

Diplomamunka

Kalina Csenge
2022

Állatorvostudományi Egyetem

Ökológiai Tanszék

**A hormonális stressz szerepe az ivarváltás
kialakulásában erdei békáknál (*Rana dalmatina*)**

The role of hormonal stress in the development of sex reversal in agile frogs
(*Rana dalmatina*)

Készítette: Kalina Csenge

Témavezetők:

Dr. Bókony Veronika

tudományos főmunkatárs

ELKH Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet,
Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport

Dr. Vili Nóra

adjunktus

Állatorvostudományi Egyetem, Ökológiai Tanszék, Konzerváció-
Genetikai Kutatócsoport

Budapest, 2022

TARTALOMJEGYZÉK

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés	4
3. Célkitűzések	6
4. Anyag és módszer.....	7
Természetvédelmi engedélyek	7
A kísérleti állatok	7
A hormonkezelés menete	9
Metamorfózis, majd a békák nevelése	10
A boncolás menete	11
Genetikai ivar meghatározása	14
A vízminták előkészítése és a kortikoszteron mérése	15
Statisztikai elemzés	16
5. Eredmények	17
Fenotípusos ivararány	17
Ivari rendellenességek	19
Ivarváltás a genetikai nőstényeknél.....	20
Testtömegre korrigált kortikoszteron ürítési ráta	22
6. Következtetések.....	23
7. Összefoglalás	27
8. Abstract.....	28
9. Irodalomjegyzék	29
10. Köszönetnyilvánítás	32

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATK NÖVI: Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet

CORT: corticosterone (kortikoszteron)

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (enzimhez kötött immunoszorbens próba)

ESD: environmental sex determination (környezeti ivarmeghatározás)

GSD: genetic sex determination (genetikai ivarmeghatározás)

HRM: high-resolution melting

MS222: az eutanizáláshoz használt altatószer (etil-3-aminobenzoát-metánszulfonát)

RSW: reconstituted soft water (reverz-ozmózis szűrt, visszasózott lágy víz)

SE: standard error (standard hiba)

SPE: solid-phase extraction (szilárd fázisú extrakció)

TSD: temperature-dependent sex determination (hőmérsékletfüggő ivarmeghatározás)

2. BEVEZETÉS

A kétéltűek természetvédelmi szempontból kiemelt fontosságú állatcsoportnak számítanak, hiszen jelenleg a világ kétéltű fajainak 41%-át veszélyezteteti kihalás [1]. Az élőhelyek leromlása és fragmentálódása [2], a klímaváltozás, a környezetszennyezés, a különböző patogének és invazív fajok megjelenése mind szerepet játszanak ebben a folyamatban [3]. Az emberi környezet-átalakítás következtében számos stresszhatás éri az élőlényeket, ezek a stresszhatások pedig különféleképpen befolyásolják az ökoszisztémát, ezzel veszélyeztetve például a kétéltűeket is. Fontos megvizsgálni és megérteni azt, hogy ezekhez az antropogén stresszorokhoz képesek-e a fajok alkalmazkodni, és ha igen, akkor ez hogyan is valósul meg. Kétéltűek esetén az antropogén környezet egyik potenciálisan káros hatása lehet az ivardetermináció és ivari fejlődés megzavarása. Gerinces élőlények esetében az ivarmeghatározási rendszernek 3 fő típusát szokták elkülöníteni: a genetikai ivarmeghatározást (GSD), a környezeti ivarmeghatározást (ESD, amely leggyakrabban hőmérsékletfüggő ivarmeghatározás, TSD), illetve az előző két típus együttesét, amikor ún. „vegyes” rendszer alakul ki [4]. Ez utóbbi esetben a genetikai ivarmeghatározást a környezet befolyásolni tudja, ezzel akár az ivarváltást is előidézve. Ivarváltás során a fejlődő egyedben egy olyan fenotípusos ivar alakul ki, amely nem egyezik az egyed genetikai ivarával, vagyis az ivari kromoszómák által meghatározott ivarral [4, 5, 6]. Ez az ivarváltás nem egyezik meg az elsősorban halaknál leírt, felnőtt egyedeknél megjelenő szekvenciális hermafroditizmussal, amit ivarváltottnaként ("sex change") is szoktak emlegetni. A szekvenciális hermafroditizmus az ESD egy speciális formájának tekinthető a halak esetében [7]. Az ivarváltás ("sex reversal") viszont az egyedfejlődés korai szakaszában, az embrionális vagy lárvális fejlődés során következik be valamilyen környezeti tényező hatására. Előidézheti extrém hőmérséklet [8], kiszáradás és vízvesztés [9], éhezés [10], illetve a különböző kemikáliák, mint az utak jégmentesítésére használt sók használata is [11]. Az ektoterm gerinces élőlények (halak, hüllők, kétéltűek) populációiban előfordulnak ivarváltott egyedek természetes körülmények között is [4, 6], azonban a klímaváltozás és a környezetszennyezés miatt az előbb említett környezeti stresszhatások és azokkal együtt az ivarváltások is gyakoribbá válhatnak [12].

Az ivarváltást eddig viszonylag kevés fajban vizsgálták részletesebben, mivel az ektoterm gerincesek genetikai ivarának megállapítása sokszor nehézségekbe ütközik a fajspecifikus markerek kifejlesztésének a szükségessége miatt [13], illetve az is előfordul, hogy akár fajon

belül, különböző populációk között különbözik az ivarmeghatározási rendszer (XX/XY és ZW/ZZ ivari kromoszómák) [14]. Továbbá, a fenotípusos ivart bizonyos fajoknál csak az ivarérett egyedek esetében lehet biztosan megállapítani, a nászidőszakon kívül viszont csak invazív vagy destruktív módon a belső ivarszerveik alapján [15]. Kételtűek esetében eddig összesen négy fajban találtak ivarváltott egyedeket természetes populációkban. Finnországban, a vizsgált populációk esetében a gyepi békák (*Rana temporaria*) felnőtt egyedei között a genetikai nőstények 9%-a fenotípusosan hím, tehát ivarváltott egyed volt [16]. Az Amerikai Egyesült Államokban őshonos *Rana clamitans* egyedek 4,5%-a volt ivarváltott a kutatók által vizsgált populációkban [17]. Kínában, három különböző populációt vizsgálva is találtak ivarváltott egyedeket a *Rana dybowskii* faj esetében [18]. Hazai területeken az erdei béka (*Rana dalmatina*) populációknál a fenotípusos hímek 20%-ánál mutatták ki az ivarváltás jelenségét [12]. Az ivarváltás gyakoribbnak bizonyult a városi és mezőgazdasági területeken a természetes populációkhoz viszonyítva erdei békák esetében, amit feltehetőleg a városi hősziget effektus és a szennyező anyagok nagyobb mennyiségben lévő jelenléte idézhetett elő [12].

Az ivarváltásnak meghatározó evolúciós és ökológiai következményei lehetnek, például az ivarváltott egyedek fitnessze különbözhet a fajtársakétól [19, 20]. Az ivarváltott erdei békák például kisebb testtömeget érnek el a metamorfózisuk utáni néhány hónapban, mint a nem ivarváltott egyedek, illetve fejlődési rendellenességek is gyakrabban fordulnak elő az ivarváltott békáknál (például máj és lép rendellenességek) [12]. Továbbá, az ivarváltás a populációk ivararányának az eltolódásához is vezethet egyrészt azért, hogy az egyik fenotípusos ivar túlsúlyba kerül, másrészt az ivarváltott egyedek utódainál is eltorzult ivararány jöhet létre [21]. A populációk szaporodási rátáját és ezzel párhuzamosan a genetikai változatosságát csökkentheti az eltorzult ivararány, amely hosszabb távon az evolúciós alkalmazkodási képességet is ronthatja [22], akár a populáció kihalását is előidézve ezzel [23]. Az ivarváltásnak tehát jelentős evolúciós-ökológiai következményei lehetnek, és ezek vizsgálatához azt is fontos lenne megismerni, hogy milyen proximális mechanizmusok révén jön létre.

Halak és kételtűek esetében a magas hőmérséklet többnyire maszkulinizáló hatással rendelkezik, ami azt jelenti, hogy a genetikai nőstények fenotípusos hímmé fejlődnek [8], bár kivételt képez a *Pleurodeles poireti* götefaj, ahol a magas hőmérséklet feminizál [5]. Néhány, halakon végzett vizsgálat eredménye arra utal, hogy a hőség-indukált maszkulinizáció hátterében a glükokortikoid hormonok állnak, amelyek stressz (pl.

hőstressz) hatására fokozott mértékben termelődnek [4, 24]. A glükokortikoidok gátolják az aromatáz enzimet (a CYP 19 gén expresszióját), amely a hím nemi hormont (tesztoszteron) női nemi hormonná (ösztadiol) alakítja át [25]. Abban az esetben, ha az aromatáz blokkolva van, nem alakul át a tesztoszteron, ezáltal a genetikailag nőstény egyedekben herék fognak kifejlődni a bipotens ivarmirigy-kezdemény differenciálódása során. Ezt a hipotézist néhány kísérlet hüllők esetében is tesztelte, azonban az eredményeik ellentmondásosak voltak [26, 27], kétéltűeknél pedig még csak olyan glükokortikoidok hatását vizsgálták publikált kísérletekben, amelyek nem tekinthetők a kétéltűek biológiailag aktív, fő "stresszhormonjának" [28]. A glükokortikoid hormonok közül a halaknál a kortizol, kétéltűeknél és hüllőknél pedig a kortikoszteron játszik főszerepet a stresszre adott élettani válaszokban [29, 30].

3. CÉLKITŰZÉSEK

A dolgozatomban bemutatott kísérlet során választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a glükokortikoid hormonok szerepet játszanak-e az ivarváltás kialakulásában kétéltűeknél. Ehhez erdei békákon kísérletesen teszteltük, hogy a glükokortikoidok csoportjába tartozó kortikoszteron miként befolyásolja az állatok fenotípusos ivararányát, illetve az ivarváltott egyedek arányát. Ennél a fajnál ismert, hogy lárvakori hőstressz hatására maszkulinizáció következik be [31], ezért az ivarmeghatározás érzékeny időszakában manipuláltuk az ebihalak kortikoszteron-szintjét többféle koncentráció alkalmazásával, majd az ivarmirigyek kialakulása után megállapítottuk az átalakult erdei békák fenotípusos ivarát, majd később molekuláris módszerek segítségével az egyedekhez tartozó genetikai ivart is. A predikciónk az volt, hogy a kortikoszteronnal kezelt csoportokban hím túlsúlyos fenotípusos ivararány fog megjelenni az ivarváltás (maszkulinizáció) jelensége miatt.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

Természetvédelmi engedélyek

A petegyűjtéshez, az ebihalak, majd a későbbiekben a békák neveléséhez, kísérletes kezeléséhez és eutanáziájához a Pest Megyei Kormányhivatal által kiállított PE-06/KTF/8060-1/2018; PE/EA/295-7/2018 számú engedélyekkel rendelkezünk, és ezekkel összhangban zajlott a kísérlet teljes menete. Továbbá az ATK NÖVI Etikai Bizottsága is jóváhagyta a kísérlet kivitelezését.

A kísérleti állatok

A kísérlethez négy különböző erdei béka populációból (1.ábra), populációnként három különböző családból (petecsomóból) körülbelül 40-50 friss petét gyűjtöttünk 2021. április 07-én. A négy populáció, amivel dolgoztunk a Bajdázó-tóban (koordináták: É 47.903382, K 18.978482), az Ilona-tóban (É 47.713432, K 19.040242), a gödi Feneketlen-tóban (É 47.684865, K 19.129855), és az Erzsébet-érben (É 47.429196, K 19.132845) él. A petéket az ATK NÖVI juliannamajori kutatóintézetébe szállítottuk, ahol a különböző populációkat, illetve azokon belül a családokat egymástól külön tartottuk, de azonos laboratóriumi körülmények vonatkoztak rájuk. Ez 19 °C-os hőmérsékletet és szabályosan váltakozó világos-sötét periódusokat jelentett, melyek hosszát a természetes fotoperiódushoz igazítottuk. A kísérletben a későbbiek során is ezek a laboratóriumi körülmények vonatkoztak az egyedek tartására. Egy család egyedei kb. 1 cm magasságig RSW-vel (reverz-ozmózis szűrt, visszasózott lágy vízzel) megtöltött műanyag dobozban (19 × 30 × 15 cm) együtt voltak tartva, a pete állapotól egészen a szabadon úszó stádium eléréséig. Az RSW reverz-ozmózis szűrőn megtisztított és UV-fénnyel fertőtlenített lágy víz, amelyhez egy olyan sókeveréket (48 mg/l NaHCO₃, 30 mg/l CaSO₄ × 2H₂O, 61 mg/l MgSO₄ × 7H₂O, 2 mg/l KCl) adagoltunk hozzá, amely biztosította a peték, majd az ebihalak normális fejlődéséhez szükséges sók jelenlétét.

Amikor az egyedek elérték a szabadon úszó fejlődési stádiumot, amely a 25. fejlődési stádiumnak felel meg [32], minden családból 25-25 ebihalat választottunk ki a kísérlet indításához. A kísérlet így 2021. április 23-án indult 300 egyeddel. A kísérletbe be nem választott egyedeket még ebihal korukban visszaszállítottuk a származási helyükre.



1. ábra: A négy populáció földrajzi elhelyezkedése: Bajdázó-tó (zöld), Ilona-tó (rózsaszín), gödi Feneketlen-tó (kék), Erzsébet-ér (narancs), illetve a sárga vonal jelzi az országhatárt

Az ebihalak nevelése

Az egyedeket egyesével, 1 liter RSW-ben tartottuk 2 literes műanyag dobozokban. Az ebihalak dobozait véletlen blokkos elrendezéssel helyeztük el a laboratóriumi polcokon (**2. ábra**). A vízcseré és az etetés is hetente kétszer (3-4 naponta) történt, a vízcseré minden esetben 1 liter RSW-vel, az etetés pedig *ad libitum* felaprított spenóttal (**2. ábra**).



2. ábra: A dobozok elrendezése (balra) és egy kísérletben szereplő ebihal, vízcsere és etetés után közvetlenül (jobbra)

A hormonkezelés menete

A kísérlet indítása utáni 3. héten kezdődött az egyedek hormonkezelése, amely hat napon át tartott. Öt kezelési csoportba osztottuk a 300 ebihalat úgy, hogy mindegyik csoportba öt egyed került mindegyik családból. Az első csoport az oldószer kontroll volt, amelynek során az ebihalak vizébe 0,1 ml/liter 96%-os etanol került. Ekkora mennyiségben az etanol nem befolyásolja az ebihalak fejlődését és növekedési ütemét [33, 34, 35, 36]. Az oldószer kontroll csoportra azért volt szükség, mert a kortikoszteronnal kezelt csoportok esetében a hormont etanolban oldva tudtuk az ebihalak vizébe juttatni. A kortikoszteront az ebihalak képesek a tartóvizükből felvenni, így tudjuk az egyedek szervezetében lévő hormommennyiséget manipulálni. A további négy kezelési csoport kortikoszteron-kezelést kapott, amelyhez a koncentrációkat korábbi irodalmi adatok alapján állítottuk be. A második kezelési csoporttal (0,01 nM kortikoszteron) a környezetileg releváns koncentrációtartományt reprezentáltuk, vagyis a világszerte jellemző, természetes vizekben megtalálható átlagos kortikoszteron koncentrációt [37, 38] adagoltuk a vízbe. A harmadik és negyedik kezelési csoportok (10 és 100 nM kortikoszteron) a biológiailag releváns koncentrációkat foglalták magukba, vagyis azokat a kezeléseket, amelyekkel más fajokon végzett korábbi kísérletekben hasonló endogén kortikoszteron szinteket értek el, mint amelyek az akut stresszre jellemzőek [39, 40, 41]. Ezek a koncentrációk tehát olyan mértékű

kortikoszteron-emelkedést okoznak, ami összevethető a természetes stresszorok (táplálékhiány, magas egyedsűrűség, ragadozóveszély) hatásával. A legmagasabb koncentrációt (1000 nM kortikoszteron) pedig a szakirodalmi adatokkal való összehasonlíthatóság végett választottuk, mert hasonlóan magas koncentrációkat használtak azokban a korábbi ebihalas és halas kísérletekben, amelyek során a glükokortikoidoknak az ivar kialakulására gyakorolt hatását vizsgálták [28, 42, 43].

A vízcseréket a hormonkezelés időtartamában gyakrabban végeztük, hogy biztosítsuk a megfelelő kortikoszteron koncentrációkat. Kétnaponta cseréltük ki az ebihalak vizét és újítottuk meg a hormonkezeléseket [44 alapján], majd megettük az egyedeket ugyanúgy spenóttal, *ad libitum*. A hormonkezelés vége után tovább neveltük az ebihalakat tiszta (sem etanollal, sem kortikoszteronnal nem kezelt) RSW-ben.

A hormonkezelés utolsó napján az ebihalak kortikoszteron szintjének a méréséhez vízmintákat gyűjtöttünk. Azt a nem invazív mintavételezési módszert alkalmaztuk, amelyet már több kétélűfaj esetében sikeresen használtak fel arra, hogy az egyedek által a vízbe ürített kortikoszteron mennyiséget mérjék [41, 45, 46]. Az egyedeket a tartódobozukból háló segítségével egy 100 ml RSW-t tartalmazó pohárba helyeztük át, majd az ebihalakat hagytuk egy órán át a poharakban úszni és közben üríteni. Az 1 óra letelte után a 100 ml vizet szűrőpapíron keresztül lezárható tetejű műanyag poharakba öntöttük, majd a mintákat lefagyasztottuk a felhasználásukig. Az ebihalak testtömegét is megmértük, hogy később az ürített kortikoszteron mennyiséget az egyedek testtömegére tudjuk korrigálni.

Metamorfózis, majd a békák nevelése

Az egyedek átalakulásának kezdetét (42-es fejlődési stádium) az jelentette, ha legalább az egyik mellső lábuk láthatóvá vált. Ekkor feljegyeztük a metamorfózis kezdetének dátumát, lemértük az egyed testtömegét analitikai mérlegen ($\pm 0,1$ mg), majd 1 dl RSW-be, enyhén megdöntött dobozba helyeztük vissza. A tartódoboz megdöntésére azért volt szükség, hogy megfelelő száraz felületre ki tudjanak mászni az átalakuló békák. A metamorfózis ideje alatt nincs szükség az etetésre, mivel ekkor alakulnak át a szájképletek is. Az átalakulás végét (46-os fejlődési stádium) a farok teljes visszaszívódása jelzi, ami általában hat napot vett igénybe, ezután áthelyeztük az egyedeket a békák számára kialakított dobozokba. A békák ugyanolyan dobozokban és ugyanolyan laboratóriumi körülmények között voltak tartva, mint ebihal korukban. A dobozokba összehajtogatott, megnedvesített papírtörlet került alulra, majd erre egy tojástartó darabot is elhelyeztünk, hogy búvóhelyet biztosítsunk az egyedek számára. A békák hetente kétszer, az eredeti vízcseré időpontjában kaptak enni. Az

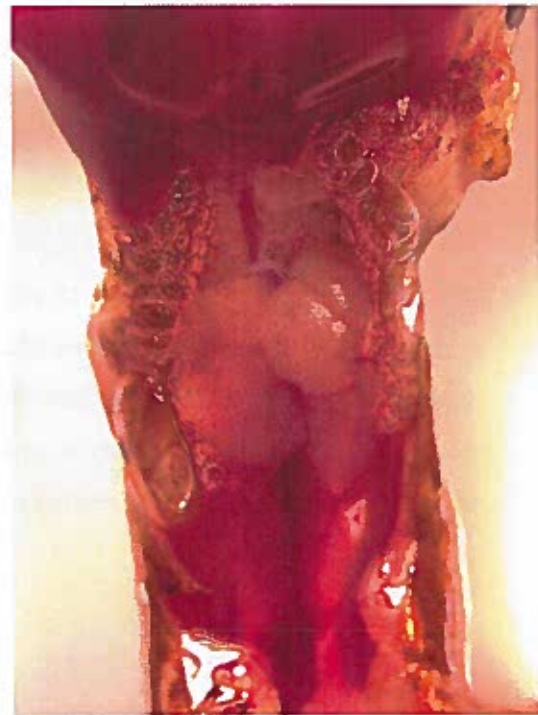
etetés kisméretű (2-3 mm-es) barna tücskökkel (*Acheta domesticus*) történt, melyeket kételtük fejlődéséhez és növekedéséhez hozzájáruló táplálékkiegészítők 3:1 arányú keverékével hintettünk meg (Reptiland 76280 (Trixie Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Tarp, Németország) és Promotor 43 (Laboratorios Calier S.A., Barcelona, Spanyolország)), ezzel biztosítva a vitaminokat, ásványi anyagokat és aminosavakat. Az első pár hétben a tücskök mellett kiegészítésképpen ugróvillások is a táplálék részét képezték. Azért, hogy elkerüljük a békák esetleges kiszáradását, minden etetés előtt RSW-vel bespricceltük a tartódobozait.

A boncolás menete

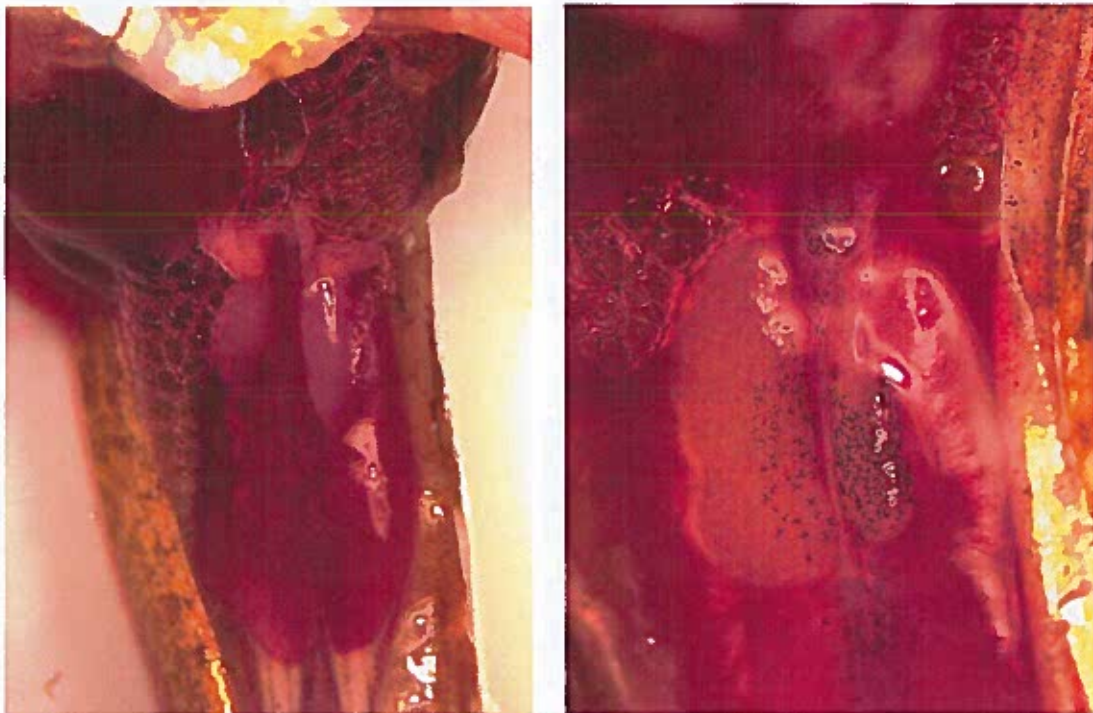
Az erdei békák esetében a gonádok kialakulásához legalább 12 hétre van szükség, ami általában a metamorfózis utáni 4. hétben következik be [47]. Mivel a kísérlet indításától a boncolás kezdetéig több, mint 15 hét eltelt, ezért a kísérleti egyedek esetében ez a 12 hét teljesült. A boncolásnál figyelembe vettük a békák átalakulásától eltelt idő hosszát, és a korábban átalakult egyedekkel kezdtük el a boncolási folyamatokat, így a boncoláskor az állatok az átalakulás kezdetétől számítva 34-70 (többnyire 60-66) naposak voltak. A boncolandó egyedek testtömegét megmértük ($\pm 0,01$ g), majd túlaltattuk a békákat MS222 oldatba merítéssel. A békákat legalább egy órán keresztül az altatótálban tartottuk (3. ábra), hogy biztosan bekövetkezzen a várt hatás és megtörténjen az egyedek eutanizálása. Az altatószert a következők alapján állítottuk elő: 2 g MS222-t és 2 g NaH_2PO_4 -ot (a pH semlegesítése végett) kevertünk el 300 ml RWS-ben. Ez 6,66 g/literes MS222 koncentrációt eredményezett. Az 1 óra letelte után következett a DNS mintavétel, amihez minden egyed hátsó lábfejeit 96 %-os etanol tartalmú eppendorf csőbe helyeztük, hogy a későbbiekben a genetikai ivart is képesek legyünk meghatározni. Ezután megtörtént az egyedek felnyitása, az ivarszerveik beazonosítása, és ezzel együtt fényképek is készültek az ivarszervekről (4. ábra), illetve a mellettük látszó vesékről. Ezzel megtörtént a fenotípusos ivar megállapítása és feljegyzése. Néhány esetben rendellenességet is találtunk az ivarmirigyek külső morfológiájában, egy béka esetében pedig egy petefészket és egy herét is találtunk (5. ábra). A felboncolt egyedeket ezután a gyomorral és a belekkel együtt egy 40 ml-es csőbe helyeztük kb. 10-15 ml formalinba (4%-os formaldehid oldat foszfát pufferrel stabilizálva) (3. ábra). A boncolást és a fenotípusos ivarról készült fotókat az összes egyed esetében Ujhegyi Nikolett (ATK NÖVI, Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport) kivitelezte.



3. ábra: Az altatótálban lévő békák (balra) és a boncolás után formalinban elrakott egyedek (jobbra)



4. ábra: A fenotípusos ivar meghatározása a boncolás során, balra láthatjuk egy hím heréit, a jobb oldali képen pedig egy nőstény petefészkeit



5. ábra: Rendellenes morfológiájú ivarmirigyek: a bal oldali képen megnyúlt és kissé amorf herék, a jobb oldali képen pedig az az egyed látható, amelynél egy petefészek (balra) és egy here (jobbra) alakult ki

A kísérlet folyamán összesen 83 egyed pusztult el nem ismert okok miatt. A pusztulás mértéke minden kezelési csoportban (1. táblázat) hasonló volt (15-21 egyed), az elhullott egyedek zöme két városi populációból került ki (2. táblázat). A hormonkezelés kezdete előtt három egyed, a hormonkezelés közben négy egyed, a többi pedig a hormonkezelés utáni időszakban pusztult el. Továbbá 15 ebihal az első boncolási napig sem kezdett átalakulni, ezért ezeket az egyedeket eutanizáltuk. Az ivarmirigyek fejletlensége miatt a fenotípusos ivart nem lehetett ezeknél az egyedeknél megállapítani. Végül összesen 199 egyednél tudtuk meghatározni a fenotípusos ivart (az átalakulás után felboncolt 203 békából négy esetében az ivarmirigyek morfológiája nem tette lehetővé az ivar egyértelmű megállapítását).

1. táblázat: A kísérlet vége előtt elpusztult egyedek száma kezelési csoportonként

Kezelési csoport	<i>Kontroll</i>	<i>0,01 nM CORT</i>	<i>10 nM CORT</i>	<i>100 nM CORT</i>	<i>1000 nM CORT</i>
Mortalitás	15	21	16	16	15

2. táblázat: A kísérlet vége előtt elpusztult egyedek száma populációnként

Populáció	Bajdázó-tó	Erzsébet-ér	Feneketlen-tó	Ilona-tó
Mortalitás	9	36	35	3

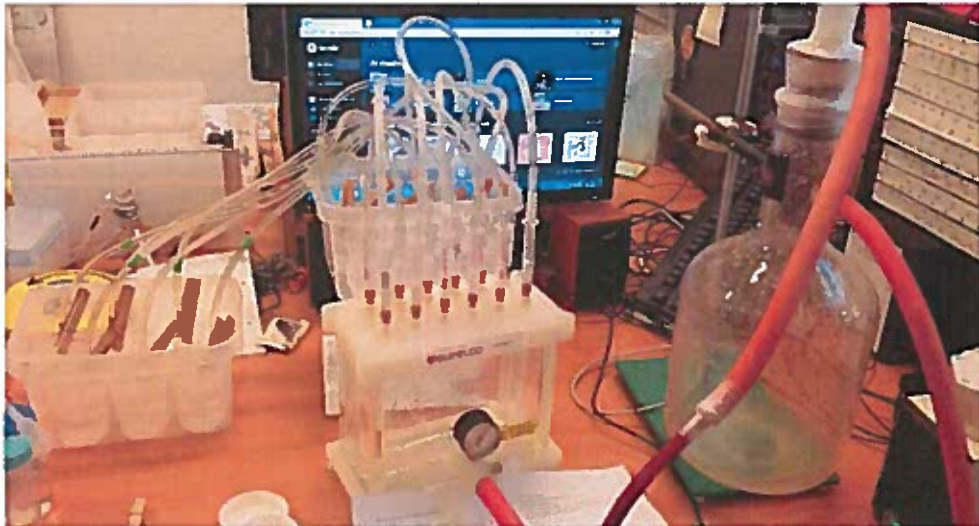
Genetikai ivar meghatározása

A DNS izolálás a korábban 96 %-os etanolban tárolt állati szövetből (hátsó lábfejek) E.Z.N.A. Tissue DNA Kit használatával történt a gyártó utasításainak megfelelően, azzal a kivétellel, hogy az emésztési időt két órára emeltük. Az izolált minták koncentrációját azonos szintre hoztuk, ehhez a DNS koncentrációk ellenőrzése NanoDrop segítségével történt. A genetikai ivar meghatározásához egy nemrég erdei békára kifejlesztett molekuláris markerkészletet használtunk fel, ahol követtük a cikkben leírt protokollt [12]. Az izolált mintákat az Rds3 markerre teszteltük úgynevezett high-resolution melt (HRM) analízis segítségével. Abban az esetben, ha a HRM által meghatározott genetikai ivar megegyezett a boncolás során megállapított fenotípusos ivarral, elfogadtuk az adott mintához tartozó ivari egyezést. Viszont, ha a fenotípusos ivarral ellentétes genetikai ivart detektáltunk, akkor azokat az egyedeket, mint ivarváltottak jegyeztük fel.

Mind a 203 DNS izolátum esetében sikerült genetikai ivart határozni. Ebből egy minta esetében a boncolás során nem derült ki a fenotípusos ivar, így ezt a mintát nem vettük bele az ivarváltással kapcsolatos statisztikai elemzésekbe. A minták HRM analízise Gál Zoltán (NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet) segítségével történt.

A vízminták előkészítése és a kortikoszteron mérése

A lefagyasztott vízmintákat kiolvastottuk. A teljes ürített kortikoszteron mennyiség meghatározásához a hormont a vízmintákból szilárd fázisú extrakció (SPE) segítségével vontuk ki. Ehhez vákuum feltétet (Sigma-Aldrich Visiprep) és szivattyút is használtunk (6. ábra). 2 ml metanolt pipettáztunk a C18 SPE oszlopokra (SepPak Vac 3cc/500mg, Waters Inc.), majd a vákuum (max. 67,7 kPa) segítségével a metanolt az SPE oszlopokon keresztül átszívattuk az oszlopok alatti tartályba. Ezután újabb 2 ml metanollal megismételtük az előző lépést, azzal a különbséggel, hogy másodszorra nagyon kevés mennyiségű metanolt rajta hagytunk az SPE oszlopok tetején. Ez azt a célt szolgálta, hogy az aktivált SPE oszlopok ne száradjanak ki. Ezt a két lépést 2-2 ml desztillált vízzel is elvégeztük. A vízmintákat a Tygon csöveken keresztül vákuum (max. 67,7 kPa) segítségével átengedtük az SPE oszlopokon. Ennél a lépésnél kötődött a mintákban található kortikoszteron az SPE oszlopok felületére. Ezután az SPE oszlopokat megfelelően lezártuk és mélyhűtőbe helyeztük az enzimhez kötött immunoszorbens próba (ELISA) elvégzéséig. A minták ELISA analízisét Ujhegyi Nikolett (ATK NÖVI, Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport) végezte egy korábban publikált módszertannak [45] megfelelően. Összesen 287 egyed esetében sikerült az ELISA analízist elvégezni.



6. ábra: A hormonminták előkészítésére használt berendezés (a vákuum feltétet láthatóak az SPE oszlopok)

Statisztikai elemzés

Az elemzés egységei az erdei béka egyedek voltak. Az elemzést az R programban végeztük el, amely során általános lineáris kevert modelleket és binomiális (általánosított lineáris) kevert modellt használtunk ('lme4' csomag 'lmer' és 'glmer' függvényei). Minden modell esetében a kezelési csoportot, mint magyarázó változót (fix faktort) vettük bele a modellbe, a random faktor pedig a populációba ágyazott család volt. Erre azért volt szükség, mert az egy populációba, illetve családba tartozó békák nem tekinthetők egymástól függetlennek. A modelldiagnosztikához a binomiális modellek esetében a 'DHARMA' csomagot használtuk, a 'simulateResiduals' parancs segítségével. Az eredmények értelmezésekor 5%-os szignifikancia küszöböt vettünk figyelembe.

Az első modellben, ahol a függő változónk a fenotípusos ivar (hím vagy nőstény) volt, a hímmé alakulás esélyét elemeztük. A második modellben az ivarmirigyek morfológiai rendellenességeinek elemzéséhez a függő változónk az ivarszervi rendellenesség előfordulása volt (igen vagy nem). A harmadik modellben az ivarváltott egyedek arányának elemzéséhez a függő változónk az ivarváltás előfordulása volt (ivarváltott az egyed vagy nem). Ez utóbbi modellben csak azokat az egyedeket vettük figyelembe, amelyek a genetikai ivarhatározás alapján genetikailag nősténynek (119 egyed a 203-ból) bizonyultak (mivel ezeknél az egyedeknél várható maszkulinizáció). Mindhárom modellben binomiális hibaeloszlást használtunk. A modellek jó illeszkedést mutattak a modelldiagnosztikai ábrák alapján.

A kortikoszteron minták elemzéséhez a függő változónk az egyedek testtömegére korrigált kortikoszteron ürítési ráta (pg/h/mg) volt. Ez a változó azt adja meg, hogy az adott ebihal az egy órán át tartó kortikoszteron mintavétel során hány pg kortikoszteront ürített a vízbe egységnyi testtömegre vonatkoztatva. A modelldiagnosztikai ábrák alapján a függő változó eloszlása ferdének látszott, ezért 10-es alapú logaritmust használtunk az elemzéshez a lineáris modellben (normál eloszlású hiba). A logaritmizálás után a modelldiagnosztikai ábráink jó illeszkedést mutattak.

5. EREDMÉNYEK

Fenotípusos ivararány

Az 3. táblázat alapján láthatjuk, hogy a kontroll és a 100 nM kortikoszteronnal kezelt csoportban fenotípusosan több nőstény, mint hím egyed volt, míg a 0,01 nM, a 10 nM és az 1000 nM kortikoszteronnal kezelt csoportok esetében fordítva alakult a fenotípusos ivararány, és ugyanezeknél a csoportoknál több ivarszervi rendellenesség is detektáltunk.

3. táblázat: A fenotípusos ivar eloszlása a kezelési csoportokban, illetve alatta feltüntetve az ivari rendellenességek csoportonkénti száma

Fenotípusos ivar	Kezelési csoportok				
	<i>Kontroll</i>	<i>0,01 nM CORT</i>	<i>10 nM CORT</i>	<i>100 nM CORT</i>	<i>1000 nM CORT</i>
<i>Nőstény</i>	23	17	15	24	16
<i>Hím</i>	18	20	25	17	24
<i>Rendellenesség</i>	2	8*	10*	5	7*

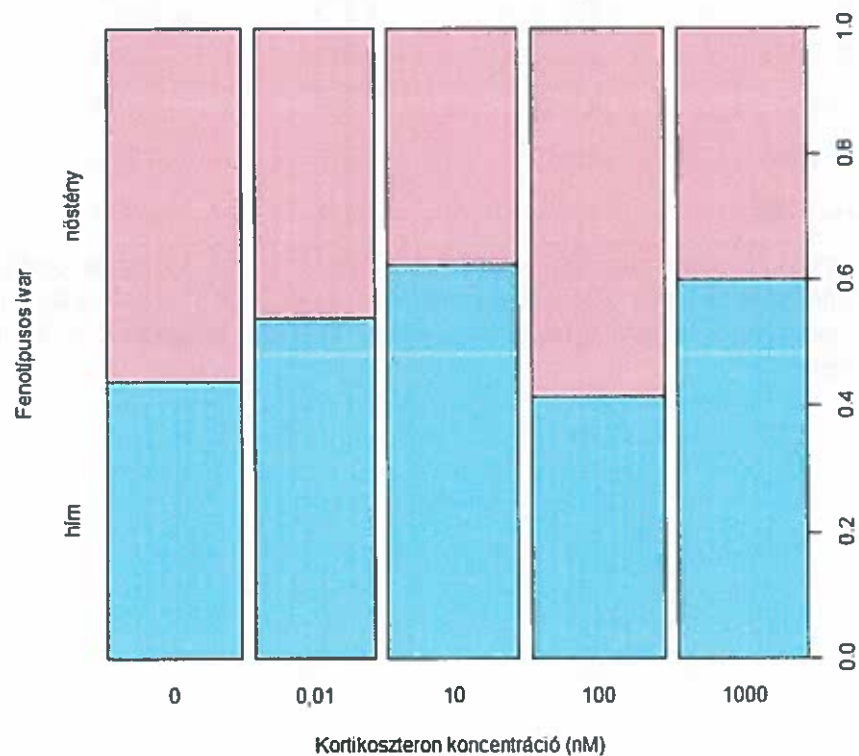
*4 egyed fenotípusos ivarát nem tudtuk meghatározni: ebből 1 egyed a 0,01 nM, 2 egyed a 10 nM, illetve 1 egyed az 1000 nM kortikoszteronnal kezelt csoportból származott.

Az általánosított lineáris kevert modellel (4. táblázat) azt találtuk, hogy nincs szignifikáns különbség a hímmé alakulás esélyében a kontroll és a kortikoszteronnal kezelt csoportok között. Azonban a statisztikailag nem szignifikáns különbségek egy részéhez biológiailag nem elhanyagolható hatásnagyságok tartoznak: azoknál a csoportoknál, ahol 0,01 vagy 10 nM kortikoszteron koncentrációt alkalmaztunk, a hímek aránya 53-61%-ra emelkedett a kontroll csoport 44%-ához képest, és hasonló tendencia (60 % hím) figyelhető meg az 1000 nM kortikoszteronnal kezelt csoport esetében is (7. ábra).

4. táblázat: A fenotípusos hím ivar kialakulásának az esélyét elemző binomiális modell eredményei

	<i>Paraméter becslés</i>	<i>SE</i>	<i>z-érték</i>	<i>p</i>
<i>Kontroll</i>	-0,172	0,370	-0,466	0,642
<i>0,01 nM CORT</i>	0,437	0,461	0,946	0,344
<i>10 nM CORT</i>	0,754	0,460	1,639	0,101
<i>100 nM CORT</i>	-0,082	0,452	-0,182	0,856
<i>1000 nM CORT</i>	0,696	0,458	1,520	0,128

Random hatások: a populációba ágyazott családhoz tartozó variancia értéke <0,001, a populációhoz tartozó pedig 0,113. A paraméterbecslések logit (log-odds) skálán mutatják a kontroll csoporthoz tartozó átlagot és a többi kezelési csoportnak a kontrolltól vett különbségét.



7. ábra: A kezelési csoportonként meghatározott fenotípusos ivararány

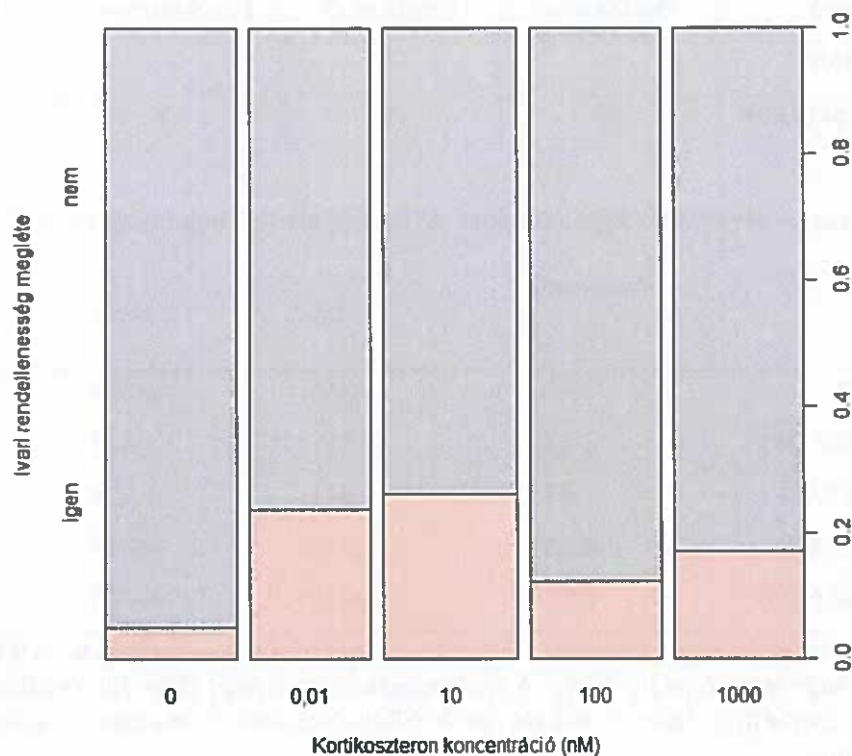
Ivari rendellenességek

A második modellünk szerint a 0,01 és a 10 nM kortikoszteronnal kezelt csoportok esetében szignifikánsan gyakrabban detektáltunk rendellenességeket a gonádok morfológiájában, a többi kezelési csoportnál nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll csoporttól (5. táblázat). A 8. ábra szemléletesen mutatja, hogy az ivari rendellenességek előfordulási gyakorisága a kontroll csoport 5%-ához képest a 0,01 és a 10 nM kortikoszteronnal kezelt csoportok esetében 22-25%-ra emelkedett. Hasonló, bár marginálisan nem szignifikáns emelkedést találtunk a gonádrendellenességek gyakoriságában (18 %) az 1000 nM kortikoszteronnal kezelt csoport esetében (5. táblázat, 8. ábra).

5. táblázat: A rendellenes gonád kialakulásának az esélyét elemző binomiális modell eredményei

	<i>Paraméter becslés</i>	<i>SE</i>	<i>z-érték</i>	<i>p</i>
<i>Kontroll</i>	2,952	0,770	3,835	<0,001
<i>0,01 nM CORT</i>	-1,868	0,823	-2,269	0,023
<i>10 nM CORT</i>	-1,948	0,809	-2,407	0,016
<i>100 nM CORT</i>	-1,049	0,870	-1,206	0,227
<i>1000 nM CORT</i>	-1,457	0,838	-1,739	0,082

Random hatások: a populációba ágyazott családhoz tartozó variancia értéke <0,001, a populációhoz tartozó pedig 0,264. A paraméterbecslések logit (log-odds) skálán mutatják a kontroll csoporthoz tartozó átlagot és a többi kezelési csoportnak a kontrolltól vett különbségét.



8. ábra: Kezelési csoportonként az észlelt ivari rendellenesség gyakoriság

Ivarváltás a genetikai nőstényeknél

A genetikai ivarhatározás alapján a 203 egyedből 84 genetikailag hím volt, 119 pedig genetikailag nőstény, melyek között 23 volt ivarváltott (6. táblázat). Az ivarváltás gyakorisága hasonló különbségeket mutatott a kezelési csoportok között, mint a fenotípusos ivararány és a gonárendellenességek aránya: a kontroll és a 100 nM kezeléseknél 11% -os rátájához képest a 0,01, 10 és 1000 nM-os kezeléseknél 20-32% volt az ivarváltási ráta (9. ábra). Binomiális modellel viszont azt találtuk, hogy a genetikai nőstények csoportján belül nincs szignifikáns különbség az ivarváltás kialakulásának az esélyében a kontroll és a hormonkezelt csoportok között (7. táblázat). Azonban azt meg kell jegyeznünk, hogy az ivarváltott egyedek többsége két családból került ki (az összesen 23 ivarváltott egyedből 10 az egyik Bajdázó-tóból származó családból, illetve 8 ivarváltott egy gödi családból (6. táblázat)).

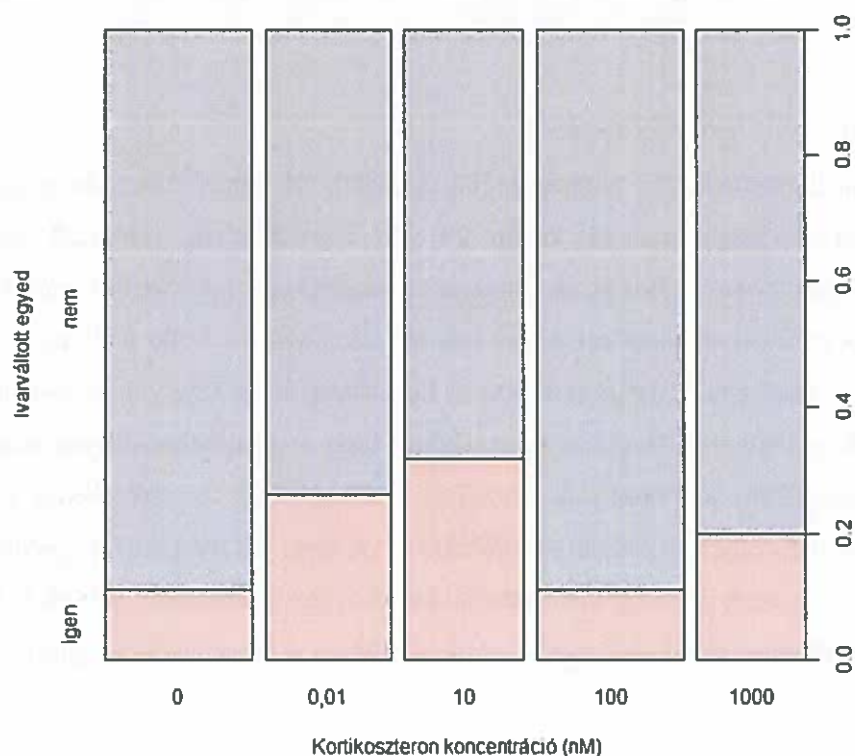
6. táblázat: A genetikai nőstény egyedek ivarváltás szempontjából vizsgálva

Populáció	Bajdázó-tó	Erzsébet-ér	Feneketlen-tó	Ilona-tó
Ivarváltott	10	4	8	1
Nem ivarváltott	33	5	18	40

7. táblázat: Az ivarváltás kialakulásának az esélyét elemző binomiális modell eredményei

	Paraméter becslés	SE	z-érték	p
Kontroll	-2,931	1,015	-2,888	0,004
0,01 nM CORT	1,199	0,911	1,317	0,188
10 nM CORT	1,625	0,941	1,724	0,085
100 nM CORT	-0,241	1,012	-0,238	0,812
1000 nM CORT	0,629	0,978	0,643	0,520

Random hatások: a populációba ágyazott családhoz tartozó variancia értéke 3,068, a populációhoz tartozó pedig 0,213. A paraméterbecslések logit (log-odds) skálán mutatják a kontroll csoporthoz tartozó átlagot és a többi kezelési csoportnak a kontrolltól vett különbségét.



9. ábra: Kezelési csoportonként az ivarváltott egyedek gyakorisága

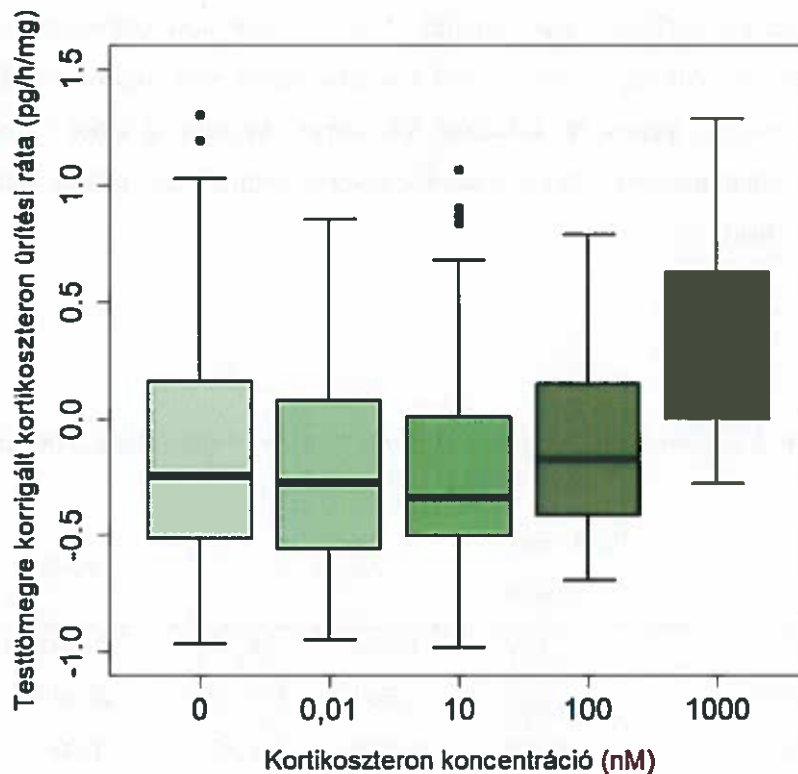
Testtömegre korrigált kortikoszteron ürítési ráta

A lineáris kevert modellünkkel azt találtuk, hogy az 1000 nM kortikoszteronnal kezelt csoport esetében a testtömegre korrigált kortikoszteron ürítési ráta szignifikánsan növekedett a kontroll csoporthoz képest (8. táblázat, 10. ábra). Azonban a többi kezelési csoport esetében nem találtunk szignifikáns különbségeket a kontroll csoporthoz viszonyítva (8. táblázat, 10. ábra).

8. táblázat: A testtömegre korrigált kortikoszteron ürítési rátát elemző lineáris kevert modell eredményei

	<i>Paraméter becslés</i>	<i>SE</i>	<i>df</i>	<i>t-érték</i>	<i>p</i>
<i>Kontroll</i>	-0,129	0,124	4,349	-1,041	0,352
<i>0,01 nM CORT</i>	-0,066	0,081	271,322	-0,809	0,419
<i>10 nM CORT</i>	-0,085	0,080	271,228	-1,069	0,286
<i>100 nM CORT</i>	0,039	0,080	271,326	0,485	0,628
<i>1000 nM CORT</i>	0,468	0,081	271,301	5,761	<0,001

Random hatások: a populációba ágyazott családhoz tartozó variancia értéke 0,006, a populációhoz tartozó pedig 0,046. A paraméterbecslések a 10-es alapú logaritmus-transzformált függő változóra mutatják a kontroll csoporthoz tartozó átlagot és a többi kezelési csoportnak a kontrolltól vett különbségét.



10. ábra: A testtömegre korrigált kortikoszteron tartalom 10-es alapú logaritmus a hormonkezelések függvényében. Az egyes boxplot ábrákon a középső vastag vonal a mediánt jelzi, a doboz az interkvartilis terjedelmet (IQR), a bajuszok az alsó, ill. a felső kvartilistől 1,5 IQR távolságra levő értékeket, a pöttyök pedig az annál távolabbiakat.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

A kísérletünk során azt találtuk, hogy a kontroll és a kortikoszteronnal kezelt csoportok között nincs statisztikailag szignifikáns különbség sem a hím fenotípusos ivar kialakulásának esélyében, sem az ivarváltási rátában. Az eredmények egyik lehetséges magyarázata az, hogy az erdei békák ivarváltását nem a stresszhormonszint növekedése váltotta ki, vagyis nem a glükokortikoidok indukálják ezt a jelenséget a faj esetében. A hipotézisünket halakon végzett laboratóriumi kísérletek [4, 24] alapján állítottuk fel, azonban úgy tűnik, hogy a kételtűek ebben a tekintetben inkább a hüllőkre hasonlítanak, mint a halakra. Halak esetében a kortizol kezelés több kísérletben is kiváltotta az ivarváltást [4, 24], míg a hüllőknél nem egyértelműek a szakirodalmi adatok. Az embrionális fejlődés

során megemelt kortikoszteronszint több hím utódot eredményezett a *Bassiana duperreyi* vakondgyíkféle esetében, viszont az agámafélékhez tartozó *Amphibolurus muricatus* fajnál több nőstény utódhoz vezetett [26]. Ezzel ellentétben egy másik agámaféle, a *Pogona vitticeps* esetében a kortikoszteronszint emelkedése nem váltott ki ivarváltást [27]. Ez azt veti fel, hogy stresszhormonhatás nem, vagy nem következetesen befolyásolja az ivarváltás kialakulását a hüllőfajok esetében. Feltéve, hogy a kétélűek a hüllőkre hasonlítanak az ivarváltást kiváltó tényezők és hatásmechanizmusok tekintetében, kétélűeknél is érdemes lehet a hüllők esetében is felmerült egyéb biológiai rendszerek szerepét megvizsgálni. Ilyen például az a felvetés, hogy a különböző környezeti tényezők a celluláris kalciumszabályozáson vagy pedig hőmérséklet-érékeny splicing faktorokon keresztül fejthetik ki az ivarváltást előidéző hatásukat [27].

Eredményeink értelmezéséhez azonban további szempontokat is figyelembe kell venni. Az alternatív lehetőség az, hogy a kortikoszteron valójában befolyásolja a kétélűek ivarváltását, de ezt a hatást nem tudtuk a kísérletünkben kimutatni. Erre két lehetséges okot látunk. Az egyik, hogy esetleg a vízbe adagolt kortikoszteron kezeléssel nem sikerült megfelelően manipulálni az ebihalak szervezetében keringő kortikoszteron koncentrációját. A testtömegre korrigált kortikoszteron ürítési ráta ugyanis egyedül a legnagyobb (1000 nM-os) hormonkezelésnél növekedett szignifikánsan a kontroll csoportéhoz képest. Azonban ezt a lehetséges magyarázatot azért nem tartjuk valószínűnek, mert a felállított hipotézis alapján az 1000 nM-os kezelési csoportban számítottunk a legnagyobb arányban az ivarváltott egyedek kialakulására, de ez nem így történt, mivel nem detektáltunk ebben a kezelési csoportban szignifikánsan több ivarváltott egyedet. Ezért inkább egy technikai problémára gondolunk a kortikoszteron szintek mérésével kapcsolatosan. Előfordulhatott az, hogy az alacsonyabb koncentrációjú kezelési csoportokban található ebihalak gyorsabban kiürítették a szervezetükben felhalmozódott többlet kortikoszteront. A mintavételezés előtt egy teljes vízcserét kellett végrehajtanunk ahhoz, hogy tiszta, hormonmentes vízből szedhessük ki az ebihalakat a kortikoszteron méréshez. Erre azért volt szükség, hogy az ebihalakkal együtt ne kerüljön hormonkezelt víz a mérési poharakba. Mivel a vízcseré viszonylag hosszabb ideig tartott (kb. 2 óra), ezért felvetődik annak a lehetősége, hogy még a mérés elkezdése előtt, a tartóvizetekbe már megtörtént a kezelés által előidézett többlet kortikoszteronnak az ürítése, ezért csak a legnagyobb koncentráció esetén detektáltunk szignifikáns különbséget.

A másik ok, ami sikeres kortikoszteron kezelés esetén is megghiúsíthatta a hatás detektálását, az alacsony statisztikai erő, ugyanis a tervezettnél jóval alacsonyabb mintaszámot tudtunk

csak használni az ivar vizsgálatához (300 helyett kb. 200 egyed). A kísérletben megfigyelt megközelítőleg 27%-os mortalitás jóval magasabb, mint a korábbi, erdei békával végzett laboratóriumi kísérletekben tapasztaltak (jellemzően néhány %). Mivel a kezelési csoportoktól független volt az elpusztult egyedek száma, ezért kijelenthetjük, hogy a váratlanul magas mortalitást nem a kortikoszteron idézte elő. Viszont a pusztulások többsége két populációból került ki, az Erzsébet-érből, illetve a gödi Feneketlen-tóból. Ez alapján az a legvalószínűbb, hogy ezekben a populációkban természetesen is nagyobb a halálozási ráta, amelynek az oka esetleg az lehet, hogy két városi populációról van szó, míg az Ilona-tó és a Bajdázó-tó zavartalanabb és természetközeli területeken helyezkednek el. Az antropogén környezetben található Erzsébet-érből és a gödi Feneketlen-tóból származó egyedek feltehetőleg a genetikai leromlás miatt kevésbé életképesek, ugyanis a városi élőhelyek fragmentáltsága miatt a populációk kis méretűek és beltenyésztettek lehetnek. Hasonló lehet az oka annak is, hogy a kutatócsoport egy másik vizsgálatában azt találta, hogy a városi és mezőgazdasági területekről származó barna varangy (*Bufo bufo*) ebihalak növekedési és fejlődési üteme elmarad a természetes élőhelyekről származókéval azonos, kedvező körülmények között [48]. Egy másik ok lehet a magas mortalitási rátára, hogy a két városi populáció egyedekének petéi a vízben lévő szennyezőanyagoktól károsodhattak. Ezt a lehetőséget nem zárhatjuk ki, ugyanakkor nem tartjuk túl valószínűnek, hiszen friss petéket gyűjtöttünk be, amelyek kevés ideig voltak a vizekben és ezáltal a petéken lévő zseléburok is sértetlen volt. Korábbi vizsgálatok alapján ez a zseléburok rendkívül jó védelmet nyújt a peték számára, méghozzá a mechanikus és toxikus hatások ellen egyaránt [49, 50, 51].

Az alacsony mintaszám problémájára utal az, hogy mind a fenotípusos ivararány, mind az ivarváltási ráta esetében biológiailag jelentős különbségeket találtunk a kontroll csoporttól a 0,01, 10, és 1000 nM-os kezeléseknél. Ezzel párhuzamosan szignifikáns különbségeket kaptunk két csoport esetén (és marginálisan nem szignifikáns különbséget egy harmadik csoport esetén) az ivari rendellenességek detektálási gyakoriságában. A 0,01 és 10 nM kortikoszteronnal kezelt csoportok esetében szignifikánsan gyakrabban fordultak elő gonáddal kapcsolatos rendellenességek a többi csoporthoz viszonyítva. Habár itt statisztikailag szignifikáns különbségeket kaptunk, de ahhoz, hogy határozottan kijelenthessük, hogy a kortikoszteron bizonyos koncentrációkban történő alkalmazása ivari rendellenességeket okoz, további szövettani vizsgálatokra van szükség, hogy pontosíthassuk a kérdéses fenotípusos ivarokat is. A kísérletben tapasztalt morfológiai rendellenességek ugyanis a kutatócsoport korábbi vizsgálataira utalhatnak arra is, hogy interszex

ivarmirigyekről (petesejtek a hereszövetben: ovotestis) van szó [12, 31]. Lehetséges tehát, hogy a gonádok külső morfológiája alapján hímnek vagy nősténynek kategorizált egyedek egy része valójában interszex fenotípusú, ami az ivarváltás egy tökéletlen formája.

Összességében elmondhatjuk, hogy kísérletünk nem támasztotta alá, hogy az ivarváltást erdei békák esetében a kortikoszteron indukálja, azonban az ivari rendellenességek (interszex gonádok) kialakulásával kapcsolatban nem kizárható ennek a hormonnak a szerepe. A továbbiakban szövettani vizsgálatokat fogunk végezni annak kiderítésére, hogy a bizonytalan besorolású vagy rendellenesnek tűnő ivarszervek valójában ovotestisek-e, azaz női és hímvivarú szöveteket is tartalmaznak-e. A szövettani vizsgálatok elősegíthetik a rendellenes gonádok kialakulásának a megértését, illetve a boncolás során nem egyértelmű fenotípusos ivarok pontosítását is. Ezáltal biztosabb választ tudunk majd adni arra a kérdésre, hogy mi a szerepe a stresszhormonoknak az ivarváltás kialakulásában kétéltűeknél.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az ektoterm gerinces élőlények számára az antropogén környezet egy potenciálisan káros hatása lehet az ivarváltás. Az ivarváltási folyamat az egyedfejlődés során embrionális vagy lárvális korban következhet be, valamilyen extrém környezeti tényező hatására (például: magas hőmérséklet, kiszáradás, kemikáliák, éhezés). A folyamat során a fejlődő egyedben olyan fenotípusos ivar alakul ki, amely nem egyezik meg az egyed kromoszómái által meghatározott genetikai ivarral. Néhány, halakon végzett kísérlet eredménye arra utal, hogy az ivarváltás hátterében a stressz hatására termelődő glükokortikoid hormonok állnak, melyek gátolják az aromatáz enzimet, amely a hím nemi hormonokat női nemi hormonná alakítaná. Hüllőknél azonban az ilyen kísérletek ellentmondásos eredményeket adtak, kételtűek esetében pedig még nem vizsgálták ezt a hipotézist. A kísérletünk során azt vizsgáltuk, hogy a glükokortikoid hormonok hogyan befolyásolják az erdei békák (*Rana dalmatina*) ivararányát. Ehhez a glükokortikoidok közé tartozó kortikoszteron hormont használtuk, amely a kételtűek fő "stresszhormonja". Az általunk tesztelt predikció az volt, hogy a kortikoszteron szintjének az emelkedése ivarváltást okoz, és ezáltal a kezelt csoportokban hím túlsúlyos fenotípusos ivararány alakul ki. Az ebihalakat 5 kezelési csoportba osztottuk. Az oldószer kontroll csoport egyedeinek a vizébe 0,1 ml/l etanolt adagoltunk, a további 4 csoporthoz pedig különböző kortikoszteron koncentrációkat (0,01; 10; 100 és 1000 nM) állítottunk elő a kontrollal azonos mennyiségű etanolban. A hormonkezelések 6 napon át tartottak abban az időszakban, amikor az erdei békák ivari fejlődése érzékeny a környezeti körülményekre (a szabadon úszó lárvastádium elérése utáni 3. hétben), majd az átalakulás után kb. 2 hónappal, amikor az ivarmirigyek már differenciálódtak, a békák boncolásával megállapítottuk az egyedek fenotípusos ivarát az ivarmirigyek makroszkopikus megjelenése alapján, majd a genetikai ivart HRM segítségével. A kontroll és a kezelt csoportok között a fenotípusos ivararányt, illetve az ivarváltási arányt tekintve sem találtunk szignifikáns különbséget, azonban két kezelt csoportnál (0,01 és 10 nM) szignifikánsan gyakoribb rendellenességeket detektáltunk az ivarmirigyek morfológiájában. Az eredményeink arra utalnak, hogy az erdei békák ivarváltásának hátterében nem a stresszhormonszint emelkedése áll, vagyis nem a kortikoszteron idézi elő az ivarváltás jelenségét. Azonban a kísérletünkben tapasztalt, váratlanul magas (kezeléstől független) mortalitási ráta okozta alacsony mintaszám miatt további vizsgálatok szükségesek.

8. ABSTRACT

For ectothermic vertebrates, a potentially harmful effect of the anthropogenic environment could be sex reversal. The process of sex reversal can happen at the embryonic or larval phase during ontogenesis, due to extreme environmental factors (for example: high temperature, dehydration, chemicals, starvation). Sex reversal means that individuals develop a phenotypic sex that does not match their genetic sex determined by their sex chromosomes. According to some experiments with fish, sex reversal may be caused by stress-induced elevation of the secretion of glucocorticoid hormones, which inhibit the aromatase enzyme that would convert male hormones into female hormones. However, for reptiles, such experiments gave conflicting results, and for amphibians, this hypothesis has not been tested yet. In this study, we tested how glucocorticoid hormones affect the sex ratio of agile frogs (*Rana dalmatina*). We used one of the glucocorticoid hormones called corticosterone that is considered the main "stress hormone" of amphibians. The prediction we tested was that an increase in corticosterone levels would cause sex reversal, therefore resulting in male-dominated phenotypic sex ratios in the treated groups. The tadpoles were divided into 5 treatment groups. To the water of the solvent control group 0.1 ml/l ethanol was added, and for the other 4 groups, different corticosterone concentrations (0.01, 10, 100 and 1000 nM) were applied using the same amount of ethanol as the control group had. The hormone treatments lasted for 6 days during the phase when the sexual development of agile frogs is sensitive to environmental conditions (in the third week after reaching the free-swimming larval stage). Approximately two months after metamorphosis, when the gonads had already differentiated, the phenotypic sex of the individuals was determined based on the macroscopic appearance of their gonads upon dissection, then the genetic sex was detected with the help of HRM analysis. As for the phenotypic sex ratio and the sex reversal rate, no significant difference was found between the control and the treatment groups. However, significantly more abnormalities of gonadal morphology were detected in two hormone treated groups (0,01 and 10 nM). Our results suggest that the sex reversal of *Rana dalmatina* is not induced by increase in stress hormone levels, that is, corticosterone does not cause sex reversal. However, more investigations are needed, because sample size in our experiment was relatively low due to unexpectedly high (not treatment-related) mortality.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Pimm, S. L., Jenkins, C. N., Abell, R., Brooks, T. M., Gittleman, J. L., Joppa, L. N., Raven, P. H., Roberts, C. M., & Sexton, J. O. (2014). The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. *science*, 344(6187).
2. Ficetola, G. F., Rondinini, C., Bonardi, A., Baisero, D., & Padoa-Schioppa, E. (2015). Habitat availability for amphibians and extinction threat: a global analysis. *Diversity and Distributions*, 21(3), 302-311.
3. Beebee, T. J., & Griffiths, R. A. (2005). The amphibian decline crisis: a watershed for conservation biology?. *Biological conservation*, 125(3), 271-285.
4. Baroiller, J. F., & d'Cotta, H. (2016). The reversible sex of gonochoristic fish: insights and consequences. *Sexual Development*, 10(5-6), 242-266.
5. Flament, S. (2016). Sex reversal in amphibians. *Sexual Development*, 10(5-6), 267-278.
6. Holleley, C. E., Sarre, S. D., O'Meally, D., & Georges, A. (2016). Sex reversal in reptiles: Reproductive oddity or powerful driver of evolutionary change?. *Sexual Development*, 10(5-6), 279-287.
7. Todd, E. V., Liu, H., Muncaster, S., & Gemmill, N. J. (2016). Bending genders: the biology of natural sex change in fish. *Sexual Development*, 10(5-6), 223-241.
8. Ospina-Alvarez, N., & Piferrer, F. (2008). Temperature-dependent sex determination in fish revisited: prevalence, a single sex ratio response pattern, and possible effects of climate change. *PLoS one*, 3(7), e2837.
9. Dupoué, A., Lourdais, O., Meylan, S., Brischoux, F., Angelier, F., Rozen-Rechels, D., Marcangeli, Y., Decenciére, B., Agostini, S., & Le Galliard, J. F. (2019). Some like it dry: Water restriction overrides heterogametic sex determination in two reptiles. *Ecology and Evolution*, 9(11), 6524-6533.
10. Sakae, Y., Oikawa, A., Sugiura, Y., Mita, M., Nakamura, S., Nishimura, T., Suematsu, M., & Tanaka, M. (2020). Starvation causes female-to-male sex reversal through lipid metabolism in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Biology open*, 9(4), bio050054.
11. Lambert, M. R., Stoler, A. B., Smylie, M. S., Relyea, R. A., & Skelly, D. K. (2017). Interactive effects of road salt and leaf litter on wood frog sex ratios and sexual size dimorphism. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 74(2), 141-146.
12. Nemesházi, E., Gál, Z., Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Mikó, Z., Üveges, B., Lefler, K. K., Jeffries, D. L., Hoffmann, O. I., & Bókony, V. (2020). Novel genetic sex markers reveal high frequency of sex reversal in wild populations of the agile frog (*Rana dalmatina*) associated with anthropogenic land use. *Molecular Ecology*, 29(19), 3607-3621.
13. Jeffries, D. L., Lavanchy, G., Sermier, R., Sredl, M. J., Miura, I., Borzée, A., N.Barrow, L., Canestrelli, D., Crochet, P. A., Dufresnes, C., Fu, J., Ma, W. J., Garcia, C. M., Ghali, K., G. Nicieza, A., O'Donnell, R. P., Rodrigues, N., Romano, A., Martínez-Solano, Í., Stepanyan, I., Zumbach, S., Brelsford, A., & Perrin, N. (2018). A rapid rate of sex-chromosome turnover and non-random transitions in true frogs. *Nature Communications*, 9(1), 1-11.
14. Miura, I., Ohtani, H., & Ogata, M. (2012). Independent degeneration of W and Y sex chromosomes in frog *Rana rugosa*. *Chromosome Research*, 20(1), 47-55.
15. Ujhegyi, N., & Bókony, V. (2020). Skin coloration as a possible non-invasive marker for skewed sex ratios and gonadal abnormalities in immature common toads (*Bufo bufo*). *Ecological Indicators*, 113, 106175.
16. Alho, J. S., Matsuba, C., & Merilä, J. (2010). Sex reversal and primary sex ratios in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular ecology*, 19(9), 1763-1773.
17. Lambert, M. R., Tran, T., Kilian, A., Ezaz, T., & Skelly, D. K. (2019). Molecular evidence for sex reversal in wild populations of green frogs (*Rana clamitans*). *PeerJ*, 7, e6449.
18. Xu, Y., Du, Z., Liu, J., Su, H., Ning, F., Cui, S., Wang, L., Liu, J., Ren, C., Di, S., & Bai, X. (2021). Male heterogametic sex determination in *Rana dybowskii* based on sex-linked molecular markers. *Integrative Zoology*.

19. Li, H., Holleley, C. E., Elphick, M., Georges, A., & Shine, R. (2016). The behavioural consequences of sex reversal in dragons. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1832), 20160217.
20. Jones, M. E., Pistevos, J. C., Cooper, N., Lappin, A. K., Georges, A., Hutchinson, M. N., & Holleley, C. E. (2020). Reproductive phenotype predicts adult bite-force performance in sex-reversed dragons (*Pogona vitticeps*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 333(4), 252-263.
21. Bókony, V., Kövér, S., Nemesházi, E., Liker, A., & Székely, T. (2017). Climate-driven shifts in adult sex ratios via sex reversals: the type of sex determination matters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1729), 20160325.
22. Mitchell, N. J., & Janzen, F. J. (2010). Temperature-dependent sex determination and contemporary climate change. *Sexual Development*, 4(1-2), 129-140.
23. Nemesházi, E., Kövér, S., & Bókony, V. (2021). Evolutionary and demographic consequences of temperature-induced masculinization under climate warming: the effects of mate choice. *BMC ecology and evolution*, 21(1), 1-18.
24. Castelli, M. A., Whiteley, S. L., Georges, A., & Holleley, C. E. (2020). Cellular calcium and redox regulation: the mediator of vertebrate environmental sex determination?. *Biological Reviews*, 95(3), 680-695.
25. Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Acosta, O. D. M., Strüssmann, C. A., & Somoza, G. M. (2013). Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. *General and Comparative Endocrinology*, 192, 36-44.
26. Warner, D. A., Radder, R. S., & Shine, R. (2009). Corticosterone exposure during embryonic development affects offspring growth and sex ratios in opposing directions in two lizard species with environmental sex determination. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(4), 363-371.
27. Castelli, M., Georges, A., & Holleley, C. E. (2021). Corticosterone does not have a role in temperature sex reversal in the central bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 335(3), 301-310.
28. Hayes, T. B. (1998). Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *Journal of experimental zoology*, 281(5), 373-399.
29. Denver, R. J. (1998). Hormonal correlates of environmentally induced metamorphosis in the Western spadefoot toad, *Scaphiopus hammondi*. *General and comparative endocrinology*, 110(3), 326-336.
30. Denver, R. J. (2009): Structural and functional evolution of vertebrate neuroendocrine stress systems. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology: Annals of the New York Academy of Sciences*. 1163, 1-16
31. Mikó, Z., Nemesházi, E., Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Ujszegi, J., Kásler, A., Bertalan, R., Vili, N., Gál, Z., Hoffmann, O. I., Hettyey, A., & Bókony, V. (2021). Sex reversal and ontogeny under climate change and chemical pollution: are there interactions between the effects of elevated temperature and a xenoestrogen on early development in agile frogs?. *Environmental Pollution*, 117464.
32. Gosner, K. L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16(3), 183-190.
33. Peng, Y., Kwok, K. H. H., Yang, P. H., Ng, S. S., Liu, J., Wong, O. G., He, M. L., Kung, H. F., & Lin, M. C. (2005). Ascorbic acid inhibits ROS production, NF- κ B activation and prevents ethanol-induced growth retardation and microencephaly. *Neuropharmacology*, 48(3), 426-434.
34. Taylor, B. E., & Brundage, C. M. (2013). Chronic, but not acute, ethanol exposure impairs central hypercapnic ventilatory drive in bullfrog tadpoles. *Respiratory physiology & neurobiology*, 185(3), 533-542.
35. Verebélyi, V., 2017: Barna varangy (*Bufo bufo*) szaporodási sikerének és szennyezőanyag rezisztenciájának összehasonlítása különböző szennyezett élőhelytípusok között. BSc diplomadolgozat, Állatorvostudományi Egyetem, Budapest.
36. Fainsod, A., & Kot-Leibovich, H. (2018). *Xenopus* embryos to study fetal alcohol syndrome, a model for environmental teratogenesis. *Biochemistry and Cell Biology*, 96(2), 77-87.

37. Macikova, P., Groh, K. J., Ammann, A. A., Schirmer, K., & Suter, M. J. F. (2014). Endocrine disrupting compounds affecting corticosteroid signaling pathways in Czech and Swiss waters: potential impact on fish. *Environmental science & technology*, 48(21), 12902-12911.
38. Bókony, V., Ujhegyi, N., Hamow, K. Á., Bosch, J., Thumsová, B., Vörös, J., Aspbury, A. S., & Gabor, C. R. (2021). Stressed tadpoles mount more efficient glucocorticoid negative feedback in anthropogenic habitats due to phenotypic plasticity. *Science of the Total Environment*, 753, 141896.
39. Glennemeier, K. A., & Denver, R. J. (2002). Small changes in whole-body corticosterone content affect larval *Rana pipiens* fitness components. *General and comparative endocrinology*, 127(1), 16-25.
40. Belden, L. K., Moore, I. T., Wingfield, J. C., & Blaustein, A. R. (2005). Corticosterone and growth in Pacific treefrog (*Hyla regilla*) tadpoles. *Copeia*, 2005(2), 424-430.
41. Forsburg, Z. R., Goff, C. B., Perkins, H. R., Robicheaux, J. A., Almond, G. F., & Gabor, C. R. (2019). Validation of water-borne cortisol and corticosterone in tadpoles: Recovery rate from an acute stressor, repeatability, and evaluating rearing methods. *General and comparative endocrinology*, 281, 145-152.
42. Kitano, T., Takamune, K., Kobayashi, T., Nagahama, Y., & Abe, S. I. (1999). Suppression of P450 aromatase gene expression in sex-reversed males produced by rearing genetically female larvae at a high water temperature during a period of sex differentiation in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of Molecular Endocrinology*, 23(2), 167-176.
43. Kitano, T., Hayashi, Y., Shiraishi, E., & Kamei, Y. (2012). Estrogen rescues masculinization of genetically female medaka by exposure to cortisol or high temperature. *Molecular reproduction and development*, 79(10), 719-726.
44. Krain, L. P., & Denver, R. J. (2004). Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Journal of endocrinology*, 181(1), 91-104.
45. Gabor, C. R., Bosch, J., Fries, J. N., & Davis, D. R. (2013). A non-invasive water-borne hormone assay for amphibians. *Amphibia-Reptilia*, 34(2), 151-162.
46. Baugh, A. T., Bastien, B., Still, M. B., & Stowell, N. (2018). Validation of water-borne steroid hormones in a tropical frog (*Physalaemus pustulosus*). *General and comparative endocrinology*, 261, 67-80.
47. Ogielska, M., & Kotusz, A. (2004). Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. *Journal of morphology*, 259(1), 41-54.
48. Bókony, V., Üveges, B., Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Nemesházi, E., Csikvári, O., & Hettyey, A. (2018). Endocrine disruptors in breeding ponds and reproductive health of toads in agricultural, urban and natural landscapes. *Science of the Total Environment*, 634, 1335-1345.
49. Berrill, M., Coulson, D., McGillivray, L., & Pauli, B. (1998). Toxicity of endosulfan to aquatic stages of anuran amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(9), 1738-1744.
50. Pauli, B. D., Coulson, D. R., & Berrill, M. (1999). Sensitivity of amphibian embryos and tadpoles to Mimic® 240 LV insecticide following single or double exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 18(11), 2538-2544.
51. Edginton, A. N., Rouleau, C., Stephenson, G. R., & Boermans, H. J. (2007). 2, 4-D butoxyethyl ester kinetics in embryos of *Xenopus laevis*: the role of the embryonic jelly coat in reducing chemical absorption. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 52(1), 113-120.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni Dr. Bókony Veronikának a sok segítséget, konzultációt és türelmet, amivel segítette ennek a dolgozatnak a létrejöttét. Továbbá köszönöm Dr. Vili Nórának a támogatását a dolgozatommal kapcsolatban. Szeretném megköszönni Dr. Mikó Zsanett és Ujhegyi Nikolett munkáját a kísérlet minden egyes fázisában, illetve Dr. Nemesházi Edina közreműködését a boncolási előkészületeknél és a HRM analízis ismertetésénél. Végül a HRM analízisekkel kapcsolatosan megköszönném Gál Zoltánnak a közreműködését, illetve Dr. Hoffmann Orsolya Ivettnek, aki anyagilag segítette a genetikai ivarmeghatározást.

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapja (OTKA-K135016, ÚNKP-21-5) támogatásával valósult meg.

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Bókony Veronika, mint témavezető nyilatkozom, hogy Kalina Csenge biológus MSc hallgató „A hormonális stressz szerepe az ivarváltás kialakulásában erdei békáknál (*Rana dalmatina*)” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak találom.

Budapest, 2022. 04. 29.

.....
Bó
Dr. Bókony Veronika
témavezető
ATK NÖVI

Témavezetői nyilatkozat

Alulírott Dr. Vili Nóra, mint témavezető nyilatkozom, hogy Kalina Csenge biológus MSc hallgató „A hormonális stressz szerepe az ivarváltás kialakulásában erdei békáknál (*Rana dalmatina*)” című szakdolgozatát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak találom.

Budapest, 2022. április 28.



.....

Dr. Vili Nóra
témavezető

Állatorvostudományi Egyetem,
Ökológiai Tanszék

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: ...KALINA CSENGE.....
Elérhetőség (e-mail cím):.....csengekalina@gmail.com.....
A feltöltendő mű címe: A harmonikus étkezési szokások kialakításának lehetőségei (Kana dietetika).....
A mű megjelenési adatai: Állatorvostudományi Egyetem, Biológia MSc. - diplomadolgozat
Az átadott fájlok száma:1.....

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel):

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

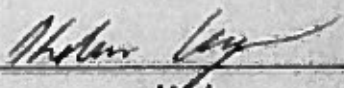
Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA tiszeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2022. év ..*október*.....hó ..*24*...nap


aláírás

szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutya Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatssa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*