



OSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

HŐMÉRSÉKLET OKOZTA IVARARÁNY VÁLTOZÁS VIZSGÁLATA ZEBRADÁNIÓ MODELLEN

Analysis of heat-induced sex change in the zebrafish model

Készítette:

Pethő Cintia

C415XU

Mezőgazdasági mérnök, alapképzés

Nappali tagozat

Georgikon Campus

Témavezető:

Dr. Szeverényi Ildikó, szenior kutató,

Dr. Orbán László, tudományos tanácsadó

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,

Georgikon Campus Akvakultúra és

Környezetbiztonsági Intézet, Alkalmazott

Halbiológia Tanszék

Lehetséges OTDK szekció: Agrártudományi szekció

**Kaposvár
2023.**

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
1. Bevezetés és célkitűzés.....	4
2. Irodalmi áttekintés	6
2.1. Zebradánió bemutatása.....	6
2.2. A zebradánió ivara.....	6
2.3. Az ivararány billentésére alkalmas eljárások	10
2.3.1. Az állomány sűrűségének hatása	10
2.3.2. Inhibitorok és hormonok hatása halak ivarára	10
2.3.3. Hőmérséklet	11
2.4. A hősokk válasz	12
2.5. A hő hatása a zebradánió ivarára	13
3. Anyag és módszer.....	16
3.1. A halak származása	16
3.2. A halak tartása.....	16
3.3. A halak szaporítása	17
3.4. Az embriók és lárvák nevelése.....	17
3.5. A halak takarmányozása	18
3.6. A zebradánió ivadékok hőkezelése	19
3.6.1 Akut hőkezelések.....	19
3.6.2. Krónikus hőkezelések	20
3.7. Az ivarszerv fejlődésének mikroszkópos analízise	21
3.8. RNS izolálás és az expressziós analízis előkészítése	22
3.9. Statisztikai analízis.....	23
3.10. Hozzájárulások	23
4. Eredmények és értékelésük	24

4.1.	A zebradánió családok rövid akut hőkezelése nem okozott változást az ivararányban	24
4.2.	A hosszú akut és krónikus hőkezelések egyes családokban eltolták az ivararányt a hímek felé.....	25
4.3.	A négy hőre válaszoló zebradánió család jellemzése	27
4.4.	Előkészületek a hősokk válasz validálására molekuláris eljárásokkal.....	29
4.5.	Limitációk	30
5.	Következtetések, javaslatok	31
6.	Összefoglalás	33
7.	Irodalomjegyzék.....	35
8.	Mellékletek.....	38

Rövidítések jegyzéke

18s rRNA	'18S ribosomal RNA gene' azaz a 18s RNS riboszómális génje
AB	Háziasított zebradánió vonal
AFLP	'Amplified Fragment Length Polymorphism', azaz felsokszorozott fragmenshossz polimorfizmus
CSD	'Chromosomal Sex Determination' azaz kromoszómás ivarmeghatározás
Cyp19a1a	'Ovarian aromatase enzyme' azaz petefészek aromatáz enzim
dpf	'Days post-fertilization', azaz a megtermékenyítés utáni kor napokban
eef1a1	'eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 gene' azaz eukarióta transláció-elongációs faktor 1 alfa 1 gén
Egfp	'Enhanced Green Fluorescent Protein', azaz zöld fluoreszcens fehérje
ESD	'Environmental Sex Determination', azaz környezeti ivarmeghatározás
fluoMEP	'fluoreszcens Motif Enhanced Polymorphism', azaz fluoreszcens motívumot erősítő polimorfizmus
gapdh	'glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene' azaz gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz gén
GSD	'Genetic Sex Determination', azaz genetikai ivarmeghatározás
Hsps	'Heat Shock Proteins', azaz hősokk fehérjék
Hsp70	'Heat Shock Protein 70' azaz 70-es hősokk fehérje
PCR	'Polymerase Chain Reaction', azaz polimeráz láncreakció
PGC	'Primordial Germ Cell', azaz ivari őscsírasejt
PSD	'Polygenic Sex Determination', azaz poligénes ivarmeghatározás
RAPD	'Randomly Amplified Polymorphic DNA' azaz véletlenszerűen felsokszorozott polimorf DNS
rpl13	'ribosomal protein L13 gene' azaz az L13-as riboszómális fehérje génje
SD	'Sex Determination', azaz ivarmeghatározás
TSD	'Temperature-based Sex Determination' azaz hőmérsékleti ivarmeghatározás

1. Bevezetés és célkitűzés

A környezeti tényezők különösen nagy hatással vannak a változó testhőmérsékletű (poikiloterm) állatok, így a halak fiziológiájára is. Korunk egyik legégetőbb problémája a globális klímamódosulás okozta hőmérséklet emelkedés természetes vizeinkben, mely oly mértékben változtathatja meg a halak életkörülményeit, ami akár kritikus is lehet túlélésük szempontjából. Tekintve, hogy legnagyobb hazai tavaink (Balaton, Fertő, Velencei tó) sekély vízűek, ezek a problémák itthon kiemelkedő jelentőségűek. A poikiloterm szervezeteknek a belső testhőmérséklete a külső hőmérséklet függvényében változik, amely hatással van a működésük minden szintjére. Megváltozik a halak metabolizmusa, immunrendszerük működése, sőt még az ivar kialakulására is hatással lehet (pl. a hullók tojás-inkubálási időszaka alatti hőmérséklet meghatározza az utódok ivararányát). Több ismert halfaj esetében megfigyelték, hogy a magas hőmérséklet hatással van az állomány nemére, többnyire a hímek számának növekedését okozva (Baroiller et al., 2009).

A zebradánio egy kedvelt gerinces modell, mivel gyors az egyedfejlődése, egyszerre több száz utódot hozhat létre, melyeken számos vizsgálat végezhető el.

A gerinceseknél az ivart genetikai hatások (Genetic Sex Determination, GSD), környezeti hatások (Environmental Sex Determination, ESD) vagy ezek együttese határozza meg (Liew & Orbán, 2014). Az ESD mechanizmus egyik leggyakoribb típusa a hőmérséklettől függő ivarmeghatározás (Lawrence et al., 2008). Korábban kimutatták, hogy a magas hőmérséklet hatására egyes zebradánio családokban az ivararány eltolódik a hímek irányába (Ribas et al., 2017). Ennek a mechanizmusnak a jelenlegi fejlettebb technológiával történő tanulmányozása és megértése kiemelkedő jelentőségű lehet.

A zebradánio egyik vonalába bejuttattak egy zöld fluoreszcens fehérje (Egfp) génjét tartalmazó riporter konstrukciót, amely az ivarszervekben eltérő mértékben expresszálódik, ezáltal lehetővé teszi fluoreszcens mikroszkóp alatt a nemek korai elkülönítését (Krøvel & Olsen, 2002; Wang et al., 2007).

A hőmérséklet zebradánio ivarára kifejtett hatásának mélyebb ismerete azért is kiemelkedő jelentőségű lehet, mivel a zebradánio a pontyfélékhez tartozik. Így ezen munka eredménye releváns lehet az összes többi pontyfélén, de akár még más hazai halfajokon végzett munkák során is.

Mindezeket figyelembe véve, munkám folytatását képezi az egyik szakvezetőm korábbi szingapúri csoportja által végzett közel két évtizedes vizsgálatoknak. Munkájukkal nagy előrelépést értek el a zebradánio ivarkialakulási folyamatának megértésében.

Reményeim szerint az én munkám eredményei is hozzájárulnak majd ahhoz, hogy a hőmérséklet hatását a zebradánió és más halfajok ivarának kialakulására mélyebben megismerhessük.

Célkitűzéseim:

- A hőkezelési módszer adaptálása és optimalizálása a helyi körülményekhez
- Nagyszámú zebradánió család hőkezelése
- A hőkezelt és kontroll ivadékok felnevelése, azok mikroszkópos szexálása
- Hőre válaszoló vonalak azonosítása és alapszintű jellemzése
- Előkészületek hőre válaszoló családok kontroll és kezelt egyedein végzett expressziós vizsgálatokhoz

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Zebradánió bemutatása

A zebradánió egy nagyon kedvelt modellorganizmus a laboratóriumokban. Kis testű édesvízi hal, amelynek természetes élőhelyei Dél-Ázsia és Délkelet-Ázsia lassú lefolyású, stagnáló vizei (Spence et al., 2008). Számos kedvező tulajdonsággal rendelkezik: egyszerre több száz utódot hoz létre, külső megtermékenyítéssel szaporodik. az embriók átlátszó ikraburokban fejlődnek, és gyors az egyedfejlődése (3-4 hónap). Talán az egyik legalkalmasabb gerinces modell a fenotípusos vizsgálatokhoz. Genomja tartalmazza az emberi gének többségének ortológjait, ez lehetővé teszi a génfunkciók jellemzését (Fuentes et al., 2018). A zebradánió mutáns fenotípusok közül sok az emberi betegségekre emlékeztet. Különösen alkalmas a hematopoiesis tanulmányozására, szív működés, valamint a vesebetegségek vizsgálatára (Dooley & Zon, 2000). Az ún. előremutató ('forward') és fordított ('reverz') genetikák lehetővé tették a genotípus és a fenotípus szisztematikus összekapcsolását. A 'forward genetika' módszereivel tömegesen állítottak elő mutánsokat, majd a fenotípusból kiindulva eljutottak a génhez. A 'reverz genetika' azon alapul, hogy egy ismert gén szekvenciájában hoznak létre mutációkat és az általuk kiváltott fenotípust keresik (Fuentes et al., 2018). A zebradánió molekuláris technikái gyorsan fejlődtek. Mikroinjektációs technikák alkalmazásával sikeresen hoztak létre transzgénikus halakat (Dooley & Zon, 2000). A fluoreszcens 'riporter transzgén' lehetővé teszi olyan specifikus folyamatok vagy sejttípusok vizsgálatát, amelyek egyébként szabad szemmel nem lennének észrevehetők (Fuentes et al., 2018).

2.2. A zebradánió ivara

Az ivaros szaporodás genetikailag változatos utódokat hoz létre, ami fontos az evolúció szempontjából. Ám valójában a szaporodás nem mindig növeli a variációt, ugyanis a változatos utódok nem minden esetben segítik a szaporodás fejlődését (de Visser & Elena, 2007). A többsejtű állatok szaporodásához speciális haploid (hím és női ivarsejtekre) sejtekre van szükség, amelyek meghatározzák a nemet. Az egyének nem csak ivarsejtjeikben, ivarmirigyeikben különbözhetnek, hanem anatómiájukban, fiziológiájukban és viselkedésükben, ezt nevezzük ivari dimorfizmusnak (Gamble & Zarkower, 2012). A zebradániókra jellemző az ivari dimorfizmus, ami fontos szerepet játszhat a potenciális társ kiválasztásában. A hímek vékonyabbak, torpedó alakúak, kissé intenzívebb sárgás vagy fémes

elszíneződést mutatnak, míg a nőtények kerekesebbek, nagyobb hassal, valamint kevésbé intenzív színnel rendelkeznek (1. ábra).



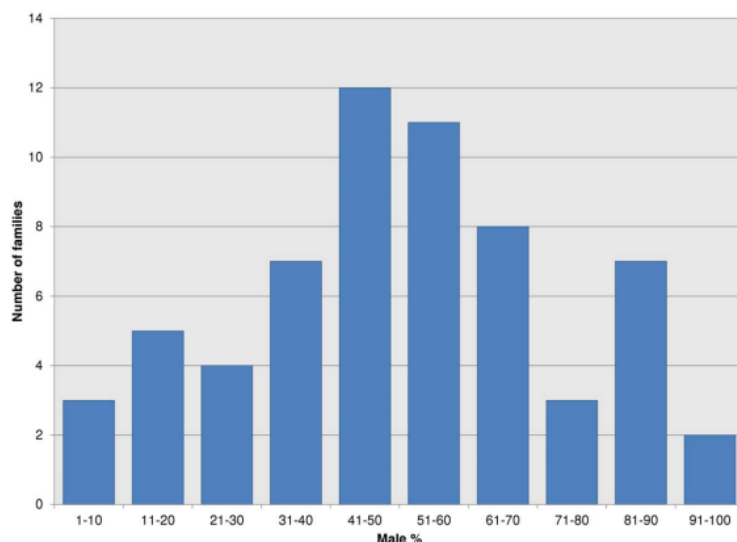
1. ábra: A zebradánio hím- és nőivarú egyedei ivari dimorfizmust mutatnak. Felül a hím (tejes) látható, amelynek testalkata vékonyabb, kissé torpedó alakú. Alul a nőtény (ikrás), amely kerekdedebb.
(Forrás: <https://devbiootago.wordpress.com/> 2013/02/18/female-to-male-sex-reversal-in-adult-fish/)

Az ivart meghatározó folyamatok ('Sex Determination', SD) eldöntik az adott egyed nemét, és elindítják az ivari differenciálódás folyamatát (Liew et al., 2012). A gerinceseknél a nemet genetikai mechanizmusok ('Genetic Sex Determination', GSD), környezeti hatások ('Environmental Sex Determination', ESD) vagy ezek együttesen (GSD+ESD) határozzák meg. GSD esetén elsősorban a szülőktől örökölt gének határozzák meg, aminek több fajtája ismert, az egyik a kromoszóma ivarmeghatározás ('Chromosomal Sex Determination', CSD), a másik a poligén ivarmeghatározás ('Polygenic Sex Determination', PSD;) (Moore & Roberts, 2013). Egyes GSD fajokban, mint az emberekben és más emlősökben XX/XY az ivarmeghatározási mechanizmus, ahol az Y kromoszóma indítja be a férfiasodást, ezt hím heterogametikus ivarnak nevezzük. Más fajok esetében, mint például a madarak, nő heterogametikus ivarról beszélhetünk, ahol a ZZ/ZW rendszer működik (Gamble & Zarkower, 2012).

Az ESD leggyakoribb típusa a hőmérséklettől függő ivarmeghatározás ('Temperature-based Sex Determination', TSD), de lehet befolyásoló a pH, társadalmi kölcsönhatások, sőt akár az állomány sűrűsége is (Lawrence et al., 2008). Egyes fajok, például a sósvízi garnéla esetében a fotoperiódus is ivarmeghatározó tényező lehet, ugyanis egyes populációkban azt láthatjuk, hogy a hímek hosszú, míg a nőtények rövid nappalon születnek. Az ivar meghatározásának nagy változatossága azt mutatja, hogy a mechanizmusok között átmenetek vannak (Gamble & Zarkower, 2012).

Annak ellenére, hogy a zebradánió egy nagyon elterjedt modellszervezet, viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre az ivarának fejlődéséről. A jelenlegi ismeretek inkább az ivarmirigy differenciálódásához kapcsolódnak, az ivarmeghatározás módja még mind a mai napig vitatott (Liew et al., 2012). A laboratóriumokban használt házasított vonalak esetében gyakran tapasztaltak súlyos ivararány torzulást (**2. ábra**), ami arra utalhat, hogy a szelekció vagy beltenyésztés befolyásolhatja a nemek differenciálódását (Lawrence et al., 2008). Az ivaros szaporodás eredeti funkciója feltehetően nem az evolúciós újdonság generálása, hanem a károk helyreállítása volt, tehát egy rekombinációs helyreállító folyamatként indult ki és ezt a funkcióját megtartotta az evolúció során (Bernstein et al., 1981).

A zebradánió nemének vizsgálatára számos módszert alkalmaznak. A nemi markerek izolálására használt legnépszerűbb módszerek a polimeráz láncreakción (PCR) alapuló módszerek. Ilyen például a véletlenszerűen felsokszorozott polimorf DNS (Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD) és az amplifikált fragmentum hossz polimorfizmus (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP). A házasított zebradánió vonalak genomjának a vizsgálatára egy továbbfejlesztett PCR-alapú módszert használtak, ami az úgynevezett fluoreszcens Motif Enhanced Polymorphism (fluoMEP) eljárás, ami ötvözte a RAPD és az AFLP előnyös tulajdonságait (Chang et al., 2007). A hím és nőstény genomok részletes összehasonlítása után nem találtak univerzális ivari markert a két törzsben, ami arra utalhat, hogy nincsenek jelentős különbségek az ivari kromoszómák között vagy egyáltalán nincsenek ivari kromoszómák (Liew & Orbán, 2014). Későbbi kutatások eredményei arra utaltak, hogy a vadon élő zebradániókban megtalálták a ZW/ZZ ivari kromoszómákat (Wilson et al., 2014), de ezek feltehetően elvesztek a házasítás során, így egyes domesztikált zebradánió vonalak ivarmeghatározása poligénes (Liew et al., 2012; Liew & Orbán, 2014). A poligénes ivarmeghatározás esetében az ivarmirigy differenciálódását befolyásoló gének eloszlának a genomban és ezek alléljainak a kombinációja határozza meg az egyén nemét. A zebradániók vizsgálata során azt tapasztalták, hogy ugyanazon tenyészpároktól származó utódok, eltérő körülmények között nevelt ivararánya nagyon hasonlított egymáshoz. Ez is azt erősíti, hogy a zebradánió ivararányát elsődlegesen genetikai, és nem pedig környezeti tényezők határozzák meg (Liew et al., 2012).



2. ábra: A házasított vonalaktól származó zebra-dánió családok ivararánya széles tartományban változik. Az ábra összesen 62 család adatait összegzi (Forrás: Liew et al, 2012).

A zebra-dánió ivari differenciálódásának vizsgálatához szükség volt olyan eszközökre, ahol látni és tanulmányozni lehet a petefészek herékké történő átalakulását. A szívárványos pisztrángban, medakában és zebra-dánióban is létrehoztak olyan transzgénikus, csírasejt-specifikus expressziót mutató vonalakat, amelyek *vasa-egfp* konstrukciót tartalmaznak. Ezekben a hím és női ivarszervek eltérő mennyiségű zöld fluoreszcens fehérjét ('Enhanced Green Fluorescent Protein', azaz Egfp) termelnek (Hsiao & Tsai, 2003). Kimutatták, hogy a Vasa fehérje fontos a csírasejtek fejlődésében és a hasi szegmensek kialakulásában, ezáltal széles körben csírasejtspecifikus markerként használták (Bártfai & Orbán, 2003). A Vasa szabályozhatja a csírasejt fejlődését (primordial germ cell, PGC) mind a gerincesekben, mind a gerinctelenekben. A transzgénikus zebra-dánió vonalak ivari PGC-jükben szintén Egfp-t expresszálnak (Krøvel & Olsen, 2002). Ez a jel a hímekben a fejlődésük során fokozatosan eltűnik, így nyomon tudják követni petefészek herékké való átalakulását a nemi differenciálódás során. Mivel a transzgénről átíródó Egfp fehérje főként a női ivarszervben expresszálódik, ezért azt mondhatjuk, hogy egy adott kortól minden erősen fluoreszkáló ivarmirigyekkel rendelkező hal nőstény, a fluoreszkáló jellel nem rendelkező hal pedig hím (Hsiao & Tsai, 2003; Wang et al., 2007).

2.3. Az ivararány billentésére alkalmas eljárások

2.3.1. Az állomány sűrűségének hatása

A szelekció előnyben részesíti az utód vagy a szülő azon képességét, hogy az ivararányt úgy manipulálják, hogy az mind a két nem esetében életrevalóbb utódokat eredményezzen. A fonálférgek esetében a nagyobb sűrűség több hímeket eredményez, ugyanis az alacsonyabb sűrűség lehetővé teszi növekedést, ami a nőstények szempontjából előnyösebb (Charnov & Bull, 1977). A zebradánió számos kedvező tulajdonsága közé tartozik a környezeti tényezőkkel szembeni tolerancia. Ez lehet az oka annak, hogy ugyan nagyon kedvelt modellszervezet, az optimális tartási feltételek későn kerültek előtérbe (Castranova et al., 2011). Az egyedek sűrűsége hatással lehet az ivari differenciálódásra, ahogy azt a paradicsomhalban (*Macropodus opercularis*) is kimutatták. Az amerikai angolna (*Anguilla rostrata*) esetében azt tapasztalták, hogy míg a magasabb sűrűség a hímek, addig az alacsonyabb sűrűség a nőstények fejlődését segítette elő (Lawrence et al., 2008). A sűrűségfüggő növekedés a fiatal és felnőttkorban fejti ki leginkább a hatását (Hazlerigg et al., 2012). Az általános protokoll szerint 5 hal/liter a megfelelő állománysűrűség, de ez az iránymutatás nem publikált adatokon alapul (Matthews et al., 2002). Castranova és munkatársai kísérleti tapasztalatai alapján, 12 hal/liter állománysűrűség nem befolyásolta negatívan a reprodukciós képességeket. Egyes halfajoknál a magas sűrűség javítja, másoknál csökkenti a növekedési teljesítményt (Castranova et al., 2011). A zebradánió laborok általános megfigyelése, hogy a magas sűrűség általában a hímek fejlődését segíti elő, míg az alacsony sűrűség a nőstényeknek kedvez (Orbán L., személyes közlés). Ezek a megfigyelések is arra következtetnek, hogy a zebradánió nemét genetikai és környezeti tényezők együttesen, egymás után hatva határozzák meg (Lawrence et al., 2008).

2.3.2. Inhibitorok és hormonok hatása halak ivarára

Az ivart meghatározó rendszertől függetlenül a nem emlős gerinceseknél az androgén-ösztrogén arány határozza meg, hogy az ivarmirigyek herékké vagy petefészkekké differenciálódnak-e (Navarro-Martín et al., 2011). Az ösztrogéneknek való korai kitettség a nőstény, az androgéneknek való korai kitettség a hímek fejlődését indukálja (Orban et al., 2009). Az exogén nemi hormonok figyelemre méltó hatással lehetnek a fenotípusos ivarra. A japán lepényhalban (*Paralichthys olivaceus*) és nílusi tilápiában (*Oreochromis niloticus*) egy rövid aromataz inhibitoros kezelés az ivar differenciálódás során a genetikai nőstények hímekké való átfordulását eredményezte (Uchida et al., 2004).

A Fadrozole-lal kezelt nőtények esetében a szövettani vizsgálat kimutatta, hogy szinte minden petesejt eltűnt a kezelt nőtények ivarmirigyeiből és heréket fejlesztettek (Uchida et al., 2004). Számos halfajban a nemi szteroid hormonok fontos szerepet játszanak az ivarmirigy differenciálódásában.

A nemi szteroid arány a Cyp19a1a¹ ivarszervi aromatáz enzim (angolul ‘gonadal aromatase’) aktivitásától függ, ugyanis ez alakítja visszafordíthatatlanul az androgéneket ösztrogénekké. A változó testhőmérsékletű (ectotherm/poikilotherm) fajoknál a *cyp19a1a* expresszió változásai közvetítik a környezeti hőmérséklet nemre gyakorolt hatásait. A magas hőmérséklet férfiasító hatását mindig a *cyp19a1a* gén gátlása okozza a szabályozó régiójának (promoter) metilációja révén (Navarro-Martín et al., 2011).

2.3.3. Hőmérséklet

A környezeti tényezők nemekre gyakorolt hatásának ismerete fontos a globális felmelegedés, kémiai szennyezés, valamint az SD mechanizmusok megértése szempontjából (Ribas et al., 2017). Az ESD mechanizmus leggyakrabban előforduló típusa a hőmérséklettől függő ivarmeghatározás, azaz ‘Temperature-based Sex Determination’, TSD. Hüllők esetén ismert, hogy az embriófejlődés vagy tojás inkubálás során a hőmérséklet határozza meg az utód nemét (Cornejo-Páramo et al., 2020). A halakban a környezeti hatások első bizonyítékát az atlanti ezüstoldalú halon (*Menidia menidia*) végzett kísérletek szolgáltatták. Megállapították, hogy azok a fajok, amelyek nemét a környezeti tényezők befolyásolhatják, többnyire egyféle válaszreakciót adhatnak, ami a hímek irányába való eltolódás (Ospina-Álvarez & Piferrer, 2008). Az európai farkassügérben (*Dicentrarchus labrax*) az aromatáz promóter fokozott DNS-metilációját okozta a magas hőmérséklet, ami csökkent expressziót és a férfiak irányába való eltolódást eredményezte (Navarro-Martín et al., 2011). Vizsgálták afrikai harcsában, európai tengeri sügérben, japán lepényhalban, és nílusi tilápiában is a hőmérsékletnek a nemi differenciálódás során a génexpresszióra gyakorolt hatását (Baroiller et al., 2009). Azoknál a fajoknál, ahol a hőmérséklet hat a nemek közötti arányra, a korai fejlődés szakaszában magas hőnek való kitettség a herék differenciálódásával kapcsolatos gének megemelkedett expresszióját, míg a petefészek differenciálódásához kapcsolatos gének csökkent expresszióját okozza. Ez a hímek irányába való eltolódást eredményezhet (Ribas et al., 2017). Ezzel szemben,

¹ A zebradánio nomenklatúra szerint a (transz)gének és a róluk átíródó hírvivő RNS-ek szimbólumait végig kis dőlt betűvel (pl. *cyp19a1a*), míg a róluk termelődő fehérjetermékét nagybetűvel kezdődő normál betűvel (pl. Cyp19a1a) írjuk.

néhány faj esetében, mint a csatorna harcsa, a magas hőmérséklet az ivart a nőtények irányába tolja el (Patiño et al., 1996). Egyes halfajoknál mint a japán lazac, európai angolna vagy zebradánió, megfigyelték, hogy a fejlődésük során először mind egy „fiatalkori petefészket” fejlesztenek, amelyek később alakulnak majd herékké (Hsiao & Tsai, 2003; Takahashi, 1977).

2.4. A hősokk válasz

Az élő szervezetek gyakran kerülnek stresszes állapotba, melyeket valahogy túl kell élniük. A hőmérsékletet tekintjük a fő stresszornak, mivel az optimális hőmérséklettől való eltérés kritikus lehet minden szervezet számára. A hősokk válasz egy gyors és átmeneti génexpressziós program. Univerzálisnak és ősi mechanizmusnak tekintjük, ugyanis a hősokk vizsgálata során prokariótákban és eukariótákban is találtak hősokk válaszra utaló jeleket (Richter et al., 2010). A sejtek stressz hatására aktiválnak olyan jelátviteli útvonalakat, amelyek a hősokk vagy hőstressz fehérjék ('heat shock proteins', Hsps) átmeneti expressziójához vezet. Különböző stresszek hatására alakulhatnak ki ezek a válaszok, ilyen például a hőmérséklet, oxidatív stressz, nehéz fémek, etanol, mérgező anyagok. Tehát ez egy stresszre adott védelmi mechanizmus, amit nem csak hőmérséklet okozta változás válthat ki.

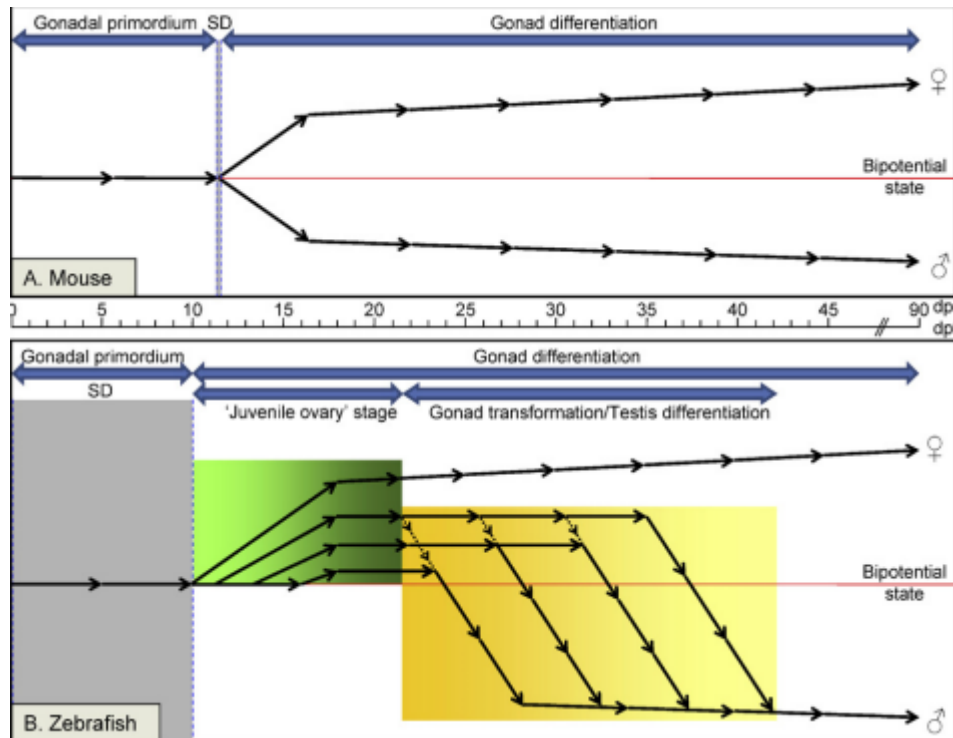
A Hsp-eket általában hét osztályba sorolják. Minden osztály más rendszerben vesz részt, más feladatot lát el. Minden sejt önállóan indukálhatja a hősokk választ. Vannak közvetlen elsődleges hőérzékelő struktúrák, melyek érzékelik a hőmérsékletet, de vannak olyanok is, amelyek a membránok merevségét figyelik, ha a membrán merevebb a hidegre adott válasz koordinálását jelzi. Ezeken kívül vannak közvetett jelek, ezek magasabb hőmérséklet esetén a denaturált fehérjék felhalmozódását jelentik, hidegebb hőmérséklet esetében a megrekedt riboszómák felhalmozódását jelentik (Richter et al., 2010).

A hősokk erősen befolyásolhatja a fehérjék, RNS-ek mellett a sejtmembránokat is. Ha ezek mind együttesen történnek, az a sejtciklus megállásához, valamint a növekedés és proliferáció stagnálásához vezethet. A hőstressz időtartamától, valamint a súlyosságától függően okozhat károkat, súlyos esetben akár a sejt halálát is eredményezheti. A Hsp szint megnövekedik mérsékelt stressz hatására, ami által keresztvédelem is kialakulhat. Ez azt jelenti, hogy az adott Hsp nem csak arra a stresszre reagál, amire specializálódik, hanem más tényezők miatt kialakult stressz ellen is védelmet nyújthat (Richter et al., 2010).

2.5. A hő hatása a zebradánió ivarára

A hőmérsékletnek a nemek differenciálódására, meghatározására gyakorolt hatását számos halfajnál megfigyelték (Abozaid et al., 2012). Zebradánió populációkban az olyan környezeti tényezők, mint a hipoxia vagy a hőmérséklet megváltoztathatják a nemek arányát (Orban et al., 2009). A halak ivara kialakulhat gonochorista úton (például, ahol az ivarmeghatározás genetikai alapú) vagy hermafroditista úton is, ahol az egyik ivar a másikba alakul át. A szekvenciális hermafrodita halak mindössze 2%-át teszi ki az összes létező halfajnak (Kobayashi et al., 2013). Utóbbiak között léteznek olyan halfajok, melyek protandriásak, azaz hímről nőténnyre változtatják a nemüket (pl.: bohóchal), és léteznek protogének is, amelyek esetében nőténnyről hímre változik az ivar (pl.: egyes tengeri sügerek). Ezek a folyamatok kevés kivétellel egy életcikluson belül egyszer történnek meg, azaz visszafordíthatatlanok (Kobayashi et al., 2013). A hőmérséklet normál tartományon belüli változása a kémiai reakciók sebességét szabályozhatja, valamint fontos akadályt jelent a szaporodási ciklusok időzítésének szabályozása szempontjából. A hő befolyásolja az ivarszervi aromatáz *cyp19a1a* expresszióját, a csírasejtek szaporodását, amik jelentős szerepet játszanak a nemek kialakulásában (Abozaid et al., 2012). A vadon élő és házasított zebradániók genomjának összehasonlítása során, azt vették észre, hogy a vad típusban jelen vannak a nemi kromoszómák, míg a házasított típusokban az egyik vagy mindkét ivari kromoszóma hiányozhat (Wilson et al., 2014).

A hím zebradániók úgy fejlődnek ki, mint a protandriás hermafroditák, ugyanis a fejlődésük kezdeti szakaszán egy úgynevezett „fiatalkori petefészeket” fejlesztenek, amely később átalakul herékké. A női ivarmirigyek kialakulásához elengedhetetlenek PGC-k. Amikor az ivarmirigyek fejlődésnek indulnak a „fiatalkori petefészek” már 10-14 nappal a megtermékenyítés után (days post-fertilization, dpf) láthatóvá válnak. Ez független attól, hogy milyen nemű lesz később a hal, minden egyednél ezt láthatjuk. A „fiatalkori petefészek” herékké történő átalakulása körülbelül a 21 dpf kortól indulhat meg, de ez nem történik minden egyedben egyszerre (**3. ábra**). Transzgénikus *tg[vasa:egfp]* zebradánió vonal használatával megfigyelték, hogy a herékké történő átalakulás bekövetkezése, valamint a folyamat időtartama egyedenként eltérő. A jövőbeni hímeknél a „fiatalkori petefészek” apoptózison megy keresztül és herékké alakulnak át, míg a jövőbeni nőtényeknél folytatódik tovább a petefészek differenciálódása (Abozaid et al., 2012; Orban et al., 2009; Ribas et al., 2017).



3.ábra: Az egér és a zebradánió ivarkialakulásának folyamata. Az egérnél 11,5 napnál elől, hogy milyen lesz az egyed ivara, majd ezután megkezdődik a herék vagy a petefészek differenciálódása. A zebradániónál 10 és 16 nap között kezd el az ivarszerv differenciálódni, először egy 'fiatal petefészekké', majd a jövőbeni hímek esetében a herék ezután kezdenek el fejlődni. A folyamat a hímek esetében még ugyanazon családon belül is nagyon változó a folyamat kezdete és az időtartam tekintetében. (Forrás: Orbán et al., 2009)

Az ebben az időszakban (21 dpf körül) magas hőmérsékletnek való kitettség a család hímek irányába való eltolódását eredményezi. Ribas és munkatársai vizsgálták a megemelkedett hőmérséklet hatását embriókra, fiatal egyedekre vagy felnőtt korban. A hat családon végzett kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a 18-32 dpf-kori magas hőmérsékletnek való kitettség szinte minden esetben a hímek irányába való eltolódást eredményezte, de a hővel való ivarbillentés családspecifikus. Egyes családok reagálnak a hőre, míg mások nem. Az így keletkezett hímeket angolul 'neomale'-eknek nevezzük. A vizsgálatok szerint ezeknek az átfordult 'neomale'-eknek a hereszerkezete és génexpressziós profilja hasonló vagy teljesen azonos azokéval a hímekével, akik eredetileg is hímekként fejlődtek volna. Ezenkívül a 'neomale'-ek is életképes spermiumokat hoznak létre (Ribas et al., 2017). A kezelt és kontroll állományok között nem találtak szignifikáns eltérést az elhullás mértékében (Abozaid et al., 2012). Családtól függően azt tapasztalták, hogy a magas hőmérséklet okozott az egyedeken deformitást, például hasduzzadást, gerincvelő rendellenességet vagy a pigmentáció elvesztését (Ribas et al., 2017).

A halak színének intenzitását alapvetően genetikai tényezők határozzák meg, de ezen túl befolyásolhatják környezeti tényezők, mint a hőmérséklet vagy a fény. A zebradániók hím egyedei intenzívebb, sárgás vagy fémes pigmentációval rendelkeznek, mint a nőstények. A hőmérséklet morfológiára való hatásának tanulmányozása során, azt tapasztalták, hogy a hővel kezelt állományok alacsonyabb pigmentációs intenzitást mutattak a kontroll csoporthoz képest. A nőstényeknél szignifikáns eltérés nem volt, azonban a hímeknél a kezelt állományban határozottan csökkent a pigmentáció intenzitása. A női egyedeknél a kezelt és kontroll csoport között a méretben, testtömegben nem volt nagy különbség. Hímek esetében a kezelés a testtömeg jelentős csökkenését eredményezte (Hosseini et al., 2019).

Ugyan számos kísérlet bizonyítja, hogy a magas hőmérséklet a zebradánió állományaiban az ivararány hímek irányába való eltolódását eredményezi, a hő által kiváltott nemi átfordítás mögöttes molekuláris mechanizmusa korántsem egyértelmű. Kérdésként felmerülhet, hogy egyes nőstények miért tudnak ellenállni a magas hőmérsékletnek, valamint, hogy vannak-e morfológiai és expressziós különbségek a nőstények kezelt valamint nem kezelt osztálya között (Ribas et al., 2017).

3. Anyag és módszer

3.1. A halak származása

Az AB (vad típusú, nem transzgénikus, háziasított zebradánió vonal) részlegesen beltenyésztett vonala a MATE és az ELTE halas házaiból származik. A *tg(vasa::egfp)* transzgénikus vonal fenntartó állományát a MATE AKI Csenki Bakos Zsolt vezette gödöllői zebradánió laborjából kaptuk.

3.2. A halak tartása

A halakat, egy más rendszerektől elkülönített szobában tartottuk, a fertőzések elkerülése végett. A megfelelő tartási körülmények biztosításához a szobában sötétített ablakok voltak, ez segített abban, hogy mi határozzuk meg a sötét és világos órák számát. A lámpafényen kívül számos eszköz segítette a környezet gazdag tartásmód kialakítását, ilyenek a zöld tetők, a szaporításnál a kavics mintázatú aljzat és műnövények használata. A halak egy Auaneering Aquatic Housing rendszerben voltak tartva, amin napi szintű vízminőség ellenőrzést és vízcserét végeztünk (4. ábra). A rendszeren különböző méretű haltartó tartályokat használtunk, ezekben csoportosan vagy párokban (családok kialakításához) tartottuk a halakat, kor és létszám szerint elkülönítve.



4.ábra: A zebradániók tartására használt rendszer. A rendszer alján lévő tartályban a víz egy többlépcsős szűréseken keresztül tisztul meg, majd UV fertőtleníti. Két ilyen rendszer található a szobában. A tartályok a rendszeren különböző méretűek, a halak létszámának és méretének megfelelően. (Forrás: Saját kép)

3.3. A halak szaporítása

A zebradániók 1,5-2 évig élnek, viszont a szaporításukat másfél éves korukig végezzük. A hímek vékony, torpedó alakúak, a nőstények inkább kerekdedebbek, nagyobb hassal rendelkeznek. Az ivatás lehet csoportos, vagy páros, amit ivató kádakban végeztünk el (5. ábra). A környezetgazdagítás szempontjából a kádak alá kavics mintázatot tettünk, kicsit megdöntve helyeztük el őket, hogy legyen sekélyebb és mélyebb víz, valamint műnövényeket illesztettünk a belső rácsos aljú betétbe. Ha kiválasztottuk a párokat, amiket szaporítani szeretnénk, behelyeztük ezekbe a kádakba éjszakára elválasztva a tejest és az ikrást, úgy hogy lássák, érezzék egymást. Reggel a villanykapcsolás után a két halat áthelyeztük egy másik, teljesen új kádba, itt már összeengedtük őket és friss vizet adtunk nekik, ezzel csökkentve az éjjel keletkezett szennyeződés, ürülék ikrák közé való keveredését.



5. ábra: Zebradánió páros szaporítására használt ivató kád. A páros szaporításhoz használt kádak alá kavics mintázatot teszünk, a rácsos aljú belsejébe pedig műnövényeket a környezetgazdagítás céljából (Forrás: Saját kép).

3.4. Az embriók és lárvák nevelése

Amennyiben a zebradánió pár megfelelő számú, megtermékenyített ikrát adott, megkezdhattuk azok kezelését. Az első lépés, hogy előkészítettünk egy vagy két Petri-csészét, annak megfelelően, hogy mennyi ikrát láttunk. Feljegyeztük egy papírra a szülőpár adatait és a szaporítás dátumát, ezt a papírt ráragasztottuk a Petri-csésze tetejére, majd az oldalára filctollal is feljegyeztük ezeket az adatokat, hogy biztosan ne keverjük össze az ikrákat. Mielőtt az ikrákat kimostuk a Petri-csészébe feljegyeztük a szülőpár tartályán lévő papírra, a szaporítás dátumát és az ikrák számát. Az ikraszám meghatározása körülbelüli értékre történt. Jelöltük, ha nem volt ikrák, ha volt, de elpusztult, ha száz alatt, száz és kétszáz között vagy kétszáz felett adott.

Ha ezzel végeztünk, a halakat áthelyeztük egy másik tartályba és visszatettük őket a rendszerbe. Miután ez megtörtént, a mosdókagyló felett egy apró lyukú szűrőkanálba mostuk az ikrákat, úgy, hogy ne maradjon semennyi a tartály falára tapadva. A szűrőkanálban lévő ikrákat egy úgynevezett „kék vízzel” óvatosan belemostuk a Petri-csészébe. A „kék víz” a rendszerről levett víz, amibe literenként egy csepp 25 mg/ml koncentrációjú metilénkék oldatot adtunk, ennek célja, hogy megakadályozza a gombák elterjedését az ikrán. Ez után jött az ikrák válogatása. Egy jól elkülönülő felületen, lámpa alatt, Pasteur pipetta segítségével eltávolítottuk a szennyeződések és az élettelen ikrákat (**6. ábra**). Ezek után inkubátorba helyeztük őket. Az ikrák kezelését minden nap el kellett végezni, amíg az összes ki nem kelt és be nem kerültek a rendszerbe.



6. ábra: A zebradániók ikráinak válogatása. Az ikrákat Petri-csészében tartjuk az inkubátorban a lárvák kikeléséig. Az elpusztult ikrák kifehérednek, ezeket Pasteur pipetta segítségével el kellett távolítani az egészséges ikrák közül. (Forrás: Saját kép)

3.5. A halak takarmányozása

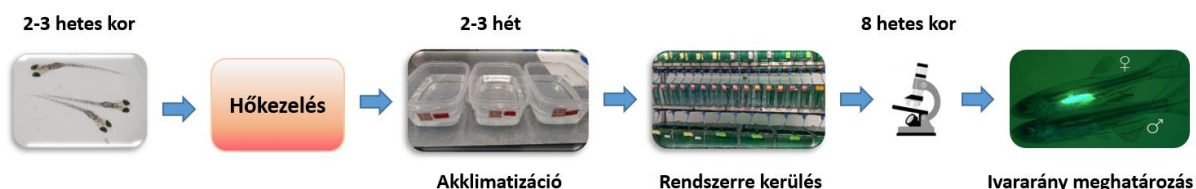
Mivel a zebradánió szájnylása öt napos korban nyílik ki, ezért a lárvákat ez után kezdtük el etetni a szájnylásnak megfelelő méretű táppal, addig a lárvák a szikanyagból táplálkoznak.

A halakat napi háromszor etettük, reggel kilenckor, délután egy órakor és három órakor. Az etetés kialakításához figyelembe kellett vennünk a tápok méretét, összetételét. A tápot a hal méretének és korának megfelelően kellett kiválasztani, nem lehetett nagyobb méretű, mint amit a hal meg tudott enni. A mennyiség kialakításánál mindig figyelnünk kellett a halak reakcióját, ha láttuk, hogy hamar felveszik a tápot és éhesek, akkor adhattunk nekik többet, ha már nem igen vették fel a tápot, akkor nem volt szükséges. A halak növekedésével változtattuk a táp méretét is. Az etetésnél fontos volt, hogy nem egyik napról a másikra váltottunk tápot, hanem szépen fokozatosan kellett hozzászoktatnunk a halakat az új táphoz, ez idő alatt mind a kettő tápból kaptak enni. Fiatalabb halak esetében alkalmaztunk szuszpenziós etetést is. A délután három órakor történő etetéshez élő tápot, artémiát (sórákot) használtunk.

3.6. A zebradánió ivadékok hőkezelése

A hőkezeléshez alkalmazott családok különböző tenyészpárok szaporításából származó utódok voltak. Olyan családokat kerestünk, amelyek kevesebb tejest (hím ivarú egyed) tartalmaztak, ezáltal könnyebben detektálható az ivararány eltolódás a hőkezelést követően. A hőkezelést először három hetes, majd később két hetes halakon is elvégeztük. Két-három hetes lárvákat kerestünk, amelyekből leszámoltuk az általunk meghatározott egyedszámot. Kezdetben egyre nagyobb és nagyobb egyedszámot határoztunk meg, majd a későbbiekben az elhullás mértéke miatt, a sűrűség figyelembevételével próbáltuk optimalizálni ezeket a számokat. A kiválogatott kezelt csoport mellé mindig tettünk egy ugyanolyan körülmények között lévő kontroll csoportot is. Ezt követően elvégeztük a hőkezelést. A teljes kezelés végeztével a halakat még rendszeren kívül tartottuk pár hétig, hogy elmúljon a stressz hatása és felerősödjének. Ezután a rendszeren nevelkedtek tovább. Amikor elérték a nyolc hetes kort, valamint a megfelelő méretet, mikroszkóp segítségével elvégeztük az ivararány meghatározást a *vasa::egfp* transzgénről detektált alapján (7. ábra).

A hőkezelést a halakon az alábbi módszerek alapján végeztük. A kezelések alapja mind a két módszer esetében azonos.



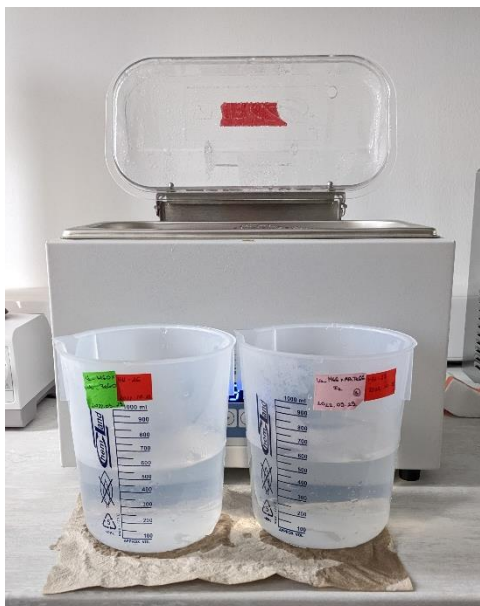
7. ábra: A hőkezeléshez használt módszerek alapja. A két-három hetes lárvákat hőkezelésnek vetettük alá, majd két-három hétig rendszeren kívül (tálban) neveltük őket. Ezt követően felkerültek a rendszerre. Amint elérték a megfelelő kort és méretet elvégeztük a mikroszkópos szexálást (Forrás: Saját ábra).

3.6.1 Akut hőkezelések

Az akut hőkezelés egy több egymást követő napon történő rövid hősokk, amit két módszerre bontottunk. Az egyik az előkísérletek során alkalmazott rövid akut kezelést három egymást követő napon, két órás idő intervallumban végeztük, 36 °C-on. Eleinte három fél literes üvegben, 300 ml vízben kezeltük a halakat. A két óra leteltével, a halakat az üvegből egy fehér tálba öntöttük nagyon óvatosan és saját vizükben hagytuk őket kihűlni. Másnap a kezelés előtt eltávolítottuk a szennyeződések és vízcserét végeztünk az edényeken. A vízcseréhez levegőztetett rendszervizet használtunk, ezzel együtt kerültek újra az üvegbe a halak. A kezelést ugyan úgy végeztük el, mint az előző napon.

A halakat kezdetben reggel és délután etettük táppal. A 3x2 óra kezelést követően a halak pár napi pihentetés (akklimatizáció) után felkerülhettek a rendszerre. A rendszeren a velük azonos korcsoportúaknak megfelelő etetést alkalmaztuk. A kezelt csoport mellett megtartottunk egy kontroll csoportot is, nagyjából ugyanolyan egyedszámmal és ugyanakkora tartályba tartva. Így később össze tudtuk hasonlítani a kontroll és kezelt állomány ivararányát.

A hosszú akut kezelés során kétszer öt egymást követő napon kezeltük a halakat. A módszert először szintén a fél literes üvegekben 300 ml vízzel kezdtük, majd az elhullást, sűrűséget figyelembe véve módosítottuk a módszert és két egy literes főzőpohárban, 600 ml vízben folytattuk **(8. ábra)**. A halak etetésén is módosítottunk, eleinte reggel és délután kaptak tápos etetést, azonban a tületetés lehetőségének felmerülése miatt, napi egyszeri délutáni szuszpenziós etetést alkalmaztunk. A szuszpenzió kívül a három-négy hetes korú halak már megkapták az artémiát is.



8. ábra: Az akut hőkezeléseket vízfürdő segítségével végeztük. A rövid akut és hosszú akut kezelésekre használt vízfürdő, melyben 36 °C-on két órán keresztül kezeltük a halakat (Forrás: Saját kép).

3.6.2. *Krónikus hőkezelések*

A krónikus hőkezelés során a halak 14 napon keresztül folyamatosan 36 °C-nak voltak kitéve. Ebben az esetben is két-három hetes halakkal indítottuk a kezelést. Kezdetben minden edénybe 500 ml rendszervizet töltöttünk, ebbe helyeztünk kb. 60 egyedet családonként. Összesen négy családot tudtunk egyszerre vizsgálni, és kétnaponta végeztünk vízcserét rajtuk.

A kísérletek során a halakat a pontos kezdeti létszám miatt egyesével, levágott, leégetett végű pipetta segítségével helyeztük az edényekben. A kezelések lejárta után két-három héttel a halak felkerülhettek a rendszerre. A kísérlet közben felmerült akadályok (elhullás, etetéssel járó gondok) miatt módosítottunk a módszeren. Az inkubátorban egyenlőtlenül eloszló hőmérséklet miatt az edényeket csak az alsó polcra helyeztünk, mivel itt maradt a víz hőmérséklete 35-36 °C körüli értéken. A sűrűséget (hal/l) valamint a folyamatos hőnek való kitettséget figyelembe véve az edényekben lévő víz mennyiségét 800 ml-re emeltük, az egyedszámot pedig 15 egyedre csökkentettük (**9. ábra**). Minden kezelt állomány mellé tettünk egy azonos körülmények között tartott, de a hőkezelésnek ki nem tett kontroll csoportot is. A halakat a 14 nap letelte után pár hétig még a rendszeren kívül neveltük, majd ezt követően kerülhettek a rendszerre.



9. ábra: A krónikus hőkezeléshez használt inkubátor. Az inkubátorban a folyamatos 14 napos kezelést végeztük, amely során kb. 35-36 °C-on tartottuk a halakat (Forrás: Saját kép).

3.7. Az ivarszerv fejlődésének mikroszkópos analízise

Az ivarszerv fejlődésének vizsgálata fluoreszcens adapterrel (BLS Kft, Budapest) ellátott SZ61 sztereomikroszkóppal (Olympos) történt. A vizsgálatot bódítás alatt végeztük, a *tg{vasa:egfp}* transzgénikus család ivadékainak ivarszerveiben megnyilvánuló Egfp jelzőfehérje erősségét

követve. Az Egfp a petefészekben volt erőteljesen jelen, ezért amikor kék fénnel megvilágítottuk erős zöld fénnel jelent meg, átütve az élő hal testfalán Ennek a jelnek a megléte, illetve hiánya alapján határoztuk meg az adott egyed ivarát. Az Egfp jel alapján felállítottunk egy vizuális skálát. A skálát öt állapotra bontottuk, az első, amikor egyáltalán nem volt jel, a második amikor nagyon minimális jelet láttunk, a harmadik közepes erősségű, a negyedik már intenzív jelet, míg az ötödik csoportba nagyon erőteljes jelet mutató egyedek kerültek (10. ábra).



10. ábra: Az ivar kialakulásának során a zebradánió egyedek eltérő Egfp jelet mutattak, a petefészek fejlettségének megfelelően. A vizuálisan felállított skálát öt részre bontjuk a jelerősség szempontjából. Mivel a halak a mikroszkópos elemzés során kettesével lettek fényképezve, ezért a skála ábrázolásánál az egyik halat mindig kitakartuk (Forrás: Saját kép)

3.8. RNS izolálás és az expressziós analízis előkészítése

A hőkezelési adatok validálása céljából RNS izoláláshoz gyűjtöttünk szövetmintákat. A minták a folyamatban lévő (0 nap) kísérletből, valamint másik kísérletekből, melyek három nappal (3 nap) és kilenc nappal (9 nap) a hőkezelés utáni stádiumból származtak. Mind a három család kontroll és kezelt csoportjából három-három egyedet emeltünk ki véletlenszerűen, azaz az ivarszerv Egfp jelét nem detektálva. A mintavételhez a halakat túlaltattuk szegfűszeg olaj segítségével. A halak kis mérete miatt az egész halat 300 µl DNA/RNA Shield oldatba (Zymo Research) tettük. Ezután hozzáadtunk 30 µl Proteinase K puffert és 15 µl Proteinase K enzimet, majd kék műanyag pálcával és 15 percenkénti vortex-szeléssel homogenizáltuk. Az RNS izolálását a Quick-RNA Microprep kittel (Zymo Research) végeztük el a gyártó protokollja szerint.

Az RNS mintákat a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) kittel cDNS-sé fordítottuk át. A referencia gén kiválasztásához megkezdjük négy korábban használt zebradánió háztartási gén (*18S ribosomal RNA (18s rRNA)*, *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eef1a1)*, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapdh)*, *ribosomal protein L13 (rpl13)*) PCR-es tesztelését (McCurley & Callard, 2008).

A háztartási gének kiválasztását követően a mintákon el fogjuk végezni a hőkezelés hatásának molekuláris validálását, illetve a hősokk válasz időtartamának meghatározását a *hsp70* és *cyp19a1a* mRNS-ek qPCR-es analízisével.

3.9. Statisztikai analízis

A statisztikai analízis GraphPad Prism 8.0.1 verziójú (GraphPad Prism for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com) programmal történt. Az adatsorokat normalitás vizsgálatnak (Shapiro-Wilk) vetettük alá. Normál eloszlást kaptunk, így páros t próba vizsgálatot folytattunk le. A $p < 0,05$ szignifikancia esetén fogadtuk el a páronkénti összehasonlításban a különbséget.

3.10. Hozzájárulások

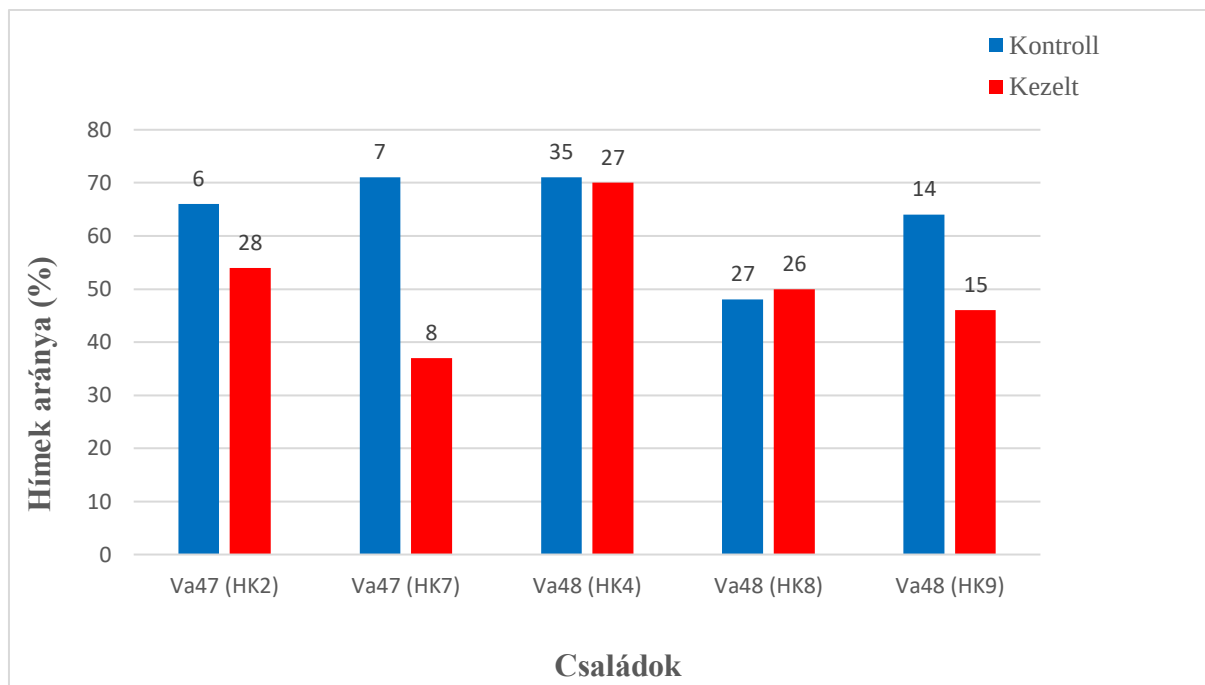
A halak gondozását és etetését Marton Csabával, Horváth Kornéllal és Hirth Mirellával közösen végeztük. A rövid és hosszú akut hőkezelések paramétereit én magam optimalizáltam, és a rövid akut kezelések zömét én magam végeztem. A krónikus hőkezelést munkatársammal Hirth Mirellával közösen optimalizáltuk. A hosszú akut és krónikus hőkezeléseket, valamint a kontroll és kezelt halak mikroszkópos szexálását Hirth Mirellával végeztem. Az RNS munkákat a betanítást követően önállóan végeztem el. A statisztikai analízist Bognár András segítségével végeztem el.

4. Eredmények és értékelésük

Célunk olyan zebradánió családok keresése volt, amelyek ivararány eltolódásával reagálnak a megemelkedett hőmérsékletre. Felállítottuk a hőkezelések módszerét, valamint optimalizáltuk azok körülményeit. A hőkezelések során kétféle módszert alkalmaztunk. Az egyik típus az akut hőkezelés volt, melyet kezdetben röviden - három egymást követő napon - végeztünk, majd később hosszabban kétszer öt napon át. Ezeknél mindkét esetben a halakat naponta két órán át tettük ki a magasabb hőmérsékletnek. A másik módszer a krónikus, 14 napon át folyamatosan zajló kezelés volt. A kísérlet során nagy számú családot és több ezer egyedet vetettünk alá hőkezelésnek. Ezeket az egyedeket neveltük és mikroszkóp segítségével meghatároztuk az ivarukat. Mindezek során találtunk négy olyan családot melyeket sikeresen el tudtunk tolni a hímek irányába hőkezeléssel.

4.1. A zebradánió családok rövid akut hőkezelése nem okozott változást az ivararányban

Eleinte rövid akut hőkezelést alkalmaztunk (lásd: 3.6.1). Összesen kilenc ilyen kezelést végeztünk, öt különböző családon. Sajnos a kezelések közben, valamint a kezeléseket követően felmerültek olyan tényezők, melyek miatt a kilenc kezelésből csak ötöt tudtunk kiértékelni. A kezdeti tapasztalatlanság miatt a nehezítő tényezők közé tartozott, hogy egyes családoknak nem indítottunk saját megfelelő kontroll csoportot, valamint, hogy a halak nagyszámban elhullottak. A halak ivarmeghatározását követően összehasonlítottuk a hőkezelt és kontroll csoportok ivararányát, melyek egyik esetben sem mutattak jelentős különbséget **(11. ábra)**. Ez arra utalt, hogy rövid akut (3 napos) hőkezelés nem képes eltolni a zebradánió állományok ivararányát jelentős mértékben a hímek felé.



11. ábra: A rövid akut hőkezelés nem okozott ivararány eltolódást. A rövid három egymást követő napon végzett két órás kísérlet eredményei azt mutatják, hogy a kezelt csoportok ivararánya közel azonos vagy alacsonyabb mint a kontroll állományé. Az oszlopok fölötti számok a csoportban fennmaradt létszámot jelölik.

A korábban a laborban lesőharcsán végzett rövid három napon történő két órás kísérletek eredményei azt mutatták, hogy a hőkezelt harcsák esetében megtizedelődtek, vagy teljesen eltűntek a kopolyúféreg paraziták (Bognár András, személyes közlés). Kollégáim arra utaló jeleket láttak, hogy a hőkezelés nem csak a parazitára volt hatással, hanem a kezelt halak immunrendszerének működésére is. Ennek alapján feltételeztük, hogy egy ilyen rövid akut hőkezelés elegendő lehet ahhoz, hogy megváltoztassuk a zebradánió családok ivararányát. Sajnos ez a feltételezésünk nem igazolódott be, ezért hosszabb kezeléseket kellett alkalmaznunk.

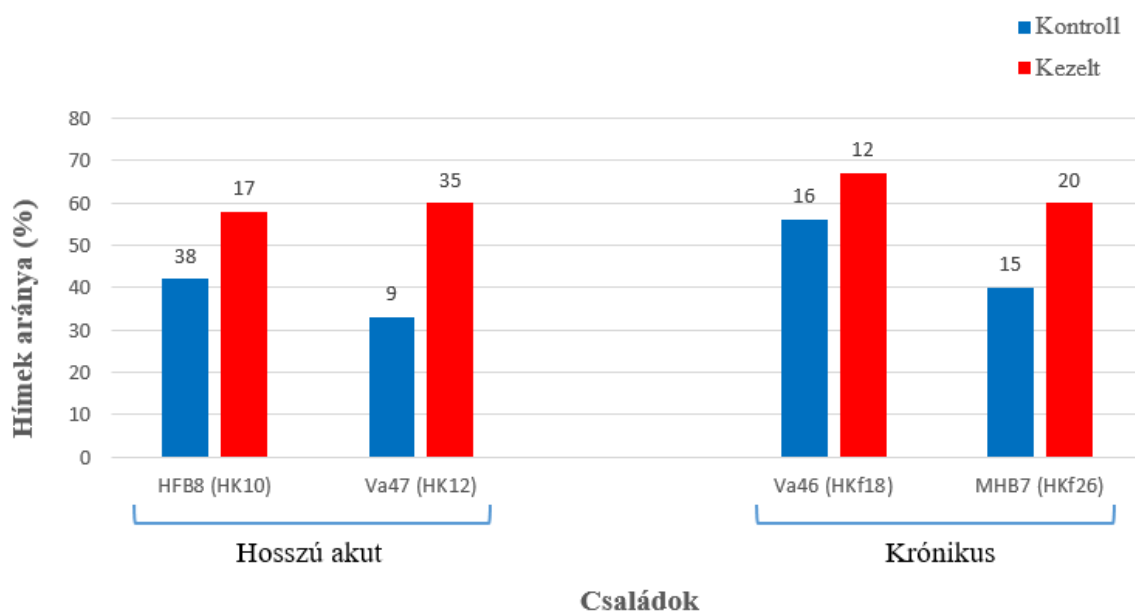
4.2. A hosszú akut és krónikus hőkezelések egyes családokban eltolták az ivararányt a hímek felé

Az előkísérletek eredményei azt mutatták, hogy a háromszor ismételt napi két órás hőkezelés nem volt elegendő az ivararány eltolásához, ezért a következő lépcsőben három helyett 2 x 5 egymást követő napon kaptak két órás kezelést a halak (lásd: 3.6.1. alfejezet). Ebből a hosszú akut kezelésből eddig 11 kísérletet végeztünk el, kilenc családon. A kilenc családból, két család esetében figyeltünk meg nagyobb (>10%) ivararány eltolódást a kontroll és kezelt állomány

között a hímek irányába, azonban az egyik család (HFB8) esetében a kísérletet a szülőpár elhullása miatt nem tudtuk megismételni.

Mindezekkel párhuzamosan kialakítottunk egy másik módszert, a krónikus hőkezelést. A krónikus hőkezelés során 14 napig folyamatosan kezeltük a halakat egy üvegajtós inkubátorban (lásd: 3.6.2), ugyanis korábban bizonyították, hogy a folyamatos hőstressz okoz ivararány eltolódást a zebradánió családokban (Ribas et al., 2017). Eddig krónikus kezelést 22-szer végeztünk, hét családon, ebből öt családon és 13 esetben láttunk jelentős ivararány eltolódást. Ebből egy családnál fordult elő, hogy ugyan láttunk ivararány eltolódást, de a szülőpár elhullása miatt a kísérletet nem tudtuk megismételni. A többi kilenc kezelés esetében nem tapasztaltunk ivararány eltolódást.

A hosszú akut és a krónikus hőkezelésnél egyaránt azt tapasztaltuk, hogy a kezelésre válaszoló csoportokban az ivararány eltolódott a hímek irányába a kontroll csoporthoz képest. Egyes esetekben az ivararány változása igen jelentősnek (20-30%) mutatkozott (**12. ábra**).



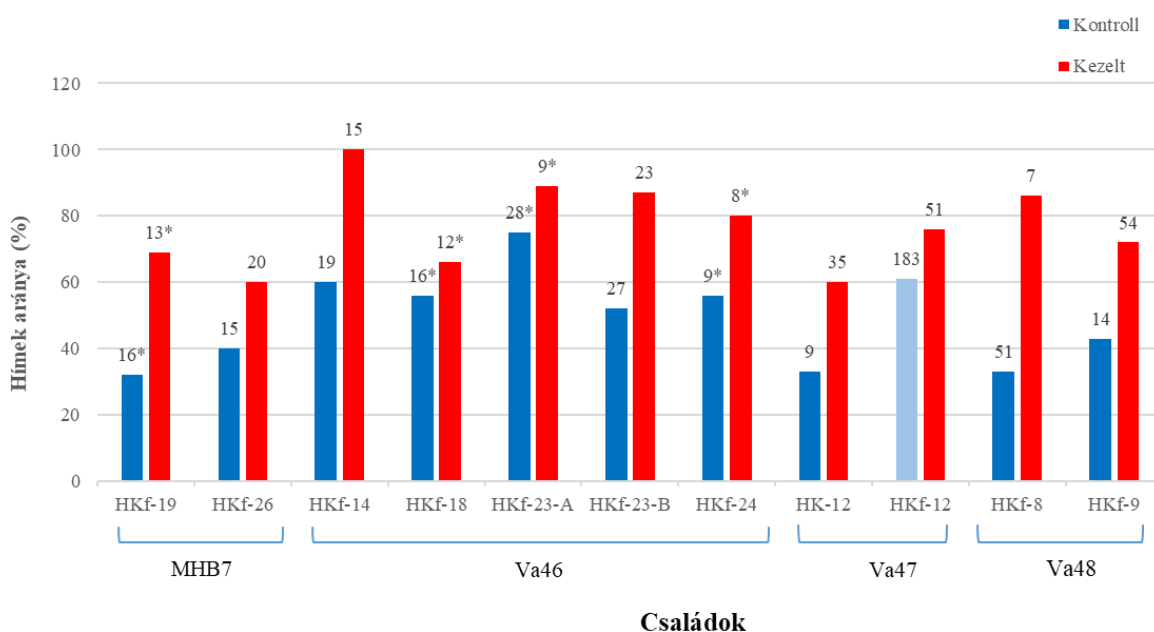
12. ábra: A hosszú akut és krónikus kezelések is okoztak jelentős ivararány eltolódást a hímek irányába. A sikeres kezelésekből kiemelt két-két család, mely bizonyítja hogy mindkét kezelés alkalmas lehet ivararány eltolásra. Az oszlopok fölötti számok a csoportból megmaradt létszámot jelentik.

A hosszú akut kezelés esetében (HK-10) megfigyelhetjük, hogy a kontroll csoport egyedszáma (38 egyed) jóval magasabb volt, mint a kezelt csoporté (17 egyed). Ennek ellenére ezeket az eredményeket sikeresnek számítottuk, mivel a zebradánió családok esetében az alacsony

létszám a nőivarú egyedek fejlődésének kedvez, és a kezelték között mégis a hímek voltak többségben.

4.3. A négy hőre válaszoló zebradánió család jellemzése

A kísérlet során a hőkezelést összesen 10 családon végeztünk el. A 10 családból csak nyolc esetében tapasztaltunk ivararány eltolódást, azonban csak négy család (MHB7, Va46, Va47, Va48) esetében állíthatjuk biztosan, hogy a család valóban válaszol a hőkezelésekre (**13. ábra**).



13. ábra: Négy család esetében sikeresen eltoltuk az ivararányt a hímek irányába. A négy családon belül elvégzett kísérletek eredményei. A csillaggal jelölt számok esetében a kezelést az elhullás növekedése miatt egy hét után leállítottuk. A halványkék oszlop esetében a kontroll csoport nem azonos ivatásból és nem azonos körülmények között nevelkedett a kezelt csoporttal.

Ezen családokon elvégzett kísérletek közül ugyanis legalább kettő sikeresnek bizonyult (**1. táblázat**). A másik négy családon, amely egy kezelésnél mutatott ivararány eltolódást, a szülőpár kiöregedése (ikra hiánya), a szülőpár elhullása miatt a kísérletet nem tudtuk megismételni vagy pedig számos elvégzett kísérletből csak egy olyan kísérlet született, ami ivararány eltolódást mutatott. Emiatt a hatás csak valószínűsíthető, de nem bizonyított.

1. táblázat: A hőkezelés hatása családonként különböző mértékben tolja el az ivararányt.

Családok	Siker kísérletek száma	Kontroll / Kezelt Egyedszám	Kontroll ivararány (%)	Kezelt ivararány (%)	Eltolás mértéke (%)
MHB7*	2	31/33	35	57	22
Va46**	5	119/67	52	87	35
Va47	2	192/86***	60	70	10
Va48	2	65/61	35	74	39

* A rózsaszín kiemelés a kevesebb mint 50% hím ivararányú családot jelöli.

** A halványkék szín az 50% feletti hím ivararányú családokat jelöli.

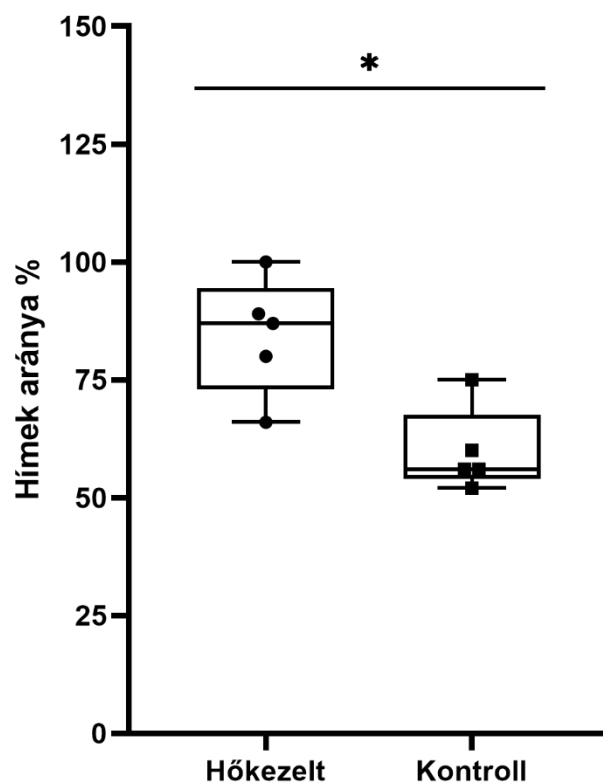
*** A kezeléshez tartozó kontroll csoport ebben az esetben nem azonos ivatásból származott és nem azonos körülmények között nevelkedett, mint a kezelt csoport.

A kezelésenként összesített sikeres kísérletek száma alapján azt feltételezzük, hogy a krónikus kezelés nagyobb valószínűséggel okoz ivararány eltolódást, mint a hosszú akut kezelés. Egyes feltüntetett csoportok esetében a kezelést az elhullás mértékének növekedése miatt egy hét kezelés után leállítottuk, ezek csillaggal vannak jelölve az ábrán. Egy család esetében pedig a kontroll csoport nem azonos ivatásból származott és nem hasonló körülmények között növekedett a kezelt csoporttal, ezt az ábrán világoskék oszloppal jelölve láthatjuk. A leállított kísérletekből származó eredményeket a két hetes kezelésekhöz hasonlítva azt láttuk, hogy az egy hetes kezelés is okozott ivararány eltolódást.

Így feltételezhetjük, hogy a hőre érzékeny családokban ennyi idő is elegendő lehet az ivararány eltolódáshoz. Ez egy fontos felfedezés, hiszen ezzel jelentősen csökkenthetjük a kezelés okozta veszteségeket, ezáltal növelve a beavatkozások sikerességét.

Mivel a Va46-os család esetében öt olyan sikeres kísérletünk volt, mely mutatott ivararány eltolódást, ezért ezen kezelésekről statisztikai analízist végeztünk. A kapott eredmények igazolták, hogy a hőkezelés hatására a hímek százalékos aránya megemelkedett ($p=0,0132$; páros t próba) (14. ábra).

Az MHB7, Va47 és Va48 családok esetében sajnos nem volt elegendő a hőkezeléses kísérletek ismételtségének a száma ahhoz, hogy összehasonlító statisztikai vizsgálatot végezzünk. Az adatok azonban ígéretesek, az említett három család esetében további vizsgálatok szükségesek, amelyek jelenleg is zajlanak.



14. ábra: A Va46-os családon végzett statisztikai analízis szignifikánsan bizonyította, hogy a hímek százalékos aránya megemelkedett a hőkezelt csoportokban.

A hosszú optimalizálási időszakot követően tehát találtunk négy olyan családot, melyek sikeresen reagálnak a hőkezelésre. Ezeken a családokon – amellet, hogy új családokat is keresünk, próbáljuk folyamatosan ismételni a kezeléseket, melyet nehezíti, hogy szülőpárok idősek, néhány ritkán, vagy kevés ikrát ad. Ezeket a családokat, melyeknek sikeresen eltoltuk az ivararányát, a jövőben csoportunk fel fogja használni a hőkezelés hatásának molekuláris analíziséhez, mely az Élvtal Kutatási Kiválósági program egyik fő célkitűzése.

4.4. Előkészületek a hősokk válasz validálására molekuláris eljárásokkal

A validáláshoz elengedhetetlen szükségünk lesz olyan referencia génekre, melyekhez a célgénekből mért mRNA értékeket hasonlítani lehet, azaz a hőkezelés hatására az expressziójuk zebbradánióban nem változik. Négy korábban használt zebbradánió háztartási génnel: *18S ribosomal RNA (18s rRNA)*, *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 (eef1a1)*, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (gapdh)*, *ribosomal protein L13 (rpl13)* (McCurley & Callard, 2008) kezdtük meg, az ezzel kapcsolatos kísérletek folyamatban vannak. Két

referencia gént fogunk kiválasztani, melyekhez hasonlítva fogjuk meghatározni a tesztelt gének relatív expressziós értékét.

Ezt követően a mintákon el fogjuk végezni a hőkezelés hatásának molekuláris validálását, illetve a hősokk válasz időtartamának meghatározását a *hsp70* és *cyp19a1a* mRNS-ek qPCR-es analízisével. Ezekre az eredményekre azért van szükségünk, hogy a nagyléptékű szekvenálást biztosan olyan mintákon végezhessek el, melyekben a hőkezelés működött, de a hősokk válasz mindent elfedő, *hsp* mRNS-ekben gazdag kezdeti szakasza már lezajlott.

4.5. Limitációk

A hőkezelések módszereit a laboratórium adottságaihoz kellett igazítanunk. Eleinte csak a vízfürdővel történő akut kezeléseket tudtuk elvégezni, és csak később, az inkubátor megérkezését követően kezdhettük a krónikus kezelést. Az inkubátor kezdetben nem tartotta a hőmérsékletet, ezért cserére vissza kellett küldeni, ami sok időt vett igénybe. Mivel ezekkel az eszközökkel nem érkezett hozzájuk tartozó edény, ezért ki kellett kísérleteznünk, hogy milyen edényekkel, eszközökkel tudjuk hatékonyan elvégezni a hőkezeléseket. A vízfürdő hőmérsékletének beállítása is okozott némi gondot, mivel a 36 °C-ra állított hőmérséklet esetén, a benne lévő üvegek vize nem érte el a 36 °C-t.

Így időbe telt mire megtaláltuk azt a hőmérsékletet, amit be kell állítani a vízfürdőn, hogy az üveg vize a megfelelő hőmérsékletre melegedjen. A krónikus kezeléshez használt inkubátor esetében a benne lévő edények vízhőmérsékletének beállítása szintén hosszadalmas volt, ugyanis az inkubátor sokszor nem tartotta pontosan a beállított hőmérsékletet. Valamint felmerült annak a lehetősége is, hogy az inkubátorban a hőmérséklet nem egyenlően oszlik el, ezért a felső polcon tárolt edényekben mindig magasabb volt a vízhőmérséklet (sokszor a halak számára már kritikus értékű), ezért az ott folytatott kísérleteket felfüggesztettük. Mivel előre nem tudtuk melyik család az, amelyik reagál a hőkezelésre, ezért sok családon kellett kipróbálnunk a kezelést. Ezek mind az optimalizálási időszak meghosszabbodását eredményezték. A hosszú optimalizálási időszak miatt sajnos a tervezettnél kevesebb időm maradt arra, hogy molekuláris vizsgálatokat végezzek.

A laboratórium jelenlegi eszköztára sajnos nem tette lehetővé, hogy az egyedekből szerveket izoláljunk, ezért az RNS-hez való mintákat, a halak apró termete miatt egészben tettük el Eppendorf csőbe. Emiatt szervenkénti expressziós analízis helyett csak egész egyeden tudtunk expressziós vizsgálatot végezni.

5. Következtetések, javaslatok

A halak ivarát számos tényező befolyásolhatja. Lehet genetikai, környezeti vagy akár ezek együttese meghatározhatja, hogy egy hal hím vagy nőstény ivarú lesz-e. Az ivarra ható környezeti tényezők közül a leggyakrabban előforduló a hőmérséklet. Korábban bizonyították, hogy egyes zebradánió családok magas hőmérsékletnek való korai kitettsége a hímek irányába való ivararány eltolódását okozták (Ribas et al., 2017). A munkám során ezt a mechanizmust vizsgáltuk meg annak érdekében, hogy az azóta rendelkezésre álló fejlettebb genomikai technológiák segítségével a hőkezeléssel eltolt ivararányú családok egyedeiről mélyebb, részletesebb képet kapjunk.

A hőkezelést kétféle eljárással végeztük (akut, krónikus). Az akut kezelésből először egy rövid akut kezeléssel kezdtünk (lásd: 3.6.1.). Feltételeztük, hogy a három egymást követő napon adott két órás hő sokk elegendő lesz ahhoz, hogy eltoljuk a családok ivararányát a hímek felé. A kísérletekből származó eredmények azonban azt mutatták, hogy a három nap nem volt elegendő az ivararány elbillentésére, így onnantól hosszú, 2x5 napon át tartó akut és 14 napos krónikus kezeléseket alkalmaztunk. Ezen utóbbi kísérletek eredményei arra utaltak, hogy ekkora kitettség már okoz ivararány eltolódást egyes családokban. Az eddig elvégzett kezelések alapján a krónikus hőkezelés bizonyult a leghatásosabbnak. A krónikus hőkezelés során folyamatosan, azaz 24 órán keresztül, kapják a hő sokkot, 14 napon át. Több esetben előfordult a krónikus kezelés során, hogy a kezelt állomány elkezdett nagymértékben elhullani, ezért a halak érdekében egy hét után leállítottuk a kísérletet. A leállított kísérletekből származó eredményekből azt láttuk, hogy az egy hetes kezelés is okozott ivararány eltolódást. Így feltételezhetjük, hogy az egy hetes folyamatos hőstressz is elegendő lehet az ivararány eltolódáshoz.

Eredményeink igazolták Ribas és munkatársai (2017) azon megfigyelését, hogy a hőre adott válasz családspecifikus. Egyes családok reagáltak a hőkezelésre, míg más családok nem. A családok között különbség volt arra nézve is, hogy milyen módszerrel kezeltük őket. Azon családok közül melyek jelentősen reagáltak a hőkezelésre, a krónikus kezelés mindegyiknél okozott ivararány eltolódást. A hosszú akut kezelésnél azt láttuk, hogy ugyan okozhat ivararány eltolódást, néhány esetben ez az értékben nem jelentős mértékű. A hosszú akut kezelésből jelenleg nincs ahhoz elég mérésünk, hogy pontos összehasonlítást végezhesünk a krónikus kezeléssel. A későbbiekben amint lesz elegendő eredmény, ezen módszerek sikerességének összehasonlítása fontos lehet abból a szempontból, hogy ha elegendő ismételt rövidebb

hőhatások sorozata is az ivar eltolásához, az a halak számára csökkentené a stresszt, és esetleg javíthatja a túlélést.

A módszerek optimalizálási időszaka alatt egyre nagyobb egyedszámmal indítottunk kísérleteket. Ezen kísérletek során az egyedszám a kísérlet végére, valamint a későbbiek nagyon kis mértékben maradt fenn, valamint a nagy sűrűség a zebradánió családok esetében a hím ivarú egyedek többségét okozhatja. A későbbiekben a sűrűség figyelembevételével kezdtük el a kísérleteket indítani, tehát növeltük a víz mennyiségét és csökkentettük az egyedek számát.

(Melléklet 1. és 2. ábrák). A tapasztalataink azt mutatják, hogy az így indított kezeléseknél nagyobb eséllyel maradtak fenn a kezdeti egyedszámok mint a korábbi nagy egyedszámmal indított kísérleteknél. Az egyedek fennmaradása tekintetében megfigyelhető hogy néhány család egyedei nehezebben bírják a hőkezelést, mint mások. Valamint hogy bizonyos családok csak egy adott ideig (pl. egy hét) bírják a hőkezelést, ezután elkezdnek elhullani.

Ezek a tapasztalatok és eredmények a jövőbeni kísérletek elvégzését segíthetik. A jövőre nézve a hőkezelésre válaszolt családokon további kezelések indítása javasolt. Ezek a családok alkalmasak lehetnek molekuláris analízisek elvégzésére. Érdekes lehet megvizsgálni, hogy a hőkezelés hatására ivart váltó, úgynevezett „neomale”-eket továbbszaporítva milyen lesz az utódállományuk ivararánya. Mivel ezek az egyedek csak külsőleg, azaz fenotípusosan váltanak ivart és a genotípusuk női marad, ezért az várható, hogy az utódállományukban sok ikrás egyed lesz.

Csoportunkban korábban kimutatták, hogy hőkezelés nem csak az ivararányra, de sok más tényezőre, így a halak immunrendszerére is hatással lehet (Bognár András, személyes közlés). A továbbiakban ennek a mechanizmusát és mértékét is érdemes lenne megvizsgálni a zebradánió modellen.

A hőkezelés hatásának haszonhalakon való vizsgálata jelentős lehet a jövőre nézve. Mivel ezt a hazai haszonhalakon eddig nem vizsgálták, nem tudjuk, hogy rájuk hatással van-e egyáltalán, ha igen milyen hatással van rájuk a magas hőmérséklet. Ez a tudás fontos lehet a tógazdasági tevékenységek szempontjából, főleg a klímaváltozás okozta felmelegedés veszélyének figyelembe vételével.

6. Összefoglalás

A TDK munkám során vizsgáltam a hőmérséklet halak ivarára gyakorolt hatását a zebradánió modell segítségével. A globális klímamódosulás által okozott felmelegedés jelentős mértékben megváltoztathatja változó testhőmérsékletű (poikiloterm) állatok, így a halak fiziológiáját is. Hatással lehet a halak metabolizmusára, immunrendszerének működésére és akár még az ivaruk kialakulására is.

Korábban Ribas és munkatársai (2017) vizsgálták, hogy a hőmérséklet milyen hatással van a zebradánió ivarára. Azt tapasztalták, hogy a korai időszakban a magas hőmérsékletnek kitett halak ivararánya eltolódott a hímek irányába. A munkám során ezen a mechanizmus részletesebb vizsgálatához teremtettem meg a feltételeket olyan zebradánió családok azonosítása révén, melyekben a hőkezelés hatására az ivararány a hímek irányába tolódott el.

A hőkezelést kétféle eljárással (akut és krónikus) végeztük, az előbbiből egy rövid, három napos és egy hosszú, 2x5 napos változat alkalmasságát is megvizsgáltuk. Eredményeink azt mutatták, hogy a három nap nem volt elegendő az ivararány elbillentésére, így onnantól csak hosszú akut és 14 napos krónikus kezeléseket alkalmaztunk. Összességében ezzel a két eljárással 14 család több, mint kétezer egyedével 33 kísérletet végeztünk el.

A legfontosabb kitűzött célt sikerült elérnem, mert négy olyan családot azonosítottam, amelyekben a hőkezelés hatására az utódok ivararánya eltolódott a hímek irányába. Több családban mindkét kezeléssel sikerült az ivararányt elbillenteni. Több esetben előfordult a krónikus kezelés során, hogy a kezelt állomány elkezdett nagymértékben elhullani, ezért a halak érdekében egy hét után leállítottuk a kísérletet. A leállított kísérletekből származó eredményekből azt láttuk, hogy az egy hetes kezelés is okozott ivararány eltolódást, így feltételezhetjük, hogy a hőre érzékeny családokban ennyi idő is elegendő lehet az ivararány eltolódáshoz. Eredményeink igazolták Ribas és munkatársai (2017) azon megfigyelését, hogy a hőre adott válasz családspecifikus.

Az optimalizált eljárás és az azonosított hőérzékeny családok nagyon fontosak a csoport további munkája szempontjából, hiszen megteremtik annak lehetőségét, hogy a hőkezelés ivarra gyakorolt hatását mélyebben megérthessük. Mivel a zebradánió a pontyfélékhez tartozik, a TDK munkám eredményei relevánsak lehetnek a többi pontyfélére, így pl. a ponty, az amúr, a busák és számos keszegfaj, számára is. Ezen ismeretek fontosak a lehetnek a hazai sekély vízü tavaink természetes ökoszisztémájának és az azokban élő halfajok fennmaradása szempontjából.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőimnek Dr. Szeverényi Ildikónak és Dr. Orbán Lászlónak, akik rengeteg segítséget és támogatást nyújtottak, mind a szakmai gyakorlatom elvégzésében, mind a dolgozatom megírásában.

Külön köszönöm Hirth Mirellának, aki az itt létem során rengeteg segítséget nyújtott a kísérletek összeállításában, lebonyolításában, folyamatos javításában, valamint számos hasznos tanáccsal látott el a dolgozatom elkészítése során.

Köszönet illeti továbbá az Alkalmazott Halbiológia Tanszék minden munkatársát és hallgatóját, akik bármilyen formában segítettek a munkámat. Köszönettel tartozom Marton Csabának és Horváth Kornélnak, akik segítettek a kísérleti halaim gondozását, valamint Bognár Andrásnak, aki segített elvégezni a statisztikai analízist és megtanította a Zotero szoftver használatát, ezzel is megkönnyítve munkámat.

Köszönöm a családomnak és a barátaimnak, hogy tanulmányaim alatt végig támogattak és mindenben mellettem álltak.

7. Irodalomjegyzék

- Abozaid, H., Wessels, S., & Hörstgen-Schwark, G. (2012). Elevated Temperature Applied during Gonadal Transformation Leads to Male Bias in Zebrafish (*Danio rerio*). *Sexual Development*, 6(4), 201–209. <https://doi.org/10.1159/000336297>
- Baroiller, J. F., D’Cotta, H., & Saillant, E. (2009). Environmental Effects on Fish Sex Determination and Differentiation. *Sexual Development*, 3(2–3), 118–135. <https://doi.org/10.1159/000223077>
- Bártfai, R., & Orbán, L. (2003). The vasa Locus in Zebrafish: Multiple RGG Boxes from Duplications. *DNA and Cell Biology*, 22(1), 47–54. <https://doi.org/10.1089/104454903321112497>
- Bernstein, H., Byers, G. S., & Michod, R. E. (1981). Evolution of Sexual Reproduction: Importance of DNA Repair, Complementation, and Variation. *The American Naturalist*, 117(4), 537–549. <https://doi.org/10.1086/283734>
- Castranova, D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D. P., Best, J., Coscolla, J., Doherty, A., Ramos, J., Hakkesteeg, J., Wang, C., Wilson, C., Malley, J., & Weinstein, B. M. (2011). The Effect of Stocking Densities on Reproductive Performance in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 8(3), 141–146. <https://doi.org/10.1089/zeb.2011.0688>
- Chang, A., Liew, W. C., Chuah, A., Lim, Z., Lin, Q., & Orban, L. (2007). FluoMEP: A new genotyping method combining the advantages of randomly amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism. *Electrophoresis*, 28(4), 525–534. <https://doi.org/10.1002/elps.200600715>
- Charnov, E. L., & Bull, J. (1977). When is sex environmentally determined? *Nature*, 266(5605), Article 5605. <https://doi.org/10.1038/266828a0>
- Cornejo-Páramo, P., Lira-Noriega, A., Ramírez-Suástegui, C., Méndez-de-la-Cruz, F. R., Székely, T., Urrutia, A. O., & Cortez, D. (2020). Sex determination systems in reptiles are related to ambient temperature but not to the level of climatic fluctuation. *BMC Evolutionary Biology*, 20(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01671-y>
- de Visser, J. A. G. M., & Elena, S. F. (2007). The evolution of sex: Empirical insights into the roles of epistasis and drift. *Nature Reviews Genetics*, 8(2), 139–149. <https://doi.org/10.1038/nrg1985>
- Dooley, K., & Zon, L. I. (2000). Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 10(3), 252–256. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00074-5](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00074-5)
- Fuentes, R., Letelier, J., Tajer, B., Valdivia, L. E., & Mullins, M. C. (2018). Fishing forward and reverse: Advances in zebrafish phenomics. *Mechanisms of Development*, 154, 296–308. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.08.007>
- Gamble, T., & Zarkower, D. (2012). Sex determination. *Current Biology*, 22(8), R257–R262. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.02.054>

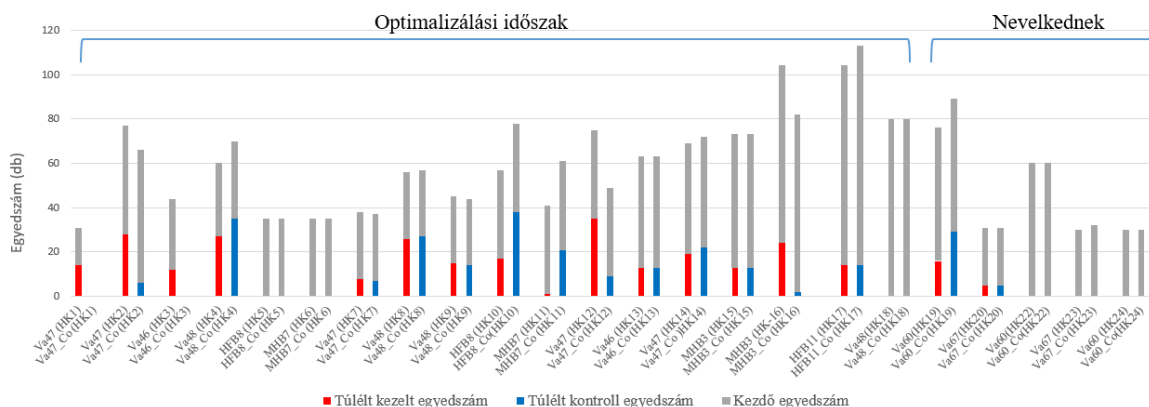
- Hazlerigg, C. R. E., Lorenzen, K., Thorbek, P., Wheeler, J. R., & Tyler, C. R. (2012). Density-Dependent Processes in the Life History of Fishes: Evidence from Laboratory Populations of Zebrafish *Danio rerio*. *PLoS ONE*, 7(5), e37550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037550>
- Hosseini, S., Simianer, H., Tetens, J., Brenig, B., Herzog, S., & Sharifi, A. R. (2019). Efficient phenotypic sex classification of zebrafish using machine learning methods. *Ecology and Evolution*, 9(23), 13332–13343. <https://doi.org/10.1002/ece3.5788>
- Hsiao, C.-D., & Tsai, H.-J. (2003). Transgenic zebrafish with fluorescent germ cell: A useful tool to visualize germ cell proliferation and juvenile hermaphroditism in vivo. *Developmental Biology*, 262(2), 313–323. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00402-0](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00402-0)
- Kobayashi, Y., Nagahama, Y., & Nakamura, M. (2013). Diversity and Plasticity of Sex Determination and Differentiation in Fishes. *Sexual Development*, 7(1–3), 115–125. <https://doi.org/10.1159/000342009>
- Krøvel, A. V., & Olsen, L. C. (2002). Expression of a vas::EGFP transgene in primordial germ cells of the zebrafish. *Mechanisms of Development*, 116(1), 141–150. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00154-5)
- Lawrence, C., Ebersole, J. P., & Kesseli, R. V. (2008). Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Biology of Fishes*, 81(2), 239–246. <https://doi.org/10.1007/s10641-007-9195-8>
- Liew, W. C., Bartfai, R., Lim, Z., Sreenivasan, R., Siegfried, K. R., & Orban, L. (2012). Polygenic Sex Determination System in Zebrafish. *PLoS ONE*, 7(4), e34397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034397>
- Liew, W. C., & Orbán, L. (2014). Zebrafish sex: A complicated affair. *Briefings in Functional Genomics*, 13(2), 172–187. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elt041>
- Matthews, M., Trevarrow, B., & Matthews, J. (2002). A Virtual Tour of the Guide for Zebrafish Users. *Lab Animal*, 31(3), 8.
- McCurley, A. T., & Callard, G. V. (2008). Characterization of housekeeping genes in zebrafish: Male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *BMC Molecular Biology*, 9(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-102>
- Moore, E. C., & Roberts, R. B. (2013). Polygenic sex determination. *Current Biology*, 23(12), R510–R512. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.004>
- Navarro-Martín, L., Viñas, J., Ribas, L., Díaz, N., Gutiérrez, A., Croce, L. D., & Piferrer, F. (2011). DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (cyp19a) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass. *PLoS GENETICS*, 7(12), e1002447. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002447>
- Orban, L., Sreenivasan, R., & Olsson, P.-E. (2009). Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 312(1), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.04.014>

- Ospina-Álvarez, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002837>
- Patiño, R., Davis, K. B., Schoore, J. E., Uguz, C., Strüssmann, C. A., Parker, N. C., Simco, B. A., & Goudie, C. A. (1996). Sex differentiation of channel catfish gonads: Normal development and effects of temperature. *Journal of Experimental Zoology*, 276(3), 209–218. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19961015\)276:3<209::AID-JEZ5>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19961015)276:3<209::AID-JEZ5>3.0.CO;2-R)
- Ribas, L., Liew, W. C., Díaz, N., Sreenivasan, R., Orbán, L., & Piferrer, F. (2017). Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(6), E941–E950. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609411114>
- Richter, K., Haslbeck, M., & Buchner, J. (2010). The Heat Shock Response: Life on the Verge of Death. *Molecular Cell*, 40(2), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.10.006>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x>
- Takahashi, H. (1977). Juvenile Hermaphroditism in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido University* 28(2), 57-65.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., & Iguchi, T. (2004). An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 137(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00178-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00178-8)
- Wang, X. G., Bartfai, R., Sleptsova-Freidrich, I., & Orban, L. (2007). The timing and extent of ‘juvenile ovary’ phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. *Journal of Fish Biology*, 70(sa), 33–44. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01363.x>
- Wilson, C. A., High, S. K., McCluskey, B. M., Amores, A., Yan, Y., Titus, T. A., Anderson, J. L., Batzel, P., Carvan, M. J., III, Scharl, M., & Postlethwait, J. H. (2014). Wild Sex in Zebrafish: Loss of the Natural Sex Determinant in Domesticated Strains. *Genetics*, 198(3), 1291–1308. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.169284>

8. Mellékletek

Akut hőkezelés

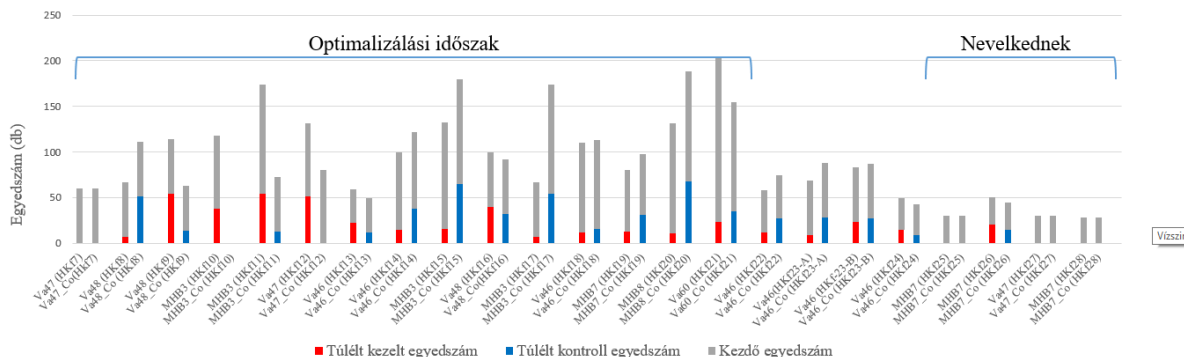
Akut kezelés: 10 család 25 kezelés
Összesen indított kontroll: 1022
Túlélt kontroll: 281
Összesen indított kezelt: 1048
Túlélt kezelt: 261



Melléklet 1. ábra: Az akut hőkezelések során indított egyedszám (szürke) és az azokból túlélő kezelt (piros) és kontroll (kék) egyedszám. Az optimalizálási időszak alatt az egyre nagyobb kezdeti létszámok egyre nagyobb elhullást eredményeztek.

Krónikus kezelés: létszám

Krónikus kezelés: 7 családon 22 kezelés
Összesen indított kontroll: 1388
Túlélt kontroll: 535
Összesen indított kezelt: 1541
Túlélt kezelt: 442



Melléklet 2. ábra: A krónikus hőkezelések során indított egyedszám (szürke) és az azokból túlélő kezelt (piros) és kontroll (kék) egyedszám. Az optimalizálási időszak alatt az egyre nagyobb kezdeti létszámok egyre nagyobb elhullást eredményeztek.