

37. OTDK Biológia Szekció
ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM
Zoológiai Tanszék

Hőstressz által indukált ivarváltásra való hajlam összehasonlítása erdei és antropogén területeken élő populációk között erdei békánál (*Rana dalmatina*)

Heat-induced sex reversal in agile frogs (*Rana dalmatina*) from populations living in woodland and anthropogenic habitats

Készítette:

Örkényi Zoltán

Biológia MSc II.

Témavezetők:

Dr. Bókony Veronika

HUN-REN ATK NÖVI Evolúciós Ökológiai Osztály, tudományos tanácsadó

Balogh Emese

Állatorvostudományi Egyetem, Zoológiai Tanszék, PhD hallgató

Budapest, 2025

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
1. Bevezetés.....	4
1.1. Az antropogén környezet-átalakítás és az élővilág alkalmazkodása	4
1.2. A környezet által indukált ivarváltás	5
2. Célkitűzések	9
3. Anyag és módszer.....	10
3.1. Természetvédelmi engedélyek.....	10
3.2. A kísérleti állatok.....	10
3.3. Az ebihalak nevelése	12
3.4. A hőkezelés lebonyolítása	13
3.5. A metamorfózis időszaka, majd a békák nevelése	13
3.6. A boncolás menete.....	14
3.7. Genetikai ivar meghatározása	16
3.8. Statisztikai elemzés	18
4. Eredmények.....	19
5. Következtetések	23
6. Összefoglalás.....	27
7. Summary	29
8. Irodalomjegyzék.....	31
9. Köszönetnyilvánítás	36

Rövidítések jegyzéke

ATK NÖVI: Agrártudományi Kutatóközpont, Növényvédelmi Intézet

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

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

HRM: High Resolution Melting (nagyfelbontású olvadásgörbe analízis)

1. Bevezetés

1.1. Az antropogén környezet-átalakítás és az élővilág alkalmazkodása

Napjainkban fajunk tevékenysége számtalan változást idéz elő környezetében, annak számos aspektusát érintve, melyek közül az egyik legjelentősebb a hőmérséklet. A környezet hőmérsékletének emelkedését az emberi jelenlét számos formában eredményezheti. Ilyen kétségtől a klímaváltozás, mely a hőhullámok intenzitását és gyakoriságát egyaránt fokozza, továbbá a városokban megfigyelhető hősziget hatás („urban heat island effect”) is, melynek keretében a járdákon, utakon, épületeken és más struktúrákon keresztül a nap melege abszorbeálódik, majd visszasugárzódik, hevítve a környezet mikroklimáját. Ez a városi hősziget hatás a léghőmérsékleten túl a helyi víztestek hőmérsékletében is detektálható [1]. Mindezek felül, a természetes, árnyékoló vegetáció hiánya, és az annak kiirtásával megváltoztatott evapotranszpiráció mértéke is lokális felmelegedést okoz a mezőgazdasági és városi területeken [2–4]. Ezek az emberi eredetű, azaz antropogén környezeti eltérések, melyek sokszor érzékenyen érintik az élővilágot, különösen veszélyesek lehetnek a kételtűek csoportjára nézve. E taxon fajainak száma világszerte apad, és közel 40%-uk mára a kihalás küszöbén áll, jelentős természetvédelmi szerepet kölcsönözve számukra [5]. E folyamatban a klímaváltozáson túl főleg az élőhelyek számának csökkenése, a környezetszennyezés, az invazív fajok megjelenése, valamint a kórokozók terjedése játssza a főszerepet [6–8].

Az emberi eredetű környezeti változások mind-mind különféle stresszhatásnak teszik ki bolygónk élővilágát. Annak megértése, hogy e hatások miképp befolyásolják az ökoszisztémát, továbbá, hogy hogyan képes az élővilág alkalmazkodni e változásokhoz, fontos kérdések az ökológia, az evolúcióbiológia, továbbá a természetvédelmi biológia területén. Az élőlények fenotípusának a környezethez való alkalmazkodása több módon történhet, például fenotípusos plaszticitás [9], vagy adaptív evolúció útján [10–12], de akár ezek kombinációja is előfordulhat [13]. Fenotípusos plaszticitásnál ugyanaz a genotípus eltérő környezetben más-más fenotípust alakít ki, míg adaptív evolúció esetében ha egy jellegben örökölhető változatosság van, és a változatok fitnessze egy adott környezetben eltérő, akkor az adott környezetben legnagyobb előnyt biztosító változat (genotípus) terjed el a populációban generációról generációra. Látványos különbség tehát, hogy míg az első jelenségnél csupán fenotípusos elkülönülés van, addig a másodikonál az abbéli eltéréseket genetikai elkülönülés is indokolja. A populációk közti fenotípusos változások mechanizmusainak

felderítésére megfelelő módszert szolgáltat a „common-garden” kísérlet, melynek lényege, hogy azonos körülmények között neveljük föl eltérő környezetből származó, ott eltérő fenotípust mutató populációk egyedeit [3, 13]. Amennyiben az alkalmazkodás evolúciós módon zajlik (a populáció genetikai összetételének generációról generációra történő változásával), az eltérő környezetekben jelenlevő különböző fenotípusok (lokális adaptációk) azonos körülmények közti ontogenezis folyamán is megmaradnak. Viszont, ha fenotípusos plaszticitás útján jönnek létre a populációk közti fenotípusos különbségek (tehát azonos genotípusok hozzák létre a különböző fenotípusokat az aktuálisan tapasztalt környezeti körülmények hatására), akkor közös környezetben nevelkedve e különbségek eltűnnek, nem alakulnak ki az egyedekben.

1.2. A környezet által indukált ivarváltás

Kételtűek esetén, a különféle stresszorok egyik következménye az állatok szexuális fejlődésének befolyásolása lehet. Ehhez elengedhetetlen tudni, hogy a gerincesek körében három fő ivarmeghatározási rendszer létezik: genetikai (amikor csak az egyed genotípusa, például az ivari kromoszómái határozzák meg az ivari fenotípusát), környezeti (amikor a korai egyedfejlődés során a környezet, például a hőmérséklet határozza meg, melyik fenotípusos ivar alakul ki), és e két típus kombinációja [14]. A harmadik formánál a genetikai ivardeterminációt a környezet befolyásolni képes, ezáltal ivarváltást indukálva. Az ivarváltás, angol szaknyelvi néven „sex reversal” lényege, hogy az élőlényben egyedfejlődése korai szakaszában, embrionális vagy lárvális korban tapasztalt környezeti körülmények hatására, az ivari kromoszómáin kódolt genetikai ivarával ellentétes fenotípusos ivar fejlődik ki. Fenotípusos ivar alatt az elsődleges ivarmirigyeket értjük (hímekben herék, nőstényekben petefészkek), melyek a másodlagos szexuális jellegek kialakulását irányítják.

Az ivarváltás megértése, tanulmányozása rendkívüli jelenséggel bír az elméleti munkák alapján várható kulcsfontosságú következményei miatt. Populációk ivararányának eltolódásához vezethet, egyrészt valamelyik fenotípusos ivar felszaporodásán keresztül, másrészt az ivarváltott egyedek utódaiban kialakult ivari kromoszóma gyakoriságok megváltozásával [15]. Ezen felül, az ivarváltott egyedek szaporodása új genotípusok (YY vagy WW) létrejöttét is eredményezheti, melyek életképtelenek vagy sterilek lehetnek [16]. A fenotípusos ivararányok eltolódása csökkentheti a párzóképes, ellentétes ivarú egyedek egymásra találásának esélyét, mely a populáció egyedszámát is csökkentheti, a beltenyésztettség fokozása által pedig az evolúciós alkalmazkodási

potenciált is ronthatja, mely szélsőséges esetben az adott csoportosulás kipusztulását eredményezheti [17].

Az ivarváltást kritikus jelentősége ellenére eddig kevés fajban vizsgálták, mivel az ektoterm gerincesek genotípusos ivarának megállapítása sokszor nehézségekbe ütközik. Ennek oka, hogy hozzá gyakran fajspecifikus markerek kifejlesztésére van szükség [18], továbbá némely esetben az is megesik, hogy fajon belül, különböző populációk között is eltér az ivarmeghatározási rendszer [19]. Végül a fenotípusos ivar megállapítása egyes fajoknál kizárólag ivarérett korban, nászidőszakban lehetséges, viszont azon kívül csupán invazív vagy destruktív módon, gonádjaik vizsgálata által történhet [20].

Az ivarváltás jelenségével ektoterm gerincesek körében találkozhatunk, így a halak, kételtűek és a hüllők csoportjában egyaránt [21–23]. Bekövetkezését számtalan hatás indukálhatja, melyek közül a legismertebb az extrém hőmérséklet, melyből a felső tartomány halakban és kételtűekben többnyire maszkulinizáló hatással bír, míg hüllőknél fajtól függően mind az alacsony, mind a magas hőmérséklet okozhat ivarváltást, és annak iránya is változó a fajok között [24]. Az előző kijelentésre megfelelő példát szolgáltat két gyíkfaj, egyrészt a *Bassiana duperreyi*, mely XX/XY ivari kromoszómarendszerrel bír, és maszkulinizációs ivarváltást (XX hímek) produkál alacsony inkubációs hőmérsékleten, valamint a belföldi szakállasagama (*Pogona vitticeps*), mely az előző példával ellentétesen ZZ/ZW ivari kromoszómarendszerrel rendelkezik, és feminizációval járó ivarváltást (ZZ nőstények) mutat emelkedett inkubációs hőmérsékleti körülmények között [25]. Az említett extrém hőmérsékleten túl ivarváltást egyéb hatások is indukálhatnak, például különböző fajokon végzett laboratóriumi kísérletekben eltolódott fenotípusos ivararányt eredményezett a kiszáradás és vízvesztés [26], az éhezés [27], valamint egyes vegyszerek, például utak jégmentesítésére használt sók használata is [28].

Az ivarváltás proximális okainál kevésbé ismerjük az ultimális mozgatórugóit. Elméleti modellek alapján az ivarváltás a körülményektől függően lehet előnyös, semleges, vagy hátrányos, és a folyamatos környezeti változás szelekciós nyomást gyakorolhat az ivarváltás valószínűségére [29]. Érdemes tehát megvizsgálni, hogy melyek a természetes szelekciónak a feltételei, melyek teljesülése révén az ivarváltásra való hajlam megváltozhat adaptív evolúciós úton. Ezekből az egyik, hogy örökölhető változatosságnak kell lenni a kérdéses tulajdonságban. Erre szolgál például egy teknősnél végzett vizsgálat. A díszes ékszerteknősnél (*Chrysemys picta*) sikeresen

kimutatták az úgynevezett pivotális hőmérséklet heritabilitását, mely érték felett egy fészekaljban főként az egyik, alatta pedig inkább a másik ivar képviselői jelennek meg a hőmérsékletfüggő ivarmeghatározású fajoknál [30]. Ehhez hasonlóan elképzelhető örökölhető változatosság az ivarváltásra való érzékenységben is (pl. abban, hogy milyen magas hőmérséklet okoz ivarváltást az egyedben). A másik feltétel, hogy a kérdéses tulajdonságbéli változatok fitneszének különbözni kell. A hőmérsékletfüggő ivarmeghatározás akkor adaptív, ha az egyedfejlődés kezdetén tapasztalt hőmérséklet eltérően befolyásolja a hímek és a nőstények fitneszét, mint például az alligátorok esetében [31]. Hasonló körülmények között lehet adaptív a környezet által indukált ivarváltás is, azonban erről még nem állnak rendelkezésre empirikus adatok. Néhány faj esetében összehasonlították az ivarváltott egyedek különféle fitneszmutatóit a nem ivarváltott egyedekével, azonban ezek vegyes eredményekre vezettek. Belföldi szakállaságámakon (*Pogona vitticeps*) végzett tanulmány, példának okáért kimutatta, hogy az ivarváltott nőstények szignifikánsan több tojást raknak évente, mint genetikailag is nőstény fajtársaik [32]. Egy másik, halakon végzett tanulmány pedig, mely hormonkezeléssel indukált ivarváltással foglalkozott, felfedte, hogy a gonado-szomatikus index kisebb az ivarváltott egyedeknél, ami csökkent szaporodási sikerre utal [33]. Arra is van példa, amikor sem pozitív, sem negatív irányban nem találtak különbséget az ivarváltott és nem ivarváltott fajtársak fitneszmutatói között, például halak spermiumainak tulajdonságaiban [33].

Amennyiben az ivarváltás nem semleges a fitnesz szempontjából, feltételezhetjük, hogy eltérő mértékű vagy irányú természetes szelekció hat az ivarváltás gyakoriságára azokon az élőhelyeken, amelyek között például az eltérő mikroklíma miatt eltérő gyakorisággal érhetik a fejlődő egyedeket olyan környezeti hatások, amelyek ivarváltást indukálnak. Ilyen esetben, ha az ivarváltásra való hajlamnak van örökölhetősége, az eltérő szelekciós nyomás eredményeként az várható, hogy ennek a hajlamnak a mértéke evolúciósan megváltozik: növekszik ott, ahol előnyös a fitneszre nézve, illetve csökken ott, ahol káros. Ilyen evolúciós elkülönülésre utal az a tanulmány, amelyet egy ausztráliai elevenszülő gyíkfélén (*Carinascincus ocellatus*) végeztek [34]. E fajnál terepi megfigyelésekkel felfedezték, hogy a környezet hőmérsékletének hatása az egyes populációk ivararányára a tengerszint feletti magasság függvényében variál: hegyvidéken a hőmérséklettől függetlenül kiegyenlített az ivararány, míg az alacsonyabb területeken meleg körülmények között több nőstény, míg hidegben több hím születik. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a két populáció evolúciósan elkülönült oly módon, hogy magasszállón nem vagy csak kevésbé érzékeny a

hőmérsékletre az ivarmeghatározás, míg az alacsonyabb területeken a hőmérséklet erős(ebb)en befolyásolja az utódok ivarát. Ennek tesztelésére különböző élőhelyről (alacsony és magas tengerszint feletti magasságról) származó gravid nőstényeket azonos körülmények között, vagy az egyik vagy a másik élőhelyre jellemző hőmérsékleti körülmények között tartottak, a születendő utódok ivardeterminációja szempontjából kritikus periódust is érintve. A vizsgálat során azt találták, hogy a származási élőhely és a hőmérséklet kezelés is befolyásolta az ivarváltás (maszkulinizáció) gyakoriságát (mind az alacsony hőmérséklet, valamint az alacsony tengerszint feletti magasságról való származás növelte azt), de e két tényező interakciója nem volt szignifikáns. A vizsgálat eredményei azt sugallják, hogy az említett két élőhely populációi között van evolúciós divergencia az ivarváltási hajlamban, de nem a hőmérsékleti érzékenységben, ugyanis a hőkezelés egyforma mértékben növelte meg az ivarváltási rátát mindkét származási populáció utódaiban. Hasonló mikroevolúciós változás várható az antropogén területeken is a melegebb mikroklíma miatt, azonban ezt empirikusan még nem vizsgálták egyetlen faj esetében sem.

2. Célkitűzések

Kutatásunk célja a hőstressz által indukált ivarváltásra való hajlam összehasonlítása erdei és antropogén területeken élő populációk között erdei békánál (*Rana dalmatina*). Hipotézisünk, hogy az antropogén területeken a melegebb mikroklíma miatt az ivarváltásra való hajlam mértéke evolúciósan megváltozott a természetes élőhelyeken élő populációkhoz képest. Predikciónk ezek alapján, hogy amennyiben egy „common garden” kísérlet során azonos mértékű hőstressznek teszünk ki eltérő környezetből származó erdei béka egyedeket, azok eltérő mértékben váltanak ivart. A kutatáshoz az említett fajt számos ismert tulajdonsága teszi alkalmassá. E taxon XX / XY ivari kromoszómarendszerrel bír, egyedei pedig hőstressz hatására maszkulinizálódnak, azaz laboratóriumi kísérletek szerint a nőstény genotípusú egyedekben egy lárvakori hőhullámot követően herék alakulnak ki [35]. Terepi megfigyelések alapján a vadon élő populációkban a fenotípusosan hím felnőttek kb. 20%-a genetikailag nőstény, főleg a városi és mezőgazdasági területeken [36]. Vizsgálatunk kérdése tehát ökológiailag releváns a fajban.

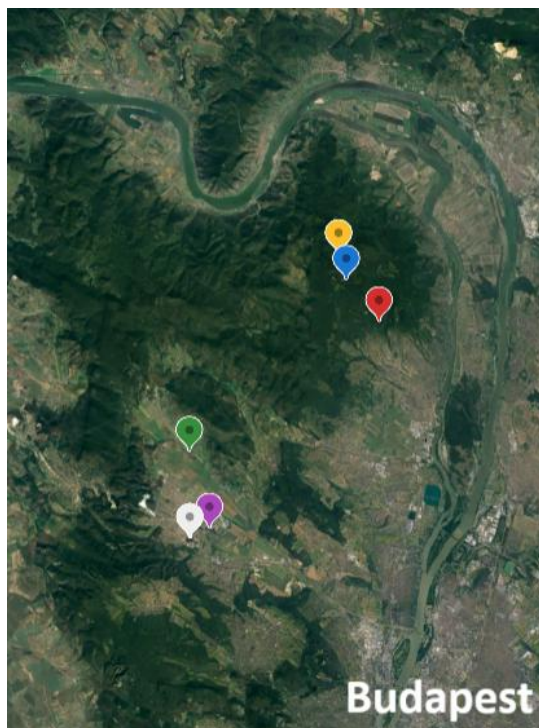
3. Anyag és módszer

3.1. Természetvédelmi engedélyek

Kísérletünket a Pest Vármegyei Kormányhivatal Környezetvédelmi és Természetvédelmi Főosztálya engedélyezte (PE-06/KTF/00754-8/2022, PE-06/KTF/00754-9/2022, PE-06/KTF/00754-10/2022, PE/EA/295-7/2018), továbbá az ATK NÖVI Etikai Bizottsága is jóváhagyta kivitelezését.

3.2. A kísérleti állatok

A kísérlethez az állatok az erdei-antropogén területi felosztásnak megfelelően hat különböző populációból származtak (1. ábra), melyhez populációnként hat családból (petecsomóból) körülbelül 50-50 friss petét gyűjtött kutatócsoportunk 2023. március 13. és 14. között. A fent említett hat populációból három hegyvölgyes erdei élőhelyen található (Felsőhosszúrét: 47°43'37.00" 19°01'02.00", Mélymocsár: 47°42'27.00" 19°02'24.00", Paprét: 47°44'20.00" 19°00'43.00"), míg a további három gyűjtési helyszín olyan tavakból állt, amelyek 500 m-es körzetének legalább 70%-át antropogén területek teszik ki: főleg városi (Pilisvörösvár: 47°36'39.14" 18°55'21.49", Pilisszentiván: 47°36'21.89" 18°54'32.68") illetve mezőgazdasági (Határréti-tó: 47°38'48.20" 18°54'31.25") területek. Ezeken az antropogén helyeken a víztestek hőmérséklete szignifikánsan magasabbnak bizonyult az erdei élőhelyeken tapasztaltakhoz képest a kutatócsoport által elvégzett mérések alapján [37].



1. ábra: A hat populáció földrajzi elhelyezkedése: Felsőhosszúrét (kék), Mélymocsár (piros), Paprét (sárga), Pilisvörösvár (lila), Pilisszentiván (szürke), Pilisszántó (zöld)

Ezután a begyűjtött petéket a kutatócsoport laboratóriumába szállítottuk, ahol az egyes populációk különböző családait egymástól elkülönítve, de azonos körülmények között tartottuk. Ehhez az egyes családok külön műanyag nevelődobozokba ($19 \times 30 \times 15$ cm) kerültek, melyeket 1 cm magasságig töltöttünk fel vízzel. A teljes kísérlet során speciális vizet, ún. RSW-t használtunk, hogy ezáltal biztosítsuk a peték, majd később az ebihalak normális fejlődéséhez szükséges sókoncentrációkat. Ennek előállításához 1 liter reverz-ozmózis szűrőn megtisztított, UV-fénnyel sterilizett csapvízhez a következő sókat adtuk hozzá: 48 mg NaHCO_3 , 30 mg $\text{CaSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 61 mg $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 2 mg KCl, továbbá levegőztetővel biztosítottuk a maximális oxigéntartalmat. A kísérlet során márciustól júliusig a dobozat tartalmazó helység léghőmérsékletét fokozatosan 16-ról 22 °C-ra (átlag $\pm$ szórás: 19.7 ± 1.7 °C) emeltük, továbbá a terem megvilágítási viszonyait a természetes sötét-világos ciklus alapján határoztuk meg.

Mikor az állatok elérték a szabadon úszó fejlődési fázist, mely a Gosner-skála szerint a 25. stádiumnak felel meg [38], elkezdhattuk a kísérletet 2023. március 28-án. Ehhez véletlenszerűen

20-20 egészséges kinézetű ebihalat választottunk ki minden családból, mely összesen 720 egyedet jelentett. A kísérletbe nem választott egyedeket ezután, még ebihal korukban visszaszállítottuk, és szabadon bocsátottuk eredeti származási helyükön.

3.3. Az ebihalak nevelése

A kísérlet során az ebihalakat egyesével két literes műanyag nevelődobozokban tartottuk, melyeket egy liter RSW-vel töltöttünk meg. A dobozok elhelyezését illetően random blokkos elrendezést követtünk (2. ábra), hogy ezáltal biztosítsuk a hat populáció homogén eloszlását a laboratórium polcain. Az állatok vizét hetente kétszer cseréltük, míg táplálékként főzött, aprított spenótot biztosítottunk az ebihalak számára *ad libitum* mennyiségben.



2. ábra: A dobozok random blokkos elrendezése

3.4. A hőkezelés lebonyolítása

Két héttel a kísérlet kezdete után egy hat napos hőkezelés vette kezdetét, mely egy korábban leírt metodikát követett [35]. Ez idő alatt az állatokat két liter RSW-ben tartottuk, melyet a dobozokban kétnaponta cseréltünk, valamint ekkor az állatok etetését is elvégeztük csökkentett spenót porciók adagolása által, hogy így elkerülhessük a víz elszennyeződését, oxigén koncentrációjának csökkenését. A kezelési időszak során a nevelődobozok tizenkettesével egy vízzel teli tálcára kerültek, melynek tartalma vízpumpa által volt keringetve, továbbá a hőkezelt csoportokban akváriummelegítővel melegítve is lett. A víz hőmérséklete a dobozokban a kezelés során 27.7 ± 0.4 (átlag $\pm$ szórás) °C volt a hőkezelt állatoknál, míg a kontroll csoport esetében ez az érték 18.2 ± 0.4 (átlag $\pm$ szórás) °C volt. A kezelés során minden családból véletlenszerűen tíz-tíz ebihal lett a hőkezelt és kontroll csoporthoz rendelve, mely elrendezés összesen 60 hőkezelt, és 60 kontroll ebihalat jelentett tavanként (populációnként). A hat nap letelte után az állatokat újra a fejlődésük első két hetében leírt módszerrel gondoztuk átalakulásuk kezdetéig.

3.5. A metamorfózis időszaka, majd a békák nevelése

Az állatok átalakulásának, metamorfózisának kezdetét a mellső lábak kibújása jelentette, mely a Gosner-féle skálán a 42-es stádiumnak felel meg. Ekkor vizüket 0.1 liter RSW-re cseréltük, dobozuk egyik oldalát pedig nagyjából 2 cm-rel megemeltük, hogy így biztosítsunk az állatoknak mind vizes, mind száraz életteret. Az említetteken felül a dobozok nyitott tetejét lyukakkal borított, fényáteresztő fedőkkel is elláttuk. A metamorfózis ideje alatt az állatok nem kaptak élelmet, ugyanis ilyenkor nincs szükség erre, tekintve, hogy ekkor alakulnak át a szájképletek is.

Mikor az átalakulás teljesen végbement (teljes farok visszaszívás; 46-os stádium), az egyedeket új, korábbival megegyező, fedeles dobozba helyeztük, melynek alját nedves papírtörkövel béleltük, továbbá fedezék gyanánt karton tojástartó darabok is kerültek a dobozokba. A békák ekkor ugyanolyan laboratóriumi körülmények között voltak tartva, mint ebihal korukban, így hetente kétszer, az eredeti vízcsere időpontjában lettek etetve, ellátva *ad libitum* apró (2-3 mm-es) tücskökkel (*Acheta domestica*), melyeket előzetesen meghintettünk 3:1 arányú Reptiland 76280 (Trixie Heimtierbedarf GmbH & Co. KG, Tarp, Németország) és Promotor 43 (Laboratorios Calier S.A., Barcelona, Spanyolország) keverékkel, hogy így biztosítsuk az állatok szükséges vitamin, ásványi anyag és aminosav adagját. Az első pár hétben a tücskök mellett kiegészítésképpen

ugróvillások is a táplálék részét képezték, továbbá, hogy elkerüljük a békák esetleges kiszáradását, minden etetés előtt RSW-vel bespricceltünk dobozaikba.

3.6. A boncolás menete

Az állatok túlaltatását, majd fenotípusos szexálását 9-12 héttel metamorfózisuk lezajlása után végeztük, mikorra az egyes ivarokra jellemző gonádok megfelelően kialakultak, könnyedén tanulmányozhatóvá váltak [39]. Boncolás előtt az állatokat túlaltattuk 6 g/L-es MS222 oldatban, mely folyamat legalább egy órán keresztül tartott a biztos eutanizálás elérése érdekében (3. ábra). Az altatószerhez a pH semlegesítése végett azonos mennyiségű NaH_2PO_4 sót adtunk. Az állatok túlaltatását követően a DNS mintavételezésre került sor, melyhez az állatok mindkét hátsó lábfejét 96 %-os etanolt tartalmazó eppendorf csőbe helyeztük, lángsterilezett ollót és csipeszt használva. A későbbiekben e testrészekből történt a DNS kivonása, majd az azt követő genetikai ivarmeghatározás. A DNS mintavételezés kivitelezését követően felboncoltuk a testeket, és megvizsgáltuk a belső szerveket APOMIC SHD200 digitális mikroszkóp alatt. Az ivarmirigyek mikroszkóp alatt látható külső megjelenése alapján rögzítettük, hogy az állat herével, vagy petefészekkel bír (4. ábra), meghatározva fenotípusos ivarát. Az állatok nevelése, illetve a velük folytatott kísérletek kivitelezése során, a kezdeti 720 egyedből végül 438 jutott el a boncolásig, maradt addig életben, mely szám 282 egyed elhullását jelentette. A mortalitás mindkét kezelési csoportban hasonló volt (kontroll: 134, hőkezelt: 148), ugyanakkor az antropogén eredetű populációkban jóval tekintélyesebb mértékű pusztulás volt tapasztalható, mint az erdei populációkban (1. táblázat).



3. ábra: Az altatószerben eutanizált békák



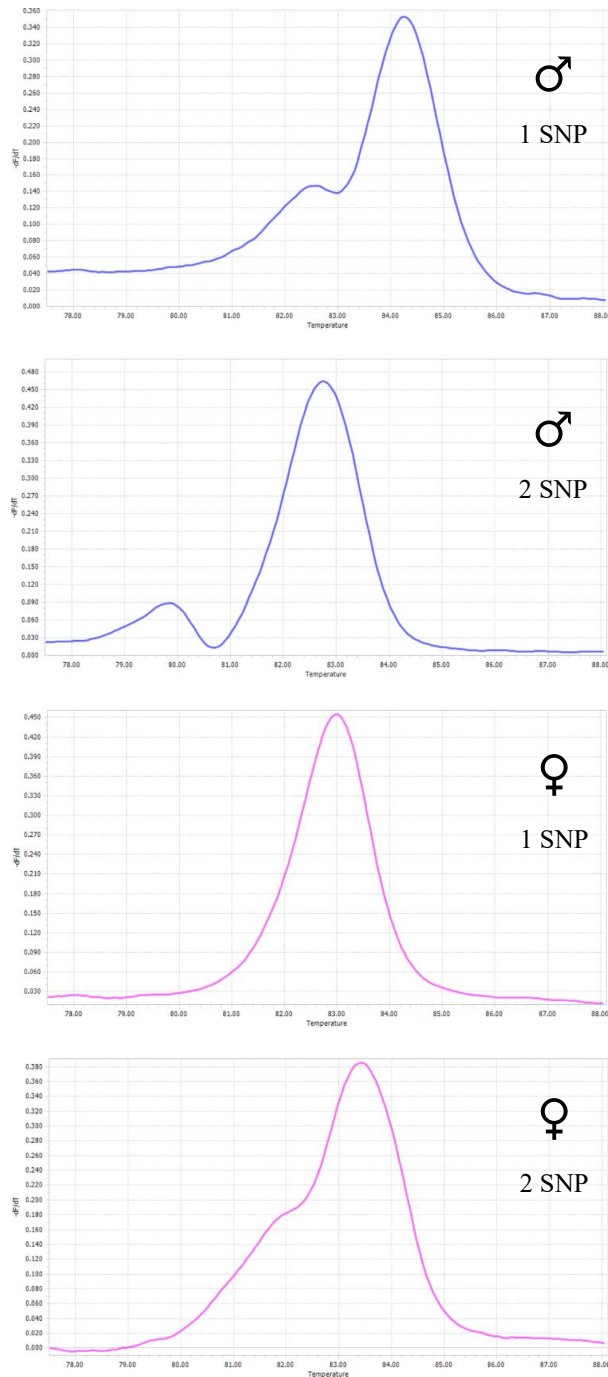
4. ábra: Erdei béka gonádok 16× nagyításnál: normál petefészkek (o), normál herék (t); zsírtestek (f) [36]

1. táblázat: Túlélés az egyes élőhelyek különböző populációiban

Élőhely	Erdi			Antropogén		
Populáció	Felsőhosszúréti	Papréti	Mélymocsári	Határréti	Pilisvörösvári	Pilisszentiváni
Túlélés	79	92	91	49	80	47

3.7. Genetikai ivar meghatározása

A DNS izolálást az előzetesen 96%-os etanolba rakott hátsó lábfejek egyikéből végeztük el, a másikat meghagyva a későbbi, esetlegesen felmerülő izolálási hibák korrigálására. A DNS kivonás E.Z.N.A. Tissue DNA Kit (Omega) segítségével történt, követve a gyártó utasításait, leszámítva, hogy az emésztési időt egy éjszakára meghosszabbítottuk. Az izolálást követően szükség volt a minták DNS koncentrációinak megállapítására, melyet NanoDrop spektrofotométer segítségével mértünk be. Erre a lépésre azért volt szükség, hogy a kapott értékek alapján, megfelelő fokú hígítást alkalmazva, mindegyik egyed izolátumának DNS koncentrációját egységes szintre hozzuk. A genotípusos ivar azonosításához a DNS mintákat egy nemrégiben publikált, erdei békára kifejlesztett molekuláris marker segítségével teszteltük, követve a cikkben leírt protokollt [36]. Ennek során az izolátumokat Rds3-HRM-F/R markerre ($\geq 95\%$ -os ivarhoz kötöttség) teszteltük, amihez nagyfelbontású olvadásgörbe (HRM) analízist alkalmaztunk, mivel a HRM lehetővé teszi az SNP-k (egypontos nukleotid-polimorfizmus) kimutatását az olvadási hőmérséklet pontos meghatározásával, így biztosítva az egyes genotípusok gyors és precíz megkülönböztetését. A reakciókat Roche LightCycler® 96 qPCR készüléken futtatuk, az eredményeket pedig a LightCycler 96 v.1.1.0.1320 szoftverrel (Roche Diagnostics International LTD) elemeztük (5. ábra). Azokat az egyedeket, melyeknél a fenotípusos ivar nem egyezett a marker által jelzett genetikai ivarral, ivarváltottnak nyilvánítottuk.



5. ábra: HRM-alapú genotipizálás az Rds3 markerrel a LightCycler 96 v.1.1.0.1320 szoftver „Normalized Melting Peaks plot” nevű ábrája alapján. A kék színű görbék az XY, a rózsaszínűek pedig az XX genotípusokat reprezentálják. Mindkét ivar esetében megfigyelhető egy második, nem ivarhoz kötött SNP is a marker által amplifikált szakaszon, ami megváltoztatja a görbék alakját. Ez lehetővé teszi négy különböző genotípus (1 SNP hím, 2 SNP hím, 1 SNP nőstény, 2 SNP nőstény) megkülönböztetését.

3.8. Statisztikai elemzés

A vizsgálathoz tartozó elemzést, melynek egységei az egyes erdei béka egyedek voltak, R szoftverrel végeztük [40]. Kérdéseink megválaszolására általánosított lineáris kevert modellt alkalmaztunk, melynek felállításához az lme4 csomag glmer függvényét használtuk [41], míg az előzetes modelldiagnosztikához a DHARMA csomag simulateResiduals parancsát vettük igénybe [42].

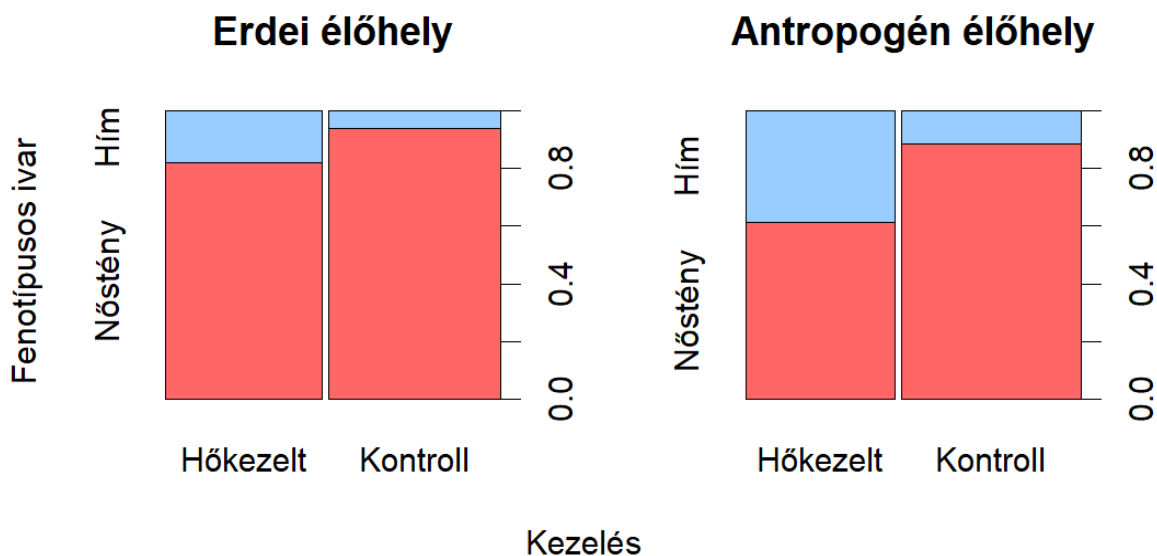
Először több, szám szerint három darab potenciális modellt állítottunk fel (kizárólag az XX egyedek, azaz genetikai nőstények körére, mivel csak itt következhet be maszkulinizáció, így biztosítva az ivarváltásra vonatkozó kérdések pontos vizsgálatát), melyek közül modellszelekciós eljárással („likelihood ratio” tesztekkel, majd az AIC értékek bírálatával) választottuk ki a legmegfelelőbbet. A három modell egymástól csupán a random faktorok tekintetében tért el: az egyik modell csak a családot, a másik csak helyet (populációt), a harmadik pedig ezek mindegyikét tartalmazta, a család random hatását a populáció random hatásába ágyazva. Modelljeinkben a hibaeloszlás binomiális volt, ugyanis függő változóként az állatok fenotípusos ivarát (hím / nőstény) adtuk meg. A magyarázó változók közül fix faktornak a kezelést (kontroll / hőkezelt) és az élőhelyet (erdei / antropogén) választottuk, melyek hatásának interakciójára voltunk elsősorban kíváncsiak. Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a modellszelekció során választott modellünk illesztésének minden statisztikai feltétele teljesül a diagnosztika alapján, kiértékelhettük az eredményeket, melyek elbírálásakor 5%-os szignifikancia küszöböt vettünk alapul.

4. Eredmények

A vizsgálat során a sikeresen genotipizált 438 egyed alapján kiderült, hogy az Rds3 marker alapján 187 nőtény és 213 hím esetében megegyezett a fenotípusos ivar a genotípusos ivarral, 38 egyed pedig ivarváltottnak bizonyult (2. táblázat). Bár mind az erdei, mind az antropogén populációk esetében a kontroll és a hőkezelt csoportban is egyaránt detektálható volt bizonyos mértékű ivarváltás, a hőkezelt csoportokban ez a jelenség mindig gyakoribbnak bizonyult (6. ábra). Továbbá az antropogén populációkban mind kontroll, mind hőkezelt kezelésben nagyobb mértékű ivarváltási ráta volt detektálható, mint az erdei élőhelyről származó egyedek megfelelő kezelési csoportjaiban (2. táblázat, 6. ábra).

2. táblázat: A genetikai és fenotípusos ivar három kombinációjának megoszlása származási élőhely és kezelési csoport függvényében

Élőhely		Erdei		Antropogén	
Kezelési csoport		Kontroll	Hőkezelt	Kontroll	Hőkezelt
Genotípus - fenotípus kombináció	XX hím (ivarváltott)	4	11	6	17
	XX nőtény	63	50	47	27
	XY hím	61	73	45	34



6. ábra: Az egyes fenotípusos ivarok relatív megoszlása származási élőhely és kezelési csoport függvényében az XX nőstények között

A kezdeti három potenciális modell vizsgálatánál ahhoz a modellhez viszonyítva, melyben mind a család, mind a helyszín (populáció) szerepelt random faktorként, a helyszín elhagyása nem rontott a modell illeszkedésén (az AIC 187.75-ről ugyan 185.75-re csökkent, de a likelihood ratio teszt alapján ez a különbség nem volt szignifikáns: $p > 0.9994$), azonban a család elhagyása igen (az AIC 187.75-ről 193.96-ra nőtt, $p = 0.004$). Ezen eredmény jelzi, hogy a családok között jelentős eltérések vannak az ivarváltási gyakoriságban. A leírtakra alapozva, végül csak a családot tartottuk meg random faktorként végleges modellünkben.

Amennyiben a modell eredményeit áttekintjük (3. táblázat), láthatjuk, hogy az 6. ábrával összhangban szignifikáns különbség detektálható az ivarváltási rátában a hőkezelt és a kontroll csoport között, az előbbiek javára (4-5. táblázat). Az antropogén területekről származó egyedekben magasabb a maszkulinizáció valószínűsége, mint az erdei élőhelyekről származó egyedeknél (5. táblázat), de ez a különbség csak marginálisan szignifikáns (3. táblázat). A kezelés és az élőhely interakciója nem szignifikáns (3. táblázat), ami azt jelenti, hogy a hőstressz hasonló mértékben növelte az ivarváltási rátát az antropogén és az erdei élőhelyekről származó egyedek esetében.

3. táblázat: A genetikai és fenotípusos ivar három kombinációjának megoszlása származási élőhely és kezelési csoport függvényében

Fix hatás	χ^2	Szabadsági fok	P-érték
Kezelés	12.2593	1	0.0005
Származási élőhely	3.2280	1	0.0724
Kezelés - Élőhely interakció	0.2495	1	0.6174

4. táblázat: Az XX nőstények XX hímmé való átalakulásának (maszkulinizációjának) valószínűsége, továbbá az ehhez tartozó standard hiba és 95%-os konfidenciaintervallum (K.I.) a binomiális kevert modell becslése alapján

Származási élőhely	Kezelési csoport	Ivarváltási valószínűség	Standard hiba	K.I. alsó határa	K.I. felső határa
Erdei	Hőkezelt	0.1267	0.0568	0.0504	0.284
	Kontroll	0.0372	0.0241	0.0102	0.126
Antropogén	Hőkezelt	0.3284	0.1057	0.1605	0.556
	Kontroll	0.0771	0.0418	0.0258	0.209

5. táblázat: Az XX nőtények XX hímmé való átalakulásának (maszkulinizációjának) esélyhányadosa a hőkezelt csoportban a kontroll csoporthoz viszonyítva, továbbá az ehhez tartozó standard hiba a binomiális kevert modell becslése alapján.

Származási élőhely	Összehasonlítás	Esélyhányados	Standard hiba	P-érték
Erdei	Hőkezelt / Kontroll	3.75	2.48	0.0458
Antropogén	Hőkezelt / Kontroll	5.85	3.52	0.0033

5. Következtetések

Kísérletünkben szignifikáns különbséget detektáltunk erdei békák ivarváltási rátájában a hőkezelt és a kontroll csoport között az első csoport javára: a hőstressznek kitett csoportban a genetikailag nőstény egyedek kb. 27%-a fenotípusos hímmé fejlődött. Ehhez hasonló eredményről számolt be egy korábbi tanulmány is [35], melyben ugyanolyan korú ebihalakat tettek ki hőstressznek, mint a dolgozatomban bemutatott vizsgálatban, és $\geq 94\%$ -os maszkulinizációt tapasztaltak. A számszerű különbség egyik oka lehet, hogy a mi átlagosan $27,7^{\circ}\text{C}$ -os beállításunk (kontroll: $18,2^{\circ}\text{C}$) helyett az állatok $28,1$ illetve 30°C -os hőkezelésben (kontroll: 19°C) részesültek az előző kísérletben. További eltérés volt, hogy e munkában az állatok bár szintén Pest vármegyéből származtak, a konkrét származási populációk eltértek a két vizsgálat között. Kísérletünk által további megerősítést nyert az a megfigyelés, hogy az erdei békákat hőstressz hatására fokozott maszkulinizációs ivarváltási ráta jellemzi. Ezen felül vizsgálatunkban nemcsak a hőkezelt, de a kontroll csoportban is tapasztalható volt némi ivarváltás, csakúgy, mint a kutatócsoportunk két korábbi vizsgálatában [35, 43]. Ez a megfigyelés arra utal, hogy bizonyos egyedek akár viszonylag stresszmentes körülmények között is válhatnak ivart, azaz létezik egyfajta intraspecifikus változatosság az ivarváltási hajlamban a vizsgált fajon belül. Bár e vizsgálatokban a kontroll csoportban ki lett zárva a hő- illetve a kémiai stressz, egyéb zavaró hatások továbbra is megmaradtak ebben az ivarmeghatározás szempontjából kritikus egyedfejlődési periódusban. Például a vízcserek és etetések alkalmával történő emberi zavarás is jelenthetett az állatoknak egyfajta predációs stresszt, vagy a nevelődobozok kis méretéből eredő bezártságot is érzékelhették stresszhatásként. Lehetséges, hogy a kontroll csoport néhány egyede ezek hatására váltott ivart, feltehetőleg fokozott érzékenység miatt.

Másik eredményünk, hogy az antropogén területekről származó egyedekben magasabb volt a maszkulinizáció valószínűsége, mint az erdei élőhelyekről származó egyedeknél, bár ez a különbség csak marginálisan tekinthető szignifikánsnak. Ehhez hasonló trendről számolt be a kutatócsoportunk egy korábbi tanulmánya is, amely a glükokortikoidok (e faj esetében kortikoszteron) szerepét tesztelte az ivarváltás folyamatában, két városi és két erdei populációból származó erdei békákat vizsgálva (melyek nem egyeznek meg a jelen kísérletben vizsgált populációkkal). Ennek során az ivarváltási ráta a városi populációk esetében a mi eredményeink tükrözte trendet követve, viszont azzal ellentétben szignifikánsan jelentősebbnek bizonyult, mint az erdei származású fajtársaknál [43]. Vizsgálatunk, illetve a korábbi „common garden” kísérlet

eredményei arra utalnak, hogy az ivarváltásra való hajlam erősebb az antropogén populációkban, mint a természetes erdei élőhelyek esetén. Ez alapján feltételezhető, hogy megkezdődött egy mikroevolúciós divergencia az antropogén és erdei populációk között az ivarváltási hajlamban. Megjegyzendő, hogy efféle több generáción átívelő alkalmazkodás nemcsak mikroevolúciós módon, azaz a genetikai differenciálódás útján történhet, hanem epigenetikai, vagy egyéb transzgenerációs plaszticitási mechanizmusok formájában egyaránt [44]. Ezen felül azt is érdemes szem előtt tartani, hogy mikroevolúció nemcsak természetes szelekció útján történhet. A változás a vizsgált jellegben lehet neutrális vagy szélsőséges esetben akár maladaptív is az élőlényre nézve [44]. Ez utóbbi forgatókönyvek különösen azon városi populációk esetében elképzelhetőek, melyek meglehetősen izoláltak egymástól az élőhelyek fragmentációja miatt [45, 46], és így például a környezeti stresszre hiperérzékeny genotípusok gyakoribbak lehetnek az alapító vagy palacknyak hatás és a beltenyésztettség eredményeként. Kutatásunk következő lépéseként fontos lenne megvizsgálni a jövőben, hogy az ivarváltás a fitnessre nézve előnyös, semleges, vagy éppen káros, hogy így eldönthessük, hogy amennyiben történik mikroevolúciós divergencia az ivarváltási hajlamban az élőhelyek között, az adaptív-e. Az erdei békáknál eddig csak közvetett adatok álltak rendelkezésre ennek a kérdésnek a vizsgálatához. A kutatócsoportunk egy korábbi tanulmánya, mely a fitnesszel kapcsolatos tulajdonságokat az állatok korai életszakaszában vizsgálta fogságban, sem egyértelműen előnyös, sem egyöntetűen káros eltéréseket nem talált az ivarváltott egyedekben a nem ivarváltott fajtársakhoz képest, hanem végül azt a hipotézist fogalmazta meg, hogy az ivarváltás fitnessre gyakorolt hatása annak etiológiájától függ [47]. Azonban egyértelmű választ a kérdésre csak a szabadon élő állatok túlélésének és szaporodási sikerének éveken át tartó vizsgálatával kaphatunk majd.

A kezelés és az élőhely interakciója nem lett szignifikáns vizsgálatunkban, ami arra utal, hogy a hőstressz által indukált ivarváltásra való érzékenység hasonló mértékű az antropogén és az erdei élőhelyekről származó állatok esetében, tehát feltehetőleg nem történt mikroevolúciós divergencia az ismertetett állományok között abban, hogy hőhullám hatására milyen mértékben növekszik meg az ivarváltás valószínűsége a kontroll csoportban megfigyelt "alap" valószínűséghez képest. Másként fogalmazva: bár az antropogén területeken élő populációkban magasabb az ivarváltási hajlam, mint a természetes területeken, ez a különbség hasonló mértékű a két élőhelytípus között a lárvakorban tapasztalt hőmérséklettől függetlenül: akár éri hőstressz az ebihalakat, akár nem. Ezt többféle indokkal is magyarázhatjuk. Egyrészt, elképzelhető, hogy nincs szükség az ivarváltásra

való érzékenység efféle modulációjára, mivel nem hat rá szelekció, az állatok fitneszt nem befolyásolja az ivarváltás, így neutrális tulajdonság a vizsgált populációkban az, hogy a hőstressz hatására milyen valószínűséggel történik maszkulinizáció. Ennek teszteléséhez olyan vizsgálatra lesz szükség, amely összehasonlítja a hőstressz hatására ivart váltott egyedek fitneszt az ugyanolyan hőstresszt átélő, de nem maszkulinizált egyedek fitneszével. Másrészt az is lehetséges, hogy hiába lenne rá szelekció, nincs az ivarváltás hőmérsékletre való érzékenységének örökölhetősége, azaz nincs genetikailag kódolva ez a tulajdonság. Ez az elképzelés azért számít megkérdőjelezhetőnek, ugyanis esetünkben a család-hatás szignifikánsnak mutatkozott, jelezve, hogy bizonyos testvércsoportok kisebb vagy nagyobb mértékben váltanak ivart függetlenül a kezelés típusától. Ez az eredmény arra utal, hogy lehet örökölhetőség az ivarváltási hajlamban. Ez alapján elképzelhető, hogy az ivarváltás hőmérsékletre való érzékenysége is genetikailag kódolt legyen. Ez utóbbit viszont nem tudtuk jól kimérni, mert túl alacsony volt az egyedszám, a mortalitás miatt számos egyed kiesett a vizsgálatból. Mivel az ivarváltási hajlamot csak a genetikailag nőstény egyedek fenotípusos ivarával tudjuk mérni, ami egy bináris változó, igen nagy mintaszám szükséges annak megfelelő statisztikai erővel történő teszteléséhez, hogy a testvércsoportok között különbözik-e (ismételhető-e) a hőkezelésre adott válasz mértéke; ehhez további vizsgálatok szükségesek. Harmadrészt az is lehetséges, hogy, amennyiben az ivarváltás nem neutrális a fitneszre, továbbá az ivarváltás hőmérsékletre való érzékenysége is genetikailag kódolt, valami lassítja, akadályozza a mikroevolúciót. Például, túl kevés idő telt el mikroevolúciós divergencia kialakulásához azóta, hogy a klímaváltozás révén a hőhullámok gyakorisága és mértéke az antropogén élőhelyeken elérte azt (az erdeiekhez képest magasabb) szintet, ami a szabadon élő populációkban már elég gyakorivá teszi az ivarváltást ahhoz, hogy érvényesülhessen rá a természetes szelekció. Ez már csak azért is lehetséges, mert az erdei béka generációs ideje viszonylag hosszabb, átlagosan 2-3 év, és az állatok ivarérettségüket is hímek esetében legkorábban 1-2, nőstények esetében 2-3 évesen érik el [48]. Az időbeli korlát mellett, tovább gátolhatja a mikroevolúciós elkülönülést a populációk közötti génáramlás, mely kiegyenlítheti a szelekció által felhalmozott különbségeket a különböző állományok között. Erre azért van lehetőség, mert bár a faj többnyire filopatikus, azaz ugyanoda tér vissza szaporodni, amely víztestből származott, előfordulnak olyan egyedek is, melyek képesek komolyabb, akár >1 kilométeres távolságok megtételére [49], így előfordulhat, hogy egy erdei populációból származó egyed egy városi populációban szaporodik, vagy épp fordítva. Ugyanakkor az antropogén területek fragmentáció

általi izoláltsága miatt feltételezhetjük, hogy az ilyen génáramlás az erdei béka populációi között meglehetősen ritka, például az autóutak jelentős migrációs barriert jelentenek a faj számára [45].

Munkám eredményeit összegezve, mivel az ivarváltási hajlamnak valószínűleg van genetikai komponense (melyre a testvércsoportok közt jelentősen eltérő mértékű ivarváltás utal), teljesíti a természetes szelekció általi adaptáció feltételei közül az egyiket. Ezáltal, ha a másik feltétel is fennáll, tehát ha az antropogén hőmérsékletváltozás szelekciós nyomást gyakorol az ivarváltási rátára, a populációk evolúciósan alkalmazkodhatnak ehhez úgy, hogy megváltoztatják a hőstresszre adott válaszukat (azt, hogy milyen mértékben nő az ivarváltás valószínűsége hőhullám hatására). Eredményeink szerint a hazai populációkban ilyen változás még nem következett be, ám a klímaváltozás folytatódása esetén potenciálisan végbe mehet. A vizsgálatunkban megfigyelt trend alapján az ivarváltásra való hajlam (a lárvakorban tapasztalt hőmérséklettől függetlenül) magasabb az antropogén területekről származó populációkban, és feltételezhető, hogy ez az élőhelyükön gyakrabban előforduló hőhullámok következtében nagyobb számú ivarváltást eredményez ott, mint a természetes élőhelyeken. Egy másik, szintén a kutatócsoportunk tagjai által elvégzett tanulmány hasonló megállapításra jutott. Ez terepen begyűjtött felnőtt egyedeken alapult, és ivarváltási mutatóként a fenotípusos hímek között mérte az XX genotípusúak arányát, így jellemezve az ivarváltási rátát 11 hazai erdei béka populációban. E módszereket alkalmazva kimutatta, hogy az antropogén területi lefedettség (a tó 500 m-es körzetében a városi és mezőgazdasági területek arányának) növekedésével szignifikánsan nő a maszkulinizált egyedek aránya [36]. Érdekes módon, ugyanezek az élőhelyek egy másik fajt, a barna varangyot (*Bufo bufo*) vizsgálva, az antropogén lefedettség nem függött össze az ivarváltási rátával, mely a szabadon élő felnőtteknél igen ritkának adódott [50]. Ráadásul a barna varangyok esetében az állatokat lárválisan egy „common garden” kísérletben két gyakori ösztrogénikus szennyezőanyagnak kitéve, nem volt tapasztalható különbség a feminizációs ivarváltási gyakoriságban az antropogén és természetes élőhelyek között [50]. Tehát mind a fajok között, mind a fajkon belül különbségek lehetnek az ivarváltásra való hajlamban, és ezeknek a különbségeknek természetvédelmi jelentősége is lehet, ezért fontos lenne további vizsgálatokkal az okokat és a következményeket feltárni.

6. Összefoglalás

Az emberi tevékenység nyomán számos változás indukálódik a környezetben, melyek biológiai következményeinek megértése az ökológia és a természetvédelem fontos céljai közé tartozik. Az emberi eredetű változások közismert formája az élettérek (levegő, víz, szárazföld) hőmérsékletének emelkedése, például a városi hősziget hatás és az árnyékoló vegetáció hiánya révén. E mikroklimatikus változások különösen érzékenyen érintik a természetvédelmileg oly fenyegetett kételtűeket, többek között azért, mert az egyedfejlődésük korai szakaszában tapasztalt szélsőséges hőmérsékletek hatására ivarváltáson eshetnek át. Az ivarváltott egyedek fenotípusos ivara eltér a genotípusos ivaruktól, ami hatással lehet a fitnessükre és ezáltal a populációdinamikára is. Mivel az antropogén környezet gyakrabban okozhat ivarváltást, szelekciós nyomást gyakorolhat az ivarváltási hajlamra, így az megváltozhat mikroevolúció vagy fenotípusos plaszticitás útján. Vizsgálatunkban arra a kérdésre kerestük a választ, hogy eltér-e az antropogén és erdei élőhelyek között az ivarváltási hajlam mikroevolúciós adaptáció eredményeként erdei békák (*Rana dalmatina*) populációiban. Ebben az XX/XY ivari kromoszóma rendszerű fajban a lárvakori hőstressz hatására az XX nőstényekből fenotípusos hímek fejlődnek ki, és ilyen ivarváltott egyedek viszonylag nagy arányban fordulnak elő a vadon élő populációkban, főleg a városi és mezőgazdasági területeken. A kísérletünk során azonos körülmények között neveltünk fel három erdei és három antropogén élőhelyről származó egyedeket pete koruktól az átalakulás utáni két hónapos korig. Az állatok felét a lávafejlődés 3. hetében hatnapos hőstressznek tettük ki, majd összehasonlítottuk az ivarváltási arányokat. Ahogy vártuk, magasabb volt az ivarváltási arány a hőkezelt (26,67%), mint a kontroll csoportban (8,33%), azonban a hőkezelésnek ez a hatása hasonló mértékű volt mindkét élőhelytípusból származó egyedeknél (a kezelés és a származási élőhelytípus interakciójának nem volt szignifikáns hatása). Az antropogén populációk esetében mind a hőkezelt, mind a kontroll csoportban kb. 2,33-szor gyakoribb volt az ivarváltás, mint az erdei populációk megegyező csoportjaiban, bár ez a különbség csak marginálisan volt szignifikáns. Az egyes testvércsoportok között viszont jelentős variabilitást tapasztaltunk az ivarváltási rátában. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy az erdei békáknál az ivarváltásra való hajlam mértéke örökölhető és az antropogén populációkban magasabb, ami az élőhelyükön gyakrabban előforduló hőhullámok következtében nagyobb számú ivarváltást eredményez ott, mint a természetes élőhelyeken. Az, hogy az antropogén területekről származó egyedek kontroll és hőkezelt körülmények között is magasabb ivarváltási rátát produkáltak, mint az erdeiek,

mikroevolúciós elkülönülésre utal a két élőhelytípus között, azonban további vizsgálatok szükségesek annak kiderítésére, hogy ez a fokozott ivarváltási hajlam adaptív-e.

7. Summary

Human activities induce numerous changes in the environment, and understanding the biological consequences of these changes is one of the key goals of ecology and conservation. A well-known form of human-induced change is the increase in the temperature of habitats (air, water, land), for example, due to the urban heat island effect and the lack of shading vegetation. These microclimatic changes particularly affect amphibians, which are already highly threatened in terms of conservation, partly because extreme temperatures experienced during the early stages of their development can lead to sex reversal. In sex-reversed individuals, the phenotypic sex differs from their genotypic sex, which can impact their fitness and thus population dynamics. Since anthropogenic environments may more frequently cause sex reversal, they can exert selective pressure on the propensity for sex reversal, potentially altering it through microevolution or phenotypic plasticity. In our study, we tested whether the propensity for sex reversal differs between agile frog (*Rana dalmatina*) populations from anthropogenic and forest habitats as a result of microevolutionary adaptation. This species has XX/XY sex chromosome system, and heat stress during the larval stage results in XX females developing into males. Such individuals are found at relatively high rates in wild populations, especially in urban and agricultural areas. In our experiment, we raised individuals from three forest and three anthropogenic habitats under identical conditions, from the eggs until two months after metamorphosis. Half of the animals were exposed to six days of heat stress during the third week of larval development, after which we compared the sex-reversal rates. As expected, the sex-reversal rate was higher in the heat-treated (26.67%) than in the control group (8.33%). However, the effect of heat treatment was similar in both habitat types (the interaction between treatment and habitat type had no significant effect). In the anthropogenic populations, sex reversal was approximately 2.33 times more frequent in both the heat-treated and control groups compared to the corresponding groups in forest populations, although this difference was only marginally significant. We also observed significant variability in sex-reversal rates among sibling groups. Our results suggest that the propensity for sex reversal in agile frogs is heritable and higher in anthropogenic populations, which results in more frequent sex reversal due to the higher incidence of heatwaves in their habitats compared to natural habitats. The fact that individuals from anthropogenic areas produced higher sex-reversal rates under both control and heat-treated conditions than those from forests suggests microevolutionary divergence

between the two habitat types. However, further research is needed to determine whether this increased propensity for sex reversal is adaptive.

8. Irodalomjegyzék

1. Brans KI, Engelen JM, Souffreau C, De Meester L (2018) Urban hot-tubs: Local urbanization has profound effects on average and extreme temperatures in ponds. *Landscape and Urban Planning* 176:22–29
2. Brans KI, Jansen M, Vanoverbeke J, Tüzün N, Stoks R, De Meester L (2017) The heat is on: Genetic adaptation to urbanization mediated by thermal tolerance and body size. *Global Change Biology* 23:5218–5227. <https://doi.org/10.1111/gcb.13784>
3. Diamond SE, Chick L, Perez ABE, Strickler SA, Martin RA (2017) Rapid evolution of ant thermal tolerance across an urban-rural temperature cline. *Biological Journal of the Linnean Society* 121:248–257
4. Yan Z, Zhou D, Li Y, Zhang L (2022) An integrated assessment on the warming effects of urbanization and agriculture in highly developed urban agglomerations of China. *Science of the Total Environment* 804:150119
5. Wake DB (2012) Facing Extinction in Real Time. *Science* 335:1052–1053. <https://doi.org/10.1126/science.1218364>
6. Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 306:1783–1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>
7. Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M (2010) The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *Journal of Experimental Biology* 213:921–933. <https://doi.org/10.1242/jeb.040865>
8. Sodhi NS, Bickford D, Diesmos AC, Lee TM, Koh LP, Brook BW, Sekercioglu CH, Bradshaw CJA (2008) Measuring the Meltdown: Drivers of Global Amphibian Extinction and Decline. *PLoS ONE* 3:e1636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001636>
9. Vincze E, Papp S, Preiszner B, Seress G, Bókony V, Liker A (2016) Habituation to human disturbance is faster in urban than rural house sparrows. *Behavioral Ecology* 27:1304–1313
10. Whitehead A, Pilcher W, Champlin D, Nacci D (2012) Common mechanism underlies repeated evolution of extreme pollution tolerance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279:427–433
11. Cothran RD, Brown JM, Relyea RA (2013) Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance: evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications* 6:832–841
12. Hua J, Morehouse NI, Relyea R (2013) Pesticide tolerance in amphibians: induced tolerance in susceptible populations, constitutive tolerance in tolerant populations. *Evolutionary applications* 6:1028–1040

13. Brans KI, Stoks R, De Meester L (2018) Urbanization drives genetic differentiation in physiology and structures the evolution of pace-of-life syndromes in the water flea *Daphnia magna*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285:20180169
14. Kraak SB, Pen I (2002) Sex-determining mechanisms in vertebrates. Sex ratios: concepts and research methods 158–177
15. 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* 372:20160325
16. Nemesházi E, Bókony V (2022) Asymmetrical sex reversal: Does the type of heterogamety predict propensity for sex reversal? *BioEssays* 44:2200039
17. Mitchell NJ, Janzen FJ (2010) Temperature-dependent sex determination and contemporary climate change. *Sexual Development* 4:129–140
18. Jeffries DL, Lavanchy G, Sermier R, Sredl MJ, Miura I, Borzée A, Barrow LN, Canestrelli D, Crochet P-A, Dufresnes C (2018) A rapid rate of sex-chromosome turnover and non-random transitions in true frogs. *Nature communications* 9:4088
19. Miura I, Ohtani H, Ogata M (2012) Independent degeneration of W and Y sex chromosomes in frog *Rana rugosa*. *Chromosome Res* 20:47–55. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9258-8>
20. 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
21. Lambert MR, Tran T, Kilian A, Ezaz T, Skelly DK (2019) Molecular evidence for sex reversal in wild populations of green frogs (*Rana clamitans*). *PeerJ* 7:e6449
22. Whiteley SL, Castelli MA, Dissanayake DS, Holleley CE, Georges A (2021) Temperature-induced sex reversal in reptiles: prevalence, discovery, and evolutionary implications. *Sexual Development* 15:148–156
23. Hubbard P (2019) Changing sex: it's a fishy thing. *Journal of Fish Biology* 94:351–351. <https://doi.org/10.1111/jfb.13925>
24. Edmands S (2021) Sex ratios in a warming world: thermal effects on sex-biased survival, sex determination, and sex reversal. *Journal of Heredity* 112:155–164
25. Holleley CE, Sarre SD, O'Meally D, Georges A (2016) Sex reversal in reptiles: reproductive oddity or powerful driver of evolutionary change? *Sexual Development* 10:279–287
26. Dupoué A, Lourdais O, Meylan S, Brischoux F, Angelier F, Rozen-Rechels D, Marcangeli Y, Decencière B, Agostini S, Le Galliard J (2019) Some like it dry: Water restriction

overrides heterogametic sex determination in two reptiles. *Ecology and Evolution* 9:6524–6533. <https://doi.org/10.1002/ece3.5229>

27. 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:bio050054
28. Lambert MR, Stoler AB, Smylie MS, Relyea RA, Skelly DK (2017) Interactive effects of road salt and leaf litter on wood frog sex ratios and sexual size dimorphism. *Can J Fish Aquat Sci* 74:141–146. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0324>
29. Nemesházi E, Kövér S, Bókony V (2021) Evolutionary and demographic consequences of temperature-induced masculinization under climate warming: the effects of mate choice. *BMC Ecol Evo* 21:16. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01747-3>
30. McGaugh SE, Bowden RM, Kuo C-H, Janzen FJ (2011) Field-measured heritability of the threshold for sex determination in a turtle with temperature-dependent sex determination. *Evolutionary Ecology Research* 13:75–90
31. Bock SL, Loera Y, Johnson JM, Smaga CR, Haskins DL, Tuberville TD, Singh R, Rainwater TR, Wilkinson PM, Parrott BB (2023) Differential early-life survival underlies the adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a long-lived reptile. *Functional Ecology* 37:2895–2909. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.14420>
32. Holleley CE, O’Meally D, Sarre SD, Marshall Graves JA, Ezaz T, Matsubara K, Azad B, Zhang X, Georges A (2015) Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature* 523:79–82
33. Senior AM, Lim JN, Nakagawa S (2012) The fitness consequences of environmental sex reversal in fish: a quantitative review. *Biological Reviews* 87:900–911. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2012.00230.x>
34. Hill P, While GM, Burrige CP, Ezaz T, Munch KL, McVarish M, Wapstra E (2022) Sex reversal explains some, but not all, climate-mediated sex ratio variation within a viviparous reptile. *Proc R Soc B* 289:20220689. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.0689>
35. Ujszegi J, Bertalan R, Ujhegyi N, Verebélyi V, Nemesházi E, Mikó Z, Kásler A, Herczeg D, Szederkényi M, Vili N (2022) “Heat waves” experienced during larval life have species-specific consequences on life-history traits and sexual development in anuran amphibians. *Science of the Total Environment* 835:155297
36. Nemesházi E, Gál Z, Ujhegyi N, Verebélyi V, Mikó Z, Üveges B, Lefler KK, Jeffries DL, Hoffmann OI, 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* 29:3607–3621. <https://doi.org/10.1111/mec.15596>

37. Bókony V, Balogh E, Ujszegi J, Ujhegyi N, Szederkényi M, Hettyey A (2024) Tadpoles Develop Elevated Heat Tolerance in Urban Heat Islands Regardless of Sex. *Evol Biol* 51:209–216. <https://doi.org/10.1007/s11692-024-09626-7>
38. Gosner KL (1960) A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16:183–190
39. Ogielska M, Kotusz A (2004) Pattern and rate of ovary differentiation with reference to somatic development in anuran amphibians. *Journal of Morphology* 259:41–54. <https://doi.org/10.1002/jmor.10162>
40. R Core Team (2024) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria
41. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67:1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
42. Hartig F (2022) DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models
43. Bókony V, Kalina C, Ujhegyi N, Mikó Z, Lefler KK, Vili N, Gál Z, Gabor CR, Hoffmann OI (2024) Does stress make males? An experiment on the role of glucocorticoids in anuran sex reversal. *J Exp Zool Pt A* 341:172–181. <https://doi.org/10.1002/jez.2772>
44. Lambert MR, Brans KI, Des Roches S, Donihue CM, Diamond SE (2021) Adaptive evolution in cities: progress and misconceptions. *Trends in Ecology & Evolution* 36:239–257
45. Lesbarrères D, Primmer CR, Lodé T, Merilä J (2006) The effects of 20 years of highway presence on the genetic structure of *Rana dalmatina* populations. *Ecoscience* 13:531–538. [https://doi.org/10.2980/1195-6860\(2006\)13\[531:TEOYOH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2980/1195-6860(2006)13[531:TEOYOH]2.0.CO;2)
46. Sarasola-Puente V, Madeira MJ, Gosá A, Lizana M, Gómez-Moliner B (2012) Population structure and genetic diversity of *Rana dalmatina* in the Iberian Peninsula. *Conserv Genet* 13:197–209. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0276-z>
47. Bókony V, Ujhegyi N, Mikó Z, Erös R, Hettyey A, Vili N, Gál Z, Hoffmann OI, Nemesházi E (2021) Sex reversal and performance in fitness-related traits during early life in agile frogs. *Frontiers in Ecology and Evolution* 9:745752
48. Sarasola-Puente V, Gosá A, Oromí N, Madeira MJ, Lizana M (2011) Growth, size and age at maturity of the agile frog (*Rana dalmatina*) in an Iberian Peninsula population. *Zoology* 114:150–154
49. Hartel T, Oellerer K (2009) Local turnover and factors influencing the persistence of amphibians in permanent ponds from the Saxon landscapes of Transylvania. *North-Western Journal of Zoology* 5:

50. Nemesházi E, Sramkó G, Laczkó L, Balogh E, Szatmári L, Vili N, Ujhegyi N, Üveges B, Bókony V (2022) Novel genetic sex markers reveal unexpected lack of, and similar susceptibility to, sex reversal in free-living common toads in both natural and anthropogenic habitats. *Molecular Ecology* 31:2032–2043. <https://doi.org/10.1111/mec.16388>

9. Köszönetnyilvánítás

Ezúton is szeretném külön megköszönni témavezetőim, Dr. Bókony Veronika és Balogh Emese állandó segítségnyújtását, útmutatását, tapasztalataik továbbadását, kiknek jelentős szerepe volt munkám létrejöttében. Továbbá, hálával tartozom az egész Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoportnak, kik egytől egyig részt vettek az állatok felnevelésében, gondozásában, és a kísérlet lebonyolításában. Mivel munkám molekuláris laboratóriumi részét pedig a HUN-REN Agrártudományi Kutatóközpont Növényvédelmi Intézetében, továbbá az Állatorvostudományi Egyetem Gyógyszertani és Méregtani Tanszékén, valamint az Ökológiai Tanszék Konzerváció-Genetikai Kutatócsoportjának laboratóriumában végeztem, e laboratóriumoknak is hálás vagyok a befogadásért, a helyszín biztosításáért.