

Okozhat-e ivarváltást kétéltűekben a kémiai szűnyoggyérítés?

Tudományos Diákkör Dolgozat
biológia mesterszak

készítette:
HÓCZA SZABOLCS

Témavezető:
Dr. Bókony Veronika
Tudományos főmunkatárs, ELKH ATK Növényvédelmi Intézet

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOLÓGIAI INTÉZET



Tartalomjegyzék

Összefoglaló	3
Bevezető	4
Anyagok és módszerek.....	6
Kísérlet menete.....	6
Statisztikai elemzések.....	8
Eredmények	10
Ivararány.....	10
Mortalitás.....	11
Diskusszió.....	15
Szerzői hozzájárulás	17
Irodalomjegyzék	17
Köszönetnyilvánítás	21

Összefoglaló

Az ivarváltás, amikor az egyedfejlődés kezdetén a genetikai ivarral ellentétes fenotípusos ivar alakul ki, vizsgálata ektoterm gerincesek természetes populációiban az utóbbi néhány évben kezdett fellendülni. Többféle környezeti hatás okozhat ivarváltást, köztük endokrin diszruptor kemikáliák is. Ilyen endokrin diszruptorok lehetnek a kémiai szúnyoggyérítésben használt rovarirtószerek, melyek különösen a vizes élőhelyek állatvilágát károsíthatják. Két manapság elterjedten használt szintetikus piretroid alapú rovarirtószer, a deltametrin és az etofenprox korábbi kutatások eredménye alapján élettani és viselkedésbeli elváltozásokat okozhat vízi állatokban, azonban egyetlen tanulmány sem vizsgálta még, hogy befolyásolják-e az ivari fejlődést kételtűekben. A kutatásom célja e két piretroid környezetileg releváns koncentrációinak hatásait felmérni az ivararányra és az ivarfüggő mortalitásra erdei békáknál (*Rana dalmatina*). Terepen gyűjtött petékből nevelt ebihalakat mezokozmoszban neveltünk fel úgy, hogy a vízbe 0.03 vagy 0.3 µg /l deltametrint vagy etofenproxot adagoltunk háromszor, majd az átalakult állatok ivarát boncolással állapítottuk meg. Az eredményeink alapján lehetséges, hogy az alacsony koncentrációjú etofenprox kezelés növeli a nőstények mortalitását és/vagy ivarváltást (maszkulinizációt) okoz. Ennek pontos kiderítésére a kísérleti állatok genetikai ivarának vizsgálatára lesz szükség.

Bevezető

Két nagyon gyakori ivarmeghatározási rendszer az élővilágban a genetikai ivarmeghatározás és a környezeti ivarmeghatározás. Az előbbi esetében a gének határozzák meg az egyed ivarát, az utóbbinál az egyedfejlődés korai szakaszában tapasztalt környezeti hatások [1]. Újabb kutatások alapján megállapították, hogy ez a két rendszer egy kontinuum két végpontja és vannak olyan fajok, ahol e kettő vegyes rendszerén alapszik az ivarmeghatározás. Az ilyen vegyes rendszerek azok, ahol előfordulhat ivarváltás.

Ivarváltásnak nevezzük azt a jelenséget, amikor az egyedfejlődés korai érzékeny stádiumaiban a környezet felülírja a gének által meghatározott ivart és az attól ellentétes ivar fenotípusát alakítja ki. Számos faj természetes populációiban találtak ivarváltott egyedeket [2–4], de laboratóriumi kísérletekkel többen is sikeresen indukáltak ivarváltást [1,5,6]. A két fő környezeti hatás, ami ivarváltást okozhat: az extrém magas vagy alacsony hőmérséklet és a különböző vegyszerek. Az ember általi környezet-átalakítás mindkét tényezőt keresztül, a klímaváltozás és a kémiai környezetszennyezés révén is növelheti az ivarváltás gyakoriságát az erre érzékeny állatokban [1]. Hormonkezelés által indukált ivarváltást évtizedek óta alkalmaznak haltenyészetekben gazdaságilag profitálóbbr ivararány kialakítására.

Azokban a taxonokban van főleg ökológiai jelentősége az ivarváltásnak, amelyeknek a lárvái vagy embriói a környezeti körülményeknek viszonylag nagymértékben kitéve fejlődnek [1,7]. A halak és hüllők mellett ilyenek a kételtűek is, melyeknek sok faja kihalással veszélyeztetett [8]. Ezekben az állatcsoportokban több szempontból is fontos lenne minél kiterjedtebben vizsgálni az ivarváltást, hogy megérthessük, melyik környezeti változások melyik fajokra jelentenek veszélyt, és hogy ennek a következményeit előrejelezhessük vagy akár megelőzhessük. Az ivarváltott egyedek több olyan tulajdonságban különbözhetnek a nem ivarváltott egyedektől, amelyek befolyásolhatják a túlélést vagy a szaporodási sikert [7], például több halfajban is alacsonyabb fitness mutatókat találtak a hormonkezelés miatt ivarváltott egyedekben [1]. Mikó és mtsai. [9]. kísérletében, amikor egy mesterséges hőhullámmal indukáltak ivarváltást, akkor az így maszkulinizált egyedeknek szignifikánsan romlottak a fitnessmutatói. Az ivarváltás nemcsak az egyes egyedek fitnessére, hanem a populáció egészére is hatással lehet. Egyrészt a populáció ivararánya kiegyensúlyozatlanná válhat, ami csökkentheti az effektív populációméretet, a genetikai változatosságot, és ezek miatt az evolúciós alkalmazkodó képességet is [10]. Másrészt elméleti modellek szerint az egyre

gyakoribbá váló ivarváltás befolyásolhatja az ivarmeghatározási rendszer evolúcióját, az ivari szelekciót, és akár a populáció kihalásához is vezethet [11,12].

Olyan vegyületeket nevezünk endokrin diszruptoroknak, amelyek befolyásolják a szervezetben található endokrin mirigyek által termelt hormonok működését. Mivel a hormonok fontosak az ivarszervek differenciációjához, az ivarváltásra hajlamos fajok érzékenyek az endokrin diszruptorként viselkedő szennyezőanyagok hatásaira is [5]. Laboratóriumi kísérletek során számos környezetszennyező vegyületről bebizonyosodott, hogy endokrin diszruptorként hat és megváltoztatja a fiatal egyedek ivararányát, vagy interszexet okoz, ami azt jelenti, hogy hím és női ivarú szövetek is találhatóak ugyanabban az egyedben, akár egy ivarszerven belül is [13]. Azonban kevés ökotoxikológiai vizsgálat bizonyította az ivarváltás megtörténtét az egyedek genetikai ivarának meghatározásával, ehelyett többnyire csak a fenotípusos ivararányok alapján következtettek a meglétére, amivel az a probléma, hogy nem lehet kizárni az ivarspecifikus mortalitás lehetőségét [6]. Ugyanis az ivararány eltolódások oka nemcsak ivarváltás lehet, hanem ivarspecifikus tolerancia is a környezeti stresszre [14]. Például a *Salvelinus umbla* halfajnál szennyezett környezetben a nőstény embriók mortalitása nagyobb, mint a hímeké [15]. Ezért fontos elkülöníteni az ivarspecifikus mortalitási rátát az ivarmeghatározási hatásoktól, azaz ivarváltástól [16].

Az endokrin diszruptor hatású szerek közé tartoznak a rovarirtószerként használt piretroidok is, amik hatékonyan helyettesítik az organokloridokat és organofoszfátokat [17]. Utóbbiakhoz képest a piretroidoknak kisebb a perzisztenciája a környezetbe jutva és relatíve biztonságosabb madarakra és emberekre nézve [18], azonban magas toxicitást mutatnak vízi gerinctelenekre [19] és halakra [20]. Mezőgazdasági, háztartási és állatorvosi használatban alkalmazzák leginkább a piretroid rovarirtókat, de ezek a vegyszerek a fő hatóanyagai a kémiai szúnyoggyérítésnek is. Mindezek által a piretroidok bejuthatnak felszíni vizekbe [21], legfőképp 0.01-1 µg/L nagyságrendben mozognak a mért értékek. Az egyik, régebb óta használt piretroid a deltametrin (DTM), ami az egyik legszélesebb körben alkalmazott rovarirtószer a világon [22]. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy szubletális koncentrációkban toxikus lehet halakra és kételtűekre is, befolyásolhatja a viselkedést [22], egyedfejlődési rendellenességeket okoz és akár sejthalált is előidézhethet az embriókban [23]. A halakra gyakorolt toxikus hatások csökkentésére fejlesztették ki az újgenerációs piretroidokat, köztük az etofenproxot (ETF) [24], amelyeket kifejezetten vizes területeken (pl. rizsföldeken, szúnyoggyérítés során) javasolnak alkalmazni. Bár a kezdeti ökotoxikológiai vizsgálatok szerint az ETF kevésbé toxikus halakra nézve [24], más vízi élőlényekre kifejtett hatásait kevés kutatás vizsgálta. Újabb tanulmányok

kimutattak akut toxikus ETF hatásokat algákon, halakon és vízi gerincteleneken [25–27]. Az ivari fejlődéssel kapcsolatos endokrin diszruptor hatásokat nagyon kevés tanulmányban vizsgálták: ETF esetén egyetlen ilyen publikáció sem található, DTM esetén pedig egyetlen releváns cikk jelent meg. Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) egyedeken végzett kutatásban 0.22, 0.44, 0.88 és 1.76 µg/L DTM koncentrációk mellett szignifikáns endokrin diszruptor hatást figyeltek meg: csökkent tesztoszteron és megnövekedett ösztrogén szintet, valamint szövettani elváltozásokat figyeltek meg a magasabb koncentrációknál a gonádokban, köztük interszex ivarmirigyeket (ovotestis) és a herék degenerációját [18]. Az ETF ökológiailag releváns koncentrációk mellett kételtűekre kifejtett hatásairól még nincs publikált kutatás, és sem a DTM, sem az ETF esetében nem vizsgálták, hogy a kételtűek ivari fejlődését befolyásolhatják-e. Mivel a kémiai szűnyoggyérítést kifejezetten olyan élőhelyeken és olyan időszakban végzik, ahol és amikor a kételtűek lárvái fejlődnek és ivarmeghatározásuk érzékeny szakaszában lehetnek [28], ezért különösen releváns lenne annak vizsgálata, hogy a DTM és ETF okozhatnak-e ivarváltást kételtűekben.

A TDK kutatásom célja erdei béka fiatal egyedein feltárni, hogy környezetileg releváns koncentrációkban a DTM és az ETF milyen hatással van a fenotípusos ivararányra és az ivarspecifikus mortalitásra. Ezen faj természetes, hazai populációiban korábbi kutatások alapján a fenotípusos hímek között az ivarváltottak (genetikai nőstények) aránya 20% [4], laborban pedig magas hőmérséklettel is indukáltak ivarváltást korábban, ahol kezeléstől függően 30-100% volt az ivarváltott (maszkulinizált) nőstények aránya [9]. Továbbá ebben a fajban rendelkezésre áll genetikai marker az ivarváltás megállapításához [29]. A kísérletben az ebihalakat mezokozmoszokban a két piretroid valamelyikével kezeltük, majd az átalakulás után laboratóriumi körülmények között neveltük tovább az állatokat, hogy megállapíthassuk a kialakuló fenotípusos ivarukat és nyomon követhessük a mortalitásukat.

Anyagok és módszerek

Kísérlet menete

A kísérletet a Nagykovácsi-tóból 2022. április 29-én begyűjtött erdei béka petéken végeztük. Hét petecsomóból (családból) hoztunk be fejlődésnek indult embriókat a laboratóriumba, ahol a hőmérséklet 19 °C-ra volt állítva, és a sötét-világos periódusok hosszát a természetes fotoperiódushoz igazítottuk. A begyűjtést követően a petéket a kísérlet kezdetéig családonként egy-egy 5 literes műanyag dobozban tároltuk, amit fél liter mesterségesen előállított lágy vízzel (RSW, reverz-ozmózis szűrt, visszasózott lágy víz, 48 mg/l NaHCO₃, 30 mg/l CaSO₄ × 2H₂O,

61 mg/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/l KCl) töltöttünk meg. Amikor elérték az ebihalak a szabadon úszó állapotot (25-ös fejlődési stádium, [30], átkerültek szabadban elhelyezett mezokozmoszokba. Ezt tekintettük a kísérlet kezdetének, ami május 5-én történt.

A mezokozmoszok kialakítása korábban sikeresen alkalmazott protokoll szerint történt, 90 literes műanyag tárolókat használva [31]. A tárolókba a kísérlet kezdete előtt két héttel 65 liter csapvíz került, majd két nappal előtte 1 liter tóvíz és 40 g szárított bükkfalevél. A tárolókat hálóval lefedtük, hogy megakadályozzuk más fajok betelepülését. Összesen 56 mezokozmosz lett kihelyezve, 4x4-es blokkokban (1. kép), randomizált blokk elrendezésben (mindegyik blokkban egy adott kezelés csak egyszer fordult elő), és a mintaszám dobozonként 14 állat, 7 családból 2-2 egyed volt. Hat kezelési csoportba osztottuk a mezokozmoszokat, melyek közül négy volt piretroid kezelés: DTM 0.03 $\mu\text{g/l}$, DTM 0.3 $\mu\text{g/l}$, ETF 0.03 $\mu\text{g/l}$, ETF 0.3 $\mu\text{g/l}$ (kezelésenként 10 mezokozmosz). Mivel a piretroidokat kis mennyiségű etanolban feloldva adagoltuk a vízbe, ezért az ötödik csoport (etanol-kontroll) ugyanilyen mennyiségű etanolt kapott a vizébe (0.3 $\mu\text{l/l}$ 96%-os etanol; 10 mezokozmosz). A kezelések megnevezése későbbiekben etanol-kontroll (EK), deltametrin alacsony koncentráció (DA), deltametrin magas koncentráció (DM), etofenprox alacsony koncentráció (EA), etofenprox magas koncentráció (EM). További 6 mezokozmoszt állítottunk be oldószer nélküli kontroll kezelésbe, azonban ezeket a jelen dolgozat célkitűzéseire nem vizsgáltuk, így az itt bemutatott elemzésekben összesen 50 mezokozmosz adata szerepel. Az anyagok koncentrációit az alapján választottuk ki, hogy a 0.03 $\mu\text{g/l}$ a felszíni vizekben mért piretroid koncentrációk középső tartományába esik [21], a 0.3 $\mu\text{g/l}$ pedig abba a tartományba, ami Eni és mtsai. [18] halakon kapott eredményei szerint ivari diszruptor hatású lehet. A vegyületeket három alkalommal: a kísérlet 1., 15. és 35. napján adagoltuk a mezokozmoszokba a fenti koncentrációkban.

A metamorfózist megkezdő egyedeket (42-es fejlődési stádium), amiknek legalább az egyik mellső lábuk már láthatóvá vált, szabadtéri tartódobozokba helyeztük át. A dobozokba kevés lágy vizet öntöttünk és enyhén megdöntöttük, hogy legyen száraz felület, amire ki tudnak menni az átalakuló békák. Azok az egyedek, amik befejezték az átalakulást (45-ös fejlődési stádium) és teljesen visszaszívták a farkukat, testtömegmérés után a 19°C-os laboratóriumba kerültek, ahol egyesével külön tartódobozokban nevelkedtek. Mind az öt kezelési csoportból 60-60 állatot neveltünk tovább (a többi átalakult békát visszavittük a Nagykovácsi-tóba). A dobozok 2 liter úrtartalmúak voltak, lyuggatott tetővel és az aljára benedvesített papírtörülő, illetve egy darab tojástartó került, búvóhely biztosítására. Etetést heti kétszer, kedden és pénteken végeztünk kisméretű barna tücskökkel (*Acheta domesticus*), amiket kételtűek fejlődését és

növekedését segítő táplálékkiegészítővel (Trixie Reptiland 76280 és Promotor 43 por 3:1 arányú keverékével) meghintve adtuk a békáknak. A dobozokat ilyenkor takarítottuk és nedvesítettük az optimális fejlődési körülmények megtartása érdekében.

A fenotípusos ivar meghatározásához augusztus 15-19. között végeztünk boncolást az egyedeken. A boncolási sorrend néhány kivétellel egybeesett az átalakulási sorrenddel. Az egyedek testtömegét megmértük, majd egy órára MS-222 altatóoldatba merítettük őket az eutanáziához. Az altatószert a következők alapján állítottuk elő: 2 g MS-222-t és 2 g NaH_2PO_4 -ot (a pH semlegesítése végett) kevertünk el 300 ml RSW-ben. Az elaltatott állatoknak a lábfejeit lángban sterilizált eszközökkel eltávolítottam, és egyedenként külön eppendorf csőbe, 1 ml 96%-os etanol oldatba elhelyeztem, hogy a későbbiekben ez alapján határozhassuk meg a genetikai ivart. Ezt követte az egyedek felnyitása és az elsődleges ivarszervek (herék, illetve petefészkek) azonosítása APOMIC SHD200 digitális mikroszkóp alatt. Mindegyik felboncolt egyedet egy-egy 40 ml-es csőbe, 13 ml formalinba (4%-os formaldehid oldat foszfát pufferrel stabilizálva) helyeztük, hogy a későbbiekben szövettani vizsgálatot is végezhesünk az ivarmirigyeken.

A kísérlet során időnként elpusztult egyedet találtunk az átalakulást megkezdett állatok, illetve a már átalakult kisbékák között. Ilyenkor az elhullott egyedet felboncoltuk és megpróbáltuk azonosítani a fenotípusos ivart a gonádok alapján. Ez nem minden esetben volt lehetséges, mivel az erdei békák ivarmirigyeinek differenciálódása csak az átalakulás után kb. 4 héttel fejeződik be [32]. Ezért a metamorfózis közben (42-45. fejlődési stádium között) elpusztult állatok esetében ötféle kategóriába soroltuk a fenotípusos ivart: hím, nőstény, bizonytalan hím, bizonytalan nőstény, nem megállapítható. Végül eltettük a tetemeket etanolba, hogy később vizsgálhassuk a genetikai ivart. Az ebihalkorban (42-es stádium előtt) elpusztult állatok (N = 80) zöme a mezokozmoszokban elbomlott, de az ilyen fiatal egyedeknél a gonádok fejletlensége miatt nem is lehet fenotípusos ivart határozni.

Statisztikai elemzések

A statisztikai elemzéseket az R programban végeztem el, egységei az erdei béka egyedek voltak. Minden modell esetében a kezelési csoportot, mint magyarázó változót vettem bele a modellbe. Az eredmények értelmezésekor 5%-os szignifikancia küszöböt vettem figyelembe. Az interakciókat tartalmazó modellek eredményét 2-es típusú szórásfelbontás táblával jelenítettem meg („Anova” függvény a „car” csomagból).

Az első modellben azt teszteltem, hogy a fenotípusos ivararány függött-e a kezeléstől. Ehhez egy általánosított lineáris modellt használtam binomiális hibaeloszlással („glm” függvény). A boncolásig túlélő, 100 napnál idősebb egyedek ivara (hím vagy nőstény) volt a függő változó és a nősténnyé válás esélyét elemeztem. A modell feltételeinek teljesülését a „DHARMA” csomag segítségével ellenőriztem („simulateResiduals” függvény). A négy piretroidos kezelés és az etanol-kontroll csoport közti különbségekre kapott szignifikancia értékeket az FDR („false discovery rate”) módszer szerint korrigáltam az összehasonlítások számával.

A második és harmadik modellben ivarspecifikus mortalitást vizsgáltam, kétféle módon. Az egyik elemzésben csak a 42-45. fejlődési stádium közötti pusztulásokat vettem figyelembe, mivel a mortalitás legnagyobb része ekkor történt. Az ivararány elemzéséhez hasonlóan binomiális modellt használtam, melyben a függő változóm az volt, hogy az egyed a metamorfózis közben pusztult-e el (N = 122) vagy sem (azaz tovább lett nevelve kisbékaként, N = 300). A magyarázó változók a kezelés és az ivar (biztos hím vagy biztos nőstény) voltak, valamint ezek interakciója. Az elemzést külön elvégeztem azokat az egyedeket is belevéve, ahol az ivar nem volt teljesen biztos. Azok az elpusztult egyedek, amelyeknél egyáltalán nem lehetett megállapítani az ivart boncoláskor, kimaradtak az elemzésből.

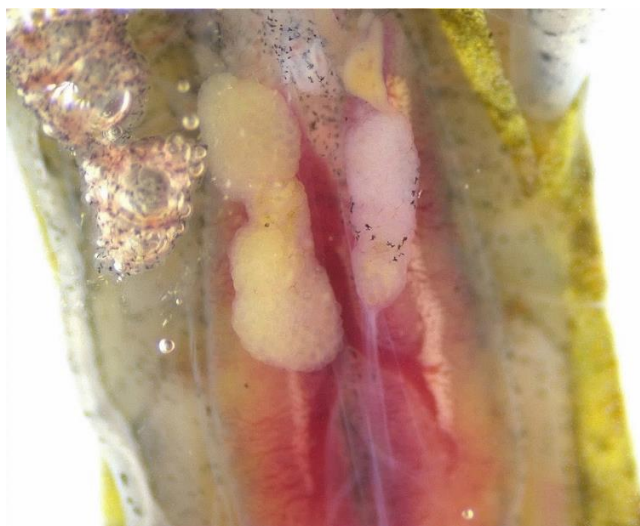
A harmadik modellben a túlélési időt vizsgáltam a kísérlet végéig Cox modellel („proportional hazards model”, „coxph” függvény a „survival” csomagból). Ebben az elemzésben tehát elpusztultként szerepeltek azok az egyedek is, amelyek az átalakulás befejezése után hullottak el (N = 3). A magyarázó változók itt is az ivar és kezelés, valamint azok interakciója volt, és ezt az elemzést is elvégeztem úgy is, hogy a biztos ivarú egyedek mellett a bizonytalanokat is bevettem. Azok az állatok, amelyek eutanázia által pusztultak el, valamint egy kisbékaként elszökött egyed cenzorált megfigyelésként szerepeltek a modellben.

Az ebihalkori mortalitás esetén ivar adatok hiányában csak a kezelés hatását vizsgáltam. Ehhez khi-négyzet próbával hasonlítottam össze a mezokozmoszokban elpusztult és a metamorfózisig túlélő egyedek arányát az öt kezelési csoport között. A mezokozmoszokban elpusztult egyedek számát úgy kaptam meg, hogy a kiindulási mintaszámból kivontam azoknak az egyedeknek a számát, amelyek elérték a metamorfózis kezdetét. Ezt az elemzést azért végeztem el, mert az ivararányokat befolyásolhatja egy esetlegesen ivarfüggő ebihalkori mortalitás is, amennyiben egyes kezelések növelték a mortalitást az oldószer kontrollhoz képest.

Eredmények

Ivararány

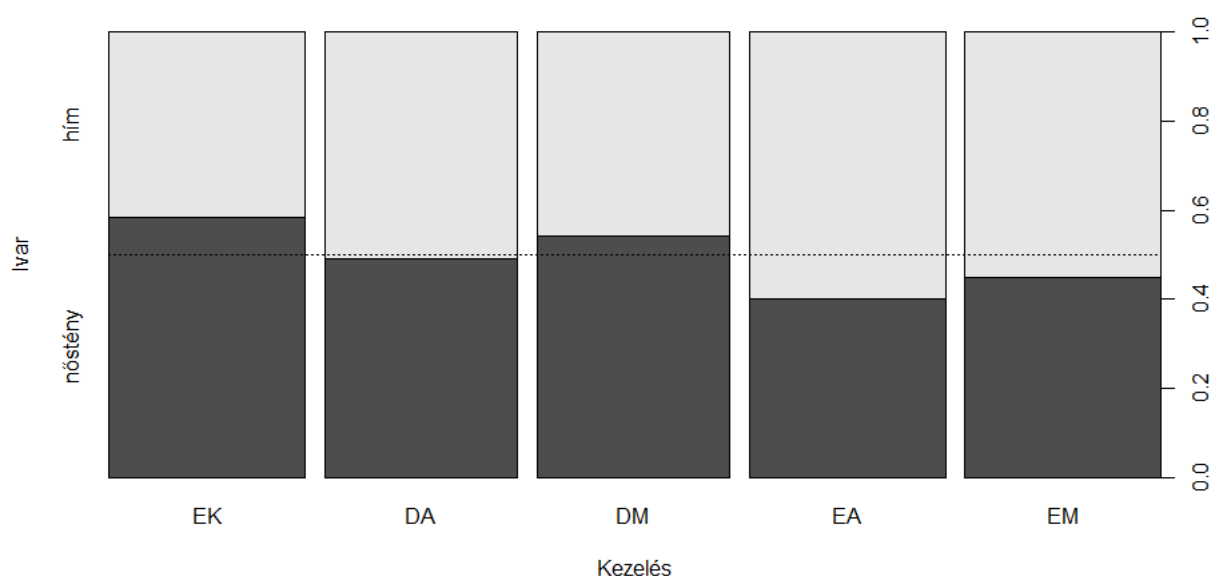
Az 1. táblázat alapján látható, hogy több volt a nőstény egyed az EK és a DM csoportban, míg a DA kezelés mellett közel azonos volt a két ivar aránya, az ETF mindkét csoportjában pedig hím többség volt (1. ábra). A binomiális modell alapján az EK csoporthoz képest mindegyik kezelésben alacsonyabb nősténnyé válási esély figyelhető meg, de ezek a különbségek nem szignifikánsak, kivéve az EA csoportot (2. táblázat). Azonban FDR korrigálást végezve ennél a csoportnál sem volt megfigyelhető szignifikáns ivararány változás a kontrollhoz képest (2. táblázat). Az 1. ábrán és az 1. táblázatban bemutatott eredményeken túl a DM csoportban egy olyan egyedet is találtam, amelynek az egyik ivarmirigye petefészek volt, a másik viszont a herékre jellemző külső morfológiát mutatta (1. kép, ezt az egyedet a statisztikai számításokból kihagytam).



1. kép: A DM kezelési csoportban talált interszex egyed gonádjainak fotója.

1. táblázat: A kísérlet végén felboncolt állatok fenotípusos ivara (mintaszámok) a gonádok morfológiája alapján az öt kezelési csoportban.

Fenotípusos ivar	EK	DA	DM	EA	EM
Hím	25	30	27	36	32
Nőstény	35	29	32	24	27



1. ábra: A kísérlet végén felboncolt, 100 napnál idősebb egyedek fenotípusos ivarának eloszlása a kezelési csoportok között. A szaggatott vonal az 1:1 ivarárányt jelzi.

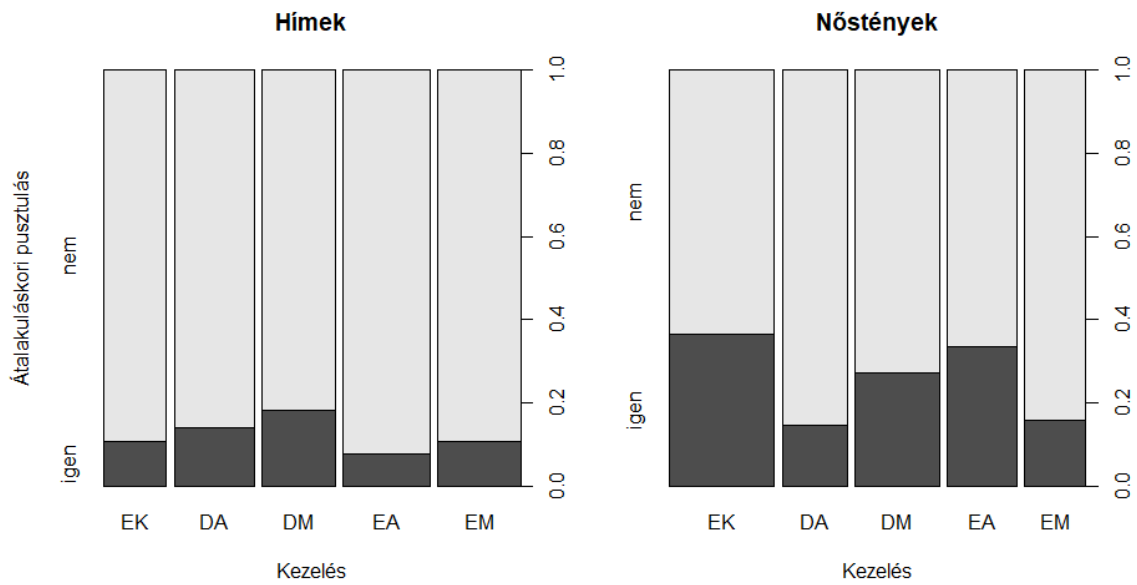
2. táblázat: A binomiális modellel becsült ivarárányok és azok standard hibája (SE), és az etanol-kontroll csoporttól vett különbségek szignifikanciája.

Kezelés	Nőstények aránya	SE	P-érték	FDR-korrigált P-érték
EK	0.583	0.0636	0.1988	-
DA	0.492	0.0651	0.3159	0.4212
DM	0.542	0.0649	0.6525	0.6525
EA	0.400	0.0632	0.0458	0.1833
EM	0.450	0.0642	0.1451	0.2902

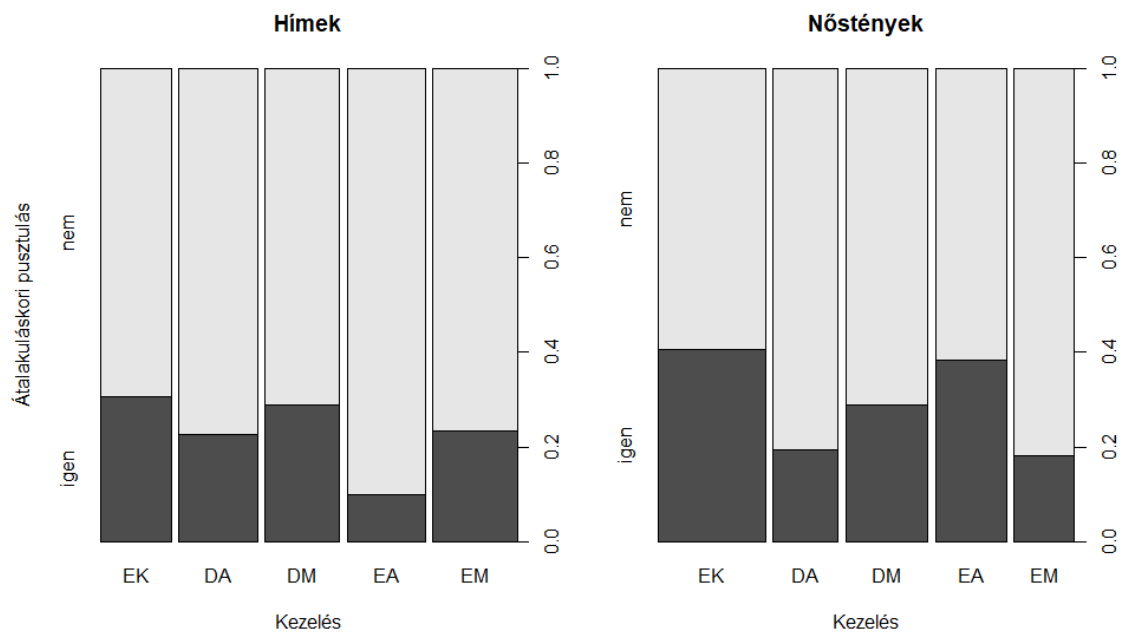
Mortalitás

Ebihalkorban kismértékű (8.6-19.66%) mortalitást tapasztaltunk, amelynek mértéke nem különbözött szignifikánsan az 5 kezelési csoport között (khi-négyzet teszt: $\chi^2 = 6.49$, $df = 4$, $P = 0.165$). A 42- 45. fejlődési stádium során elpusztult 122 egyedből 12-nek nem tudtuk megállapítani az ivarát, 21 hím és 54 nőstény volt, továbbá bizonytalanul 24 hím és 11 nőstény. Csak a biztosan meghatározható ivarú egyedeket vizsgálva a binomiális modell azt mutatta, hogy az átalakulás közbeni mortalitás a kezeléstől nem függött, viszont szignifikáns különbség van a hímek és a nőstények túlélési arányai között (3. táblázat): a nőstények nagyobb arányban pusztultak el (2A. ábra).

A) Csak a biztosan megállapítható ivarú egyedek



B) A bizonytalan ivarú egyedekkel együtt



2. ábra: A 42-45. fejlődési stádium közötti egyedek mortalitási aránya a két ivarban, kezelésekre bontva.

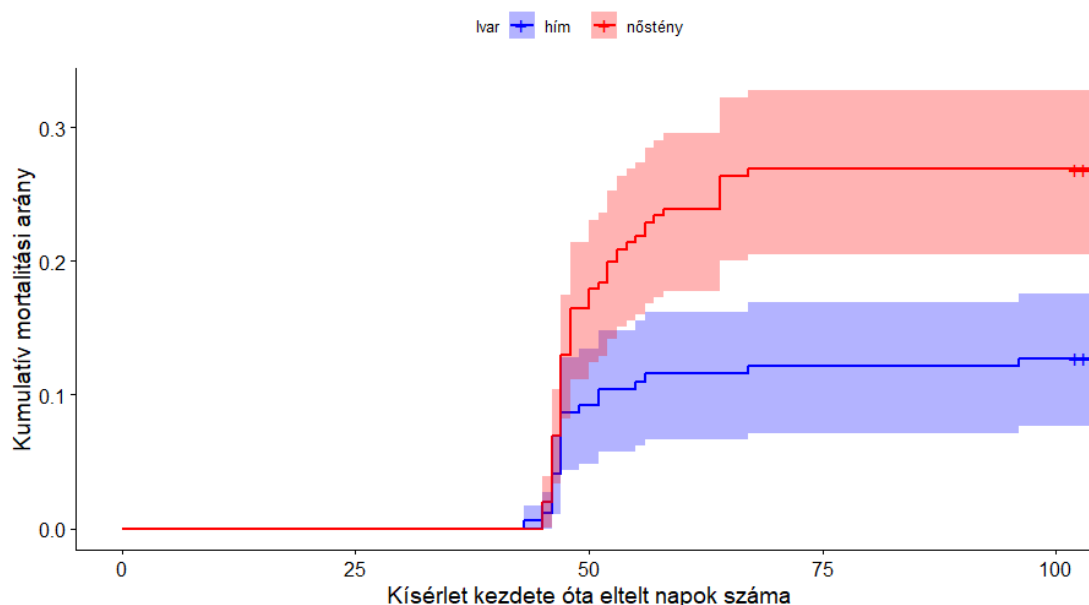
Ugyanezeket az elemzéseket elvégezve azon egyedek adataival együtt kibővítve (2B. ábra), akiknek az ivara nem volt egyértelműen megállapítható, a modell nem mutatott szignifikáns eltérést sem a kezeléseket, sem a két ivar mortalitása között (3. táblázat). A kezelés és az ivar hatása közötti interakció marginálisan szignifikáns lett, ami annak tudható be, hogy az EA

csoportban relatíve magas nőstény mortalitás látható a hímekéhez képest (2B. ábra); ez utóbbi különbség FDR-korrekciónak után is szignifikáns maradt ($P = 0.005$).

3. táblázat: *A fenotípusos ivar és a kezelés hatása a mortalitásra.*

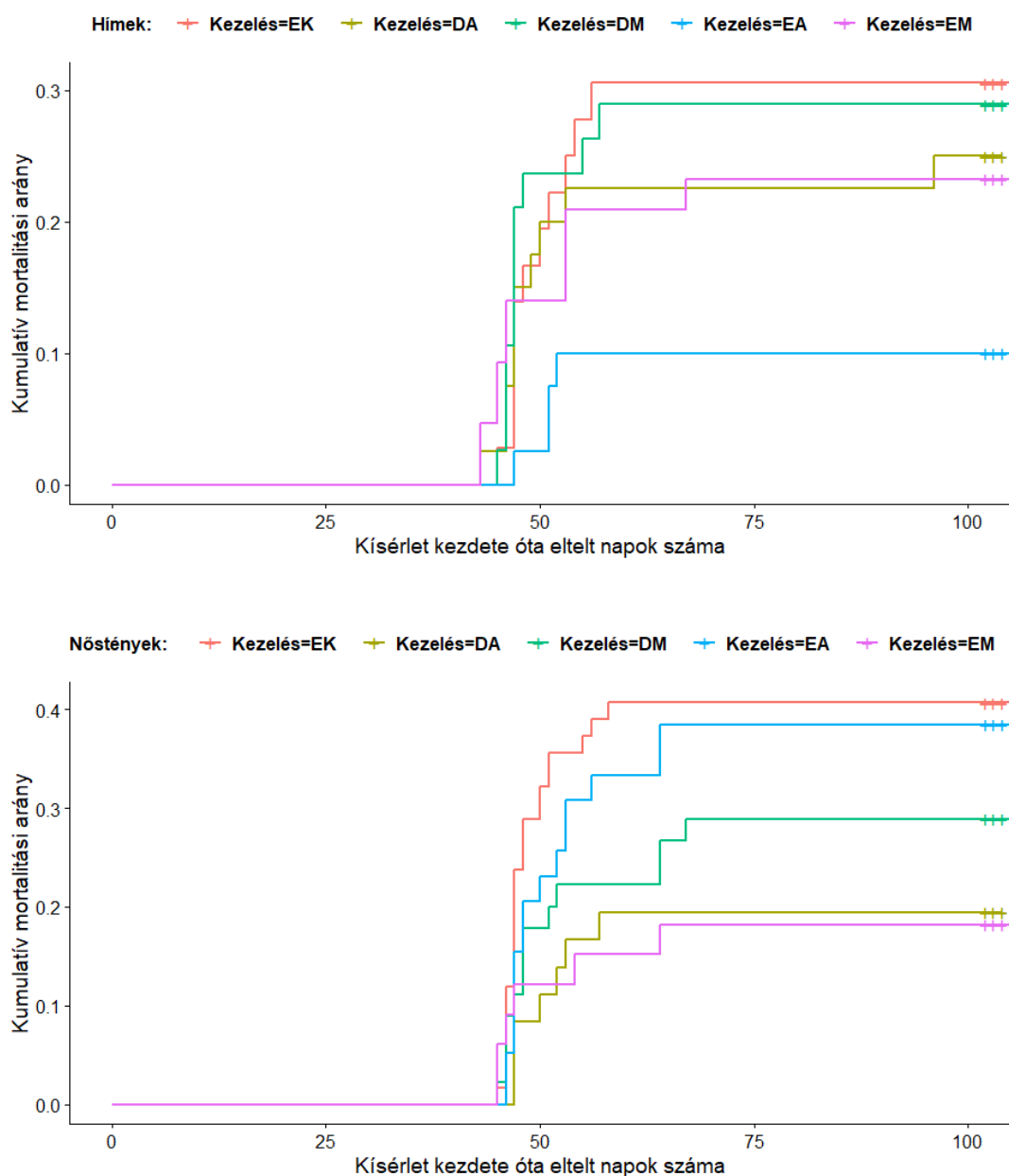
	Csak biztos ivarú egyedek:			Bizonytalan ivarúak is:		
	χ^2	df	P	χ^2	df	P
Átalakulás közbeni mortalitás:						
Kezelés	5.0976	4	0.277428	6.6601	4	0.15498
Ivar	10.8859	1	0.000969	2.0918	1	0.14809
Kezelés $\times$ ivar	5.2406	4	0.263487	8.4899	4	0.07519
Mortalitás a kísérlet végéig:						
Kezelés	4.8412	4	0.303985	6.4055	4	0.17084
Ivar	9.7022	1	0.001841	1.6661	1	0.19678
Kezelés $\times$ ivar	6.179	4	0.186172	9.068	4	0.05942

Az átalakulás kezdetétől a kísérlet befejezéséig a mortalitás csak a biztosan megállapított ivarú egyedekre 20.3 % volt, a bizonytalan ivarúakat bevéve 27.1 %, a nem meghatározható ivarúakkal együtt pedig összesen 30.7 %. A Cox modellben a biztosan meghatározott ivarú egyedek adatai alapján a kezelés nem hatott szignifikánsan a mortalitásra, viszont szignifikáns volt a túlélési valószínűségek közötti különbség a két ivar között (3. táblázat): magasabb volt a nőstények mortalitása (3. ábra).



3. ábra: *Kumulatív mortalitási arány a két ivarban a kísérlet befejezéséig, kezelésektől függetlenül. Ezen az ábrán csak azoknak az egyedeknek az adatai szerepelnek, akiknek a fenotípusos ivara biztosan megállapítható volt.*

Ugyanezen elemzést elvégezve a bizonytalan ivarú egyedeket is belevéve azonban a Cox modell nem mutatott szignifikáns különbséget sem a kezelési csoportok, sem az ivarok között (3. táblázat). Az átalakulás közbeni mortalitáshoz hasonlóan a kísérlet végéig mért túlélési idő esetében is marginálisan szignifikáns lett a kezelés és az ivar hatása közötti interakció (3. táblázat), amit az EA kezelés nőstény-túlsúlyos mortalitása okozott (4. ábra) Ebben a csoportban az ivarok közötti különbség FDR-korrekciónak után is szignifikáns maradt ($P = 0.008$).



4. ábra: Kumulatív mortalitási arány a két ivaron belül (felül hímek, alul nőstények), kezelésekre külön lebontva. Ezen az ábrán azoknak az egyedeknek az adatai is szerepelnek, akiknek a fenotípusos ivara bizonytalanul volt megállapítható.

Diszkusszió

Az eredményeket összefoglalva elmondható, hogy a kontroll csoporthoz képest a négy piretroid kezelés közül csak az EA kezelés befolyásolta az ivararányt, enyhe mértékben növelve a hímek arányát. Ugyanez a kezelés nőstény-túlsúlyos mortalitást is okozott az átalakulás megkezdése után, azonban ez a hatás (a kezelés és az ivar hatása közötti interakció) csak a bizonytalanul meghatározható ivarú egyedek bevétele esetén volt szignifikáns. Ha a túlélés elemzéséből kihagytam ezeket az egyedeket, akkor az ivarspecifikus (nőstény-túlsúlyos) mortalitásra a kezeléseknek nem volt szignifikáns hatása.

Az EK csoportban tapasztalt enyhén nőstény túlsúlyos ivararány egyezik korábbi, erdei békán végzett kutatások eredményeivel [9,33]. Az ehhez képest az EA és EM csoportokban tapasztalt enyhe hím túlsúly biológiai értelemben nem elhanyagolható: 58% nőstény helyett csak 40-45%. Annak, hogy a különbség nem lett szignifikáns (FDR korrekció után), egy lehetséges oka a viszonylag alacsony statisztikai erő, mert az arányok összehasonlítása nagyon nagy mintaszámokat igényelne. A kísérletben csoportonként csak 60 állatot tudtunk nevelni az átalakulás után, ez kb. 50%-os erőt biztosít az 58-40% közti különbség detektálására. Tehát nem zárható ki, hogy az ETF a hímek irányába tolja el a fenotípusos ivararányt, azonban ennek igazolására nagyobb elemszámú vizsgálat szükséges.

Az EA csoportban tapasztalt ivararány eltolódásnak az egyik lehetséges magyarázata az lehet, hogy a kezelés jobban növelte a nőstények, mint a hímek mortalitását. Az eredményeink egy része ezt alátámasztja, azonban több nehézséget is figyelembe kell venni az ivarspecifikus mortalitással kapcsolatos eredmények pontos értelmezéséhez. Egyrészt nem tudtuk az elpusztult ebihalak ivarát megállapítani, mivel ahhoz a hullák genetikai szexálására lett volna szükség, azonban a mezokozmoszos tartásban ez nem volt megoldható a tetemek gyors lebomlása miatt. Az átalakulás közben elhullott egyedeknek sem minden esetben tudtuk (biztosan) megállapítani az ivarát, mivel ekkor még nem differenciálódnak teljesen az ivarmirigyek. Mindezen okból az ivarspecifikus mortalitáshoz rendelkezésre álló adatok torzítottak lehetnek. Az eredményeket továbbá az is befolyásolhatja, ha az erdei béka hímek ivarszerve lassabban differenciálódik, mint a nőstényeké, mivel ismertek olyan ektoterm gerinces fajok, amelyeknél a gonádok először mindkét ivarban átesnek egy petefészekszerű fejlődési stádiumon, és a hímekben csak később alakulnak ki a herék [34]. Ha az erdei békákra is ez a fajta gonádfejlődés jellemző (ezt jelenleg nem tudjuk), akkor az átalakulás közben elpusztult állatok esetében nagyobb bizonytalansággal ismerjük fel a hímeket. Ezt

alátámasztani látszik az, hogy vizsgálatunkban több volt a bizonytalanul hímként azonosított elpusztult hulla, mint a nőtény. Ez magyarázatot adhat a csak biztos és a bizonytalan ivarokkal is végzett elemzések eredményei közti különbségekre, azaz a látszólag nőtény-túlsúlyos mortalitást valójában a hímek nehezebb felismeréséből fakadó adathiánya okozhatta. Eddigi eredményeink alapján tehát nem zárható ki egyértelműen, hogy az EA csoport nőtény-túlsúlyos mortalitást okozott, azonban ennek megerősítésére szükséges lesz az elpusztult egyedek ivarának pontos meghatározása genetikai markerek használatával.

A másik lehetséges magyarázat az EA csoportban talált enyhe ivararány eltolódásra az, hogy az ETF ivarváltást, maszkulinizációt indukált az egyedekben. Ez egy meglepő eredmény lenne, mert ellentétes lenne DTM-mel kezelt halakban tapasztalt feminizáló hatásokkal, bár ivarváltást abban a kísérletben sem igazoltak, csak a hereszövetekben megjelenő petesejtek utaltak rá [18]. Ugyanakkor nem feltétlenül várható, hogy a két vegyület ugyanolyan hatást fejtsen ki az ivari fejlődésre, mivel az endokrin hatások még rokon vegyületek között is különbözhetnek a különböző fajok között [35]. Ráadásul a DM csoportban a fenotípusos ivarmeghatározás közben az egyik egyednél két különböző ivarúnak látszó gonádot találtam, ami szintén utalhat ivarváltás meglétére a kísérlet során. Az ilyen megjelenésű erdei békák a kutatócsoport korábbi kísérleteiben ivarváltottnak bizonyultak genetikai elemzéssel, és szövettani vizsgálatuk során a herének látszó gonádokban petesejteket is találtak [4,9] Ezért akár az is lehetséges, hogy mindkét piretroid okozott zavarokat az ivari fejlődésben (részleges vagy teljes ivarváltást), aminek ivararányok alapján történő detektálását nehezíthette a kezeléseket esetleges hatása az ivarspecifikus mortalitásra. Mindennek a kiderítésére és megerősítésére az egyedek genetikai ivarmeghatározására és az ivarmirigyek szövettani vizsgálatára lesz szükség. A boncolás során eltett minták segítségével ebben az irányban fogjuk folytatni a vizsgálatot.

Szerzői hozzájárulás

- Petéket gyűjtöttem be terepről.
- Ebihalak és juvenilis békák nevelését és etetését végeztem.
- Fenotípusos ivarmeghatározást végeztem boncolással, gonád alapján.
- Statisztikai elemzéseket elvégeztem.

“Ezúton nyilatkozom, hogy TDK konferencián korábban nem értem el helyezést. Ha a jelen BTDK Konferencia előtt másik TDK konferencián helyezést érek el, arról a BTDK szervezőit még a konferencia előtt értesítem, a nyertes pályamunkát eljuttatom hozzájuk.”

Irodalomjegyzék

1. Baroiller, J.F., and D’Cotta, H. (2016). The Reversible Sex of Gonochoristic Fish: Insights and Consequences. *Sexual Development* 10, 242–266. 10.1159/000452362.
2. Alho, J.S., Matsuba, C., and Merilä, J. (2010). Sex reversal and primary sex ratios in the common frog (*Rana temporaria*). *Mol Ecol* 19, 1763–1773. 10.1111/j.1365-294X.2010.04607.x.
3. Lambert, M.R., Tran, T., Kilian, A., Ezaz, T., and Skelly, D.K. (2019). Molecular evidence for sex reversal in wild populations of green frogs (*Rana clamitans*). *PeerJ* 2019, 1–21. 10.7717/peerj.6449.
4. Nemesházi, E., Sramkó, G., Laczkó, L., Balogh, E., Szatmári, L., Vili, N., Ujhegyi, N., Üveges, B., and Bókony, V. (2020). 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. 10.1101/2021.10.18.464681.
5. Flament, S. (2016). Sex Reversal in Amphibians. *Sexual Development* 10, 267–278. 10.1159/000448797.
6. Nemesházi, E., and Bókony, V. (2022). Asymmetrical sex reversal: Does the type of heterogamety predict propensity for sex reversal? *BioEssays* 44. 10.1002/bies.202200039.

7. Holleley, C.E., Sarre, S.D., O'Meally, D., and Georges, A. (2016). Sex Reversal in Reptiles: Reproductive Oddity or Powerful Driver of Evolutionary Change? *Sexual Development* 10, 279–287. 10.1159/000450972.
8. IUCN (2022). “International Union for Conservation of Nature.” <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics>.
9. Mikó, Z., Nemesházi, E., Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Ujszegi, J., Kásler, A., Bertalan, R., Vili, N., Gál, Z., Hoffmann, O.I., *et al.* (2021). Sex reversal and ontogeny under climate change and chemical pollution: are there interactions between the effects of elevated temperature and a xenoestrogen on early development in agile frogs? *Environmental Pollution* 285. 10.1016/j.envpol.2021.117464.
10. Mitchell, N.J., and Janzen, F.J. (2010). Temperature-Dependent sex determination and contemporary climate change. *Sexual Development* 4, 129–140. 10.1159/000282494.
11. Bókony, V., Kövér, S., Nemesházi, E., Liker, A., and 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. 10.1098/rstb.2016.0325.
12. Nemesházi, E., Kövér, S., and Bókony, V. (2021). Evolutionary and demographic consequences of temperature-induced masculinization under climate warming: the effects of mate choice. *BMC Ecol Evol* 21. 10.1186/s12862-021-01747-3.
13. Orton, F., and Tyler, C.R. (2015). Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? *Biological Reviews* 90, 1100–1117. 10.1111/brv.12147.
14. Afonso, L.O.B., Basu, N., Nakano, K., Devlin, R.H., and Iwama, G.K. (2003). Sex-related differences in the organismal and cellular stress response in juvenile salmon exposed to treated bleached kraft mill effluent. *Fish Physiol Biochem* 29, 173–179.

15. Nusbaumer, D., Garaud, L., Ançay, L., and Wedekind, C. (2021). Sex-Specific Stress Tolerance in Embryos of Lake Char (*Salvelinus umbla*). *Front Ecol Evol* 9. 10.3389/fevo.2021.768263.
16. Geffroy, B., and Wedekind, C. (2020). Effects of global warming on sex ratios in fishes. *J Fish Biol* 97, 596–606. 10.1111/jfb.14429.
17. Gajendiran, A., and Abraham, J. (2018). An overview of pyrethroid insecticides. *Front Biol (Beijing)* 13, 79–90. 10.1007/s11515-018-1489-z.
18. Eni, G., Ibor, O.R., Andem, A.B., Oku, E.E., Chukwuka, A. v., Adeogun, A.O., and Arukwe, A. (2019). Biochemical and endocrine-disrupting effects in *Clarias gariepinus* exposed to the synthetic pyrethroids, cypermethrin and deltamethrin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 225. 10.1016/j.cbpc.2019.108584.
19. Palmquist, K., Salatas, J., and Fairbrother, A. (2012). Pyrethroid Insecticides: Use, Environmental Fate, and Ecotoxicology.
20. Haya, K. (1989). TOXICITY OF PYRETHROID INSECTICIDES TO FISH. *Environ Toxicol Chem* 8, 381–391.
21. Tang, W., Wang, D., Wang, J., Wu, Z., Li, L., Huang, M., Xu, S., and Yan, D. (2018). Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere* 191, 990–1007. 10.1016/j.chemosphere.2017.10.115.
22. Huang, Y., Zhang, J., Han, X., and Huang, T. (2014). The use of zebrafish (*Danio rerio*) behavioral responses in identifying sublethal exposures to deltamethrin. *Int J Environ Res Public Health* 11, 3650–3660. 10.3390/ijerph110403650.
23. Parlak, V. (2018). Evaluation of apoptosis, oxidative stress responses, AChE activity and body malformations in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to deltamethrin. *Chemosphere* 207, 397–403. 10.1016/j.chemosphere.2018.05.112.
24. Matsuo, N. (2019). Discovery and development of pyrethroid insecticides. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 95, 378–400. 10.2183/pjab.95.027.

25. Yaméogo, L., Traor, K., Back, C., Hougard, J.-M., and Calamari, D. (2001). Risk assessment of etofenprox (vectron) on non-target aquatic fauna compared with other pesticides used as *Simulium* larvicide in a tropical environment. *Chemosphere* 42, 965–974.
26. Zhang, Z.Y., Yu, X.Y., Wang, D.L., Yan, H.J., and Liu, X.J. (2010). Acute toxicity to zebrafish of two organophosphates and four pyrethroids and their binary mixtures. *Pest Manag Sci* 66, 84–89. 10.1002/ps.1834.
27. Sancho, E., Banegas, S., Villarroel, M.J., and Ferrando, D. (2018). Impaired reproduction and individual growth of the water flea *Daphnia magna* as consequence of exposure to the non-ester pyrethroid etofenprox. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 6209–6217. 10.1007/s11356-017-0952-8.
28. Brühl, C.A., Pieper, S., and Weber, B. (2011). Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environ Toxicol Chem* 30, 2465–2472. 10.1002/etc.650.
29. Nemesházi, E., Gál, Z., Ujhegyi, N., Verebélyi, V., Mikó, Z., Katalin Lefler, K., Jeffries, D.L., Ivett Hoffmann, O., and 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. 10.22541/au.158775693.35677255/v2.
30. Gosner, K.L. (1960). A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica* 16, 183–190.
31. Mikó, Z., Ujszegi, J., Gál, Z., Imrei, Z., and Hettyey, A. (2015). Choice of experimental venue matters in ecotoxicology studies: Comparison of a laboratory-based and an outdoor mesocosm experiment. *Aquatic Toxicology* 167, 20–30. 10.1016/j.aquatox.2015.07.014.
32. Ogielska, M., and Kotusz, A. (2004). Pattern and Rate of Ovary Differentiation with Reference to Somatic Development in Anuran Amphibians. *J Morphol* 259, 41–54. 10.1002/jmor.10162.

33. Bókony, V., Ujhegyi, N., Mikó, Z., Erös, R., Hettyey, A., Vili, N., Gál, Z., Hoffmann, O.I., and Nemesházi, E. (2021). Sex Reversal and Performance in Fitness-Related Traits During Early Life in Agile Frogs. *Front Ecol Evol* 9. 10.3389/fevo.2021.745752.
34. Roco, Á.S., Ruiz-García, A., and Bullejos, M. (2021). Testis development and differentiation in amphibians. *Genes (Basel)* 12. 10.3390/genes12040578.
35. Bókony, V., Verebélyi, V., Ujhegyi, N., Mikó, Z., Nemesházi, E., Szederkényi, M., Orf, S., Vitányi, E., and Móricz, Á.M. (2020). Effects of two little-studied environmental pollutants on early development in anurans. *Environmental Pollution* 260. 10.1016/j.envpol.2020.114078.

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni Dr. Bókony Veronikának a sok türelmet, útmutatást és tudást, amit kaptam tőle és a sok segítséget a kísérlet elvégzése és a dolgozat írása alatt. Továbbá szeretném megköszönni Mikó Zsanettnek, hogy becsatlakozhattam a kutatás kivitelezésébe és a segítségét a kísérlet minden szakaszában. Végezetül szeretném megköszönni a ELKH ATK Növényvédelmi Intézet Lendület Evolúciós Ökológiai Kutatócsoport minden tagjának a segítségét. Nélkülük nem jöhetett volna létre ez a dolgozat.

A kutatás az Innovációs és Technológiai Minisztérium Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapja („OTKA” PD 134241, K 135016, ÚNKP-21-5) támogatásával valósult meg. Az elvégzett kísérletet a Pest Megyei Kormányhivatal (PE-06/KTF/8060-1/2018; PE/EA/295-7/2018) és az ATK NÖVI Etikai Bizottsága engedélyezte.