAM A. A., GARNER T. W. J. 2008: Detection of Chytridiomycosis Caused by *Batrachochytrium dendrobatidis* in the Endangered Sardinian Newt (*Euproctus platycephalus*) in Southern Sardinia, Italy. In: *Journal of Wildlife Diseases*. 44. 3. p. 712-715.
- BOYLE D. G., BOYLE D. B., OLSEN V., MORGAN J. A. T., HYATT A. D. 2004: Rapid quantitative detection of chytridiomycosis. In: *Diseases Of Aquatic Organisms*. 60. p. 141-148.
- BRUCKER R. M., HARRIS R. N., SCHWANTES C. R., GALLAHER T. N., FLAHERTY D. C., LAM B. A., MINBIOLE K. P. C. 2008: Amphibian chemical defense: antifungal metabolites of the microsymbiont *Janthinobacterium lividum* on the salamander *Plethodon cinereus*. In: *Journal Of Chemical Ecology*. 34. p. 1422-1429.
- DASZAK P., BERGER L., CUNNINGHAM A. A., HYATT A. D., GREEN D. E., SPEARE R. 1999: Emerging Infectious Diseases and Amphibian Population Declines. In: *Emerging Infectious Diseases*, 5. 6. p. 735-748.
- FISHER M. C., GARNER T. W. J., WALKER S. 2009: Global Emergence of *Batrachochytrium dendrobatidis* and Amphibian Chytridiomycosis in Space, Time, and Host. In: *Annual Review of Microbiology*. 63. p. 291-310.
- FISHER M. C. 2007: Potential interactions between amphibian immunity, infectious disease and climate change. In: *Animal Conservation*. 10. p. 420-421.
- GARNER T. W. J., PERKINS M. W., GOVINDARAJULU P., SEGLIE D., WALKER S., CUNNINGHAM A. A., FISHER M. C. 2006: The emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* globally infects introduced populations of the North American bullfrog, *Rana catesbeiana*. In: *Biology letters*. p. 1-5.
- GARNER T. W. J., WALKER S., BOSCH J., HYATT A. D., CUNNINGHAM A. A., FISHER M. C. 2005: Chytrid fungus in Europe. In: *Emerging infectious diseases*, 11. 10. p. 1639-1641.
- GOKA K. 2009: Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. In: *Molecular Ecology*. p. 1-18.

- HALE S. F., ROSEN P. C., JARCHOW J. L., BRADLEY G. A. 2005: Effects of the Chytrid Fungus on the Tarahumara Frog (*Rana tarahumarae*) in Arizona and Sonora, Mexico. In: *USDA Forest Service Proceedings*. p. 407-411.
- HANSELMANN R. 2004: Presence of an emerging pathogen of amphibians in introduced bullfrogs *Rana catesbeiana* in Venezuela. In: *Biological Conservation*. 120. p. 115-119.
- JAMES T. Y., LITVINTSEVA A. P., VILGALYS R., MORGAN J. A. T., TAYLOR J. W. 2009: Rapid Global Expansion of the Fungal Disease Chytridiomycosis into Declining and Healthy Amphibian Populations. In: *PLoS Pathog.* 5. 5.: e1000458
- JOHNSON M. L., SPEARE R. 2005: Possible modes of dissemination of the amphibian chytrid *Batrachochytrium dendrobatidis* in the environment. In: *Diseases Of Aquatic Organisms*. 65. p. 181-186.
- KRIGER K. M., HERO J. M. 2006: Survivorship in Wild Frogs Infected with Chytridiomycosis. In: *EcoHealth*, 3. p. 171-177.
- KUSRINI M. D., SKERRATT L. F., GARLAND S., BERGER L., ENDARWIN W. 2008: Chytridiomycosis in frogs of Mount Gede Pangrango, Indonesia. In: *Diseases Of Aquatic Organisms*. 82. 3. p. 187-194.
- LAURANCE W. F. 1996: Epidemic Disease and the Catastrophic Decline of Australian Rain Forest Frogs. In: *Conservation Biology*. 10. 2. p. 406-413.
- LIPS K. R., BREM F., BRENES R., REEVE J. D., ALFORD R. A., VOYLES J., CAREY C., LIVO L., PESSIER A. P., COLLINS J. P. 2006: Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103. 9. p. 3165-3170.
- LIPS K. R., DIFFENDORFER J., MENDELSON J. R. III, SEARS M. W. 2008: Riding the Wave: Reconciling the Roles of Disease and Climate Change in Amphibian Declines. In: *PLoS Biol.* 6. 3.: e72
- LIPS K. R. 1998: Decline of a Tropical Montane Amphibian Fauna. In: *Conservation Biology*. 12. 01. p. 106-117.
- LIPS K. R. 1999: Mass Mortality and Population Declines of Anurans at an Upland Site in Western Panama. In: *Conservation Biology*. 13. 01. p. 117-125.

- LONGCORE J. E. 1999: *Batrachochytrium dendrobatidis* gen. et sp. nov., a chytrid pathogen to amphibians. In: *Mycologia*. 91. 02. p. 219-227.
- MORGAN J. A. T., VREDENBURG V. T., RACHOWICZ L. J., KNAPP R. A., STICE M. J., TUNSTALL T., BINGHAM R. E., PARKER J. M., LONGCORE J. E., MORITZ C., BRIGGS C. J., TAYLOR J. V. 2007: Population genetics of the frog-killing fungus *Batrachochytrium dendrobatidis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104. 34. p. 13845-13850.
- MUTSCHMANN F., BERGER L. 2000: Chytridiomycosis on amphibians - first report from Europe. In: *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 113. p. 380-383.
- OUELLET M., GREEN D. M. 2005: Historical Evidence of Widespread Chytrid Infection in North American Amphibian Populations. In: *Conservation Biology*. 19. 5. p. 1431-1440.
- PIOTROWSKI J.S., ANNIS S.L., LONGCORE J. E. 2004: Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. In: *Mycologia*. 96. 1. p. 9-15.
- POUNDS J. A 2006.: Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. In: *Nature*. 439. p. 161-167.
- RACHOWICZ L. J., HERO J. M., ALFORD R. A., TAYLOR J. W., MORGAN J. A. T., VREDENBURG V. T., COLLINS J. P., BRIGGS C. J. 2005: The Novel and Endemic Pathogen Hypotheses: Competing Explanations for the Origin of Emerging Infectious Diseases of Wildlife. In: *Conservation Biology*. 19. 5. p. 1441-1448.
- RÓZSA L., REICZIGEL J., MAJOROS G. 2000: Quantifying parasites in samples of hosts. In: *The Journal Of Parasitology*. 86. 2. p. 228-232.
- SCALERA R., ADAMS M. J., GALVAN S. K. 2008: Occurrence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in amphibian populations in Denmark. In: *Herpetological Review*. 39. 2. p. 199 – 200.
- SCHLOEGEL L. M., FERREIRA C. M., JAMES T. Y., HIPOLITO M., LONGCORE J. E., HYATT A. D., YABSLEY M., MARTINS A. M. C. R. P. F., MAZZONI R., DAVIES A. J., DASZAK P. 2010: The North American bullfrog as a reservoir for the spread of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Brazil. In: *Animal Conservation*. 13. p. 53-61.

- SIMONCELLI F., FAGOTTI A., DALL'OLIO R., VAGNETTI D., PASCOLINI R., DI ROSA I. 2005: Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* Infection in Water Frogs of the *Rana esculenta* Complex in Central Italy. In: *EcoHealth*. 2. 4. p. 307-312.
- SKERRATT L. F., BERGER L., SPEARE R., CASHINS S., MCDONALD K. R., PHILLOTT A. D., HINES H. B., KENYON N. 2007: Spread of Chytridiomycosis Has Caused the Rapid Global Decline and Extinction of Frogs. In: *EcoHealth*, 4. 2. p. 125-134.
- STAGNI G., SCOCCIANI C., FUSINI R. 2002: Segnalazione di chytridiomicosi in popolazioni di *Bombina pachypus* (Anura, Bombinatoridae) dell'Appennino toscoemiliano. Abstracts IV; Congresso della Societas Herpetologica Italica; Napoli: Societas Herpetologica Italica.
- STOCKWELL M. P., CLULOW J., MAHONY M. J. 2010: Host species determines whether infection load increases beyond disease-causing thresholds following exposure to the amphibian chytrid fungus. In: *Animal Conservation*. 13. p. 62-71.
- SURA P., JANULIS E., PROFUS P. 2010: Chytridiomikoza – śmiertelne zagrożenie dla płazów Chytridiomycosis – a mortal danger for amphibians. In: *Chronmy Przyr. Ojcz.* 66. 6. p. 406-421.
- VOYLES J., BERGER L., YOUNG S., SPEARE R., WEBB R., WARNER J., RUDD D., CAMPBELL R., SKERRATT L. F. 2007: Electrolyte depletion and osmotic imbalance in amphibians with chytridiomycosis. In: *Diseases Of Aquatic Organisms*. 77. p. 113-118.
- VÖRÖS J., ALCOBENDAS M., MARTINEZ-SOLANO I., GARCIA-PARIS M. 2006: Evolution of *Bombina bombina* and *Bombina variegata* (Anura: Discoglossidae) in the Carpathian Basin : A history of repeated mt-DNA introgression across species. In: *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 38. 3. p. 705-718.
- VÖRÖS J., HETTYEY A., SÓS E., DANKOVICS R., GARNER T. W. J. 2009: Amphibian chytrid fungus in Hungary. In: *Second European Congress of Conservation Biology, Abstract book*, p. 105.
- WALDMAN B. 2001: Chytridiomycosis in New Zealand frogs. In: *Surveillance*. 28. 1. p. 9-11.
- WELDON C., PREEZ L. H., HYATT A. D. 2004: Origin of the Amphibian Chytrid Fungus. In: *Emerging Infectious Diseases*. 10. 12. p. 2100-2105.

Internetes források:

<http://www.amphibiaweb.org/declines/declines.html> Megtekintés időpontja: 2011. április 20.

<http://hu.wikipedia.org/wiki/Thark%C3%BAt> Megtekintés időpontja: 2011. április 14.

http://www.khvsz.mme.hu/index.php?option=com_content&view=article&id=55&Itemid=75&lang=hu Megtekintés időpontja: 2011. április 10.

7. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, dr. Vörös Juditnak és belső konzulensemnek, Szabó Krisztiánnak odaadó támogatásukat és sokrétű segítségüket munkám során. Köszönettel tartozom a Magyar Természettudományi Múzeum Molekuláris Taxonómiai Laboratóriumának munkatársainak, név szerint Schrettné Dr. Major Ágnesnek, Tuschek Máriának és Krízsis Virágnak a sok segítségért, mellyel jelentősen hozzájárultak munkám sikeréhez. Hálás vagyok továbbá Dr. Dán Ádámnak és az Országos Állategészségügyi Intézet Molekuláris Biológiai Osztályának munkatársainak közreműködésükért. Mintáim feldolgozásához nagymértékben hozzájárult Katona István és az MTA Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézetének Molekuláris Neurobiológiai Kutatócsoportja.

Terepi munkámat jelentősen segítette témavezetőm és belső konzulensem, valamint dr. Jaime Bosch (Madridi Természettudományi Múzeum), dr. Ősi Attila és a Magyar Dinoszaurusz-kutató Expedíció. A vizsgálatainkhoz szükséges engedélyek biztosításáért köszönetet szeretnék mondani a Bakonyerdő Erdészeti és Faipari Zrt-nek. A kutatás anyagi háttérét az OTKA K77841 pályázat (témavezető: dr. Vörös Judit) biztosította.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak tanulmányaim során nyújtott szerető támogatásukért.