

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Parazitáltság, fajösszetétel és ploiditás vizsgálata a *Pelophylax
esculentus* komplexen**

**Parasites, taxonomic composition and ploidy level of the *Pelophylax
esculentus* complex**

Herczeg Dávid

Témavezetők:

Prof. Barta Zoltán

Dr. Vörös Judit



DEBRECENI EGYETEM

Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola

Debrecen, 2017

Bevezetés

Az elmúlt évtizedek kutatásai rámutattak arra, hogy a parazita organizmusok kiemelt jelentőségű elemei a biodiverzitásnak (Poulin és Morand 2004; Dobson et al. 2008; Kuris et al. 2008) továbbá általános evolúciobiológiai (Brooks és McLennan 1993) és ökológiai vizsgálatok számára is kiváló modellszervezeteknek bizonyulnak (Poulin 1997; Poulin és Morand 2004; Pedersen és Fenton 2007). Annak érdekében, hogy a globális biodiverzitást megfelelően tudjuk becsülni, az élőlények sokféleségének a felmérése igen fontos jelentőséggel bír. Korábban a paraziták ilyen irányú dokumentálása kimerült az egyszerű fajleírásokban, vagy csupán a faunisztikai vizsgálatokban. Az utóbbi években ezzel ellenkezőleg, a figyelem egyre inkább a (i) kvantitatív alkalmazásokra (Crofton 1971; Shaw és Dobson 1995; Wilson és Grenfell 1997) és a (ii) közösségi mintázatokat kialakító folyamatokra terelődött (Poulin 1995; Huspeni et al. 2004; Brooks et al. 2006; Hudson et al. 2006; Lafferty 2008). A hagyományos koncepciója a helminth (Annelida, Platyhelminthes, Nematoda és Acanthocephala törzsekbe tartozó féreg-szerű makroparaziták gyűjtőneve) felméréseknek azon alapul, hogy a vizsgálat kivitelezői igyekeznek minél több gazda egyedet gyűjteni, ezáltal minél több parazita fajt meghatározni, így szereztve taxonómiai, ökológiai és populációs adatokat a széleskörű és destruktív mintavételezésből. Ez különösképpen igaz akkor, ha korábban nem mintáztak gazda fajokat és/vagy élőhelyeket vizsgálnak. Az **I. cikk** egy ún. DAMA (mozaikszó, melynek elemei a dokumentáció, értékelés, monitoring és cselekvés szavakból tevődnek össze) parazitagyűjtési protokoll alkalmazását javasolja. Ezen protokoll hasonlít abban a hagyományos megközelítéshez, hogy az invazív mintavételezés itt sem elkerülhető, ellenben csak a kezdeti, dokumentációs fázisra korlátozódik. Az **I. cikk** szerint nem szükséges nagy egyedszámban a gazdák destruktív mintavételezése ahhoz, hogy fontos információt kapjunk a parazitáik sokféleségéről. A parazita közösségek hosszútávon történő nyomon követése fontos információt szolgáltat a közösségek időbeli stabilitásáról is (Burse et al. 2010). A kapott eredmények összehasonlítása a korábban ugyanazon a területen végzett alapkutatással (azaz a korábbi felmérésekből származó információval a parazitákról, gazdákról és a földrajzi elterjedésről) jelentős kérdéseket vet fel. Mint például, hogy a tapasztalt mintázatok, hogyan viszonyulnak a korábban leírtakhoz? Ezen kérdés fontosságának megértéséhez az szükségeltetik, hogy elfogadjuk azt, hogy nem csak a potenciálisan új élőhelyek és gazda populációk mintavételezése

fontos, hanem a korábban felmért területeké és/vagy populációké is egyaránt (**I. és II. cikk**). Az utóbbinak nagyobb jelentősége is lehet az előbbinél.

Az egyre inkább költséghatékonyra váló molekuláris módszerek (pl. DNS vonalkódok) robbanásszerű elterjedése és töretlen fejlődése új lehetőségeket nyitott meg a parazita taxonok nem-invazív mintavételezésen alapuló felmérésében (Darling és Blum 2007; Ferri et al. 2009; Moszczyńska et al. 2009; Darling és Mahon 2011; Locke et al. 2010; Pérez-Ponce de León és Chudbury 2005; Locke et al. 2011; Alcántar-Escalera et al. 2013; Prosser et al. 2013; Van Steenkiste et al. 2015). Ehhez viszont tudnunk kell, hogy milyen parazita fajok fordulnak elő a vizsgálni kívánt gazdáknak és élőhelyeken egyaránt. A DNS vonalkód eljárás egy széles körben használt módszer arra, hogy az élőlények faji identitását meghatározzuk (Hebert et al. 2003). Ezen módszer a helminthek esetében is alkalmazható. A módszer sikeres használatához segítséget nyújt az, hogy az endoparazita helminthek petéi a gazdaszervezetből annak a székletével ürülnek a külvilágba. Ez a fajta transzmisszió nem csupán a bélrendszerben élősködő helminthekre igaz, hanem a tüdőt, májat vagy akár a húgyhólyagot parazitáló fajokra is. A gazda széklete könnyen és nem-invazív módon gyűjthető, továbbá fontos információt hordoz az abban rejtőző parazitákról. Ily módon összehasonlíthatjuk a székletmintákból izolált parazita DNS-t a már korábban elkészített DNS vonalkódokkal, ahogy azt az **1. cikk** is javasolja.

A farkatlan kétéltűek (Anura) gazdag parazita faunával rendelkeznek, de nem ez volt az egyetlen indok, amiért a felmérésünkhöz modell gazdaszervezetnek választottuk őket. A *Pelophylax* génuszba (Frost et al. 2006; korábban *Rana* génusz) tartozó és Nyugat-palearktisi elterjedéssel bíró zöldbékák közé jelenleg 12 morfológiailag hasonló fajt sorolunk, amelyek egy részénél megfigyelhető hibridogenetikus fajkomplexek jelenléte (Graf és Polls-Pelaz 1989; Günther 1990; Plötner 2005). A hibridogenezis (Schultz 1969) egy olyan egyedi szaporodási mód, amely sok szempontból hasonlít a partenogenezishez (szűznemzés). A szűznemző állatoknál a nőstények klonális módon, diploid gamétát hoznak létre, amely az új leány utódgenerációnak ad életet. Ezzel szemben a hibridogenetikus állatok (azaz hibridek) klonális módon adják tovább az egyik szülői (anyai) kromoszómakészletet az utódoknak, míg a másik kromoszómakészlet (apai) pedig kizáródik az ivarsejtek képződése (gametogenezis) során és csak a megfelelő szülői fajjal visszakereszteződve képes helyreállni (Tunner és

Heppich 1981). A zöldbékák között az egyik ilyen hibridogenetikus fajkomplex a *Pelophylax esculentus* komplex, amelynek tagjai a tavi béka *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771) genotípus RR, a kis tavi béka *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) genotípus LL, illetve a két szülői faj hibridizációjából létrejövő kecskebéka *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758) genotípus LR. A kecskebéka „kleptoparazita”-ként viselkedik, amely a hibrid genotípust azzal a szülői fajjal visszakereszteződve tudja visszaállítani, amelynek a genomja kizárására került a meiosis előtt. A *P. esculentus* komplexben a szaporodási rendszert az határozza meg, hogy melyik szülői genom adódik át az utódoknak klonálisan és melyik záródik ki. Közép-Európában a legelterjedtebb szaporodási rendszer (LE rendszer) szerint, a *P. lessonae* és *P. esculentus* szimpatrikus (átfedő elterjedésű) populációt alkot egymással. Ebben a szaporodási rendszerben a hibrid utódokban az L genom záródik ki az ivarsejtképződés során, és az R genom pedig klonális úton jut tovább az utódgenerációba, tehát a hibridek számára a *P. lessonae*-vel való szaporodás elengedhetetlen az LR genotípus visszaállításához. Ennek ellentéte az RE rendszer, ahol az R genom záródik ki és az L genom adódik tovább a gamétákba klonális módon, illetve a *P. ridibundus*-szal való szaporodás szükséges az LR genotípus visszaállításához. Ez utóbbi szaporodási rendszer kevésbé gyakori és főként Kelet-Németországban és Lengyelországban elterjedt (Uzzell és Berger 1975; Berger 1977; Uzzell et al. 1980). Mindemellett, a *P. esculentus* képes reprodukcióra a szülői fajoktól teljesen független, tisztán hibridekből álló (EE rendszer) populációkat létrehozni és fenntartani a szülői fajok jelenléte nélkül (Graf és Polls-Pelaz 1989; Christiansen és Reyer 2009; Jakob 2007).

A *P. esculentus* komplex tagjainak morfológia és hívóhang alapú faji szintű elkülönítése sokszor nem egyértelmű és határozási problémákhoz vezethet (Lode és Pagano 2000). Ez a jelenség kifejezetten szembetűnő a fiatal egyedek esetében. Tanulmányok az elmúlt évekből kimutatták, hogy a *lessonae* haplotípus nagyobb befolyással van a hibridek morfológiai megjelenésére, mint a *ridibundus* haplotípus, tehát a hibridek külső jegyeik alapján inkább a *P. lessonae*-hoz hasonlítanak, mint sem a *P. ridibundus*-hoz (Kierzkowski et al. 2011, 2013). A másik nehézség pedig, hogy nem lehetséges morfológia alapján megkülönböztetni a különböző genotípusú (ploiditású) (diploid-LR; triploid-LLR vagy LRR) hibrideket sem. Habár számos molekuláris módszer nyújt használható eredményt, de valójában ezek kombinált alkalmazása adhat bizonyosságot a

faji összetételről és a hibridek ploiditási szintjéről ezekben a kevert populációkban (rövid összefoglalás az alkalmazható molekuláris taxonómiai módszerekről az alábbi publikációkban találhatóak: Borkin et al. 2004; Hauswaldt et al. 2012).

Célkitűzés

- Célunk volt, hogy javaslatot tegyünk egy olyan általános parazita felmérési protokollra, amely alapul szolgálhat a különböző tudományterületek közötti együttműködés elősegítésének. Továbbá egy olyan átfogó platformot hozunk létre ezen diszciplínák számára, amely széleskörű információt nyújthat a parazita szervezetek evolúciójáról, epidemiológiájáról, továbbá a különböző gazdaszervezetek, földrajzi régiók, illetve ökoszisztémák közötti kapcsolatokról **(1. cikk)**
- Külső morfológián alapuló módszerekkel meghatározzuk a Hortobágyi Nemzeti Parkban (HNP) élő *Pelophylax esculentus* komplex helminth közösségének a faji összetételét és összevessük azt a korábbi alap kutatásban tapasztaltakkal **(2. cikk)**
- DNS mintát gyűjtünk ezekből a helminth fajokból annak érdekében, hogy egy DNS vonalkód alapú nem-invazív monitoring rendszert valósíthassuk meg a DAMA protokoll keretében **(2. cikk)**
- Molekuláris taxonómiai módszerek segítségével meghatározzuk a *P. esculentus* komplex populációk faji összetételét és a hibrid egyedek ploiditását a HNP-ban **(3. cikk)**
- Populációgenetikai megközelítésben vizsgáljuk, hogy a populáció összetétele, milyen hatással van annak genetikai diverzitására és a klonális öröklődés menetére a *P. esculentus* komplexben **(3. cikk)**

Módszerek

- (1) 2012-2013-ban N=101 zöldbeka (*Pelophylax* sp.) egyedet gyűjtöttünk a HNP három különböző vizes élőhelyéről (Nádudvari Kösély-csatorna, Hortobágy-halastó, Egyek-pusztakócsi mocsarak). A zöldbékák közötti hibridizáció miatt molekuláris taxonómiai módszerrel tettünk különbséget a két szülői faj (*P. ridibundus* és *P. lessonae*) és a hibrid (*P. esculentus*) között (Hauswaldt et al.

2012). Binomiális hibaeloszlású általános lineáris modellt (GLM) alkalmaztunk arra, hogy meghatározzuk az átfogó prevalencia béli különbségeket a gazda fajok, nemek és élőhelyek között. Továbbá Poisson hibaeloszlású GLM modellt használtunk arra, hogy a gazdánkénti átfogó átlagos fertőzési intenzitást kimutassuk a már feljebb is említett változók között. Az adatok statisztikai értékelése az R statisztikai környezetben történt. (2. cikk)

- (2) A 2012-2014-es évek között $N=164$ *Pelophylax* sp. egyedet gyűjtöttünk a HNP-ban a fentebb említett három különböző típusú vizes élőhelyről (2. cikk). Molekuláris markereket alkalmaztunk annak érdekében, hogy egyrésztől elkülönítsük a *P. esculentus* komplex képviselőit egymástól, továbbá, hogy meghatározzuk a hibrid egyedek genotípusát (diploid vagy triploid). A genotípus meghatározása fajspecifikus, polimorf mikroszatellita markerek alkalmazásával történt. Mivel az L és R genomok csak nagyon ritkán, vagy egyáltalán nem rekombinálódnak egymással a hibridekben, ezért a számításokat mindkét genomra külön-külön végeztük. A genetikai diverzitás megállapítására allél gazdagságot (AR) és gén diverzitást (H_e) kalkuláltunk a SPAGeDi 1.5 program segítségével, amely lehetővé teszi a haploid és diploid adatok egyidejű kezelését (Hardy és Vekemans 2002). A genomok klonalitását a multilókusz genotípusok (MLG) és a multilókusz diszequilibrium (r_d^-) módszer segítségével számítottuk ki. Az MLG az azonos allélkombinációk száma a mikroszatellita adatsorban. Az alacsony számú kombinációk és ezek magas frekvenciája klonális reprodukcióra utal. Az MLG értékeket a GenAlEx 6.4 program segítségével határoztuk meg (Peakall és Smouse 2006). Az r_d^- a nem-véletlenszerű allél asszociációk száma a mikroszatellita adatsorban, amelynek értéke 0-1 között változik. Az 0-hoz közeli értékek magas rekombinációs rátát sejtetnek és ez által a vizsgált genom alacsony klonalitási szintjét mutatják. Ezzel szemben az 1-hez közeli értékek, pedig a klonális öröklődéssel vannak kapcsolatban, ahol a genom egyetlen blokként, rekombináció nélkül adódik tovább az utódgenerációba. Az r_d^- értékeket a Multilocus 1.3 programmal (Agapow és Burt 2001) számítottuk (3. cikk).

Az értekezés új tudományos eredményei:

1. A parazitológia és annak rokon tudományterületeit előremozdító törekvésként megfogalmaztunk egy olyan keretrendszert, amely a klímaváltozáshoz kapcsolódó előretörő fertőző betegségek jobb megértésében, megelőzésében és azok hatásának enyhítésében valós segítséget nyújthat számunkra.
2. Ezen keretrendszer részeként javasoltunk egy újfajta megközelítésű, általános parazitagyűjtési módszert, amit DAMA (dokumentáció, értékelés, monitoring és cselekvés) protokollnak hívunk. A DAMA protokoll lényegi újításai a parazita felmérések szisztematikus kivitelezésében és a gazdaszervezetek számára csak kezdetben invazív létében rejlenek.
3. A Hortobágyi Nemzeti Park (HNP) területén élő zöldbékák (*Pelophylax esculentus* komplex) helminth faunáját a DAMA protokoll alapján felmértük és értékelésnek vetettük alá, ezáltal megvalósítva a DAMA első két fázisát. Továbbá megteremtettük az alapot a monitoring fázisnak, ahol a DNS vonalkódok használata váltja ki a korábbi invazív mintagyűjtést a hosszú távú, szisztematikus és nem-invazív parazita monitoring érdekében.
4. A korábban a Hortobágyon végzett alapkutatással összevetve az eredményeinket megállapítottuk, hogy a *Pelophylax esculentus* komplex helminth közösségeinek a faji összetétele jelentősen megváltozott. Az újonnan megjelent helminth fajok közül a *Rhabdias esculentarum* (Nematoda, Rhabdiasidae) a magyar faunára új fajnak bizonyult, továbbá a *Pelophylax ridibundus* erre a parazitára egy új gazdaszervezetként került leírásra.
5. Az eltérő típusú vizes élőhelyekben élő zöldbékák fertőzöttségének az átfogó átlagos intenzitása nem volt megegyező. A *P. ridibundus* esetében a lassú folyású vizekben az átfogó átlagos fertőzési intenzitás nagyobbak bizonyult, mint az állóvizekben élő egyedekben.

6. A DAMA protokoll javaslatait követve a parazita felmérésből származó releváns információkat az *Encyclopedia of Life* (EOL) honlapján tettük elérhetővé, továbbá a flickr fényképmegosztó portálon a helminth fajokról készült mikroszkópos felvételeket feltöltöttük, amelyeket az EOL adatbázisban lévő parazita fajprofilokhoz társítottunk.
7. A molekuláris vizsgálatok bizonyították, hogy a *Pelophylax esculentus* komplex mindhárom tagja megtalálható a Hortobágyon, igaz eltérő arányban. A legritkább fajnak a *Pelophylax lessonae* bizonyult, míg a leggyakoribbnak pedig a *Pelophylax ridibundus*. A hibrid *P. esculentus* egyedeket vizsgálva a mikroszatellita analízis kimutatta, hogy diploid genotípusú (LR) hibrid békák alkotják a vizsgált populációkat, a triploid egyedek (LLR vagy LRR) jelenléte nem volt detektálható.
8. Elsőként alkalmaztuk a multilokus diszequilibrium módszert arra, hogy keresztezési kísérlet nélkül tudjunk következtetni a zöldbékák szaporodási rendszerére. Eredményeink alapján elmondható, hogy a hibridek az R (*ridibundus*) genomjukat klonális módon adják tovább és a *P. lessonae*-val visszakereszteződve tudnak új hibrid nemzedéket létrehozni, így a Közép-Európában leginkább elterjedt LE (*lessonae-esculentus*) szaporodási rendszerhez tartoznak.

Diszkusszió

Az általunk javasolt DAMA protokoll (**1. cikk**) eltér a hagyományos parazita gyűjtési módszerektől és a gazdák destruktív mintavételezését csak a kezdeti, dokumentációs fázisra korlátozza. Ennek megvalósításához viszont, először széleskörű taxonómiai felmérést kell végeznünk. Minden egyes parazita fajhoz tartozó természettörténeti információra szükségünk van, mint pl. a földrajzi eredet, transzmissziós dinamika, mikrohabitat preferencia és a gazdaspektrum. Ehhez létfontosságú, hogy hozzáférhessünk a megfelelően fenntartott természettudományos gyűjteményekhez (Frey et al. 1992; Haverkost et al. 2010). A korábbi felmérésekből származó gyűjtött anyag fontos történeti információt hordoz magában és egy előremutató alapot biztosít a mintázatok, földrajzi elterjedés és az evolúciós folyamatok jobb megértéséhez (Holmes

et al. 2016, Dunnum et al. 2017). A gyűjtemények infrastruktúrájára úgy kell tekintenünk, mint egy beépített egységre, amely a globális biológiai sokféleség forrását célzó bármilyen felmérés és dokumentáció részét képezheti (Brooks és Hoberg 2000, 2001; Scholz 2001). Összefoglalva tehát, kiemeljük a klasszikus parazitológia felmérések jelentőségét, de mindezt egy új szemszögű megközelítésben (**1. cikk**).

A DAMA protokoll alapján egy újfajta (**2. cikk**) parazita felmérést végeztem Kelet-Magyarországon, a Hortobágyi Nemzeti Parkban (HNP). Ahogy azt az **1. publikáció** is javasolja, az értékelési fázis a DAMA-n belül egy két részes folyamat. Az első részben összehasonlítjuk az adatainkat az alapkutatással (minden rendelkezésre álló információval a korábbi vizsgálatokból a parazitákról, gazdákról és a földrajzi elterjedésről), hogy feltehessük a kérdést: Hogyan viszonyulnak a jelenlegi mintázatok a korábbiakhoz? A HNP területén a zöldbékák helminth faunájára vonatkozó alapkutatót 40 évvel ezelőtt végeztek, viszont néhány létfontosságú hibát elkövetve (Edelényi 1972; Murai et al. 1983). Egyrészt, ezekben a felmérésekben nem helyeztek el bizonyító példányokat múzeumi gyűjteményekben, így nehezítve meg a jelenlegi vizsgálat eredményeivel való összehasonlítást. Másodsorban pedig, a szerzők nem közöltek prevalencia vagy átlagos fertőzési intenzitási adatot a helminthekekre vonatkozóan. Továbbá, a gazdaegyedek a régi nevezéktan szerint *Rana ridibunda*-ként (*Pelophylax ridibundus*) vagy *Rana esculenta*-ként (*Pelophylax esculentus*) voltak azonosítva. Vizsgálatunk alapján a HNP-ban élő zöldbékák helminth közössége lényegesen megváltozott az elmúlt évtizedekben. Felmérésünk során, 6 korábban a területről leírt helminth faj hiányát tapasztaltuk, míg emellett 2 HNP-ra új faj megjelenését detektáltuk (**2. cikk**). Azon helminth fajok, amelyek a korábbi felmérések során leírásra kerültek, míg a mi vizsgálatunkból hiányoztak, látszólag kevés közös tulajdonsággal bírnak, ha az alapvető ökológiájukat vizsgáljuk. Ezen paraziták a végső gazdáikban, a vastagbélben, vékonybélben, húgyhólyagban vagy a tüdőben élősködnek. Első köztes gazdaként parazitálnak csigákat és kagylókat, míg a második köztes gazdák spektruma a növények felszínétől, egészen a rákok külső vázán át, a szitakötő lárváig és ebihalakig terjed. Egy dolog viszont közös bennük és az a zöldbéka gazda. Sajnálatos módon nincs olyan kutatás, ami a *Pelophylax lessonae* térbeli elterjedésével foglalkozott volna a HNP-ban, így csak jelenlét-hiány adatok állnak a rendelkezésünkre Kelet-Magyarországról (Mészáros 1973; Mészáros és Bartos 1978; Gubányi és Korsós 1992; Mester et al. 2015;

Mester Béla, személyes közlés). A **3. cikk** megerősíti a *P. lessonae* alacsony abundanciájú jelenlétét a HNP-ban.

A **3. cikk** egyik célja az volt, hogy megállapítsa a zöldbékák fajösszetételét a HNP-ban, 3 különböző típusú, egymással kapcsolatban nem lévő vizes élőhely felmérésével. A 164 vizsgált zöldbékából 100 *P. ridibundus*, 1 *P. lessonae* és 63 *P. esculentus* egyedet találtunk. Mindösszesen egy juvenilis *P. lessonae*-t gyűjtöttünk a három éves terepi mintavételezés során. Erre két alternatív magyarázat lehetséges. Az első szerint a *P. lessonae* korábban gyakoribb elterjedésű lehetett a HNP-ban (egyedül az Egyek-pusztakócsi mocsarakban gyűjtöttük, egy olyan élőhelyen, amely tökéletesen megfelel a faj élőhely preferenciáinak) viszont az alacsony mintaszám (N=21) befolyásolhatta az eredményeket. A második szerint, a *P. lessonae* komoly populáció csökkenést szenvedett el és most már ritka faj a HNP-ban. Mészáros és Bartos (1978) bizonyította a faj jelenlétét a HNP-ban, de a gyűjtött egyedszámokat nem közölték, így nehézkesé válik bármilyen nemű konklúziót levonni a *P. lessonae* múltbéli abundanciájáról. Másrészt Mester et al. (2015) magasabb egyedszámban detektálta a *P. lessonae*-t az Egyek-pusztakócsi mocsarakban. Vizsgálatukban a faji határozás hang és morfológia alapján történt. Ezen eredmények inkább azt a hipotézisünket támogathatják, hogy az alacsony mintaszám miatt tapasztaltuk a kapott mintázatokat.

A hibrid egyedek genetikai összetételét vizsgálva a mikroszatellita elemzés eredményei alapján diploid (LR) genotípusú egyedek alkotják a hortobágyi populációt. Tunner and Heppich-Tunner (1992) voltak az egyetlenek, akik triploid genotípusú zöldbékák jelenlétét mutattak ki Észak-Nyugat Magyarországon. Egy olyan populációt írtak le, amely egyaránt állt hím és nőstény *P. ridibundus*-ból, hím és nőstény, diploid *P. esculentus*-ból és kizárólag hím, triploid (LLR) *P. esculentus*-ból. Ezt a közleményt leszámítva, a többi szerző diploid (LR) genotípusú hibrid populációt detektált hazánkban (Mészáros és Bartos 1978; Berger et al. 1988; Gubányi és Korsós 1992; **3. cikk**).

A legalkalmasabb módja annak, hogy megállapítsuk a hibrid egyedek milyen gamétákat hoznak létre, ha keresztezési vizsgálatokat végzünk (Christiansen 2009). Vizsgálatunk során a zöldbékák szaporodási rendszerét populáció genetikai megközelítéssel állapítottuk meg. A **3. cikk** volt az első tanulmány, amely a zöldbékák szaporodási

rendszerének a meghatározására a multilokus diszequilibrium (r_d^-) módszert kísérelte meg használni. A három különböző élőhely alapján nem kaptunk teljesen egységes eredményeket. Két populáció esetében, ahogy azt vártuk, az L (*lessonae*) genom volt kevésbé klonális és magasabb genetikai diverzitással rendelkezett, mint az R (*ridibundus*) genom. Ebből arra következtettünk, hogy azok a populációk a Közép-Európában leginkább tipikus LE szaporodási rendszerhez tartoznak, ahol a hibridek R gamétákat hoznak létre és csak a *P. lessonae*-val visszakereszteződve tudnak szaporodni. A harmadik vizsgált populáció az RE rendszer jelenlétét sugallta az eredmények alapján, hiszen az L genom rendelkezett az alacsonyabb genetikai diverzitással, alacsonyabb számú multilokus genotípussal (MLG) és magas r_d^- értékekkel. Ennek ellenére úgy gondoljuk, hogy egy alacsonyabb egyedszámú *P. lessonae* szülői generáció képes olyan genetikai szignált produkálni a hibridekben, amely nem megkülönböztethető a klonális öröklődéstől (azaz, alacsony MLG és magas r_d^- érték). Ez magyarázhatja, miért tartozik a harmadik populáció is az LE szaporodási rendszerhez.

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom a témavezetőimnek, Barta Zoltánnak és Vörös Juditnak, akik mindig támogattak és inspiráltak engem az évek során, amit a disszertációs munkámmal töltöttem. Szintén hálával tartozom Daniel R. Brooks-nak, aki bevezetett engem a parazitológia területére és rengeteg segítséget nyújtott számomra a kutatásom során. Mellettük, Eric P. Hoberg, Walter A. Boeger, Scott L. Gardner, Kurt E. Galbreath, Hugo H. Mejía-Madrid, S. Elizabeth Rác, Altangerel Tsogtsaikhan Dursahinhan, Zsolt Végvári, Yuriy Kuzmin, Ditte G. Christiansen, Michal Benovics és Peter Mikulíček kiváló kollaborátorok voltak. Köszönettel tartozom Krízsis Virágnak, Márton Orsolyának és Tuschek Máriának, akik a laboratóriumi munka során voltak segítségemre. Továbbá kiemelt köszönet illeti Fülöp Attilát és az MTA-DE “Lendület” Viselkedésközpontot minden tagját bármilyen hozzájárulásukhoz a dolgozat létrejöttében. Köszönet Kókay Szabolcsnak, aki illusztrációival színesítette a dolgozatomat. Különösképp köszönöm a családomnak, hogy mindig mellettem álltak és bátorítottak engem a nehéz időszakokban. Az anyagi támogatást az Európai Unió és az Európai Szociális Alap biztosította a Társadalmi Megújulás Operatív Program keretében (TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 és SROP-4.2.2.B-15/1/KONV-2015-0001).

További anyagi segítséget nyújtott az Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok (OTKA K77841) és a Campus Hungary szakmai gyakorlat pályázat (B2/1SZ/9876) továbbá a Campus Hungary rövid tanulmányutak (B2/1R/14652 és B2/1R/17869). A kutatási engedélyt a Tiszántúli Környezetvédelmi, Természetvédelmi és Vízügyi Felügyelőség állította ki (4633/OH/2012).

Introduction

During the past few decades, parasites have become recognized as significant components of biodiversity (Poulin and Morand 2004; Dobson et al. 2008; Kuris et al. 2008) and as excellent model systems for general evolutionary (Brooks and McLennan 1993) and ecological studies (Poulin 1997; Poulin and Morand 2004; Pedersen and Fenton 2007). Inventories of all species are the essential baseline for evaluating, managing and preserving global species diversity. Historically, studies of parasitic helminth (worm-like members of the phylum Annelida, Platyhelminthes, Nematoda and Acanthocephala) communities in any host mainly consisted of faunistical studies or species descriptions. Nowadays, however, the attention appears to shift away from descriptive studies toward (i) more quantitative approaches (Crofton 1971; Shaw and Dobson 1995; Wilson and Grenfell 1997) and (ii) the investigation of processes responsible for creating community patterns (Poulin 1995; Huspeni et al. 2004; Brooks et al. 2006; Hudson et al. 2006; Lafferty 2008).

Traditional parasitological inventories of helminths aimed to collect as many parasites from as many hosts as possible – especially hosts that have not been examined for parasites previously – gathering both taxonomic, ecological and population data from that extensive destructive sampling. **Paper I** summarized a comprehensive parasite inventory protocol under the acronym DAMA (Documentation, Assessment, Monitoring, Action). We emphasized that the initial phase of documentation involves destructive sampling but that should be minimized according to **Paper I**, however, it is not necessary to kill large numbers of hosts to obtain important information about parasite biodiversity. Information derived from long-term inventories allows the determination of the persistence and stability of parasite diversity (for example, see Bursey et al. 2010). Comparison of data with baselines (i.e., what is already known about the parasites, hosts, and geographic location of an inventory) offers an efficient way to address the question of how current findings relate to previous ones? It requires the understanding and acceptance of that new inventories of habitats and hosts assessed previously are just as important, and possibly even more so, than inventories of new hosts and new places never sampled before (**Paper I and II**).

The rapid evolution of cheap and efficient molecular methods and molecular data (e.g., DNA barcodes) have opened the door to the possibility of conducting parasite inventories based on non-destructive sampling, once we know what parasite species can occur in the target host(s) and in the target area(s) (Darling and Blum 2007; Ferri et al. 2009; Moszczyńska et al. 2009; Darling and Mahon 2011; Locke et al. 2010; Pérez-Ponce de León and Chudbury 2005; Locke et al. 2011; Alcántar-Escalera et al. 2013; Prosser et al. 2013; Van Steenkiste et al. 2015). DNA barcoding is a broadly used tool for specimen identification to species level in a diverse range of animal taxa including helminths (Hebert et al. 2003). We could take advantage of that helminths release their eggs to the environment along with the host faeces or urine. This type of transmission is not only true for those helminth species that parasitize the gastrointestinal tract but species that occur in the lungs, liver or the gallbladder, as well. The faeces of the host are easily and non-invasively collectable, which contains relevant information about the presence of the parasites. Therefore, the extraction of parasitic DNA from host faeces is then match with existing barcodes or material from voucher specimens as it was suggested in **Paper I**.

Anurans harbour a great diversity of helminth parasites but it is not the only reason we choose them for the model host taxa for our inventory. The western Palearctic water frogs (WPWF) in the genus *Pelophylax* (since Frost et al. 2006; formerly genus *Rana*) include twelve species with partially overlapping morphological features. Some of these species are able to form hybridogenetic species complexes (for reviews see Graf and Polls-Pelaz 1989; Günther 1990; Plötner 2005). Hybridogenesis (Schultz 1969) is a unique way of reproduction resembles parthenogenesis in many aspects. While in parthenogenetic animals, females clonally produce diploid eggs, which give rise to a new generation of daughters, hybridogenetic individuals (i.e. hybrids) transmit clonally only one chromosome set (maternal genome); the other set of chromosomes (paternal genome) is eliminated during gametogenesis and is restored in each generation by mating (Tunner and Heppich 1981). Among WPWF one of the hybridogenetic complexes is the *Pelophylax esculentus* complex formed by the two parental species, *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771), genotype RR; *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882), genotype LL; whose primary hybridization leads to hybridogenetic lineages of *P. esculentus* (Linnaeus, 1758), genotype LR, which acts as a sexual parasite that restores

hybridity by mating with the respective parental species whose genome was excluded. In the *P. esculentus* complex, the type of breeding system determines which chromosome set gets transmitted clonally, and which is excluded from the germ line prior to meiosis. To restore the LR genotype hybrids must backcross with one of the parental species. The most frequent type of breeding system in central Europe is the LE system. Here the *P. lessonae* forms sympatric populations with *P. esculentus*. In the LE system the L genome is excluded in hybrids during gametogenesis and the R genome is transmitted clonally, hence mating with *P. lessonae* is required to restore the hybrid genotype. In the RE system, hybrids eliminate the R genome, transmit L gametes clonally and backcross with *P. ridibundus*. This type of mating system is less common and has been found only in eastern Germany and Poland (Uzzell and Berger 1975; Berger 1977; Uzzell et al. 1980). *Pelophylax esculentus* is also able to maintain pure hybrid populations (EE system) which are reproductively isolated from the parental species (Graf and Polls-Pelaz 1989; Christiansen and Reyer 2009; Jakob 2007).

Identification of water frogs is sometimes challenging and taxon determination based solely on morphology or call of individuals may lead to species misidentification (Lode and Pagano 2000). This is especially apparent in the case of juveniles. Recent papers have shown that *lessonae* haplotype has a greater influence on morphology than *ridibundus* haplotype, all the hybrids being morphologically more similar to *P. lessonae* than to *P. ridibundus* (Kierzkowski et al. 2011, 2013). Furthermore, it is impossible to distinguish between hybrids of different ploidy levels (LR, LLR, LRR) by morphological means. Nevertheless, various molecular methods may give reliable results (for a brief overview of molecular methods used see Borkin et al 2004; Hauswaldt et al. 2012) and it is expected that their combined use can provide strong evidence about the taxonomical composition and level of ploidy in the hybrid populations.

Aims of the dissertation

- Propose a general parasite inventory protocol which can serve as a blueprint for many different collaborative efforts and provide a broad platform for essential information about the evolution, ecology, and

epidemiology of parasites across host groups, parasite groups, geographical regions, and ecosystem types

- Determine the helminth community of the *Pelophylax esculentus* complex in Hortobágy National Park (HNP) using morphological identification of parasites species and compare faunistical findings with baseline studies
- Collect DNA samples from helminths to develop DNA barcodes of each parasite species for future non-destructive survey within the monitoring phase of DAMA
- Determine the taxonomic composition of the *P. esculentus* complex in HNP using molecular markers and specify the ploidy level of hybrid individuals
- Examine the effect of population structure on genetic diversity and the degree of clonal inheritance in *P. esculentus* complex using population genetic indices

Methods

(1) In the years 2012-2013 water frogs (N=101) were collected from habitats associated with flowing water (Nádudvar, Kösély-canal), fishpond system (Hortobágy-fishponds) and marshland sites (Egyek-Pusztakócs marsh system) in HNP. Due to the high rate of hybridization among host species, molecular taxonomic techniques following the methods of Hauswaldt et al. (2012) were used to distinguish between *P. ridibundus*, *P. lessonae*, and the hybrid *P. esculentus*. Generalized linear models (GLM) with a binomial error distribution term were used to determine the overall prevalence differences between sexes, host species, and collection sites. GLM with a Poisson error distribution term were applied to determine the overall mean intensity of parasite species per hosts and for comparison of the previously mentioned variables (**Paper II**).

(2) Water frogs (N=164) were collected during the years 2012–2014 from three different types of wetland habitats mentioned above. Molecular markers were used to distinguish, first, among the taxa *P. ridibundus*, *P. lessonae* and

P. esculentus, and second, between the diploid and triploid individuals of hybrids. Ploidy determination and genotype composition of hybrids was based on analysis of species-specific polymorphism in selected microsatellite loci. Because R and L genomes rarely or never recombine, all population genetic parameters were calculated for each genome separately. To estimate genetic diversity within the *P. esculentus* populations, we used allelic richness (AR) and gene diversity (H_e). AR and H_e were calculated in the program SPAGeDi 1.5, allowing simultaneous analysis of haploid and diploid data (Hardy and Vekemans 2002). The level of genome clonality was determined, based on the number of multilocus genotypes (MLG) and multilocus disequilibrium (r_d^-). The number of MLGs was calculated using the program GenAlEx 6.4 (Peakall and Smouse 2006). MLG is the number of identical combinations of alleles found in microsatellite datasets; few combinations and high frequencies of these combinations may indicate clonal reproduction. Multilocus disequilibrium is a score of non-random association of alleles at microsatellite loci and varies on a scale from zero to one. Low r_d^- values are related to high recombination rate and thus would indicate low levels of clonality. Contrarily, high r_d^- values might be associated with clonal inheritance, as clonal genomes are inherited *en bloc*, without recombination. Multilocus disequilibrium was calculated in the program Multilocus 1.3 (Agapow and Burt 2001) (**Paper III**).

New scientific results of the dissertation:

1. We proposed a framework in order to move forward the field of parasitology and other related areas. This suggests an integrated proposal to build a proactive capacity to understand, anticipate, and mitigate the outcomes of emerging infectious diseases connected to climate change.
2. As a part of this framework we recommended a new type of comprehensive parasite inventory what we call DAMA (documentation, assessment, monitoring and action) protocol. The use of systematic inventories and minimized destructive sampling of hosts are the essential novelty of DAMA compared to traditional parasite inventories.

3. We followed the DAMA protocol and documented and assessed the helminth community of water frogs (*Pelophylax esculentus* complex) in Hortobágy National Park (HNP). In the next phase of DAMA, DNA barcodes will replace destructive sampling in order to monitor parasite species in systematic, long-term and non-invasive manner.
4. We compared our findings with baseline studies from HNP and we find that the helminth community of water frogs experienced a significant faunal alteration. From the new helminth species appeared at HNP, *Rhabdias esculentarum* (Nematoda, Rhabdiasidae) was a new species for the Hungarian fauna and *Pelophylax ridibundus* was a new host record as well.
5. The distinct type of wetland habitats indicated different parasite overall mean intensity. The *Pelophylax ridibundus* individuals inhabiting flowing water (i.e. canals) had a significantly greater overall mean intensity of helminth species per host than did the same species in still water (i.e. fishponds and marshland sites).
6. As it was suggested in the DAMA protocol we developed species home pages for each parasite species in *Encyclopedia of Life* (EOL) database which contains all of the relevant inventory information, i.e. images of parasites (uploaded to flickr), reported hosts, spatial distribution and references.
7. Allele size polymorphism in serum albumin intron-1 gene fragment and microsatellite data detected all members of the *P. esculentus* complex in the localities studied. The lowest abundance was experienced in *Pelophylax lessonae* individuals. On the other hand, *Pelophylax ridibundus* was the most abundant species. The microsatellite data showed that no triploid (LLR or LRR) frogs were present in the sample. All hybrid individuals were indicated to have diploid (LR) genotype.
8. The application of multilocus disequilibrium to infer breeding system of water frogs in the lack of crossing experiments is to our knowledge novel. Our data demonstrated that hybrids form gametes with clonally transmitted R

(*ridibundus*) genome and can produce a new hybrid generation by mating with *P. lessonae* and belong to the LE system (*lessonae-esculentus*) typical in central Europe.

Discussion

The proposed DAMA protocol (**Paper I**) differ from parasite inventories suggesting that destructive sampling of hosts ends with the initial documentation phase. This will require comprehensive taxonomic inventories. We need to gather species-associated information, and discover as much as possible about the natural history of each parasite species, especially with respect to its geographic origin, transmission dynamics, microhabitat preferences, and host range. For that, essential to get access to voucher specimens of parasites and hosts in properly curated archival collections (Frey et al. 1992; Haverkost et al. 2010). The role of archival collections held in museum repositories are essential and collections developed from earlier inventories provide important historical data, and predictive baselines for understanding the patterns, distribution and evolutionary processes of organisms in the biosphere (Holmes et al. 2016, Dunnum et al. 2017). The infrastructure for collections must be regarded as an integral component of any developing programs for survey, inventory, and documentation of global biodiversity resources (Brooks and Hoberg 2000, 2001; Scholz 2001). The importance of classical parasitological inventories was highlighted but in a new perspective (**Paper I**).

I followed the DAMA protocol and carried out a new type of parasite inventory (**Paper II**) in eastern Hungary at Hortobágy National Park (HNP). As suggested by **Paper I**, assessment in the DAMA protocol is a two-part process. The first of these is comparison of data with baselines (i.e., what is already known about the parasites, hosts, and geographic location of an inventory) to address the question of how current findings relate to previous ones. At HNP a baseline inventory was conducted 40 years ago with a few but essential deficiencies (Edelényi 1972; Murai et al. 1983). First, in these studies no voucher specimens (hosts or parasites) were fixed, thus making comparisons with recent studies difficult. Second, the authors did not provide any prevalence or mean intensity data of helminth infection in anuran hosts and all water frogs were identified as either *Rana ridibunda* (= *Pelophylax ridibundus*) or *Rana*

esculenta (= *Pelophylax esculentus*). In our case at HNP the helminth community of water frogs significantly changed during the last four decades. We detected the loss of six species and the emergence of two new species to the area (**Paper II**). The species previously reported in the baseline inventory but absent from our, seem to have little in common with respect to their basic ecology: as a group they live in the rectum, small intestine, urinary bladder, and lungs. Their first intermediate hosts include both gastropods and bivalves, and their second intermediate hosts range from the surface of plants and the exoskeleton of crustaceans to odonate larvae and tadpoles. One thing the missing species may have in common is their water frog host. Unfortunately no research paper focused on the spatial distribution of *P. lessonae* at HNP, and we can only refer to the presence or the absence of the species in eastern Hungary (Mészáros 1973; Mészáros and Bartos 1978; Gubányi and Korsós 1992; Mester et al. 2015; Béla Mester pers. comm.). Our results in **Paper III** confirmed the presence of *P. lessonae* in HNP, but in low abundance.

Paper III aimed to determine the taxon composition of water frogs in HNP through the examination of three distinct populations related to different habitat characteristics. The 164 frogs examined comprised 100 *P. ridibundus*, 1 *P. lessonae* and 63 *P. esculentus* individuals. We found only a single juvenile *P. lessonae* during the three years of collecting. Two alternative explanations were proposed for the low detection probability of *P. lessonae* individuals. First, *P. lessonae* may be more abundant in HNP (we found only in Egyek-Pusztakócs marsh system, a habitat that fulfils *P. lessonae* habitat preferences) and our results affected by small sample size in Egyek-Pusztakócs marsh system (N=21). Second, the species suffered a severe population decline and now is become rare in HNP. Mészáros and Bartos (1978) confirmed the presence of *P. lessonae* in HNP, but they did not provide sample size data of collected specimens, so it is hard to make any conclusions about their past abundance. On the other hand, Mester et al. (2015) reported higher frequencies of *P. lessonae* at Egyek-Pusztakócs marsh system based on morphological and call monitoring data. This may support our first explanation about the effect of our low sample size.

The genomic composition of the examined hybrid specimens analysed using microsatellites showed the occurrence of diploid (LR) genotypes only. Tunner and Heppich-Tunner (1992) reported triploids in a Hungarian water frog population in

north-western Hungary and they described a population system comprising *P. ridibundus* of both sexes, diploid *P. esculentus* of both sexes, and exclusively male triploid (LLR) *P. esculentus*. This was the only report of a triploid population in Hungary; all others (Mészáros and Bartos 1978; Berger et al. 1988; Gubányi and Korsós 1992; **Paper III**) encountered only diploid hybrids.

The most appropriate way to find a type of gametes produced by hybrids and to determine breeding system of water frogs is to implement crossing experiments (Christiansen 2009). We assessed the breeding system with the application of population genetic approach. **Paper III** was the first study attempting to use multilocus disequilibrium (r_d^-) to infer breeding systems of water frogs. The three localities analysed produce different results. In two populations, as expected the L genome was indeed less clonal, and had the higher level of genetic diversity than the R genome. This suggests that those populations belong to the LE system typical in central Europe, in which hybrids produce R gametes and can only produce hybrids by mating with *P. lessonae*. The third population may suggest the presence of an RE system (L genome had a lower number of MLG's, high score of r_d^- and a lower level of genetic diversity than the R genome) but we suspect that a lower number of *P. lessonae* parents might produce a genetic signal in the hybrid offspring that is indistinguishable from clonal reproduction (i.e. a low number of multilocus genotypes and high value of r_d^-). This could explain why the third population could also belong to the LE system.

Acknowledgements

I am the most grateful to my supervisors Zoltán Barta and Judit Vörös who always supported and inspired me during the years I spent on my dissertation work. I am also highly indebted to Daniel R. Brooks who introduced me into the field of parasitology and contributed much to the quality of the studies. Beyond them, Eric P. Hoberg, Walter A. Boeger, Scott L. Gardner, Kurt E. Galbreath, Hugo H. Mejía-Madrid, S. Elizabeth Rácz, Altangerel Tsogtsaikhan Dursahinhan, Zsolt Végvári, Yuriy Kuzmin, Ditte G. Christiansen, Michal Benovics and Peter Mikulíček were excellent collaborators. I am also appreciating the help of Virág Krízsik, Orsolya Márton and Mária Tuschek for their technical assistance during laboratory work. Furthermore, I am thankful especially to Attila Fülöp and rest of the members of MTA-DE “Lendület” Behavioural Ecology

Research Group at the University of Debrecen for any contribution to my dissertation. Szabolcs Kókay permitted to usage of his artworks. My special thanks go to my family who always supported and encouraged me in the tough periods. These works have been supported by the European Union and co-financed by the European Social Fund through the Social Renewal Operational Programme under the projects TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 and SROP-4.2.2.B-15/1/KONV-2015-0001. Additional financial support provided by the Hungarian Research Fund (OTKA K77841) the Campus Hungary Long Term (B2/1SZ/9876) and Short Term Study Program (B2/1R/14652 and B2/1R/17869). Research permit were granted by the Tisza Region Inspectorate of Environment, Nature Conservation and Water Management (4633/OH/2012).

Irodalomjegyzék/References

- Agapow PM, Burt A (2001) Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes* 1:101–102.
- Alcántar-Escalera FJ, García-Valera M, Vázquez-Domínguez E, Pérez-Poncé de León G (2013) Using DNA barcoding to link cystacanths and adults of the acanthocephalan *Polymorphus brevis* in central Mexico. *Molecular Ecology Resources* 13:1116–1124.
- Berger L (1977) Systematics and hybridization in the *Rana esculenta* complex. In: Taylor DH, Guttman SI (eds) *The Reproductive Biology of Amphibians*. Springer US, New York pp 367–388.
- Berger L, Uzzell T, Hotz H (1988) Sex determination and sex ratios in western Palearctic water frogs: XX and XY hybrids in the Pannonian Basin? *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 140:220–239.
- Borkin LJ, Korshunov AV, Lada GA, Litvinchuk SN, Rosanov JM, Shabanov DA, Zinenko AI (2004) Mass Occurrence of Polyploid Green Frogs (*Rana esculenta* complex) in Eastern Ukraine. *Russian Journal of Herpetology* 11:194–213.
- Brooks DR, Hoberg EP (2000) Triage for the biosphere: The need and rationale for taxonomic inventories and phylogenetic studies of parasites. *Comparative Parasitology* 68:1–25.
- Brooks DR, Hoberg EP (2001) Parasite systematics in the 21st century: opportunities and obstacles. *Trends in Parasitology* 17:273–275.

- Brooks DR, León-Régagnon V, McLennan DA, Zelmer D (2006) Ecological fitting as a determinant of the community structure of platyhelminth parasites of anurans. *Ecology* 87:S76–S85.
- Brooks DR, McLennan DA (1993) *Parascript: Parasites and the language of evolution*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC. 429 p
- Burse CR, Goldberg SR, Bettaso JB (2010) Persistence and stability of the component helminth community of the foothill yellow-legged frog, *Rana boylei* (Ranidae), from Humboldt County, California, 1964–1965, versus 2004–2007. *American Midland Naturalist* 163:476–482.
- Christiansen DG (2009) Gamete types, sex determination and stable equilibria of all-hybrid populations of diploid and triploid edible frogs (*Pelophylax esculentus*). *BMC Evolutionary Biology* 9:135.
- Christiansen DG, Reyer H-U (2009) From clonal to sexual hybrids: genetic recombination via triploids in all-hybrid populations of water frogs. *Evolution* 63:1754–1768.
- Crofton HD (1971) A quantitative approach to parasitism. *Parasitology* 62:179–193.
- Darling JA, Blum MJ (2007) DNA-based methods for monitoring invasive species: A review and prospectus. *Biological Invasions* 9:751–765.
- Darling JA, Mahon AR (2011) From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research* 111:978–988.
- Dobson A, Lafferty KD, Kuris AM, Hechinger RF, Jetz W (2008) Homage to Linnaeus: How many parasites? How many hosts? *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:11482–11489.
- Dunnum JL, Yanagihara R, Johnson KM, Armien B, Batsaikhan N, Morgan L, Cook JA (2017) Biospecimen repositories and integrated databases as critical infrastructure for pathogen discovery and pathobiology research. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11: e0005133.
- Edelényi B (1972) Métélyélősködők a Hortobágy vadon élő gerinceseiből. *Debreceni Déry Múzeum Évkönyve* 1972:5–34.
- Ferri E, Barbuto M, Bai, O, Galimberti A, Uni S, Guerriero R, Ferté H, Bandi C, Martin C, Casiraghi M (2009) Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in Zoology* 6:1.

- Frey JK, Duszynski DW, Gannon WL, Yates TL, Gardner SL (1992) Designation and curatorial management of type host specimens (symbiotypes) for new parasite species. *Journal of Parasitology* 78:930–932.
- Frost DR, Grant T, Faivovich et al. (2006) The amphibian tree of life. *Bulletin of the American Museum of Natural History* 297:1–370.
- Graf JD, Polls-Pelaz M (1989) Evolutionary genetics of the *Rana esculenta* complex. In: Dawley RM, Bogart JP (eds), *Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates*. New York, pp 289–302.
- Gubányi A, Korsós Z (1992) Morphological analysis of two Hungarian water frog (*Rana lessonae-esculenta*) populations. *Amphibia-Reptilia* 13:235–243.
- Günther R (1990) *Die Wasserfrösche Europas*. A. Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt. 288 p
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2:618–620.
- Hauswaldt JS, Höer M, Ogielska M, Christiansen DG, Dziwulska-Szwajkowska D, Czernicka E, Vences M (2012) A simplified molecular method for distinguishing among species and ploidy levels in European water frogs (*Pelophylax*). *Molecular Ecology Resources* 12:797–805.
- Haverkost TR, Gardner SL, Peterson AT (2010) Predicting the distribution of a parasite using the ecological niche model, GARP. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81:895–902.
- Hebert PDN, Cywinski A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identification through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 270:313–321.
- Holmes MW, Hammond TT, Wogan GOU, Walsh RE, LaBarbera K, Wommack EA, Martins FM, Crawford JC, Mack KL, Bloch LM, Nachman MW (2016) Natural history collections as windows on evolutionary processes. *Molecular Ecology* 25:864–881.
- Hudson PJ, Cattadori IM, Boag B, Dobson AP (2006) Climate disruption and parasite-host dynamics: patterns and processes associated with warming and the frequency of extreme climatic events. *Journal of Helminthology* 80:175–182.
- Huspeni TC, Hechinger RF, Lafferty KD (2004) Trematode parasites as estuarine indicators: opportunities, applications, and comparisons with conventional community approaches. In: Bortone SA (ed) *Estuarine Indicators*. CRC Press, Boca Raton, FL pp 297–314.

- Jakob C (2007) Structure and dynamics of pure hybridogenetic water frog populations of *Rana esculenta* in Southern Sweden. PhD thesis, University of Zurich, www.dissertationen.uzh.ch
- Kierzkowski P, Kosiba P, Rybacki M, Socha M, Ogielska M (2013) Genome dosage effect and colouration features in hybridogenetic water frogs of the *Pelophylax esculentus* complex. *Amphibia-Reptilia* 34:493–504.
- Kierzkowski P, Pasko L, Rybacki M, Socha M, Ogielska M (2011) Genome dosage effect and hybrid morphology – the case of the hybridogenetic water frogs of the *Pelophylax esculentus* complex. *Annales Zoologici Fennici* 48:56–66.
- Kuris AM, Hechinger RF, Shaw JC, Whitney KL, Aguirre-Macedo L, Boch CA, Dobson AP, Dunham EJ, Fredensborg BL, Huspeni TC, Lorda J, Mababa L, Mancini FT, Mora AB, Pickering M, Talhouk NL, Torchin ME, Lafferty KD (2008) Ecosystem energetic implications of parasite and free-living biomass in three estuaries. *Nature* 454:515–518.
- Lafferty KD (2008) Ecosystem consequences of fish parasites. *Journal of Fish Biology* 73:2083–2093.
- Locke SA, McLaughlin JD, Dayanandan S, Marcogliese DJ (2010) Diversity and specificity in *Diplostomum* spp. metacercariae in freshwater fishes revealed by cytochrome c oxidase I and internal transcribed spacer sequences. *International Journal for Parasitology* 40:333–343.
- Locke SA, McLaughlin JD, Lapierre AR, Johnson PTJ, Marcogliese DJ (2011) Linking the larvae and adults of *Apharyngostrigea cornu*, *Histeromorpha triloba*, and *Alaria mustelea* (Diplostomoidea: Digenea) using molecular data. *Journal of Parasitology* 97:846–851.
- Lode T, Pagano A (2000) Variations in call and morphology in male water frogs: taxonomic and evolutionary implications. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences–Series III– Sciences de la Vie* 323:995–1001.
- Mester B, Lengyel S, Puky M (2015) Low frequency of amphibian morphological anomalies in a large protected wetland and grassland complex in Hungary. *Herpetological Conservation and Biology* 10:679–687.
- Mészáros B (1973) Critical studies on karyotypes of eight anuran species from Hungary and some problems concerning the evolution of the order. *Acta Biologica Debrecina* 10-11:151–161.
- Mészáros B, Bartos L (1978) The karyological investigation of the three ranid species to be found in Hungary. *Acta Biologica Debrecina* 15:239–256.

- Moszczyńska A, Locke SA, McLaughlin JD, Marcogliese DJ, Crease TJ (2009) Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. *Molecular Ecology Resources* 9:75–82.
- Murai É, Sulgostowska T, Matskási I, Mészáros F, Molnár K (1983) Parasitic helminths of vertebrates (fishes, amphibians, reptiles and birds) in the Hortobágy National Park. In: Mahunka S (ed) *The Fauna of the Hortobágy National Park*, Budapest, Akadémia Kiadó, Budapest, Hungary pp 15–30.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288–295.
- Pedersen AB, Fenton A (2006) Emphasizing the ecology in parasite community ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 22:133–139.
- Pérez-Ponce de León G, Choudhury A (2005) Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: the search for patterns and processes. *Journal of Biogeography* 32:645–659.
- Plötner J (2005) Die Westpalaarktischen Wasserfrösche. Von Martyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. Laurenti Verlag, Bielefeld, 160 p
- Poulin R (1995) Phylogeny, ecology, and the richness of parasite communities in vertebrates. *Ecological Monographs* 65:283–302.
- Poulin R (1997) *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey. 332 p
- Poulin R, Morand S (2004) *Parasite biodiversity*. Smithsonian Institution Press, Washington DC. 216 p
- Prosser SWJ, Velarde-Aguilar MG, León- Régagnon V, Hebert PDN (2013) Advancing nematode barcoding: a primer cocktail for the cytochrome c oxidase subunit I gene from vertebrate parasitic nematodes. *Molecular Ecology Resources* 13:1108–1115.
- Scholz T (2001) Taxonomy of helminths after the year 2000. *Helminthologia* 38:155–163.
- Schultz RJ (1969) Hybridization, unisexuality, and polyploidy in the teleost *Poeciliopsis* (*Poeciliidae*) and other vertebrates. *The American Naturalist* 103:605–619.
- Shaw DJ, Dobson AP (1995) Patterns of macroparasite abundance and aggregation in wildlife populations: a quantitative review. *Parasitology* 111:S111–S133.

- Tunner HG, Heppich S (1981) Premeiotic genome exclusion during oogenesis in the common edible frog, *Rana esculenta*. *Naturwissenschaften* 68:207–208.
- Tunner HG, Heppich-Tunner S (1992) A new population system of water frogs discovered in Hungary. In: Korsós Z, Kiss I (eds), *Proceedings of the Sixth Ordinary General Meeting of the Societas Europaea Herpetologica*. Budapest, pp 453–460.
- Uzzell T, Berger L (1975) Electrophoretic phenotypes of *Rana ridibunda*, *Rana lessonae*, and their hybridogenetic associate, *Rana esculenta*. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 127:13–24.
- Uzzell TM, Hotz H, Berger L (1980) Genome exclusion in gametogenesis by an interspecific *Rana* hybrid: evidence from electrophoresis of individual oocytes. *Journal of Experimental Zoology* 214:251–259.
- Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, Marcogliese DJ, Abott CL (2015) New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). *Molecular Ecology Resources* 15:945–952.
- Wilson K, Grenfell BT (1997) Generalized linear modelling for parasitologists. *Parasitology Today* 13:33–38.



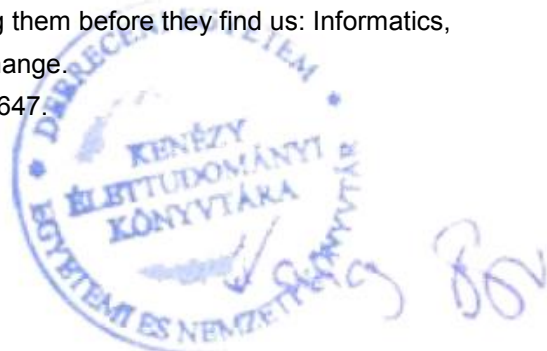
Nyilvántartási szám: DEENK/180/2017.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Herczeg Dávid
Neptun kód: G13U7U
Doktori Iskola: Juhász-Nagy Pál Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10037916

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Christiansen, D. G., Benovics, M., Mikulíček, P.: Taxonomic composition and ploidy level among European water frogs (Anura: Ranidae: Pelophylax) in eastern Hungary.
J. Zool. Syst. Evol. Res. 55 (2), 129-137, 2017. ISSN: 0947-5745.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jzs.12158>
IF: 2.444 (2016)
2. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Végvári, Z., Kuzmin, Y., Brooks, D. R.: Helminth Parasites of the *Pelophylax esculentus* Complex (Anura: Ranidae) in Hortobágy National Park (Hungary).
Comp. Parasitol. 83 (1), 36-48, 2016. ISSN: 1525-2647.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1654/1525-2647-83.1.36>
IF: 0.659
3. Brooks, D. R., Hoberg, E. P., Boeger, W. A., Gardner, S. L., Galbreath, K. E., **Herczeg, D.**, Mejía-Madrid, H. H., Rácz, S. E., Dursahinhan, A. T.: Finding them before they find us: Informatics, parasites, and environments in accelerating climate change.
Comp. Parasitol. 81 (2), 155-164, 2014. ISSN: 1525-2647.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1654/4724b.1>
IF: 0.7





További közlemények

Idegen nyelvű közlemények hazai folyóiratban (1)

4. **Herczeg, D.**, Gallé, R., Molnár, N.: Effects of urbanization on the occurrence of Anura assemblages in the city of Szeged (Hungary).
Tiscia. 39, 3-8, 2012. ISSN: 0563-587X.

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (4)

5. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Christiansen, D. G., Benovics, M., Mikulíček, P.: Fajösszetétel és ploiditás vizsgálata a kelet-magyarországi zöld békákon (Pelophylax).
In: 17. Kolozsvári Biológus Napok : Kivonatfüzet : Kolozsvár, 2016 április 8-9, Babeş-Bolyai Tudományegyetem, Kolozsvár, 34, 2016.
6. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Végvári, Z., Kuzmin, Y., Brooks, D. R.: A Pelophylax esculentus komplex endoparazitáinak vizsgálata a Hortobágyi Nemzeti Parkban.
In: IV. Herpetológiai Előadórészlet : Előadások összefoglalói, Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 16, 2014.
7. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Barta, Z., Végvári, Z., Brooks, D. R.: A Hortobágy kételtű-parazita vizsgálatainak előzetes eredményei.
In: SzüSzi 2013 : 5. Szünzoológiai Szimpózium Vácrátót MTA ÖK Ökológiai és Botanikai Intézet 2013. március 22. : Programfüzet, Előadások és poszterek összefoglalói. Szerk.: Kőrösi Ádám, Magyar Ökológusok Tudományos Egyesülete, Szeged, 20, 2013.
8. **Herczeg, D.**, Gallé, R., Molnár, N.: Az urbanizáció hatásai Szeged farkatlan kételtű (Anura) közösségeire.
In: III. Herpetológiai Előadórészlet : Előadások összefoglalói, Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 29, 2013.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (5)

9. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Christiansen, D. G., Benovics, M., Mikulíček, P.: Taxonomic composition and ploidy level among European water frogs (Pelophylax) in eastern Hungary.
In: V. Herpetológiai Előadórészlet : Előadások összefoglalói / Vörös Judit, Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 3, 2016.
10. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Benovics, M., Mikulíček, P.: Molecular taxonomic identification and determination of hybrid ploidy levels among European water frogs (Pelophylax) in Hungary.
In: Programme & Abstracts : XVIII European Congress of Herpetology, 7-12 September 2015, Wrocław, Poland. Eds.: Borczyk B., Ogińska M., Kolenda K., Skawiński T, University of Wrocław, Wrocław, 47, 2015.



11. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Végvári, Z., Kuzmin, Y., Brooks, D. R.: Amphibian parasite inventory in Hortobágy National Park (Hungary).
In: Ancient Parasites... Old Hosts... New Knowledge : ICOPA XIII México : Abstracts - 2014, ICOPA XIII, Mexico City, 1562, 2014.
12. **Herczeg, D.**, Vörös, J., Barta, Z., Végvári, Z., Brooks, D. R.: Amphibian parasites in the Hortobágy National Park: preliminary findings.
In: 17th European Congress of Herpetology Veszprém, Hungary : Programme & Abstracts, University of Pannonia, Veszprém, 236, 2013.
13. **Herczeg, D.**, Vörös, J.: Species composition and chytridiomycosis infection of the Pelophylax esculentus complex (Anura: Ranidae) in the Hortobágy National Park, Hungary.
In: 17th European Congress of Herpetology Veszprém, Hungary : Programme & Abstracts, University of Pannonia, Veszprém, 121, 2013.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 3,803

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,803

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.06.15.

