

Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Kihelyezett Ökotoxikológiai Tanszék

A Bt- kukorica által termelt toxin vízi ökoszisztémára gyakorolt hatásai

Készítette: Klátyik Szandra
Évfolyam: MSc. II. évf.

Belső konzulens: Dr. Fekete Gábor
Beosztása: tudományos főmunkatárs

Gödöllő
2012

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés és célkitűzések	2
1.1. A téma jelentőségének bemutatása	2
1.2. Célkitűzések	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A <i>Bt</i> -növények általános jellemzése	5
2.2. A <i>Bt</i> -növények alkalmazásának előnyei	6
2.3. A <i>Bt</i> -növények alkalmazásának hátrányai	7
2.4. A transzgén integrációjának, működésének és öröklődésének bizonyítása	9
2.5. A toxin minőségi és mennyiségi meghatározása	10
2.6. A toxin toxikus hatásainak meghatározása	15
3. Anyag és módszer	19
3.1. A kísérleti rendszer	19
3.1.1. Iszap- és vízmintavétel.....	19
3.1.2. A kísérleti rendszer kialakítása	20
3.2. Mintavételek.....	21
3.3. A minták immunanalitikai és ökotoxikológiai vizsgálata.....	21
3.3.1. A toxinmennyiség meghatározása ELISA módszerrel	21
3.3.2. Ökotoxikológiai vizsgálatok	23
3.4. Az adatok számítása, értékelése.....	26
3.5. Az adatok statisztikai elemzése.....	27
4. Eredmények és értékelésük	28
4.1. A levél-, illetve a Dunából és a Velencei-tóból származó vízminták toxintartalma a <i>MON 810</i> -es <i>Bt</i> -kukorica esetében.....	28
4.1.1. Cry1Ab-toxintartalom a <i>MON 810</i> -es kukorica és közel izogénikus vonalának levél- és vízmintáiban a Velencei-tó esetében	28
4.1.2. Cry1Ab-toxintartalom a <i>MON 810</i> -es és közel izogénikus vonalának levél- és vízmintáiban a Duna esetében.....	29
4.2. A mátrixhatás vizsgálatának eredményei.....	31
4.3. Az ökotoxikológiai tesztek eredményei.....	31
4.3.1. Az akut tesztek eredményei	31
4.3.2. A krónikus teszt eredményei.....	32
5. Következtetések és javaslatok	38
5.1. Következtetések	38
5.2. Javaslatok.....	39
6. Összefoglalás	40
7. Köszönetnyilvánítás	42
8. Irodalomjegyzék	43

1. Bevezetés és célkitűzések

1.1. A téma jelentőségének bemutatása

XX. század végéig az emberiség a természet adta lehetőségekkel élve alakította a növénynemesítés fejlesztési irányait, a XXI. századtól viszont a géntechnológiát felhasználva képessé vált a gazdaságilag jelentős növények tulajdonságainak és képességeinek célirányos megváltoztatására. A géntechnológia tehát lehetőséget ad arra, hogy a növények működését irányító genetikai program módosításával az adott növény tulajdonságait a gazdálkodó, illetve a fogyasztó igényeinek megfelelően megváltoztathassuk (HESZKY 2011a). A géntechnológiai úton módosított (GM) növények a hagyományos növényektől, illetve növényfajtáktól főként abban különböznek, hogy minden sejtjükben megtalálható a géntechnológia módszerével bejuttatott gén vagy gének, a bejuttatott génről vagy génekről minden növényi rész sejtjeiben termelődik az új vagy módosított fehérje vagy enzimfehérje. Transzgenikusnak nevezzük azt a növényt vagy növényfajtát, amely valamely géntranszfer technikával bejuttatott, rendszertanilag távoli fajokból származó gént vagy géneket tartalmaz (HESZKY 2011b). A transzgént tartalmazó növényeket gazdasági szempontból csoportosíthatjuk, amely alapján beszélhetünk elsőgenerációs-, második generációs-, illetve harmadik generációs transzgenikus növényekről. Az elsőgenerációs transzgenikus növények előállításának gazdasági célja a növénytermesztés technológiájának segítése, illetve a termésátlagok növelése. A második generációs növények fejlődésükben és növekedésükben, valamint az anyagcsere folyamataikban módosított fajták, mely módosítások célja speciális minőség előállítása az élelmiszeripari és fogyasztói igények kielégítésére. A harmadik generációs transzgenikus növények, mint bioreaktorok nemesítésének célja a speciális molekulák, ipari alapanyagok, enzimek, fehérjék előállítása (HESZKY 2005a).

Napjainkra a géntechnológiai úton módosított növények mezőgazdaságban való megjelenése egyre jellemzőbbé vált. A mezőgazdasági termelés szempontjából az első generációs transzgenikus növények váltak a legjelentősebbé, amelyek előállításának fő célja az agrotechnika és a mezőgazdasági termelés segítése volt. A módosítások konkrét célja a biotikus (pl. gomba, vírus, rovar, baktérium) rezisztencia, illetve az abiotikus (pl. herbicid, szárazság) tolerancia kialakítása (HESZKY 2005b). Az elsőgenerációs transzgenikus növények közül a gyomirtószer-toleráns és a kártevőkkel szemben rezisztens fajták kerültek a köztermesztésbe. A termés és a növény megóvása érdekében a kártevők, illetve a növényvédő szerek kezelések által kiváltott káros hatások elleni védekezés során elsősorban ezeket a fajtákat alkalmazzák. A világon jelenleg 29 országban termesztnek valamilyen GM-fajtát. Napjainkban az Európai Unióban csak a kukoricamoly-rezisztens GM-kukorica termesztendő, ezt a kukoricafajtát 6 tagállamban termesztik, de az összes termőterület így sem éri el a 100 000 hektárt (HESZKY 2012a). 2009-ben, az Európai Unióban 110

egyszeresen vagy többszörösen módosított GM-fajtacsoport haladt az engedélyezés útján (TAKÁCS et al., 2009). Hazánkban 2005-től moratórium van érvényben a *MON 810* géntechnológiai úton módosított kukorica fajtakör termesztésével szemben. A GM-fajták termesztése veszélyeztetné országunk vetőmagtermesztésben betöltött vezető szerepét, ezenkívül a moratórium fenntartásával számos biológiai és ökológiai kockázat is elkerülhető. 2012. január 1-jétől Magyarországon az alaptörvényben megfogalmazva tiltja a géntechnológiai úton módosított élőlények mezőgazdasági felhasználását, mivel szakmailag megalapozottan kijelenthető, hogy a jelenleg forgalmazott GM-fajták és hibridek félkész termékek és termesztésük sokféle kockázattal jár (HESZKY 2012b).

A mezőgazdaságban használt GM-fajták alkalmazása során környezeti problémát jelent, hogy termelésük, felhasználásuk során nem ismert az összes környezetre, illetve emberi egészségre gyakorolt hatás. Az adott fajták köztermesztésbe kerülése előtt számos kockázatot kell megvizsgálni. A rizikótényezők három fő csoportra oszthatók: biológiai és ökológiai -, gazdasági és szociális-, illetve élelmiszerbiztonsági rizikó. Minden előállított géntechnológiai úton módosított növényt külön-külön meg kell vizsgálni minden kockázati tényező szempontjából, tehát a „lényegi azonosság elvét” el kell vetni, amely szerint nincs szükség a GM-növények engedélyezésénél további, kiegészítő vizsgálatokra, abban az esetben, ha a géntechnológiai úton megváltoztatott és a szülővonal kémiai összetétele lényegében azonos (PUSZTAI & BARDÓCZ 2006). Biológiai és ökológiai szempontból számolni kell többek között a rezisztens rovar- és gyomnövény populációk kialakulásával, a transzgén áramlásával, illetve megszökésével, amely következtében felmerül a koegzisztencia problémája, így a GM-fajták és a hagyományos fajták egyidejű és egy adott helyen történő termesztése és nemesítése gyakorlatilag kivitelezhetetlen (HESZKY 2006). Gazdasági kockázatként kell tekinteni a genetikai gyarmatosítás lehetőségére és a vetőmagipar globalizációjára. Az élelmiszerbiztonsági rizikó vizsgálata során szükség van szabványoknak és előírásoknak megfelelő toxikológiai és allergológiai vizsgálatok végrehajtására (HESZKY 2006). A herbicid-toleráns és rovarrezisztens géntechnológiai úton módosított fajták legnagyobb hátránya, hogy a transzgén bejuttatása során konstitutív promótert alkalmaznak, amelynek következtében a géntermék folyamatosan termelődik a GM-növény minden szövetének és szervének összes sejtjében a növény egész élete alatt (HESZKY 2008, 2011b). A rovarrezisztens GM-fajták esetében így nagy mennyiségben kerül a géntermék, vagyis a toxin környezetünkbe. Bekerülhet a talajba a növényi maradványok bomlása, illetve a talajlakó állatok lebontó tevékenysége során. A szél által a különböző növényi részek, ezáltal a toxin bekerülhet a természetes vizekbe is, ahol káros hatást fejthet ki a vízi ökoszisztémára. A víz minden élőlény számára nélkülözhetetlen, ezért minőségének megóvása kiemelt fontosságú feladat.

1.2. Célkitűzések

Az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályának kutatásaihoz 2011-ben csatlakoztam, majd 2012. évtől a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézetben folytattam a vizsgálatokat, ahol két rovarrezisztens kukoricafajta transzgenikus és közel izogenikus vonalainak vízi ökoszisztémára gyakorolt hatásainak vizsgálatába kapcsolódtam be. Kutatásaink során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Van-e különbség a vizsgált kukoricafajták transzgenikus és közel izogenikus vonalainak a vizsgált vízi szervezetek (nagy vízibolha (*Daphnia magna*), egyiptomi csípőszúnyog (*Aedes aegypti*)) mortalitására gyakorolt hatásai között?
2. Milyen hatással vannak a transzgenikus kukoricák a *Daphnia magna*, illetve az *Aedes aegypti* lárvák mortalitására?
3. Van-e különbség a vizsgált kukoricafajták transzgenikus és közel izogenikus vonalainak a *Daphnia magna* reprodukciójára gyakorolt hatásai között?
4. Milyen hatással vannak a transzgenikus kukoricák a *Daphnia magna* reprodukciójára?

A kutatás alaphipotézisei:

A MON 810 transzgenikus kukoricafajta a *Daphnia magna*, illetve az *Aedes aegypti* lárvák mortalitására nincs hatással.

A DAS 59122-7 transzgenikus kukoricafajta a *Daphnia magna*, illetve az *Aedes aegypti* lárvák mortalitására nincs hatással.

A MON 810 transzgenikus kukoricafajta a *Daphnia magna* reprodukciójára hatással van.

A DAS 59122-7 transzgenikus kukoricafajta a *Daphnia magna* reprodukciójára hatással van.

Eredményeinkkel szeretnénk hozzájárulni a rovarrezisztens GM-kukorica fajták környezeti kockázatainak és mellékhatásprofiljainak részletesebb megismeréséhez.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A *Bt*-növények általános jellemzése

A géntechnológiai úton módosított élőlény olyan szervezet, mely esetében a genom módosítása az ivarsejtekre is kiterjed, tehát az élőlény öröklődő megváltoztatásáról van szó (DARVAS & LAUBER 2006). A különböző kártevőkkel szemben ellenálló transzgenikus fajtákat összefoglalóan *Bt*-növényeknek nevezzük. A *Bt* elnevezés a rovarpatogén *Bt*-endotoxinokat termelő *Bacillus thuringiensis* baktériumra utal (DARVAS & LAUBER 2006). A *Bt*-növények tehát olyan növények (pl. kukorica, szója), amelyek genomjába a *Bacillus thuringiensis*-ből származó Cry-toxinok termeléséért felelős *cry*-géneket juttatták be, ezáltal a növény képes a toxin termelésére. A toxintermelés útján a növény védett a kártevők támadásaival szemben.

A *Bacillus thuringiensis* egy aerob, Gram-pozitív baktérium (ROH et al., 2007). Szélsőséges körülmények között ez a talajbaktérium parasporális testet formál, mely során rovarpatogén fehérjét, δ -endotoxinokat termel (HESZKY 2005b). A δ -endotoxinoknak két fajtája ismert, a Cyt (cytolytic)-toxinok és a Cry (crystalline)-toxinok (SHNEPF et al., 1998). A növényvédelemben nem használt, pórusképző Cyt-endotoxinok citolitikus és hemolitikus hatásúak és főként a kétszárnyúak (*Diptera*) rendjébe tartozó rovarlárvákra fejtik ki hatásukat (PROMDONKOY & ELLAR 2003, BRAVO et al., 2007). A Cyt-toxin típusú endotoxinok citolitikus és hemolitikus hatásúak és főként a kétszárnyúak (*Diptera*) rendjébe tartozó rovarlárvákra fejtik ki hatásukat (BRAVO et al., 2007). A δ -endotoxinok másik típusát a Cry-toxinok alkotják. A Cry-toxinok specifikus hatásúak, az élőlények szervezetébe főként szájon keresztül, *per os* módon juthatnak be. A Cry-toxinokat 5 csoportba sorolhatjuk aszerint, hogy milyen kártevők ellen nyújtanak védelmet. A Cry1-toxinok a lepkefélék (*Lepidoptera*), a Cry2-toxinok a lepkefélék (*Lepidoptera*) és a kétszárnyúak (*Diptera*), a Cry3-toxinok a bogárfélék (*Coleoptera*), a Cry4-toxinok a kétszárnyúak (*Diptera*) lárváin fejtik ki specifikus toxikus hatásukat. A Cry5-toxinok a fonálférgek (*Nematoda*) osztályába tartozó fajok károsításaival szemben használhatóak fel (CRICKMORE et al., 2009, VAN FRANKENHUYZEN 2009).

A legelterjedtebb rovarpatogén Cry-toxinok a rovar szervezetébe a *Bt*-növény különböző részeinek elfogyasztásával kerülnek be, a toxin a középbelbe kerülve kapcsolódik a hámsejteken található specifikus receptorokhoz. A kapcsolódás hatására a toxin oligomerizálódik, a keletkezett oligomer a lipidmembránba ékelődik, ezáltal a sejthártyán pórusok keletkeznek, a sejt ionháztartása felborul, mely a sejtek líziséhez vezet. Végül a bél perisztaltikája leáll, melynek következtében a rovar nem képes a táplálék felvételére és a tápanyagok hasznosítására, így éhen hal, továbbá az egyed elhullásához vezethetnek a mikrosebzéseken keresztül kialakuló fertőzések is (SCHNEPF et al., 1998, HESZKY 2005b). A toxin viszont semmilyen hatást nem képes kifejteni, ha nem képes a

rovar középbelében található hámsejtek receptoraihoz kötődni. A toxin specifikus hatását tehát a toxin szerkezete és a rovar receptor molekulája határozza meg (HESZKY 2005b).

A *Bt*-növények előállításának számos módja lehet (SCHNEPF et al., 1998). Egyik módja az endotoxinok termeléséért felelős plazmidok izolálása, mivel a *cry*-génnek, amelyek a Cry-toxint kódolják a plazmidokon találhatóak meg. A rovarrezisztencia vagy herbicidtoleranciáért felelős gén konstrukciót közvetett (pl. vírus közvetített-, Agrobaktérium közvetített génátvitel) vagy közvetlen (pl. vákuummal, részecskebombázással, elektroporációval) géntranszfer technikával juttatják a célszövet sejtjeibe (HESZKY 2011e). Az előállítás másik módja lehet a hibrid képzés. Ebben az esetben a *Bacillus thuringiensis* két szerotípusát konjugálják, amely során a plazmidok új rekombinációja állítható elő, ezzel a módszerrel olyan transzgenikus növényeket hozhatnak létre, amelyek egyszerre több új tulajdonsággal is rendelkeznek. Transzgenikus növények előállíthatók CellCap eljárás során is, ahol egy mikrokapszula tartalmazza az endotoxinokat (DARVAS & LAUBER 2006).

A mezőgazdaságban elterjedt *Bt*-növények főként a világ kukorica-, gyapot-, szója- és olajrepcé-termelését érinti (DARVAS et al., 2009). Az Európai Unióban egyedül a *MON 810*-es transzgenikus kukorica vonal termesztése engedélyezett, amely Cry1Ab-toxint termel, ennek köszönhetően a kukorica védett a kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis*) kártételével szemben. Magyarországon az említett kukoricafajtával szemben vetési moratórium van érvényben, ezért vetése csak kutatási célból engedélyezett (TAKÁCS et al., 2009).

2.2 A *Bt*-növények alkalmazásának előnyei

A transzgenikus *Bt*-növények által termelt Cry-toxinok specifikus és folyamatos védelmet nyújtanak a növény számára a kártevők ellen (TAKÁCS et al., 2009). Az ilyen típusú növényvédelem nagyobb termés hozamokat eredményezhet (BETZ et al., 2000). Az aktív hatóanyag pedig nincs kitéve az olyan kedvezőtlen környezeti tényezők hatásának, mint az UV-sugárzás és a csapadék (TAKÁCS et al., 2009). Előnyt jelent az is, hogy a Cry-toxinok rendszintű specificitást mutatnak, így bizonyos fokú szelektivitást, specifikus védelmet biztosítanak a növény számára.

A rovarrezisztens GM-fajták, hibridek monokultúrában is termesztethetővé válnak, a rovarkártétel veszélye nélkül. Azokon a kukoricabogár vagy kukoricamoly fertőzött területeken, ahol a gazdák korábban nem védekeztek, jelentős terméstöbblet érhető el a GM-hibridek termesztésével, vegyszeres védekezés nélkül is. A gazdák ezáltal jelentős vegyszer és permetezési költséget takaríthatnak meg. A legújabb fejlesztésű GM-kukorica hibridek, már nem csak 1 gént, hanem egyszerre több, akár 5-6 gént is tartalmaznak, amelynek következtében több tulajdonságban módosítottak. Lehetnek egy időben moly- és bogárrezisztensek, *glyphosate* és *glufosinate*

herbicidekkel szemben toleránsak, így a jövőben egyszerre megoldhatóvá válhat a gyomirtás és a rovarkártevők elleni védelem (HESZKY 2008).

2.3. A Bt-növények alkalmazásának hátrányai

A Bt-növények felhasználása bizonyos területeken jelentős előnyökkel jár, viszont alkalmazásuk során figyelembe kell venni számos kockázatot is. Genetikai szempontból a transzgénáramlás és transzgénmegszökés jelentenek problémát. A transzgénáramlás következtében a fajta- és fajhibridek képződése is reális kockázattá válik. A transzgénmegszökés pedig azért kockázatos mivel a transzgén viselkedése, kifejeződése kontrollálhatatlanná válhat (HESZKY 2007). A génáramlás, génmegszökés kockázatának fennállása esetén számolni kell a koegzisztencia problémakörével is. A koegzisztencia a GM-fajták és a hagyományos fajták egyidejű és egy adott helyen történő termesztését és nemesítését jelenti úgy, hogy a termés az Európai Unió követelményeinek megfeleljen, miszerint a maximális GMO tartalom 0,9% lehet a hagyományos termékeknél és 0,0% a biotermékek esetében (HESZKY 2006).

A toxinnal szembeni rezisztencia viszonylag rövid időn belül kialakulhat (DARVAS & LAUBER 2007). A rezisztencia kialakulásának késleltetésére kidolgozták a „nagy dózis/menedék” termesztési módot, amely során a GM-tábla GM-fajta sorai közé meghatározott távolságokban hagyományos fajták sorait vetik el, ahol a nem rezisztens rovarok is tovább élhetnek. A rezisztencia recesszív tulajdonság, tehát csak a homozigóta rovargyedekre nincs hatással a GM-növény által termelt toxin. A rezisztens homozigóta egyedek a hagyományos sorokon élő nem rezisztens egyedekkel párosodva heterozigóta utódokat hoznak létre, amelyeket a GM-fajta által termelt toxin már képes elpusztítani. A kidolgozott technológia viszont nem képes jelentős mértékben csökkenteni a rezisztens populációk megjelenését és többlet költségeket jelent a gazdák számára (HESZKY 2012c).

Ökológiai szempontból számolni kell azzal, hogy a toxin folyamatosan termelődik, minden növényi sejtben a növény egész élete során (HESZKY 2011b). Ennek köszönhetően a toxin hosszú ideig a környezetben marad, ezzel veszélyeztetve az ökoszisztémát (SZÉKÁCS & DARVAS 2007). A kukoricabogár-rezisztens növények esetében elég lenne, ha csak a gyökerekben termelődne a toxin, mivel a jelentős gazdasági kárt okozó lárvák csak a növényi gyökereket támadják meg, de a kártétel elleni védelem legegyszerűbb módja még mindig a vetésforgó alkalmazása lenne. Gyökérspecifikus promóter alkalmazásával megoldhatóvá válna, hogy a gén csak a gyökérben működjön, így a föld feletti növényi részekben nem termelődne a toxin, amelynek következtében a génáramlás kockázata nagymértékben csökkenne. A kukoricamoly számottevő kártételével hazánkban csak kis területén, és időben korlátozottan kell számolni és az érintett gazdák általában nem védekeznek ellene, így a

molyrezisztens fajták alkalmazása nem eredményezne kisebb mértékű vegyszer költséget (HESZKY 2008). A molyrezisztens kukorica fajtáknál is elegendő lenne, ha a toxin csak a növény szárában termelődne, mivel a kukoricamoly lárvái elsősorban a növény szárában fejtik ki károsító hatásukat (HESZKY 2011b).

A nem célzott szervezetek is ki vannak téve a Cry-toxinok hatásának a táplálkozás során. A fitofág élőlények közvetlenül elfogyaszthatják a transzgenikus növények elsodort részeit, illetve a Bt-növény ültetvények közelében táplálékuk toxinnal szennyeződhet. A ragadozók és a paraziták károsodhatnak a zsákmány vagy a gazdaszervezet által, amelyek előzetesen fogyasztottak Cry-toxintartalmú táplálékot. A szaprofita szervezetek által a toxintartalmú növényi maradványok közvetlenül fogyasztásra kerülnek. A beporzást végző rovarok is kapcsolatba kerülnek a toxintartalmú pollennel és a szimbiózisban élő élőlények is károsodhatnak a toxin által, amennyiben a szimbionta partner tartalmaz toxint (DARVAS & LÖVEI 2006).

A toxint tartalmazó pollen számos állat élőhelyét képes megváltoztatni (DARVAS et al., 2006). Bizonyos védett lepke- (*Lepidoptera*) és egyéb rovarfajok is ki vannak téve a toxin károsító hatásának, mivel a Cry-toxintartalmú pollen képes kiüledni a kukoricatáblák szegély területén megtalálható csalánfélék (*Urticaceae*) leveleire., így a leveleken élő és azokat fogyasztó lepkehernyókat, mint például a nappali pávaszem (*Inachis io*) hernyóit is érintik a toxin lehetséges káros hatásai (DARVAS et al., 2004, LAUBER et al., 2007).

A pollent a szél és a víz képes szállítani. A pollen és növényi maradványok a vízi ökoszisztémába lebontás nélkül bekerülhetnek, így azok hatással lehetnek a vízi élőlényekre. Ha a toxin a felszíni vizekbe kerülve káros hatást fejt ki a vízi lebontó szervezetekre, számolni kell az eutrofizáció kialakulásának lehetőségével is, amely a vízminőség romlásához vezethet. Környezetvédelmi szempontból ez számottevő probléma lehet. Az élő vizekbe került toxintartalmú növényi törmelék, illetve a toxintartalmú pollen igen hosszú utat is megtehet lebomlás nélkül, a növényi maradványok akár 180 m-t is megtehetnek, míg a pollen akár 2 km távolságból is kimutatható (ROSI-MARSHALL et al., 2007). Rosi-Marshall és munkatársai kimutatták azt is, hogy a vizsgált Bt-kukoricafajta és a hagyományos kukoricafajta növényi maradványainak vízben való lebomlásának ütemében nincs különbség, viszont a laboratóriumi etetési kísérletek során megállapították, hogy a Bt-kukoricával etetett egyes tegzes fajok sokkal lassabb fejlődést mutattak (ROSI-MARSHALL et al., 2007). Bohn és munkatársai a vízminőség romlását kitűnően jelző nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) vizsgálták a Cry1Ab-toxintartalmú kukoricaszemek örleményének fejlődésre és szaporodásra gyakorolt hatásait. Vizsgálataik során mindkét esetben gátló hatást tapasztaltak (BOHN et al., 2008).

Az okszerűen szükséges, esetenkénti permetezéssel szemben a Bt-növények folyamatosan termelik a toxint, akkor is, ha nincs rá szükség, illetve olyan növényi szövetekben is, amely a

védekezés szempontjából felesleges. A talaj esetében kiemelkedő probléma, hogy a gyökérben termelődő nagy mennyiségű toxin a gyökérváladékkal a tenyészidőszak teljes ideje alatt folyamatosan a talajba kerül, illetve a gyökérsejtek hámlásával is növekszik a talaj Cry-toxin tartalma (SZÉKÁCS & DARVAS 2007, SZÉKÁCS et al., 2010a). A növényi sejtekben termelődött Cry-toxin a sejtekbe zárva hosszú ideig megmarad, ezért fontos megvizsgálni, hogy milyen hatást gyakorol ez a jelenség a talómaradványok lebontására és a talajt alkotó mikrobiális közösségekre. Mérések bizonyítják, hogy a talómaradvánnyal a talajba kerülő Cry-toxin 1-8%-ka egy év múlva is visszamérhető (TAKÁCS et al., 2009), ugyanis a toxinkoncentráció kezdetben gyorsan csökken, viszont utána a toxin bomlásának sebessége nagymértékben lelassul (PALM et al., 1994, 1996, SIMS & REAM 1997, HERMAN et al., 2002). A talajba jutó toxin adszorbeálódhat a talaj alkotórészek felületén, főként az agyagszemcséken (CRECCHIO & STOTZKY 1998, TAPP & STOTZKY 1998), ezáltal a toxin védett a lebontással szemben, viszont rovarpatogén tulajdonságát kötött állapotban sem veszíti el (KOSKELLA & STOTZKY 1997). Különböző vizsgálatok bizonyították, hogy a toxin patogenitása több mint 6 hónap elteltével is igazolható (TAPP & STOTZKY 1998). Látható tehát, hogy a toxin nagy mennyiségben kerül a talajba, ezért érdemes vizsgálni a talaj élővilágra gyakorolt hatásait, mivel az élőlényeket károsíthatja, direkt illetve indirekt módon is. A Cry-toxinok talajban való felhalmozódásával is számolni kell, mivel nagyüzemi körülmények között a monokultúras termesztést gyakran alkalmazzák (TAPP & STOTZKY 1998).

A toxin károsíthatja az emberi egészséget és különböző allergiás reakciókat válthat ki. A szervezetben lejátszódó folyamatok még nem teljesen ismertek, ezért számos toxikológiai és allergológiai vizsgálat elvégzésére van szükség minden egyes GM-fajta és termék esetén. A WHO (World Health Organization – Egészségügyi Világszervezet) állásfoglalása szerint viszont a transzgenikus növények nem veszélyesek az emberi egészségre (PUSZTAI & BARDÓCZ 2006).

2.4. A transzgén integrációjának, működésének és öröklődésének bizonyítása

A transzgenikus fajták nemesítése során, a géntranszfert követően a sejteket a markergén által kódolt rezisztenciára szelektálják, mivel a markergén általában antibiotikum-rezisztenciát vagy herbicid toleranciát kódol, a szelekciót a táptalajhoz letális dózisban adagolt antibiotikummal vagy herbiciddel végzik. A túlélő sejtekből regenerált növényekben különböző molekuláris módszerekkel kimutatható a transzgén beépülése, működése, illetve öröklődése, ezekkel a vizsgálatokkal bizonyítható a transzformáció sikeressége.

A transzgén sikeres integrációjáról akkor beszélünk, ha a növény minden egyes sejtjének sejtmagjában lévő DNS-ben megtalálható a bejuttatott transzgén. A transzgén a növényi genomiális DNS-ben DNS-DNS hibridizáción alapuló módszerekkel (Southern hibridizáció) illetve a DNS polimeráz-lánreakción (PCR) alapuló módszerekkel azonosítható (HESZKY 2011c).

A transzgenikus fajták előállításához csak azok a növények használhatóak fel, amelyekben a transzgén stabilan integrálódott és megfelelően működik. A működés bizonyításának legegyszerűbb módja a markergénre alapozott szelekció, viszont ezzel a módszerrel a transzgén működése csak közvetetten bizonyítható. A transzgén működésének közvetlen bizonyítása molekuláris módszerekkel történhet. A transzgén működése azt jelenti, hogy a DNS-ről mRNS szintetizálódik, amelyről folyamatosan történik a fehérjeszintézis, ezért a transzgén működése molekulárisan bizonyítható a transzgénspecifikus mRNS és a transzgén által kódolt fehérje kimutatásával. A transzgén által kódolt fehérje elsősorban a Western hibridizáción alapuló módszerekkel azonosítható, míg a transzgénspecifikus mRNS kimutatása Northern hibridizációval történhet (HESZKY 2011d).

A markergénre alapozott szelekció a géntranszfer sikerességének és a transzgén közvetett működésének bizonyítása mellett használható a transzgén öröklődésének bizonyítására is (HESZKY 2011d).

2.5. A toxin minőségi és mennyiségi meghatározása

A bejuttatott gén által termelt lektin típusú, Cry-toxin fehérjék minőségi és mennyiségi meghatározása, ezáltal a toxin növényi részekben, szövetekben való eloszlásának és környezetben való degradációjának ismerete elengedhetetlen feltétele a környezeti kockázatbecslésnek, a minőségellenőrzésnek, és nélkülözhetetlen ahhoz, hogy megállapítható legyen a szabályoknak és előírásoknak való megfelelés.

A Cry-toxinok analitikai módon történő meghatározásának széles körben alkalmazott módszere az enzimjelzéses *immunoassay* (ELISA) eljárás. Az ELISA rendszerek mérési alapelve az, hogy a mérendő anyaggal (célvegyülettel) szemben állati szervezetből nyert antitestet alkalmaz a célvegyület szelektív felismerésére. A módszer alapja az antigén-ellenanyag kapcsolat, vagyis az immunkomplex képződés, ezért nagyfokú szelektivitás jellemzi (TAKÁCS et al., 2012a). A vizsgálat kivitelezése 96-üregű polisztirol mikrotálcán történik. A meghatározás lényege, hogy a szilárd fázishoz kötött egyik komponens (antigén vagy ellenanyag) és az oldatban lévő másik komponens (ellenanyag vagy antigén) kapcsolódását az oldott komponenshez kovalensen kötött enzim működése jelzi. Az antigén-ellenanyag között kialakult kapcsolat detektálásához olyan *kromofórra* van szükség, amely az enzimreakció következtében színváltozáson megy át. Így az átalakított kromogén mennyisége az optikai denzitás mérésével meghatározható és arányos az enzimaktivitással, ami a megkötött ellenanyag vagy antigén mennyiségétől függ. Az előidézett analitikai jel intenzitása, vagyis jelen esetben a színintenzitás spektrofotometriás eljárással megfelelő hullámhosszon közvetlenül meghatározható. A mintában lévő antigén koncentrációja arányos a színintenzitással. A módszernek

két típusát különíthetjük el. A közvetlen ELISA során az antigént vagy az ellenanyagot szilárd fázishoz kötött formában, míg a másik, oldott fázisban lévő komponenst jelölt formában alkalmazzuk. Az közvetett eljárás során a szilárd fázison lezajló antigén–ellenanyag reakciót egy enzimmal jelzett második, előhívó reagenssel mutatjuk ki, ami lehet a reakció ellenanyag komponense ellen irányuló jelzett ellenanyag (az ellenanyagot szolgáltató faj immunglobulinjaival reagáló, enzimmal jelzett ellenanyag) vagy pedig olyan enzimmal jelzett fehérjék, amelyek nagy kötési erősséggel képesek ellenanyagokhoz kötődni. Kettős ellenanyag szendvics módszer során a szilárd fázishoz kötött ellenanyaghoz kapcsolódó antigén kimutatására egy másik, ugyanazzal az antigénnel kapcsolódni képes, enzimmal jelzett ellenanyagot használnak. Ebben az esetben a két ellenanyag az antigén két eltérő antigén determináns csoportja (epitópja) ellen kell irányuljon (TAKÁCS et al., 2010, 2012a). Az ELISA rendszer osztályozható aszerint, hogy mennyiségi vagy minőségi meghatározást végzünk, a reakció fázisai alapján lehet heterogén vagy homogén, az immunkomplex képződés alapján pedig lehet kompetitív, vagy konszekutív (TAKÁCS et al., 2012a).

A szakirodalomban közölt, különböző kutatások során meghatározott toxinmennyiségi adatok között igen nagy eltérések figyelhetők meg. Takács és munkatársai egy 2012-ben megjelent cikkükben összefoglalták azokat az analitikai nehézségeket és biológiai szempontokat, amelyek befolyásolhatják a toxin, esetükben a Cry1Ab-toxin mennyiségi meghatározását és magyarázhatják a közölt adatok jelentős mértékű szórását (Takács et al., 2012a).

Analitikai szempontból a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA rendszerek általános hátránya, hogy ezek a rendszerek Cry1Ab-prototoxinspecifikus antitesteken alapulnak, ezért a kitek a gyártó által biztosított Cry1Ab-prototoxin standardokat tartalmazzák. A kitekkel végzett ELISA mérések során alkalmazott antitestek a mikrobiális prototoxinra specifikusak, amelyet a *Bacillus thuringiensis* törzsek cry-génjei kódolnak. Ezzel szemben a *Bt*-növényekben preaktivált toxin termelődik, ami nem más, mint a prototoxin N-terminális fragmentje (SZÉKÁCS et al., 2010a). A baktérium által termelt prototoxin és a *Bt*-növények által termelt preaktivált toxin molekula mérete között jelentős különbség figyelhető meg, emiatt a kereskedelembe kapható ELISA kitek nem alkalmasak a *Bt*-növényekben található Cry1Ab-toxintartalom közvetlen meghatározására. A vizsgálatok során kapott eredményeket korrigálni kell a prototoxin és a preaktivált toxin közötti kereszt-reaktivitás értékével (SZÉKÁCS et al. 2010a, TAKÁCS et al., 2012a). A problémára megoldást jelenthet az is, ha analitikai standarként *Bt*-növény által termelt preaktivált toxint használnak, vagy ha a prototoxin standardet az analitikai meghatározás előtt aktív toxinná alakítják. Ez utóbbi megoldás könnyen kivitelezhető enzimatis (proteolitikus) emésztés alkalmazásával (LAMBERT et al., 1996), viszont az elsőként említett módszert megnehezíti a *Bt*-növények által termelt preaktivált toxin fehérjék hiánya (MIRANDA et al., 2001, SZÉKÁCS et al., 2010a).

A kereskedelembe forgalmazott ELISA kitek esetében a gyártók által biztosított Cry1Ab-protoxin standardokkal történő megfelelő kalibráció is nehézségeket okoz az analitikai meghatározás során, mivel Cry1Ab-protoxin meghatározására alkalmasak. A másik jelentős probléma, hogy a megvásárolható kitek az ELISA rendszerek kalibrálásánál használt szigmoid görbe alsó hajlított, majdnem lineáris részére lineáris egyenest illesztenek a kalibráció során, azért, hogy a kimutatási határ minél alacsonyabb legyen, ezzel viszont a koncentráció meghatározás pontossága, így a mérés reprodukálhatósága jelentős mértékben csökken. Továbbá a nagyon alacsony kimutatási határ a minták nagyfokú hígítási arányát igényli, amely során nem csak a pontosság, de a megbízhatóság és az ismételhetőség is romlik (SZÉKÁCS et al., 2010a, TAKÁCS et al., 2012a).

Az ELISA rendszerek esetében számolni kell a mátrixhatással is, mivel a meghatározandó komponens fizikai és biológiai környezete hatással lehet analitikai meghatározására. A mátrixhatás kétféle módon határozható meg. A genetikailag módosított növények vizsgálata során a mátrixhatás kifejezhető, ha kontrollként az adott transzgenikus fajta közel izogenikus vonalát használjuk. Ebben az esetben, a Cry1Ab-toxin megjelenése bármelyik közel izogenikus mintában mátrixhatásra vagy az ELISA eljárásban bekövetkezett hibára utalhat. A másik módszer a mátrixhatás bizonyítására a standard addíció módszere, mely során Cry1Ab standard oldattal mesterségesen szennyezik a mintát. Abban az esetben nincs mátrixhatás, ha a puffer és az adott mátrix oldat esetében kapott kalibrációs görbék között nincs szignifikáns különbség (Takács et al., 2012a).

A különböző tanulmányokban egy adott *Bt*-kukorica fajta esetében is igen nagy eltérések figyelhetők meg a közölt Cry-toxin koncentrációk között, ezért 2009-ben négy különböző ország laboratóriuma vett részt egy olyan körmérésben, ahol négy, különböző *MON 810* kukorica vonalból származó kukorica fajta levél mintáiban vizsgálták a Cry1Ab-toxintartalmat. A körmérés célja az volt, hogy feltárják a közölt koncentrációk közötti eltérések analitikai okait. A különböző laboratóriumok a minták vizsgálatához standardizált referencia mintákat használtak, méréseiket pedig egységesített ELISA módszer alapján és a saját, általuk gyakorlatban alkalmazott ELISA protokoll alapján is elvégezték. Az elemzés során a laborok eltérő ELISA mikrotiter lemez leolvasó készülékkel és szoftverekkel értékelték ki a kapott eredményeket. A kalibráció során a kalibráló pontokra szigmoid görbét illesztettek, amelyek lefutása szignifikánsan nem különbözött a laboratóriumok között (SZÉKÁCS et al., 2011), tehát az ismételhetőség ebből a szempontból megfelelő. A közös, standardizált protokollok alkalmazásakor egy adott laboratóriumon belül is jelentkeztek eltérések ugyan azon növényi minta Cry1Ab-tartalmára vonatkozóan, mely eltéréseket különböző emberi tényezők, illetve a módszerek és berendezések pontatlansága eredményezheti, ezért nyilvánvaló, hogy a kapott eredmények között jóval kevesebb eltérés figyelhető meg automatizált extrakció és pipettázás alkalmazásával, a manuális technikákhoz képest. Az

egységesített műveleti leírás alapján elvégzett vizsgálatok során kapott toxin koncentrációkban is megfigyelhetők szignifikáns különbségek, de jelentősen kisebb mértékben, a laborok saját módszertani leírásai alapján elvégzett vizsgálati eredményekhez képest, ebből is látszik, hogy egy laborok között egységesített, szabványosított módszer javítaná a vizsgálatok ismételhetőségét és lehetővé tenné a vizsgálatok különböző laboratóriumok eredményeinek jobb összehasonlíthatóságát (SZÉKÁCS et al., 2011, TAKÁCS et al., 2012a).

Székács és munkatársai 2010-ben számoltak be az ELISA rendszer belső analitikai minőség ellenőrzésének elvégzése során szerzett tapasztalataikról. A vizsgálataik során a *MON 810* géntechnológiai úton módosított, rovarrezisztens kukoricavonalból származó referencia minta Cry1Ab-toxintartalmát határozták meg két különböző cég által forgalmazott ELISA kit felhasználásával, két különböző évben. Eredményeik alapján megállapítható, hogy a kétféle ELISA módszer esetén kapott eredmények egymással közvetlenül nem hasonlíthatók össze, még akkor sem, ha az eredményeket korrigáljuk a kereszt-reaktivitás értékével (SZÉKÁCS et al., 2010a, TAKÁCS et al., 2012a), ezért a szakirodalomban közölt eredmények összehasonlítása során figyelembe kell venni az adott kutató által használt ELISA rendszer típusát, gyártóját is.

A géntechnológiai úton módosított növények vizsgálata során figyelembe kell venni a különböző biológiai szempontokat is, többek között a növény fajtáját, a mintavétel időpontját és a mintavétel helyét. A különböző kutatásokban meghatározott toxin koncentráció értékek ugyanazon genetikai eseményből származó fajták között is nagyfokú eltérést mutatnak. A toxin koncentrációja a különböző növényi részekben eltérő, mennyisége egy adott növényi részben évenként is eltérhet. (TAKÁCS et al., 2012a). Székács és munkatársai kutatásaik során meghatározták a DK-440 BTY kukorica különböző növényi részeinek a kereszt-reaktivitás értékkel korrigált toxintartalmát. Az általuk közölt adatok megfelelnek az Nguyen és munkatársai által korábban közölt adatoknak (NGUYEN et al., 2007), viszont a szakirodalomban közölt adatok nagy részéhez képest magasabb koncentráció értékeket határoztak meg, ami a fent említett kereszt-reaktivitással való korrekció eredménye (SZÉKÁCS et al., 2010a). A *MON 810* genetikai eseményű kukorica növényi részeiben mért Cry1Ab-koncentráció a következőképpen változik: levél > portok fala > gyökér > szár > mag > pollen (SZÉKÁCS et al., 2010a). A *MON 810* kukorica esetében a Cry1Ab-toxin termelése szövet- és idő-specifikus (BURNS & ABEL 2003, SZÉKÁCS et al., 2010a). A talaj minősége, elsősorban annak nitrogén tartalma is hatással van a *cry1Ab*-gén működésére. A nitrogén tartalmú trágyák intenzív használata akár háromszorosára növelheti a Cry1Ab-toxintartalmat a *Bt*-kukoricában (BURNS & ABEL 2003).

A DK440-BTY kukorica Cry1Ab-toxintartalmában jól meghatározható időbeli ingadozás figyelhető meg a fejlődési periódus alatt. A legintenzívebb toxintermelés a korai vegetatív fejlődési szakaszokra jellemző. A levelekben a toxin tartalom a V5 (öt kifejlődött levél) fejlődési stádiumban

éri el a maximumot, a V5 és az R4 (viaszérés) fenofázisok között folyamatos csökkenés figyelhető meg. Az R4 stádiumban a Cry1Ab-toxintartalom a kezdeti szintet közelíti meg, majd egy újabb emelkedés figyelhető meg az R5 (dent) állapotig. Hasonló tendencia figyelhető meg a gyökér és a szár toxin tartalmának változásaiban is, azonban ezen növényi részek esetében nem figyelhető meg intenzív növekedés a V5 stádium előtt (RITCHIE et al., 1992, SZÉKÁCS et al., 2010a, TAKÁCS et al., 2012a). Székács és munkatársai által elkészített, 2010-ben megjelent tanulmány alapján kijelenthető, hogy a Cry1Ab-toxin koncentrációja a különböző évekből is eltérő értéket mutat a *MON 810* kukorica levél- és gyökérmintáiban (SZÉKÁCS et al., 2010a, TAKÁCS et al., 2012a).

A Cry1Ab-toxintartalom a *MON 810 Bt*-kukorica esetében a levélszintek között és az egyes leveleken belül is eltérő. Székács és munkatársai meghatározták, hogy egy adott növény levélszintjeit megvizsgálva a szár alsó részein elhelyezkedő levelek esetében a toxin tartalom sokkal alacsonyabb volt a magasabban elhelyezkedő levelek toxin tartalmához képest. Az egyes leveleken belül a levélerezet közelében figyelhető meg a legnagyobb toxin koncentráció, ami a levelek széle felé fokozatosan csökken. Az egyes levelek hosszanti vizsgálatánál a levél lemez középső részén határozták meg a legmagasabb koncentrációt, a levélalapnál és levélhüvelynél alacsonyabb koncentráció értékeket állapítottak meg. A levélsúcs esetében külön vizsgálták az elszáradt részekkel együtt és azok nélkül is a toxin koncentrációját, azért, hogy a természetes levélszáradás (nekrotizáció) toxin tartalomra gyakorolt hatásait meg tudják állapítani. Az elszáradt részeket nem tartalmazó levélsúcs esetében a levél alaphoz hasonló értékeket kaptak. Vizsgálták továbbá a késői R4 fejlődési állapotban lévő *MON 810*-es kukorica különböző mértékben elszáradt leveleinek toxin tartalmát. Megállapították, hogy a zöld, nem nekrotizálódott levelekben szignifikánsan nagyobb a Cry1Ab-tartalom, mint a teljesen (barna), illetve félig nekrotizálódott (sárga) levelekben (SZÉKÁCS et al., 2010b, TAKÁCS et al., 2012a). Az egyes leveleken belül a Cry1Ab-toxintartalom arányos a klorofill tartalommal, tehát azokban a szövetekben alacsony a Cry1Ab-tartalom, amelyekben alacsony a klorofill tartalom (ABEL & ADAMCZYK 2004).

Látható tehát, hogy a toxin mennyiségi és minőségi meghatározását számos analitikai és biológiai tényező befolyásolhatja, amelynek következtében a szakirodalomban közölt adatok és eredmények összehasonlítása, értékelése során igen körültekintőnek kell lenni.

Az ELISA módszer mellett más módszerekkel is elvégezhető a toxin (pl. Cry1Ab) meghatározása, ilyen meghatározásra alkalmas módszer többek között az ionkromatográfia (MIRANDA et al., 2001), a nagyteljesítményű folyadék kromatográfia (YAMAMOTO 1983) és a kapilláris elektroforézis (LIU et al., 2001). A transzgén által termelt toxin kimutatása történhet továbbá gélekromatográfiával, gélelektroforézissel és az ún. lamináris áramlású teszt csíkokat alkalmazó technikával is (SPIEGELHALTER et al., 2001).

2.6. A toxin toxikus hatásainak meghatározása

A toxin környezetre és az élő szervezetekre gyakorolt, lehetséges toxikus hatásainak meghatározása kiemelten fontos feladat, mivel a toxin a *Bt*-növényekben folyamatosan termelődik, hosszú ideig a környezetben marad, ezzel veszélyeztetve az ökoszisztémát (SZÉKÁCS & DARVAS 2007). A talaj esetében figyelembe kell venni, hogy a gyökérben termelődő jelentős mennyiségű toxin a tenyésztési időszak teljes ideje alatt folyamatosan a talajba kerül a gyökérváladékon, illetve a lehámlott gyökér sejteken keresztül (SZÉKÁCS & DARVAS 2007, SZÉKÁCS et al., 2009), ezért káros hatást fejthet ki a talajlakó szervezetekre és a lebontó folyamatokra. A talajba jutott toxin a talaj alkotórészeinek felületén adszorbeálódhat (CRECCHIO & STOTZKY 1998, TAPP & STOTZKY 1998), amelynek következtében védetté válik a lebontással szemben, anélkül, hogy elvesztené rovarpatogén hatását (KOSKELLA & STOTZKY 1997). A toxin tartalmú növényi maradványok és a pollen a vízi ökoszisztémába lebontás nélkül bekerülhetnek, továbbá a szél vagy a víz által szállítva nagy távolságokra elsodródhatnak (ROSI-MARSHALL et al., 2007). A felszíni vizekbe jutó toxin letális vagy szubletális hatást fejthet ki a vízi élőlényekre, ezáltal sérülhet a táplálék lánc és romolhat a vízminőség. Látható tehát, hogy a toxin toxikus hatásainak megismerése nélkülözhetetlen az ökoszisztéma megóvásához és a megfelelő kockázatbecsléshez.

A toxin különböző fajokra, populációkra, a fajok közötti kölcsönhatásokra, illetve az ökoszisztémára gyakorolt káros hatásait toxikológiai és ökotoxikológiai tesztekkel vizsgálják. A hatás jellege szerint megkülönböztethetünk fokozatos, illetve „minden vagy semmi” típusú, a károsítás módja alapján pedig fizikai, kémiai, biokémiai és fiziológiai hatásokat. A toxikus anyag támadáspontjának megfelelően a hatás lehet általános vagy specifikus (pl. sejt-, szövetspecifikus) (LEHEL & LACZAY 2011a). A toxikus hatásnak való kitettség alapján beszélhetünk akut (heveny), illetve krónikus (idült) toxicitásról. Az akut toxicitás a mérgező, toxikus anyaggal történő, általában egyszeri, közvetlen, meghatározott idejű kitettség következménye, ezzel ellentétben a krónikus toxicitás tartós, többszöri kitettség eredménye (POLGÁR 2006).

A toxikus hatások megismerésére irányuló vizsgálatok elvégzését általában nemzetközi érvényességű irányelvek szabályozzák, annak érdekében, hogy a vizsgálatok során kapott eredmények nemzetközileg elfogadhatóak és összehasonlíthatóak legyenek. Az alkalmazott irányelvek között kiemelt fontosságúak az OECD (*Organization for Economic Co-operation and Development*, Gazdasági és Fejlesztési Együttműködési Szervezet) által kidolgozott módszertani útmutatók, amelyek szabványszerűen határozzák meg a vizsgálatok kivitelezése során irányadó, alapvető szempontokat. Az OECD irányelvek ennek ellenére nem tekinthetőek szabványnak, szempontjaik alapján viszont minden toxikológiai laboratórium kidolgozhatja a saját körülményeinek megfelelő vizsgálati módszert.

A különböző toxikológiai vizsgálatok lehetnek akut, szubakut, szubkrónikus illetve krónikus vizsgálatok. Az akut módszerek rövid idejű, egyszeri dózist alkalmazó vizsgálatok, míg a krónikus vizsgálatok során a vizsgálati anyagot általában több dózisban juttatják a kísérleti rendszerbe és a teszt szervezetek tartósan, akár hónapokig, évekig ki vannak téve a potenciálisan toxikus anyag expozíciójának. A toxikológiai vizsgálatok kiterjedhetnek a különböző letális (pl. mortalitás, immobilizáció) és szubletális (pl. reprodukció gátlás, növekedés gátlás) hatások meghatározására, illetve elvégezhetőek laboratóriumi, félig szabadföldi vagy szabadföldi körülmények között. A krónikus toxicitás vizsgálatok alkalmasak a reprodukciós, teratogén, mutagén hatások kimutatására. Az ökotoxikológiai vizsgálatok során a vizsgált anyag bejuttatása történhet belélegeztetés által (inhaláció), bőrön keresztül (dermális út), illetve szájon át etetés útján (*per os*). Cry-toxinok és Cry-toxin tartalmú növényi részek esetében a toxin tartalmú táplálék vagy a toxinnal szennyezett táplálékkal, illetve az ivóvízbe, vízi élőlények esetében a vízbe keverve juttatják be a vizsgálandó anyagot. (LEHEL & LACZAY 2011b).

A különböző vizsgálati anyagok toxikus hatásainak meghatározása során többféle teszt-szervezet alkalmazható. A vizsgálatok elvégezhetőek többek között alacsonyabb rendű szervezeteken is, mint például rovarokon, vízi gerincteleneken, baktérium és gomba törzseken illetve a talajlakó szervezeteken. A rovarok esetében különösen fontos a megporzás folyamatában jelentős fajokra (házi méh - *Apis mellifica*) gyakorolt káros hatások meghatározása. A vízi gerinctelenek esetében a meghatározás történhet az üledékhez kötött társulások képviselőin keresztül (*Ephemeroptera sp.*)- és tegzes (*Trichoptera sp.*) fajokon illetve csővájó fűreg (*Tubifex tubifex*) egyedeken, továbbá a vízben lebegő életmódot folytató vízibolha (*Daphnia sp.*) fajokon (POLGÁR & SCHMERA 2006). A talajlakó élőlényekre gyakorolt toxikus hatások meghatározásához többek között földigiliszta (*Lumbricidae sp.*) -, ugróvillás (*Collembola sp.*) - és atka (*Acari sp.*) fajok használhatóak fel (BAKONYI 2006).

Az alacsonyabb rendű fajok mellett a toxicitás meghatározható többek között gerinces teszt-szervezeteken. Emlősök közül a leggyakrabban alkalmazott fajok a vándorpatkány (*Rattus norvegicus*), a házi egér (*Mus musculus*), tengerimalac (*Cavia porcellus*), illetve a mezei nyúl (*Lepus europeus*) albinó változata. A madarak esetében általában a tőkés réce (*Anas platyrhynchos*), fűj (*Coturnix coturnix*) és házityúk (*Gallus domesticus*) egyedeken történik a toxikus hatások meghatározása. A vízi gerincesek közül a ponty (*Cyprinus carpio*), a szivárványos pisztráng (*Salmo gairdnerii*) (DARVAS 2006) és a zebra danió (*Danio rerio*) fajok a leggyakrabban alkalmazott teszt-szervezetek.

A Cry-toxinok nem célzott szervezetekre gyakorolt toxikus hatásait több kutató vizsgálta, többek között talajlakó élőlényeken, vízi szervezeteken, illetve különböző rovarfajokon (*Insecta*).

A talaj ökoszisztémára gyakorolt hatások kutatása során Clark és Coats kétféle Cry1Ab-toxint termelő *Bt*-kukoricafajta és közel izogenikus vonalaiból származó növényi törmelékek szubakut hatásait vizsgálta *Folsomia candida* és *Eisenia fetida* (trágyagiliszta) tesztszervezeteken. Vizsgálataik során a trágyagiliszta (*Eisenia fetida*) esetében egyik kukoricafajtát sem találták letális hatásúnak, továbbá minden egyed esetében tömegnövekedés volt megfigyelhető. A vizsgált kukorica vonalak a *Folsomia candida* esetében sem voltak letális hatásúak és nem fejtettek ki káros hatást a reprodukcióra sem (CLARK & COATS 2006). Az *Eisenia fetida* tesztszervezet esetében Ahl Goy és munkatársai sem mutattak ki letális hatást a Cry1 Ab-toxin vizsgálata során (AHL GOY et al., 1995), viszont Zwahlen és munkatársai a transzgenikus *Bt*-kukoricával etetett földigiliszta (*Lumbricus terrestris*) egyedek esetében csökkent testtömegről számoltak be (ZWAHLEN et al., 2003). Bakonyi és munkatársai a MON 810 genetikai eseményű DK-440 BTY (YieldGard) kukoricát és közel izogenikus vonalát hasonlították össze egy preferencia tesztben, amely során három ugróvillás faj (*Heteromurus nitidus*, *Folsomia candida*, *Sinella coeca*) esetében vizsgálták meg, hogy az egyedek melyik kukoricát fogyasztják el, illetve melyik növényi maradványon találhatóak meg nagyobb számban. 12 óra elteltével kevesebb *Heteromurus nitidus* volt megfigyelhető a transzgenikus kukorica körül a közel izogenikus vonalhoz képest. A másik két ugróvillás faj esetében nem volt kimutatható különbség. A *Folsomia candida* esetében az ürülékek száma a *Bt*-vonallal esetében szignifikánsan kevesebb volt az izogenikus vonalhoz képest, tehát igazolták, hogy a vizsgált egyedek a közel izogenikus kukoricát preferálták a táplálék választás során. A másik két ugróvillás esetében nem volt kimutatható különbség (BAKONYI et al., 2006). Höss és munkatársai a *Bt*-kukorica által termelt Cry1Ab-toxin hatásait vizsgálták *Caenorhabditis elegans* fonálféreg egyedeken. A *C. elegans* reprodukciója lassabb, növekedése szignifikánsan visszamaradt a Cry1Ab-toxint termelő transzgenikus kukoricát tartalmazó talajminták esetében a közel izogenikus vonalhoz képest (HÖSS et al., 2007). Clark és munkatársai vizsgálataik során bizonyították, hogy az általuk vizsgált *Bt*-kukorica negatív hatást gyakorol a talajlakó márványos ászka rák (*Trachelipus rathkii*) növekedésére, a közel izogenikus vonalhoz viszonyítva (CLARK et al., 2006).

A vízi ökoszisztémára gyakorolt káros hatások vizsgálatai során Bohn és munkatársai a vízminőség romlását kitűnően jelző nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) határozták meg a Cry1Ab-toxin tartalmú kukoricaszemek örleményének fejlődésre és szaporodásra gyakorolt krónikus hatásait. Kutatásaik során mindkét esetben gátló hatást tapasztaltak (BOHN et al., 2008), ezzel szemben a Mendelson és munkatársai által elvégzett 48 órás akut vizsgálat alapján bizonyították, hogy a Cry1Ab-toxin tartalmú kukorica pollen nem fejtett ki káros hatást a vizsgált *Daphnia magna* egyedeken (MENDELSON et al., 2003). Bohn és munkatársai egy későbbi vizsgálatuk alkalmával a *Daphnia magna* egyedek teljes életciklusán keresztül vizsgálták a Cry1 Ab-toxin

populációdinamikára gyakorolt hatásait. A vizsgálat során a tesztelt egyedeket adott *Bt*-kukorica-, illetve közel izogenikus változatának szem őrleményével etették. Eredményeik alapján kijelenthető, hogy a vízibolha egyedek a juvenil és fiatal felnőtt fejlődési állapotban a legérzékenyebbek a toxin káros hatásaira. A populációdinamikai elemzés során kapott eredmények alapján bizonyították, hogy a transzgenikus vonalával etetett egyedek túlélési aránya, illetve utódprodukciója alacsonyabb volt a közel izogenikus kukoricával etetett egyedekhez képest. Ugyanez kijelenthető a populáció növekedési rátája esetében is (BOHN et al., 2009). Laboratóriumi etetési kísérletek során Rosi-Marshall és munkatársai megállapították, hogy a *Bt*-kukoricával etetett egyes tegzes fajok sokkal lassabb fejlődést mutattak (ROSI-MARSHALL et al., 2007).

Takács és munkatársai megvizsgálták, hogy milyen hatással van a hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) termékenységre és reprodukciójára a Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinokat termelő kukorica transzgenikus és izogenikus vonalain felnevelt zselnicemeggy-levéltetű (*Rhopalosiphum padi*) elfogyasztása, kísérletük során sem a termékenységre, sem a reprodukcióra nem bizonyult károsnak a levéltetűk fogyasztása (TAKÁCS et al., 2012b). A lepkefélékre (*Lepidoptera*) gyakorolt potenciális veszélyek vizsgálata során Losey és munkatársai a *Bt*-kukorica transzgenikus, illetve közel izogenikus vonalának pollenjével borított gyermekláncfű (*Taraxacum officinale*) leveleken fejlődő *Danaus plexippus* (császárpillangó) hernyók esetében a transzgenikus kukoricának pollenje jelentős hatással volt a hernyók mortalitására (LOSEY et al., 1999). Ramirez-Romero és munkatársai kutatásaik során bebizonyították, hogy a Cry1Ab-toxin káros hatást gyakorol a házi méhek táplálkozási szokásaira és csökkentette teljesítményüket a tanulási folyamatokban (RAMIREZ-ROMERO et al., 2008). Hilbeck és munkatársai által végrehajtott etetési teszt alapján bizonyítottá vált, hogy a közönséges fátyolka (*Chrysoperla carnea*) mortalitása nő, fejlődési üteme csökken a *Bt*-kukorica tartalmú táplálék elfogyasztásának következtében (HILBECK et al., 1998).

3. Anyag és módszer

3.1. A kísérleti rendszer

3.1.1. Iszap- és vízmintavétel

Vizsgálataink során elsődleges szempont volt, hogy a beállított kísérleti rendszer minél jobban reprezentálja a természetes vizes élőhelyeket, ezért a kialakításához felhasznált iszap- és vízmintákat a Velencei-tó egyik kazettájából (É 47.135903°, K 18.365236°), illetve a Duna érdi szakaszáról, egy holtág jellegű, nem áramló területről (É 47.363689°, K 18.948755°) (1. kép, 2. kép) gyűjtöttük be. Magyarország második legnagyobb tava, a Velencei-tó Fejér megyében, a Közép-Dunántúli tájegységen megtalálható Velencei-hegység lábánál helyezkedik el. A kontinentális éghajlatnak megfelelően 10,5°C körül van az évi középhőmérséklet. Az évi csapadék mennyiség 357-828 mm között van. (VKKI és KÖDU KÖVIZIG 2010). A másik mintavételi hely Érd, egy Pest megyében, a Duna jobb partján, tehát a Dunántúlon elhelyezkedő település. A két mintavételi hely között körülbelül 32 km a távolság, így a jellemző évi középhőmérséklet itt is 10,5°C körül van. A csapadék átlagos mennyisége viszont 543 mm volt 1949 és 1994 között (KUBASSEK 2004).



1. kép: A Duna érdi szakasza

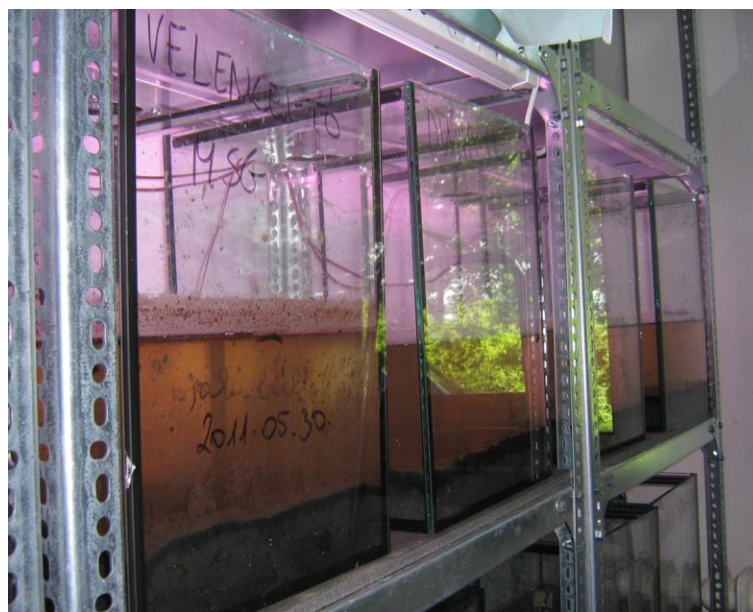


2. kép: A Velencei-tó egyik nádasos kazettája

A mintavételt a két területen 2011. május 25-én végeztük el. Az időjárás napos és száraz volt, 29-30°C körüli nappali átlaghőmérséklet jellemezte. A vízmintákat nagyméretű műanyag kannákba gyűjtöttük, amelyeket előzetesen desztillált vízzel, majd a mintavétel során azzal a vízzel öblítettünk ki, amely a konkrét mintavételi helyről származik. Az iszapmintákat zárható befőttes üvegekbe gyűjtöttük, amelyeket előzetesen szintén desztillált vízzel öblítettünk ki. A minták begyűjtésekor mind a két terület legalább 5 jellemző pontjáról vettünk víz-, illetve iszapmintát, ezáltal kevert mintákat képeztünk. Az iszapminták gyűjtésekor különös figyelmet fordítottunk arra, hogy ne kerüljenek nagyobb méretű kövek, kavicsok, kagylók a mintába.

3.1.2. A kísérleti rendszer kialakítása

A vizsgálat során az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályán 8 db akváriumot rendeztünk be a Dunából, illetve a Velencei-tóból származó vízzel és iszappal (3. kép). Minden akváriumba kb. 3 cm-es iszapréteg és kb. 12 l víz került. Az akváriumokban a megfelelő megvilágítást (16:8) és légmozgást automatikus légkeringető rendszer biztosította. A hőmérséklet $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ körül volt.



3. kép: A kísérleti rendszer

A tesztek során kétféle géntechnológiai úton módosított transzgenikus *Bt*-kukoricafajtát és közel izogenikus vonalaikat vizsgáltuk. A kísérletben vizsgált egyik kukorica a Monsanto cég által forgalmazott kukoricamoly-rezisztens *MON 810*-es kukoricavonal, ami *Cry1Ab*-toxint termel, a másik vizsgált fajta a Pioneer cég által előállított kukoricabogár-rezisztens *DAS 59122-7*, amely *Cry34Ab1*- és *Cry35Ab1*-toxinokat termel.

Három héttel a kísérleti rendszer kialakítását követően 500 mg száraz kukoricalevél-törmelék került minden egyes akváriumba. Két-két akváriumba a *DAS 59122-7 Bt*-kukorica, valamint közel izogenikus vonalának, míg a másik két-két akváriumba *MON 810*-es kukorica és közel izogenikus vonalának levéltörmeléke került. A tarlómaradványokból begyűjtött levéltörmelékek a száraz levél felső, elkeskenyedő részéből származnak, mivel a levélnek ez a része a legsérülékenyebb, és a természetben a levéltörmelékek könnyen elérhetik a talaj felszínét, illetve bekerülhetnek a felszíni vizekbe is (ROSI-MARSHALL et al., 2007). A leveleket kézzel morzszoltuk el, majd az irodalmi adatok alapján, és a vízfelszínhez viszonyítva meghatározott levéltörmelék mennyiséget, 500 mg-ot mértünk ki, majd juttattunk a vízbe minden egyes akvárium esetében. Ezt követően meghatározott időközönként víz- és levélmintát vettünk minden akváriumból.

3.2. Mintavételek

A kísérlet 0., 1., 2., 3., és 7. napján történt a víz és a nedves levélminták begyűjtése az akváriumokból a Cry1Ab-toxin koncentráció időbeni változásának vizsgálatához és az ökotoxikológiai tesztekhez.

A 0. napon (a kísérlet beállítását megelőzően) a *MON 810*-es és a *DAS 59122-7*-es kukorica fajták és közel izogenikus vonalaik száraz leveleiből 1000 mg-ot mértünk ki analitikai mérleg használatával úgy, hogy előtte 2 db levélhegyből átlagmintát készítettünk. Ebből 500 mg került az akváriumokba, a másik 500 mg száraz állapotban került fagyasztásra. A Dunából és a Velencei-tóból származó vízmintákból pedig 100-100 ml vizet különítettünk el analitikai vizsgálatra.

A többi mintavételi napon minden akváriumból 100-100 mg nedves levélmintát gyűjtöttünk Eppendorf-csővekbe, amelyeket ezt követően, az immunanalitikai vizsgálatig fagyasztva tároltunk, valamint 100-100 ml vízmintát különítettünk el az ökotoxikológiai tesztekhez. Ezeket a mintákat is fagyasztóban tároltuk. Minden mintavétel alkalmával további 50-50 ml vízmintát vettünk ki a *MON 810*-es és a közel izogenikus kukoricalevelet tartalmazó akváriumból, a vízbe beoldódott toxin mennyiségi meghatározásához. A vízben lévő toxin koncentráció megállapításához a vízmintákat liofilizáltuk, ez alól kivételt képeznek a 48. órában levett vízminták, ugyanis azokat technikai problémák miatt nem sikerült az említett módszerrel tartósítani. A liofilizálás (fagyasztva szárítás) olyan tartósítási eljárás, amely során a tartósítani kívánt anyag víz, illetve jég tartalmát szublimáció során távolítjuk el (BEKE 2002). Az eljárás lehetővé teszi a mintákban található toxin koncentráció töményítését, ezzel megkönnyítve a kimutathatóságot.

3.3. A minták immunanalitikai és ökotoxikológiai vizsgálata

3.3.1. A toxinmennyiség meghatározása ELISA módszerrel

A *MON 810*-es kukorica által termelt Cry1Ab-toxin koncentráció változásainak vizsgálatához a vízmintákban, illetve a nedves levélmintákban a toxin mennyiségét ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) módszerrel határoztuk meg a *MON 810*-es *Bt*-kukorica és közel izogenikus vonala esetében. Az ELISA módszert leginkább tendenciák vizsgálatára, illetve összehasonlításra érdemes használni. Mivel mi két ökológiai rendszeren belüli folyamatot kívántunk vizsgálni és összehasonlítani, a magunk számára alkalmasnak ítéltük ezt a módszert.

A vizsgált toxin a *MON 810*-es kukorica esetében a Cry1Ab-toxin volt. A Cry1Ab méréseket az Abraxis cég által gyártott kitekkel (Abraxis Bt-Cry1Ab/Cry1Ac kit, Abraxis, Warminster, PA, USA) végeztük el, a cég által mellékelt protokoll alapján. A toxin mennyiség meghatározáshoz a cégek által érzékenyített, 96-üreges polisztirol mikrotálcát használtunk fel. A *DAS 59122-7* esetében a Cry34/35Ab1-toxintartalmat nem tudtuk meghatározni, mivel nem állt

rendelkezésünkre a toxin mennyiségi meghatározására alkalmas ELISA rendszer, ezért ebben az esetben irodalmi adatokra támaszkodtunk.

A vízmintákban lévő Cry1Ab-toxin koncentráció az ELISA rendszerek kimutatási határa alá esett, ezért meghatározásához a mintákat előzetesen fagyasztva szárítással koncentráltuk. A begyűjtött 50 ml térfogatú vízmintákat liofilizáltuk, majd a száraz liofilizátumokhoz Eppendorf csőben 1 ml extrakciós puffert adagoltunk és vortex keverővel alaposan összekevertük. Az így nyert szuszpenziót centrifugáltuk 1200 fordulat/ perc sebességgel 10 percig MLW TH21 típusú eppendorfcentrifugával. A felülúszóból határoztuk meg a toxintartalmat. A mátrixhatás kiküszöbölésére a 0. napos, még „üres” vízmintát is alávetettük a fenti minta előkészítési eljárásnak, és az abban mért „vak érték”-kel korrigáltunk az értékelés során.

A nedves levélminták esetében a vizsgálat a cég által forgalmazott, illetve előírt extrakciós pufferrel történő extrakcióval kezdődött. A nedves levélmintákat analitikai mérlegen lemértük, majd a tömeghez viszonyítva adtuk hozzá a mintákhoz az előírt mennyiségű extrakciós puffert. A levelekből a toxint dörzsöléssel vontuk ki, dörzsmozsárban a levelek és a puffer homogén szuszpenzióját állítottuk elő, amelyet Eppendorf-csövekbe helyeztünk. Az Eppendorf-csövekben a mintákat ezután 10 percig centrifugáltuk 1200 fordulat/percen MLW TH21 típusú centrifugában. A centrifugálás után a felülúszót pipetta segítségével tiszta Eppendorf-csövekbe helyeztük át.

A minták előkészítését követően elkészítettük a megfelelő hígításokat, a vízminták esetében 10x-es, 100x-os hígítások, míg a nedves levelek esetében 100x-os és 1000x-es hígításokat alkalmaztunk. A mintákat és standardeként 100 µl mennyiségben, 2 ismétlésben vittük fel a 96-üreges mikrotálcára. A továbbiakban a cégek által leírt módszer szerint végeztük a meghatározást.

A Cry1Ab-toxin meghatározását az Abraxis cég által forgalmazott Cry1Ab/Cry1Ac Kit-tel végeztük el a mellékelt leírás alapján (Abraxis LLC 2005). Miután felvittük a szükséges mintákat a mikrotálcára, a lemezt letakartuk, hogy elkerüljük a párolgást, illetve a minták szennyeződését. A mintákat 20-30 másodpercen keresztül finom, körkörös mozdulatokkal asztali keverőgép segítségével kevertük össze, ezt követően a mikrotálcát szobahőmérsékleten inkubáltuk 30 percen keresztül. Az inkubációt követően, a fedőt óvatosan eltávolítottuk és a tálca üregeinek tartalmát kiöntöttük. Ezt követően a mikrotálcát 1:5 arányban desztillált vízzel hígított mosó pufferrel háromszor átmostuk. A felesleges nedvességet papír törölkendővel távolítottuk el. A mosási szakaszt követően minden üregbe 100 µl Cry1Ab/Cry1Ac antitest oldatot juttattunk. A mikrotálcát ismét 20-30 másodpercig ráztuk asztali keverőgép segítségével, finom körkörös mozdulatokkal és 30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezt követően egy újabb mosási szakasz következett az előbb ismertetett mosási folyamatnak megfelelően. Ezután minden üregbe 100 µl enzimkonjugátumot juttattunk pipetta segítségével. A tálcát ismét 20-30 másodpercig finoman ráztuk, majd 30 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd ismét egy mosási folyamat

következett. Ezt követően történt a 100 µl szubsztrát oldat üregekbe pipettázása, majd 20 percig inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten. A tálcát 20-30 másodpercig ismét finom mozdulatokkal ráztuk asztali keverőgép segítségével. Végül 50 µl stopreagenst adunk minden egyes mintához, ez a lépés sárga színreakciót eredményez, 15 perc elteltével. Az analitikai jel (szín) intenzitását mindkét toxin esetében 450 nm hullámhosszon Labsystem iEMS Reader MF típusú mikrotitráló lemezt leolvasó spektrofotométer használatával határoztuk meg.

A természetes vizekből adódó mátrixhatás meghatározásához a Dunából, illetve a Velencei-tóból származó vízmintákat mesterségesen toxinnal szennyeztük. 50 ml Duna és Velencei-tó vízmintához, illetve 50 ml desztillált vízhez 50 µL kiindulási levél extraktumot adtunk, tehát a spikolás a kiindulási levélben megtalálható Cry1Ab-toxin mennyiségével történt. Az elszennyezett mintákból ezt követően desztillált vízzel 10x és 100x hígításokat készítettünk. A spikolást elvégeztük a liofilizálás előtt és után is, azért, hogy meghatározható legyen a minta előkészítés hatása a visszanyerhető toxin tartalom kimutatására.

3.3.2. Ökotoxikológiai vizsgálatok

A vizsgált toxinok akut és krónikus toxicitásának meghatározása ökotoxikológiai tesztekkel történt. A vizsgálatokat kétféle teszt szervezeten végeztük el, nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) és egyiptomi csípőszúnyog lárvákon (*Aedes aegypti*). A két választott tesztállat jó indikátor faj, ezért a vízbe került növényi részek által kiváltott hatások jelzésére megbízhatóan alkalmazhatóak. A *Daphnia* fajok nagyon érzékenyek a vízminőség romlására. A vizsgálatokat a Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet Ökotoxikológiai Osztályán végeztük el.

Mortalitás vizsgálata egyiptomi csípőszúnyog (*Aedes aegypti*) lárvákon

A csípőszúnyog (*Diptera, Culicidae*) tenyésztünk az Országos Epidemiológiai Központból származik. Az állatok tartása 26-28°C-on és napi 16 órás megvilágítás mellett, erre a célra kifejlesztett ketrecekben történt. A nőtény imágók vért szívnak, ezért etetésük során fehér egereket helyeztünk el a ketrecekben. A nőtény egyedek csak vérszívást követően képesek fertilis tojásokat lerakni (FEKETE 2005). A hím imágók a természetben növényi nedveket fogyasztanak ezért cukoroldatba áztatott vattát biztosítottunk a számukra. A szaporítás során a ketrecekben található vizes tálkákba szűrőpapírhengereket helyeztünk el, amelyekre a nőtény imágók le tudták rakni a tojásaikat. A hengereket ezt követően eltávolítottuk, majd 24 órán keresztül szárítottuk, amelyre azért volt szükség, hogy az embrionális fejlődés befejeződhessen. A kiszáritott hengereket ezután befőttes üvegbe tettük, amelybe előzetesen egy telített sóoldatot tartalmazó tálkát helyeztünk el. A telített sóoldat folyamatos párolgása biztosítja, hogy a hengerek ne száradjanak ki, illetve ne penészedjenek be. A teszt során a csípőszúnyog lárvákat klórmentes csapvízben tartottuk és száraz,

őrölt szójamentes rágsáló táppal (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Germany) etették. A lárvák kedvező körülmények között 7-9 nap alatt bábbá, majd további 2 nap elteltével imágóvá fejlődnek (FEKETE 2005).

A csípőszúnyog lárvákon elvégzett etetési tesztet a WHO (WHO 2007) ajánlás alapján végeztük el, viszont pár részletben eltértünk az ajánlásban leírtaktól. A teszt során a lárvák az L₃-as lárv stádiumban voltak. A teszt során üvegből készült faeces poharakba helyeztük el a vizsgált vízmintát, a vizsgált nedves levélmintát és a véletlenszerűen kiválasztott egyedeket. A WHO ajánlástól eltérően a teszt közegeként nem csapvizet vagy mesterségesen előállított vizet használtunk fel, hanem az akváriumokból származó vízmintákat, azért, hogy a levelekből esetlegesen a vízbe került toxin hatását is vizsgálni tudjuk. Etető anyagként nem toxintartalmú szuszpenziót, hanem az akváriumokból származó nedves levél törmelékét használtunk. A levél törmelék vízben oldódó komponensei topikálisan, a lárvák kültakaróján keresztül felszívódva fejthetik ki hatásukat, míg a vízben nem oldódó összetevőkkel a lárvák a szerves törmelék elfogyasztása során (*per os*) során kerülnek kapcsolatba (ZÖLDI et al., 2005). Minden edénybe 8 db csípőszúnyog lárvát, 10 ml vízmintát és megközelítőleg egyforma mennyiségű nedves levél törmelékét helyeztünk. Az összes vízminta esetében a vizsgálatot 4 ismétlésben végeztük el. Kontroll csoportnak a közel izogenikus vonalak víz- és nedves levélmintáit tekintettük. Az elvégzett teszt egy 24 órás akut teszt, ahol a vizsgált végpont a mortalitás volt, tehát 24 és 48 óra elteltével meghatároztuk az elpusztult egyedek számát minden egyes pohárban.

Mobilitásgátlás vizsgálata nagy vízibolhán (*Daphnia magna*)

A *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) tenyészet tartása az MSZ EN ISO 6341 szabvány alapján 22°C-on és napi 16 órás megvilágítás mellett történt. Az egyedeket *Daphnia*-oldatnak nevezett oldatban tartottuk, amely különböző sók (MgSO₄, KCl, NaHCO₃ és CaCl₂) eltérő koncentrációjú oldataiból és desztillált vízből áll. Az etetés zöldalgával (*Pseudokirchneriella subcapitata*) történt. Az algatenyészet fenntartásához az MSZ EN 28692 szabvány alapján előírt tápoldatot használtuk, illetve napi 16 óra megvilágítást és folyamatos levegőztetést biztosítottunk. A tenyészetből az anyaállatokat kisméretű *Daphnia*-oldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokba helyeztük, minden lombikba 2-3 egyed került. Az anyaállatok kiválasztása szabad szemmel történt az alapján, hogy mennyi tojás figyelhető meg a költőtasakban. A kikelt utódokat elkülönítettük, majd 24 órán belül felhasználtuk a vizsgálatokhoz.

A nagy vízibolhán végzett immobilizációs vizsgálatot az MSZ EN ISO 6341 szabvány elvei alapján végeztük. A teszt során használt egyedek életkora nem haladta meg a 24 órát. A *Daphnia*-tenyészet érzékenységét előzetesen kálium-dikromát (K₂Cr₂O₇) oldattal határoztuk meg. A teszt alapján a tenyészet kevésbé érzékenynek bizonyult, mivel a LC₅₀ (24 h, 48 h értékkel korrigált)

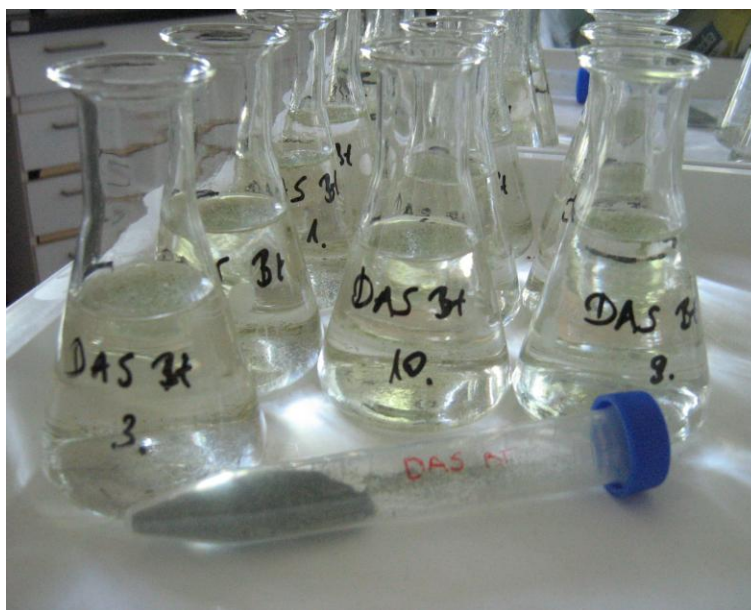
érték nem az elvárt 0,6 és 1,7 mg/l közé esett. Az általunk számított LC_{50} érték 2,06 mg/l volt ami a vízminták vizsgálata során kapott eredmények különböző irodalmi adatokkal való összehasonlítása során nem hagyható figyelmen kívül.

A tényleges vizsgálat során üvegből készült faeces poharakba helyeztük el a vizsgált vízmintát és a véletlenszerűen kiválasztott egyedeket. A szabványtól eltérően a teszt közegeként nem a meghatározott sóoldatot használtunk fel, hanem az akváriumokból származó vízmintákat. Minden faeces pohárba 10 db vízibolhát és 10 ml vízmintát helyeztünk, a kontroll csoport esetében 10 ml *Daphnia*-oldatba kerültek a vizsgált egyedek. Az összes minta esetében 4 ismétlésben végeztük el a vizsgálatot. A kísérlet során az állatokat a szabvány előírásainak megfelelően nem etettük és az edényeket $20 \pm 2^\circ\text{C}$ körüli hőmérsékleten tartottuk. Kontroll csoportnak a közel izogenikus vonalak vízmintáit, illetve az elkészített *Daphnia*-oldatot tekintettük. Tehát a transzgenikus levelet tartalmazó akváriumokból származó mintákat a közel izogenikus levelet tartalmazó akváriumból származó vízmintákhoz hasonlítottuk. Az elvégzett teszt egy 48 órás akut teszt, ahol a vizsgált végpontja az immobilizáció volt, tehát 24 és 48 óra elteltével meghatároztuk a mozgásképes egyedek számát minden egyes pohárban.

A reprodukcióra gyakorolt hatás vizsgálata nagy vízi bolhán (*Daphnia magna*)

A vizsgálat megkezdése előtt az anyaállatokat a tenyészetből kisméretű, *Daphnia*-oldatot tartalmazó Erlenmeyer lombikokba helyeztük, minden lombikba 2-3 egyed került, az anyaállatok kiválasztása szabad szemmel történt az alapján, hogy mennyi tojás figyelhető meg a költőtasakban. A kikelt utódokat elkülönítettük, majd 24 órán belül felhasználtuk a vizsgálatokhoz. A toxin reprodukcióra gyakorolt hatásának nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) végzett vizsgálatát az MSZ ISO 10706 szabvány elvei alapján végeztük. A teszt során használt egyedek életkora nem haladta meg a 24 órát. A vizsgálat során a MON 810 és a DAS 59122-7 kukoricafajták és közel izogenikus vonalaik leveleiben található toxin reprodukcióra gyakorolt hatását vizsgáltuk a *Daphnia magna* esetében a fent bemutatott kísérleti rendszertől függetlenül, a vizsgált levelek ugyanis nem kiszáradt tarlómaradványok, hanem még zölden begyűjtött és kiszáritott levelek voltak. Az előzetesen ledarált levélörlemény 250 μm -nél kisebb szemcseméretű frakcióját, az erre a célra megfelelő szitával választottuk el. A vizsgálat során 100 ml-es Erlenmeyer lombikokba 60 ml *Daphnia*-oldatot töltöttünk, majd ezt követően minden lombikba véletlenszerűen 1 db vízibolhát helyeztünk. Az összes kukorica fajta (Bt-kukorica és közel izogenikus vonalaik) és a kontroll (levélörleményt nem tartalmazó *Daphnia*-oldat) csoport esetében is 10 ismétlésben végeztük el a vizsgálatot (4. kép). A teszt szervezete a táplálék útján és topikálisan kerültek kapcsolatba a vizsgált anyaggal. A kontroll csoport táplálása algával történt (*Pseudokirchneriella subcapitata*), míg a kezelt csoportok

etetéséhez a különböző kukorica vonalak leveléből előállított leszítált kb. 4-5 mg levélörleményt használtuk. Az etetésre kb. 3-4 naponta, illetve a teszt közeg cseréjét követően minden esetben sor került. A teszt közegét hetente kicseréltük. Az elvégzett teszt egy 21 napos krónikus teszt, ahol a vizsgált anyag reprodukcióra gyakorolt hatásait elemeztük. A vizsgálat során megfigyelt végpontok az anya egyedek mortalitása, illetve a született fiatal egyedek száma volt, amelyeket heti háromszor rögzítettünk.



4. kép: A DAS 59122-7 transzgenikus kukorica fajta reprodukcióra gyakorolt hatásának vizsgálata *Daphnia magna* tesztszervezeten.

3.4. Az adatok számítása, értékelése

Adatainkból a Microsoft Excel programmal táblázatokat és grafikonokat készítettünk. Az ELISA módszer során a különböző minták esetében az Ascent Software for iEMS version 2,4 program által meghatározott optikai denzitás értékeket a Microsoft Excel program segítségével értékeltük ki. A lemezre felvitt standard koncentrációk átlag optikai denzitását ábrázolva az adatokra egyenest (kalibráló egyenes) illesztettünk. A különböző mintákban a toxin koncentrációját az egyenes egyenlete alapján számoltuk ki.

Az ökotoxikológiai tesztek esetében is táblázatokat készítettünk, amelyekben a vizsgálatok különböző napjain csoportonként feltüntettük a túlélő egyedek számát, a mortalitást, a túlélés %-os értékét, illetve a reprodukciós teszt esetében a csoportonkénti átlagos egyed és utód számokat mind a két kukorica fajta esetében. Az eredményeket grafikonokon ábrázoltuk és statisztikailag kiértékeltek.

3.5. Az adatok statisztikai elemzése

Az eredmények statisztikai kiértékeléséhez a StatSoft Inc. Statistica v.6 szoftverét és a Microsoft Excel programot használtuk.

A nedves levélmintákban kimutatott Cry1Ab-toxin koncentráció értékek időbeni csökkenését, tehát az eltelt idő és a kapott koncentráció értékek közötti összefüggést lineáris regresszióval értékeltük ki a Microsoft Excel program alkalmazásával, az adatok logaritmikus transzformálását követően.

A reprodukciós vizsgálat során a különböző kukoricafajták levelével történő etetés hatását vizsgáltuk az anyák túlélésére, illetve az utódok számára vonatkozóan. A kezelés hatását a vizsgálat három napján (12., 16. és 21. nap) értékeltük ki az utódok és az anyák esetében is. A kezelések hatásának meghatározásához egytényezős variancia-analízist (One-way ANOVA) végeztünk 5%-os szignifikancia szinten. Az ANOVA egyik feltétele az adatok normalitása, ennek ellenére az anyák számának statisztikai kiértékelése során nem végeztük el a normalitás vizsgálatot, mivel az anyák száma minden esetben csak két értéket vehet fel (1-még élt az anya, 0-már nem élt az anya az adott lombikban). A normalitás vizsgálatot elvégeztük a kiindulási adatokon és a reziduumokon is Saphiro-Wilk teszttel (5%-os szignifikancia szinten) és Q-Q plot-on történő ábrázolással is. A különböző napokon a kezelési és kontroll csoportokat ANOVA és *post-hoc* tesztek elvégzésével, 5%-os szignifikancia szinten hasonlítottuk össze. A csoportok összehasonlításánál *post-hoc* tesztként nagyrészt a Tukey-próbát alkalmaztuk, viszont azokban az esetekben ahol a normalitás feltételezhetően a kis ismétlés szám miatt nem teljesült Newman-Keuls próbát végeztünk el (KEMÉNY et al., 2004). Az anyák esetében elvégeztünk egy túlélési vizsgálatot, a Kaplan-Meier elemzést is, amely elvégzésével kiértékelhettük a kezelés anyák túlélésére gyakorolt hatását és a csoportok összehasonlítását az összes leolvasott eredmény alapján, a vizsgálat teljes idejére vonatkoztatva.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. A levél-, illetve a Dunából és a Velencei-tóból származó vízminták toxintartalma a *MON 810-es Bt-kukorica* esetében

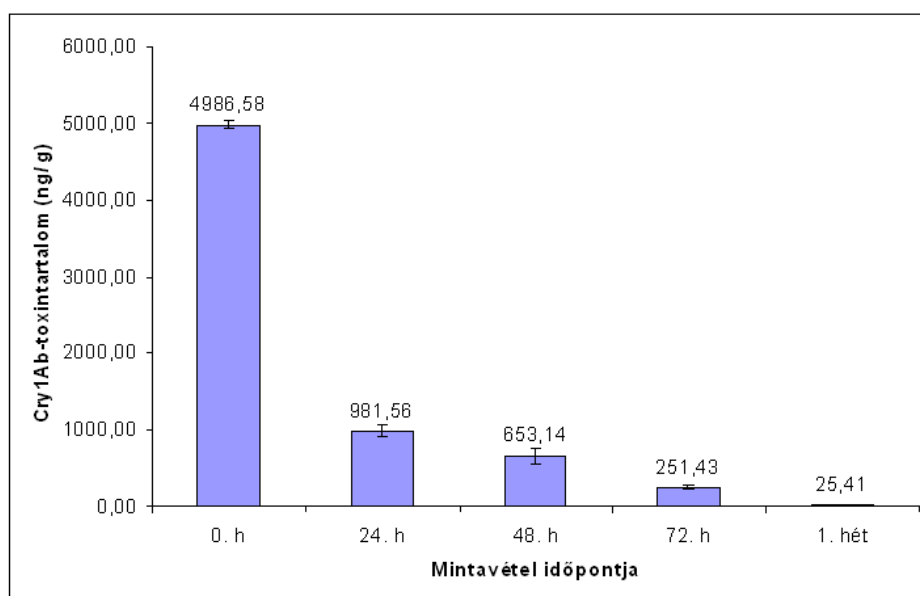
4.1.1 Cry1Ab-toxintartalom a *MON 810-es* kukorica és közel izogénikus vonalának levél- és vízmintáiban a Velencei-tó esetében

A *MON 810-es* kukorica levélmintáiban meghatároztuk a kiindulási Cry1Ab-toxintartalmat az akváriumokba helyezés előtt, azért, hogy meghatározható legyen a különböző mintavételi időpontokban a levelek toxintartalmának változása és a vízbe beoldódott toxin mennyisége. A *MON 810-es* kukorica közel izogénikus vonalában a Cry1Ab-toxin tartalom nem volt kimutatható. A transzgenikus kukorica esetében a toxintartalom 4986,58 ng/g volt.

A vízminták Cry1Ab-toxintartalma a kimutatási határ alatt volt mind a *MON 810-es*, mind a közel izogénikus kukorica esetében. A kimutatási határ a vízminták esetében 0,20 ng/ml volt. A különböző mintavételi időpontokból származó nedves levélminták Cry1Ab-toxintartalmának meghatározása során a kimutatási határ 13,87 ng/g volt.

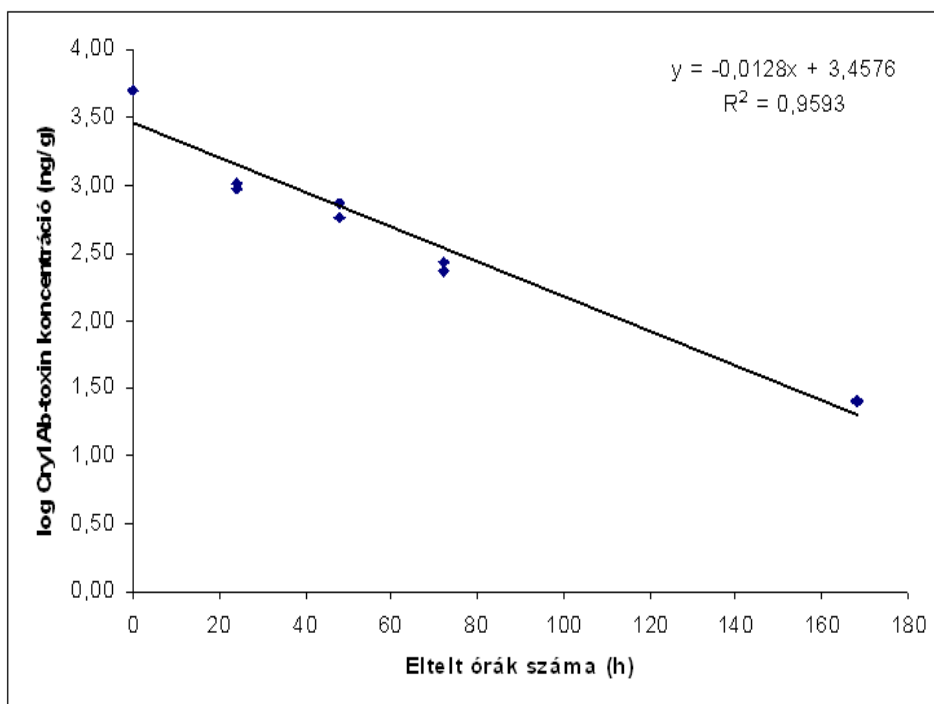
A közel izogénikus vonal levélmintáiban nem volt kimutatható a Cry1Ab-toxin jelenléte, de ez nem meglepő, mivel a közel izogénikus levelében az akváriumba helyezés előtt sem volt kimutatható Cry1Ab-toxin.

A transzgenikus levélminták esetében a toxintartalom csökkenő mennyisége figyelhető meg. 24 óra elteltével, a toxin jelentős mennyisége kioldódott, a kioldódás mértéke ezt követően sokkal kisebb volt a többi napon (1. ábra).



1. ábra: Cry1Ab-toxin tartalom a *MON 810-es* transzgenikus kukorica levélmintáiban a Velencei-tó esetében

1 hét elteltével a kimutatott toxin mennyiség megközelíti a kimutatási határt viszont a mérési határ alatt ($MH=33,69$ ng/g) volt, tehát 1 hét elteltével az ELISA módszerrel csak a toxin jelenléte bizonyítható, a kapott koncentráció érték nem tekinthető pontos értéknek. A Cry1Ab-toxin koncentráció értékek időbeni csökkenését, tehát az eltelt idő és a kapott koncentráció értékek közötti összefüggést lineáris regresszióval értékeltük ki, az adatok logaritmikus transzformálását követően. A lineáris regresszió elvégzésével igazolható az eltelt idő és a csökkenő koncentráció értékek közötti összefüggést ($p=0,00000076$, $R^2=0,9593$) (2. ábra).



2. ábra: Lineáris regresszió a *MON 810*-es transzgénikus kukorica levélmintáiban meghatározott Cry1Ab-toxin értékekre a Velencei-tó esetében

4.1.2 Cry1Ab-toxintartalom a *MON 810*-es és közel izogénikus vonalának levél- és vízmintáiban a Duna esetében

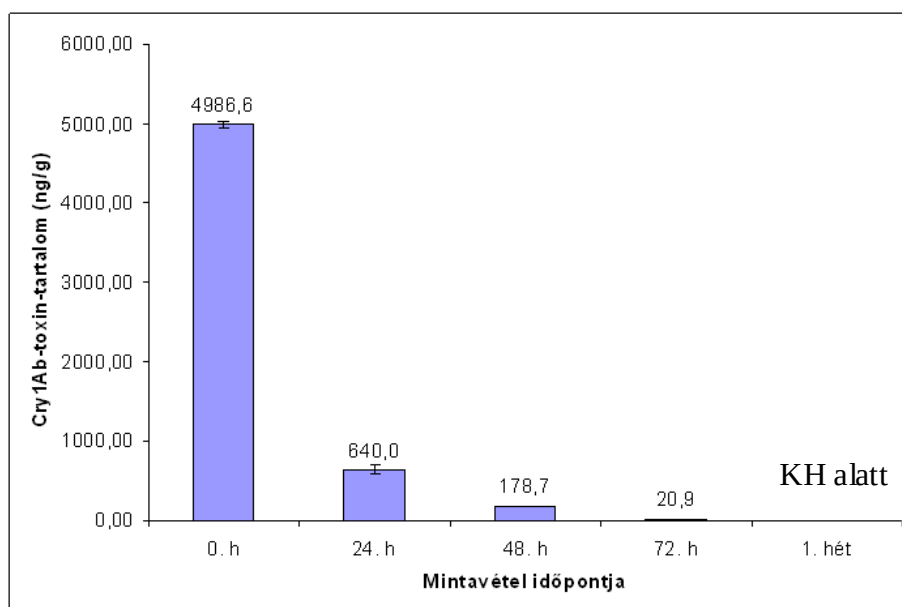
A *MON 810*-es és a közel izogénikus kukorica levélmintáiban meghatároztuk a kiindulási Cry1Ab-toxintartalmat az akváriumokba helyezés előtt, azért, hogy meghatározható legyen a különböző mintavételi időpontokban a levelek toxin tartalmának változása és a vízbe beoldódott toxin mennyisége. A *MON 810*-es kukoricavonal közel izogénikus vonalában Cry1Ab-toxintartalom nem volt kimutatható. A transzgénikus kukorica esetében a toxin tartalom 4986,58 ng/g volt.

A Velencei-tóhoz hasonlóan a Duna esetében is kijelenthető, hogy az összes vízminta Cry1Ab-toxintartalma a kimutatási határ alatt volt a *MON 810*-es és a közel izogénikus vonala

esetében. A kimutatási határ a vízminták esetében 0,20 ng/ml volt. A különböző mintavételi időpontokból származó nedves levélminták Cry1Ab-toxintartalmának meghatározása során a kimutatási határ 13,87 ng/g volt.

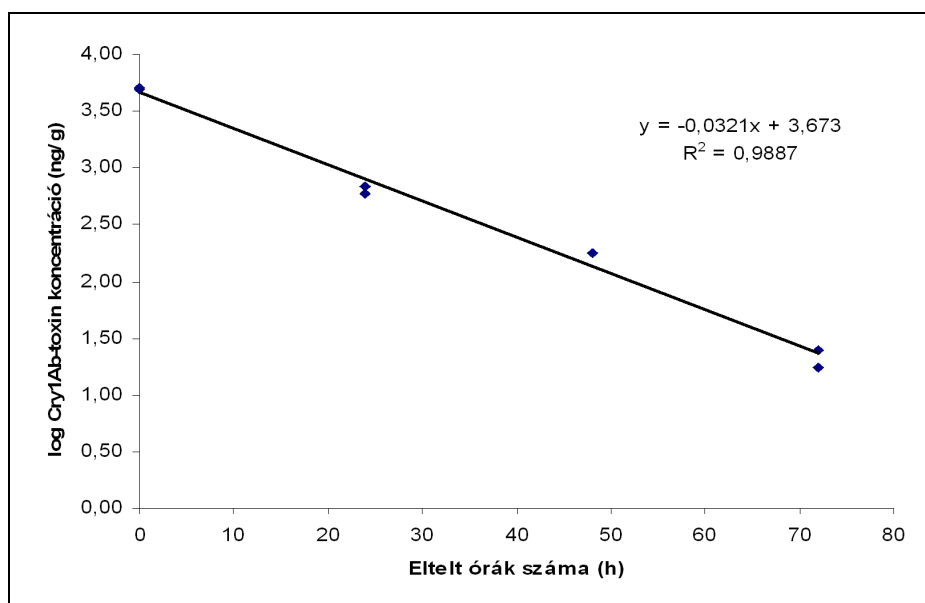
A közel izogenikus vonal levélmintáiban nem volt kimutatható a Cry1Ab-toxin jelenléte a Duna esetében sem, de ez nem meglepő, mivel a közel izogenikus kukoricalevelében az akváriumba helyezés előtt sem volt kimutatható Cry1Ab-toxin.

A transzgenikus kukorica levélmintáinak esetében a toxintartalom csökkenő mennyisége figyelhető meg 24 óra elteltével, a toxin jelentős mennyisége kioldódott, a kioldódás mértéke ezt követően sokkal kisebb volt a többi napon (3. ábra). 72 óra elteltével a kimutatott toxinmennyiség megközelíti a kimutatási határt viszont a mérési határ alatt (MH=33,69 ng/g) volt, tehát 72 óra elteltével az ELISA módszerrel csak a toxin jelenléte bizonyítható, a kapott koncentráció érték nem tekinthető pontos értéknek. 1 hét elteltével a toxin jelenléte nem volt kimutatható a levélmintákban.



3. ábra: Cry1 Ab-toxin tartalom a *MON 810*-es transzgenikus kukorica levélmintáiban a Duna esetében

A Cry1Ab-toxin koncentráció értékek időbeni csökkenését, tehát az eltelt idő és a kapott koncentráció értékek közötti összefüggést lineáris regresszióval értékeltük ki, az adatok logaritmikus transzformálását követően. A lineáris regresszió elvégzésével igazoltuk az eltelt idő és a csökkenő koncentráció értékek közötti összefüggést ($p=0,0000005$, $R^2=0,9887$) (4. ábra).



4. ábra: Lineáris regresszió a *MON 810*-es transzgenikus kukorica levélmintáiban meghatározott Cry1Ab-toxin értékekre a Duna esetében

4.2. A mátrixhatás vizsgálatának eredményei

A természetes vizekből adódó mátrixhatás meghatározásához a Dunából, illetve a Velencei-tóból származó vízmintákat mesterségesen a kiindulási levélben megtalálható Cry1Ab-toxin mennyiségével szennyeztük a liofilizálás előtt és után. A liofilizált vízmintákhoz hozzáadott toxin mennyiséget a Velencei-tó esetében nagyobb mennyiségben, 98,7%-ban sikerült visszanyerni, a Dunából származó vízmintából a mesterséges elszennyezéshez használt toxin mennyiség 74,6%-át sikerült kimutatni a meghatározást követően. A liofilizálás előtt elvégzett mesterséges elszennyezés esetében a természetes vizekből nem volt visszamérhető a hozzáadott Cry1Ab-toxin mennyiség. A liofilizálás előtt elszennyezett desztillált vízből viszont az előzetesen hozzáadott toxin mennyiség 69,9%-a volt visszamérhető.

4.3. Az ökotoxikológiai tesztek eredményei

4.3.1. Az akut tesztek eredményei

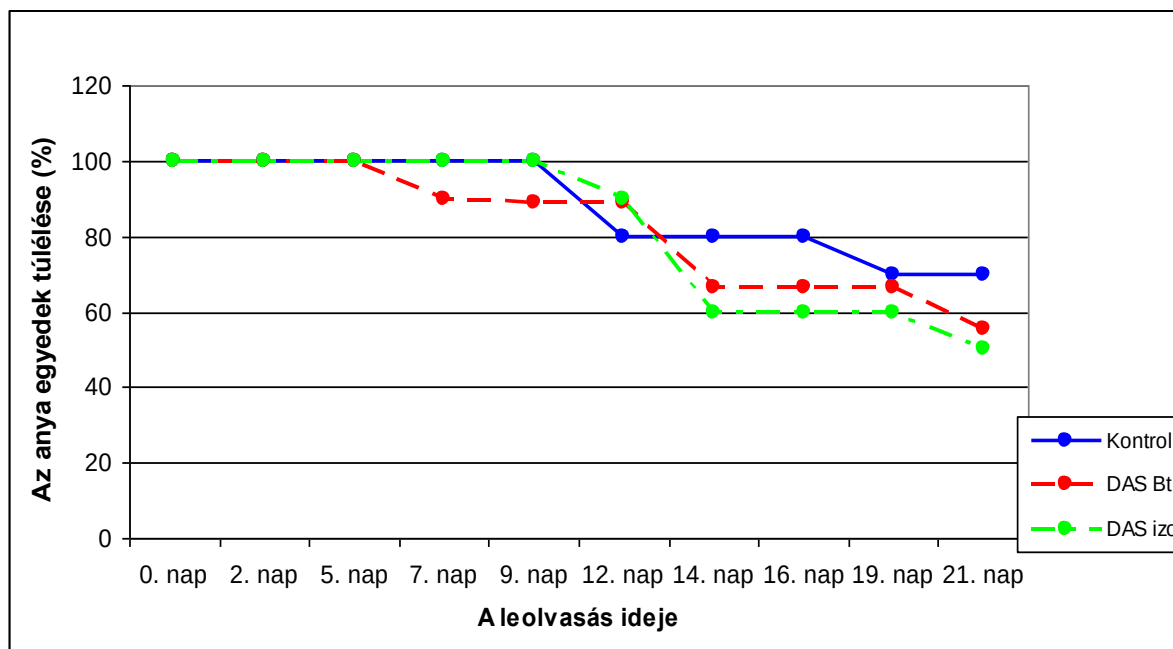
Egyik általunk vizsgált kukoricafajta (*MON 810*, *DAS 59122-7*) esetében sem tudtunk akut toxikus hatást kimutatni. A csípőszúnyog lárvák mortalitásának vizsgálata során egyik kukorica esetében sem volt megfigyelhető az egyedek pusztulása 24, illetve 48 óra elteltével. A nagy vízibolhák mobilitásgátlásának vizsgálata során, egyik kukorica esetében sem volt megfigyelhető az egyedek pusztulása vagy immobilizációja 24, illetve 48 óra elteltével.

4.3.2. A krónikus teszt eredményei

A reprodukciós vizsgálat során a különböző kukoricafajták levélmintáival történő etetés hatását határoztuk meg az anyák túlélésére, illetve az utódok számára vonatkozóan. A krónikus etetési teszt esetében használt *MON 810*-es kukorica Cry1Ab-toxin tartalma 4986,58 ng/g volt. A *DAS 59122-7* kukorica fajta transzgenikus kukorica levelében a toxintartalmat korábban Takács és munkatársai határozták meg (TAKÁCS et al., 2012b) eredményeik alapján a levél lemez Cry34Ab1-toxin tartalma $81,1 \pm 17,7$ ng/mg volt, a Cry35Ab1 tartalom pedig $75,1 \pm 11,9$ ng/mg volt.

A kezelések anyá egyedek túlélésére gyakorolt hatásait 5%-os szignifikancia szinten egytényezős variancia-analízissel (One-way ANOVA), a vizsgálat három különböző napján (12., 16. és 21. nap) hasonlítottuk össze, illetve a kapott eredményeket a Kaplan-Meier elmezés elvégzésével a vizsgálat teljes idejére vonatkoztatva is kiértékeljük.

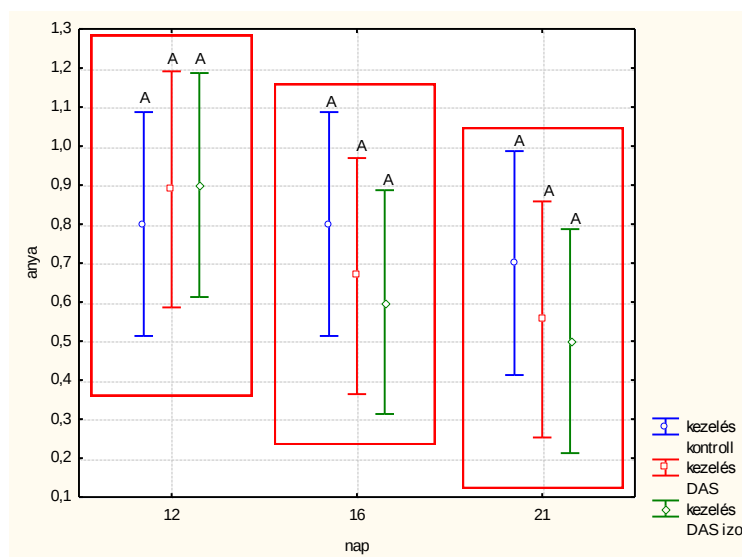
A *DAS 59122-7* kukorica fajta esetében a vizsgálat 9. napjáig nem volt megfigyelhető az anyá egyedek pusztulása a kontroll csoport (levélörlemény nélküli *Daphnia*-oldat), illetve a közel izogenikus vonallal etetett csoport esetében. A transzgenikus kukorica esetében már a vizsgálat 7. napján megfigyelhető volt mortalitás a vizsgált egyedek között (5. ábra). A kísérlet végére a kontroll csoportban volt megfigyelhető a legkisebb mértékű mortalitás, míg az anyá egyedek százalékos túlélése a közel izogenikus vonal esetében volt a legalacsonyabb.



5. ábra: Az anyá egyedek százalékos túlélése a *DAS 59122-7* kukorica esetében

Nem találtunk szignifikáns különbséget a *DAS 59122-7* kukorica és közel izogenikus vonala esetében az anyák túlélésében, mivel a p érték nagyobb, volt 0,05-nél ($p=0,693$). A vizsgálat 12.,

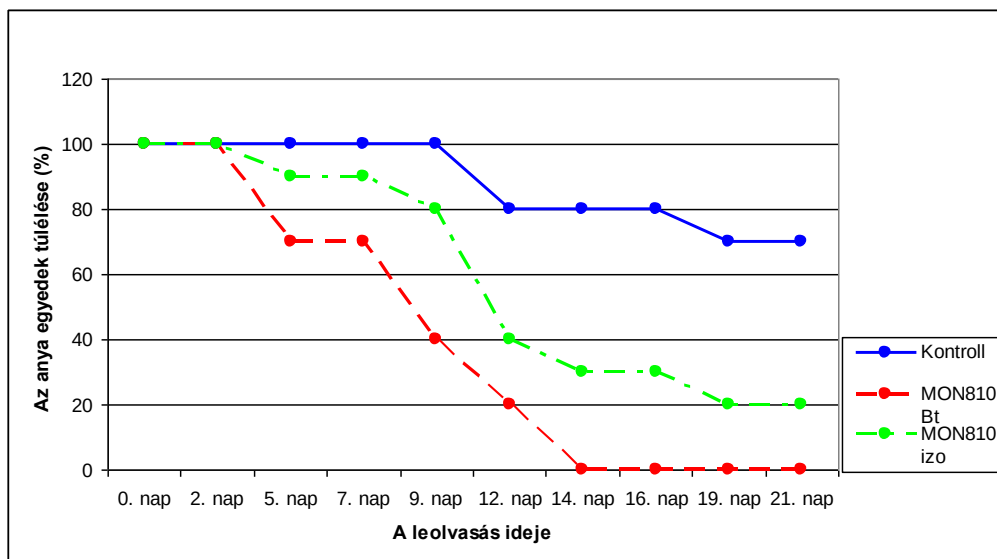
16. és a 21. napján elvégzett összehasonlítás során egyik nap esetében sem volt kimutatható különbség a kezelések között (6. ábra).



6. ábra: A kezelések hatásának összehasonlítása a vizsgálat különböző napjain a DAS 59122-7 esetében

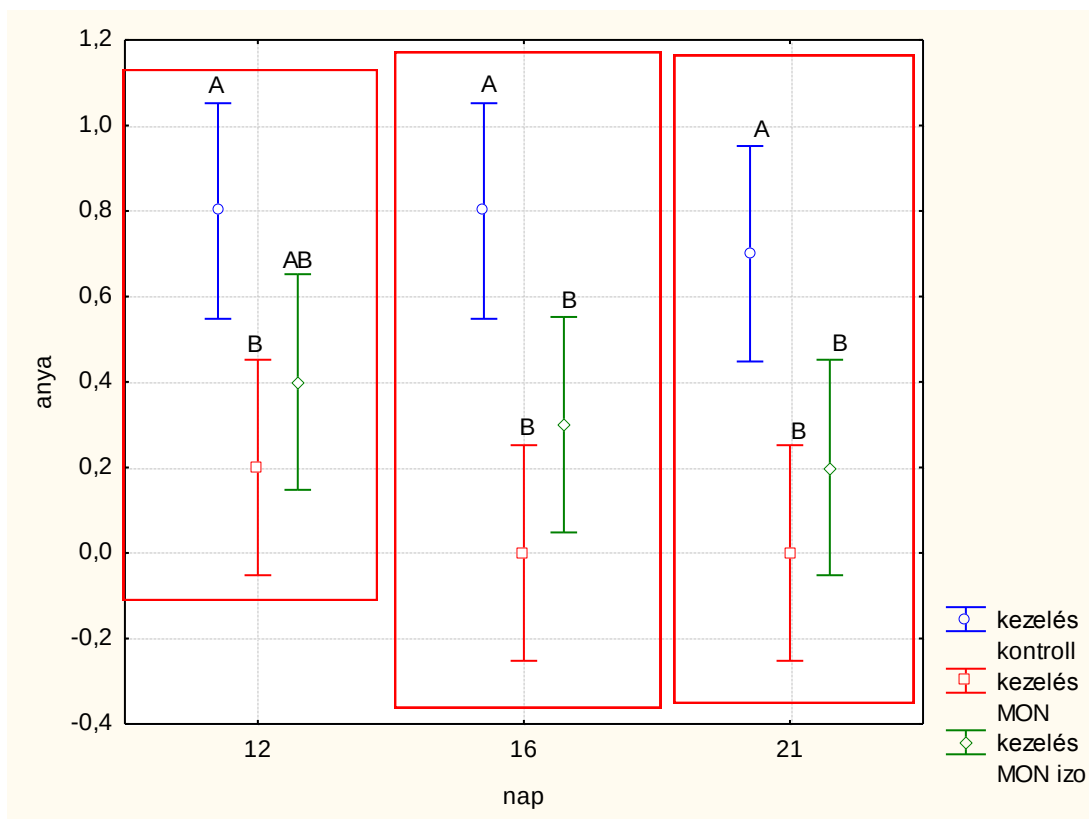
A vizsgálat teljes idejére vonatkozó Kaplan-Meier elemzés elvégzésével sem tudtunk kimutatni szignifikáns különbséget a különböző kezelések anya egyedek túlélésére gyakorolt hatása között.

A MON 810-es kukorica fajta esetében a vizsgálat 9. napjáig nem volt megfigyelhető az anya egyedek pusztulása a kontroll csoport esetében. A transzgenikus és közel izogenikus vonalak esetében viszont már az 5. napon megfigyelhető volt mortalitás a vizsgált egyedek között (7. ábra). A legjelentősebb mortalitás a transzgenikus kukorica esetében volt megfigyelhető, ahol a vizsgálat 14. napjára az összes anya egyed elpusztult. A kísérlet végére a kontroll csoportban volt megfigyelhető a legkisebb mértékű mortalitás.



7. ábra: Az anya egyedek százalékos túlélése a *MON 810*-es kukorica esetében

Szignifikáns különbség mutatkozott a *MON 810*-es kukorica és közel izogénikus vonala esetében az anyák túlélésében, mivel a p érték kisebb, volt 0,05-nél ($p < 0,000001$). A vizsgálat 12., 16. és a 21. napján elvégzett összehasonlítás során a 12. napon statisztikailag igazolható különbséget csak a transzgenikus kukoricával etetett csoport és a kontroll csoport között tudtunk kimutatni (8. ábra).

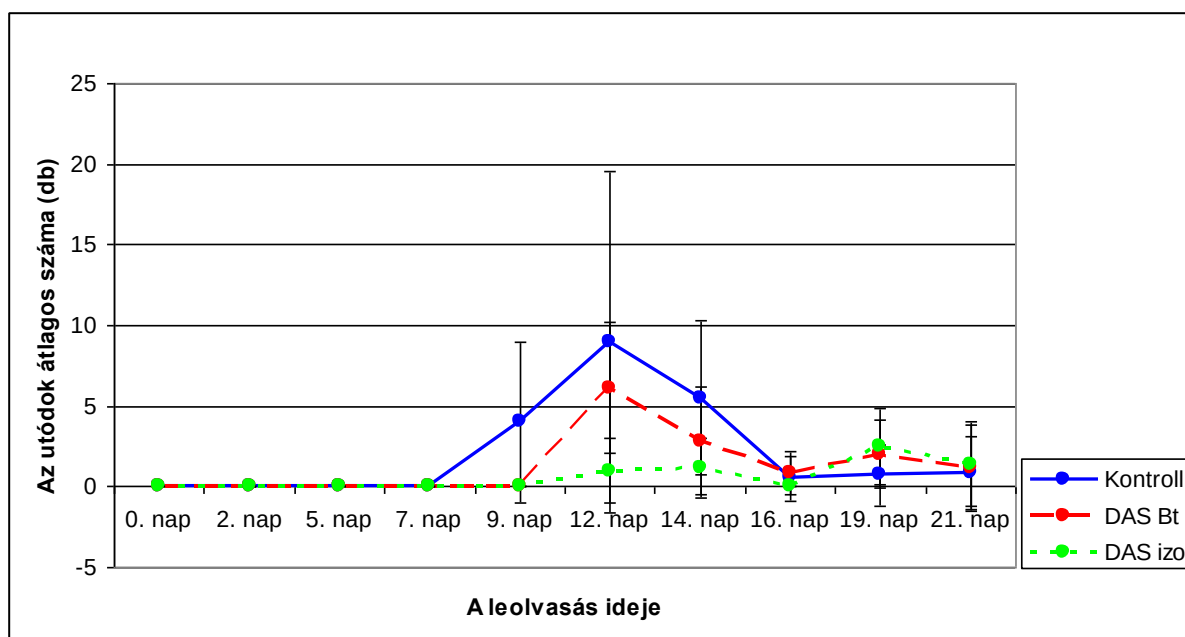


8. ábra: A kezelések hatásának összehasonlítása a vizsgálat különböző napjain a *MON 810* esetében

A 16. és a 21. napon elvégzett összehasonlítás során a kontroll csoport mind a két nap esetében különbözött a különböző kukorica vonallal etetett csoportoktól, a különböző kukorica vonalak hatásai között viszont nem tudtunk statisztikailag igazolható különbséget kimutatni (8. ábra).

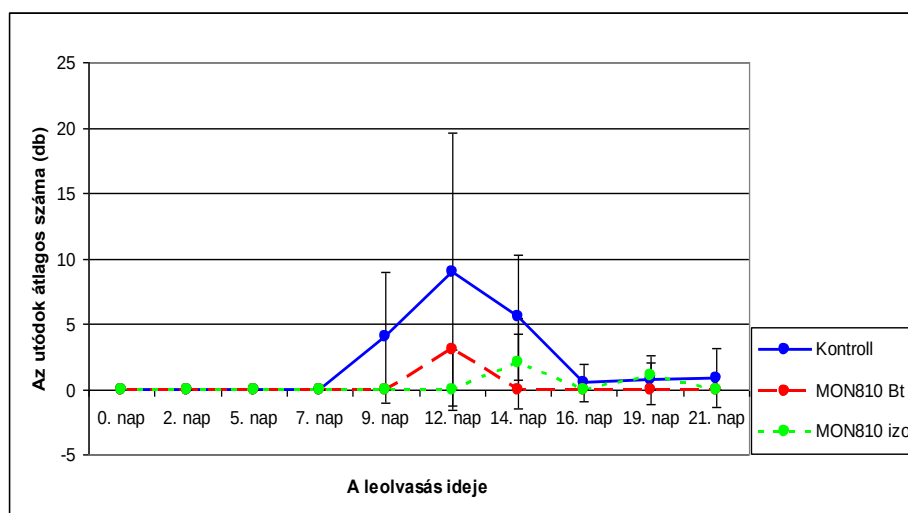
A vizsgálat teljes idejére vonatkozó Kaplan-Meier elemzés elvégzésével szignifikáns különbséget tudtunk kimutatni a kontroll csoport és a különböző kukoricavonalakkal etetett csoportok között, továbbá a *MON 810* és izogénikus vonala esetében is szignifikáns volt a különbség az anya egyedek mortalitása között.

A *DAS 59122-7* kukorica esetében az utódprodukció a kontroll csoportban volt a legjelentősebb, már a 9. napon megfigyelhető volt az anya egyedek reprodukciója. A különböző kukoricavonalak esetében a 12. napig nem volt megfigyelhető az utódok jelenléte (9. ábra). Az átlagos utódszám a közel izogénikus kukorica esetében volt a legalacsonyabb.



9. ábra: Az utódok átlagos száma naponként a *DAS 59122-7* kukorica esetében

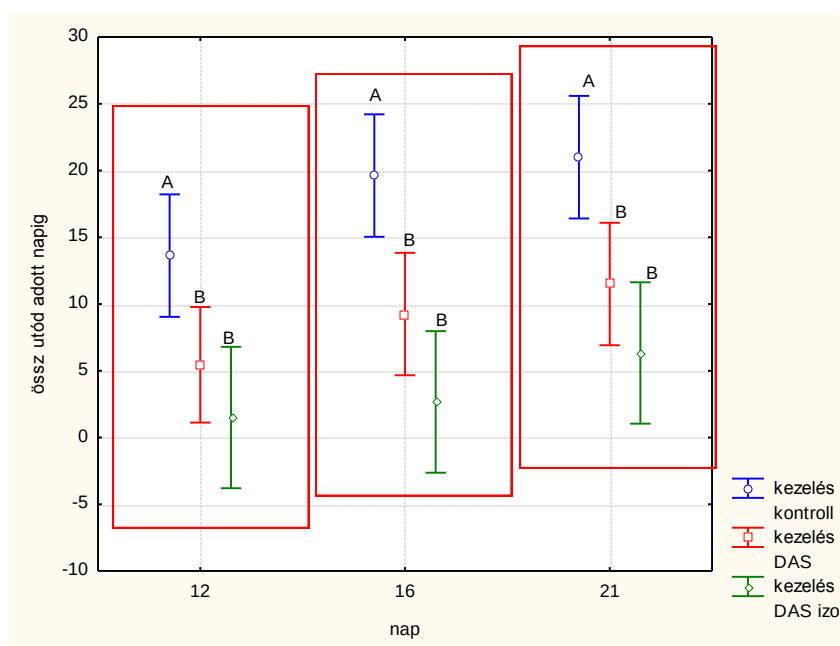
A *MON 810*-es kukorica esetében szintén a kontroll csoportban volt a legjelentősebb és ebben az esetben is a 9. napon jegyeztünk fel először utódprodukciót. A transzgenikus és közel izogénikus vonalak esetében jelentéktelen mennyiségű utód keletkezett, amely az anya egyedek jelentős mértékű mortalitásával magyarázható (10. ábra).



10. ábra: Az utódok átlagos száma naponként a *MON 810*-es kukorica esetében

Az utódprodukcóra gyakorolt hatások statisztikai kiértékelését csak a *DAS 59122-7* kukoricafajta esetében tudtuk elvégezni, mivel a *MON 810*-es kukorica fajtánál az anyák nagymértékű elhullása miatt az utódprodukcó statisztikai értékelésére nem volt lehetőség.

A *DAS 59122-7* kukoricával és közel izogénikus vonalával történő etetés utódprodukcóra gyakorolt hatása statisztikailag igazolható volt, mivel a p érték kisebb 0,05-nél ($p < 0,0001$). A vizsgálat 12., 16. és a 21. napján elvégzett összehasonlítás során mindegyik nap esetében kijelenthető, hogy a kontroll csoport szignifikánsan eltér a különböző kukoricákkal etetett csoportoktól, a különböző kukorica vonalak hatásai között viszont nem tudunk statisztikailag igazolható különbséget kimutatni (11. ábra).



11. ábra: A kezelések hatásának összehasonlítása a vizsgálat különböző napjain a *DAS 59122-7* esetében

Eredményeinket összefoglalva a következőket állapíthatjuk meg:

- A *MON 810*-es kukorica levéltörmelékeit tartalmazó akváriumokból származó vízmintákban sem a Duna, sem a Velencei-tó esetében nem volt kimutatható a Cry1Ab-toxin jelenléte. A különböző akváriumokból származó vízmintákban sem a transzgenikus kukoricafajták, sem közel izogenikus vonalaik esetében sem volt kimutatható a Cry1Ab-toxin jelenléte.
- A *MON 810*-es kukorica közel izogenikus nedves levélmintáiban nem volt kimutatható a Cry1Ab-toxin jelenléte.
- A *MON 810*-es transzgenikus kukoricafajta nedves levélmintáiban mindkét esetben (Duna és Velencei-tó) szignifikánsan csökkent a Cry1Ab-toxin mennyisége, továbbá az eltelt idő és a csökkenő Cry1Ab-toxin mennyiség között igazolható összefüggés van.
- Cry1Ab-toxinnal mesterségesen elszennyezett liofilizált vízmintákból, és a liofilizálás előtt mesterségesen elszennyezett desztillált vízből a toxin visszamérhető volt, a liofilizálás előtt elszennyezett természetes vízmintákból viszont nem.
- A vizsgált kukorica fajták (*MON 810*, *DAS 59122-7*) akut toxikus hatása az általunk vizsgált tesztszervezeteken nem igazolható.
- A *DAS 59122-7* kukoricával és közel izogenikus vonalával történő etetés hatása az anyák mortalitására nem volt eltérő, a különböző kezelések között nem volt statisztikailag igazolható különbség.
- A *MON 810*-es kukoricával és közel izogenikus vonalával történő etetés hatása az anyák mortalitására eltérő volt, a különböző kezelések között statisztikailag szignifikáns különbséget tapasztaltunk.
- Az utódprodukcióra gyakorolt hatások statisztikai kiértékelését a *MON 810*-es kukorica fajtánál nem lehetett elvégezni az anyák nagymértékű elhullása miatt.
- A *DAS 59122-7* kukorica és közel izogenikus vonala esetében szignifikánsan kisebb utódprodukciót tapasztaltunk a kontrollcsoporthoz képest, viszont a különböző kukorica vonalak hatásai között nem tudtunk statisztikailag igazolható különbséget kimutatni.

5. Következtetések és javaslatok

5.1. Következtetések

A MON 810-es és közel izogenikus kukoricalevél-őrleményt tartalmazó akváriumokból származó vízmintákban nem volt kimutatható a Cry1Ab-toxin jelenléte, aminek oka lehet, hogy a vízben lévő toxin erősen kötődik a természetes víz szárazanyag tartalmához, erre utal, hogy a liofilizált vízminták és a liofilizálás előtt mesterségesen elszennyezett desztillált vízből a szennyezéshez felhasznált toxin tartalom visszamérhető volt, míg a liofilizálás előtt elszennyezett természetes vízmintákból nem.

A MON 810-es kukorica közel izogenikus vonalának nedves levélmintáiban nem volt kimutatható a Cry1Ab-toxin jelenléte, ami azt jelenti, hogy a transzgenikus levélminták toxintartalmának mérése során mátrixhatással nem kell számolnunk.

A nagy vízibolha (*Daphnia magna*) és egyiptomi csípőszúnyog (*Aedes aegypti*) lárvák egyedek immobilizációjára, illetve mortalitására az általunk vizsgált kukorica fajták nem voltak hatással, tehát akut vizsgálataink során a Mendelson és munkatársai által elvégzett 48 órás akut Cry1Ab-toxintartalmú kukorica pollen *Daphnia magna* egyedeken történő vizsgálathoz hasonlóan mi sem tudtunk kimutatni akut toxikus hatást. A kapott eredményeink magyarázatánál figyelembe kell venni, azt is, hogy az ökotoxikológiai tesztek közegeként felhasznált különböző akváriumokból származó vízmintákban az általunk használt módszerrel nem tudtuk kimutatni a toxin jelenlétét, feltételezhetően a természetes vizek szárazanyag tartalmához való kötődés miatt. A csípőszúnyog lárvák etetési teszt során a nedves kukorica törmelékkel történő etetésnek sem volt hatása, amely magyarázható azzal, hogy a kétszárnyúak (*Diptera*) rendjébe tartozó csípőszúnyog lárvák nem célszervezetei az általunk vizsgált toxinoknak, így feltételezhetően a toxin nem képes a rovar középbelében található hámsejtek receptoraihoz kötődni (HESZKY 2005b). Korábbi feltételezéseink alapján felállított hipotéziseink egy részét igazoltuk, mivel a MON 810 és DAS 59122-7 Bt-kukorica fajták a *Daphnia magna*, illetve az *Aedes aegypti* lárvák mortalitására nem voltak hatással.

A *Daphnia magna* krónikus vizsgálata során sem a DAS 59122-7, sem a közel izogenikus vonala esetében az anyák mortalitására vonatkozóan nem találtunk szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest, illetve a két kukorica között sem. A reprodukcióra gyakorolt hatások vizsgálatánál azonban mindkét kukorica esetében szignifikánsan kevesebb volt az utódok száma a kontrollhoz képest, a két kukorica között azonban itt sem volt statisztikailag igazolható eltérés. Az utód reprodukció kisebb mértéke elsősorban a kukoricával való táplálással magyarázható, így azt a hipotézisünket, mely szerint a DAS 59122-7 kukorica fajta transzgenikus vonala hatással van a *Daphnia magna* reprodukciójára elvetettük.

A *MON 810*-es kukorica és a közel izogenikus vonala krónikus etetési vizsgálata során a Cry1Ab-toxint termelő kukorica esetében szignifikánsan több anya egyed pusztult el a kísérlet során, mint a közel izogenikus vonal esetében. A két kukorica hatása ebben a vizsgálatban is statisztikailag eltért a kontroll csoporttól. Az utód produkcióra gyakorolt hatások statisztikai kiértékelését viszont a *MON 810*-es kukorica fajtánál nem lehetett elvégezni az anyák nagymértékű elhullása miatt. A *MON 810*-es kukorica esetében az előzetesen felállított hipotézisünket igazoltuk, miszerint a *MON 810* kukoricafajta transzgenikus vonala a *Daphnia magna* reprodukciójára hatással van. A Bohn és munkatársai által a nagy vízibolhán (*Daphnia magna*) elvégzett hosszú távú vizsgálatokhoz hasonló (BOHN et al., 2008, 2009) eredményeket kaptunk.

5.2. Javaslatok

A Cry1Ab-toxin meghatározásához elvégzett vizsgálataink alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a kísérletek ismételése előtt célszerű lenne olyan extrakciós módszert fejleszteni, amivel a liofilizátumhoz kötött toxin visszanyerhető, így a különböző liofilizálás előtt a toxin expozíciójának kitett természetes vízmintákból is kimutathatóvá válna a toxin jelenléte.

Az általunk elvégzett vizsgálatok és a szakirodalomban megtalálható adatok alapján kijelenthető, hogy akut tesztek elvégzésére csak magasabb toxintartalmat eredményező módosításoknál látszik szükségesnek, jelen módosítások esetében nagyobb hangsúlyt kell fektetni a hosszabb távú vizsgálatok elvégzésére.

A *Daphnia magna* egyedeken elvégzett reprodukciós vizsgálatot meg kell ismételni lehetőség szerint nagyobb ismétlés számmal. A kísérleti rendszer fejlesztésre szorul, annak érdekében, hogy a kukoricával való táplálás hatása és a toxin hatása egyértelműen elkülöníthetővé váljon.

6. Összefoglalás

A mezőgazdaságban használt géntechnológiai úton módosított növényfajták által termelt toxinok környezetre és az élő szervezetekre gyakorolt lehetséges toxikus hatásainak meghatározása kiemelten fontos feladat, mivel a toxin a *Bt*-növényekben folyamatosan termelődik, ezért a toxin hosszú ideig a környezetben marad, ami befolyásolja az ökoszisztémát.

Vizsgálataink során két rovarrezisztens transzgenikus kukoricafajta (*MON 810*, *DAS 59122-7*) és közel izogenikus vonalaik vízi ökoszisztémára gyakorolt hatásait vizsgáltuk. A kísérleti rendszer kialakítása során elsődleges szempont volt a természetes vizes élőhelyek reprezentálása, ezért nyolc darab akváriumot rendeztünk be a Dunából, illetve a Velencei-tó egyik nádasos kazettájából származó vízzel és iszappal. Három héttel a rendszer beállítása után a két vizsgált *Bt*-kukorica és közel izogenikus vonalaik leveléből származó levéltörmelékeket helyeztük el a Dunából, illetve a Velencei-tó kazettájából származó víz és iszap mintát tartalmazó akváriumokba. Ezt követően folyamatosan történt a mintavételezés, a kísérlet 0., 1., 2., 3., és 7. napján víz és levélmintákat gyűjtöttünk be a Cry1Ab-toxin tartalom időbeni változásainak vizsgálatához és az ökotoxikológiai tesztekhez. A *MON 810*-es kukorica által termelt Cry1Ab-toxin koncentráció időbeni változásainak vizsgálatához a vízmintákban és a levélmintákban ELISA módszerrel határoztuk meg a toxin mennyiségét. A természetes vizekből adódó mátrixhatás vizsgálatához a Velencei-tó egyik nádasos kazettájából származó és a Dunából származó vizeket, illetve meghatározott mennyiségű desztillált vizet mesterségesen a kiindulási levélben található toxin mennyiséggel elszennyeztük (spike-oltuk). A spikolást elvégeztük a liofilizálás előtt és után is, azért, hogy meghatározható legyen a minta előkészítés hatása a visszanyerhető toxintartalom kimutatására. Az ökotoxikológiai tesztek mind a két kukoricafajta esetében elvégeztük. A *MON 810* által termelt Cry1 Ab-toxin és *DAS 59122-7* által termelt Cry34/35Ab1 toxinok akut és krónikus hatásait különböző vízi szervezeteken határoztuk meg. Az akut hatásokat nagy vízibolha (*Daphnia magna*) és egyiptomi csípőszúnyog (*Aedes aegypti*) lárvákon, a krónikus (reprodukcióra gyakorolt) hatásokat nagy vízibolha egyedeken állapítottuk meg. A választott tesztszervezetek jó indikátor fajok, ezért a vízbe került növényi részek által kiváltott hatások jelzésére megbízhatóan alkalmazhatóak.

A Cry1Ab-toxin koncentráció időbeni változásának vizsgálata során a különböző akváriumokból származó vízmintákban a toxin jelenlétét nem tudtuk kimutatni, amely a mátrixhatással magyarázható, ugyanis feltételezhetően a toxin kötődik a természetes vizek szárazanyag tartalmához. A transzgenikus kukorica levélmintáiban szignifikánsan csökkent a toxin mennyisége a Duna és a Velencei-tó esetében is. Az akut ökotoxikológiai tesztek esetében egyik kukorica változat esetében sem volt kimutatható toxikus hatás a vizsgált tesztszervezeteken. A

különböző kukoricafajták krónikus hatásait vizsgálva megállapítottuk, hogy: (i) a *DAS 59122-7* kukorica és közel izogenikus vonala hatással voltak az utódok számára a kontrollhoz viszonyítva, viszont a két vonal között nem volt szignifikáns eltérés, tehát az utódprodukcióra gyakorolt hatás nem egyértelműen a toxin jelenlétének az eredménye, (ii) az anyák túlélésére a *DAS 59122-7* kukorica és izogenikus vonala nem voltak hatással, (iii) a *MON 810*-es és közel izogenikus vonala hatással voltak az anyák túlélésére a kontrollhoz képest, és a két vonal hatásai között is igazolható volt a különbség. Az anyák nagymértékű elhullása miatt az utód produkció értékelésére ebben az esetben nem volt lehetőség.

A géntechnológiai úton módosított *Bt*-növények által termelt Cry-toxinok és a környezet között lejátszódó teljes folyamatok, illetve a *Bt*-növények szabadföldi termesztésének pontos hatásai még nem ismertek, ezért számos további vizsgálat elvégzésére van még szükség. Eredményeinkkel szeretnénk hozzájárulni a rovar rezisztens *Bt*-kukorica fajták környezeti kockázatainak jobb megismeréséhez.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek Dr. Fekete Gábornak, Fejes Ágnesnek és Takács Eszternek, akik feltétlen támogatásukkal, nélkülözhetetlen szakmai tanácsaikkal segítettek munkám, továbbá megteremtették számomra a terepi mintavétel és a laboratóriumi munkához szükséges feltételeket. Köszönöm segítőkész támogatásukat, dolgozatom alapos átnézését továbbá azt, hogy felkeltették figyelmem a téma iránt. Köszönettel tartozom Juracseké Nádasdi Juditnak, aki lehetővé tette számomra a toxin mennyiségi meghatározásokban való részvételt. Végül, de nem utolsó sorban ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Reiczigel Jenőnek, aki segítségemre volt az adatok statisztikai kiértékelésénél.

8. Irodalomjegyzék

- ABEL, C.A., ADAMCZYK, J.J. JR. (2004): Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (*Lepidoptera: Noctuidae*) and southwestern corn borer (*Lepidoptera: Crambidae*) on maize whorl leaf profiles. *J. Econ. Entomol.* 97: 1737-1744.
- ABRAXIS LLC (2005): *Bt-Cry1Ab/Cry1Ac*. Warminster, PA, USA.
<http://www.abraxiskits.com/moreinfo/PN510001USER.pdf>
- AHL GOY, P., WARREN, G., WHITE, J., PRIVALLE, L., FEARING, P. (1995): Interaction of an insect tolerant maize with organisms in the ecosystem. Proceedings of the key biosafety aspects of genetically modified organisms 10-11 April 1995. Braunschweig, Germany.
- BAKONYI G. (2006): Toxicitás talajlakó szervezeteken In: Darvas B. és Székács A. (eds.): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. L'Harmattan Kiadó, Budapest. pp. 137.
- BAKONYI G., SZIRA F., KISS I., VILLÁNYI I., SERES A., SZÉKÁCS A. (2006): Preference tests with collembolas on isogenic and *Bt*-maize. *European Journal of Soil Biology*. 42: S132-S135.
- BEKE J. (2002): Liofilezés (fagyasztva szárítás). In: Beke Gy. (szerk): (2002) *Hűtőipari kézikönyv*. Alapismeretek. Mezőgazda Kiadó, Budapest, pp. 52-54.
- BETZ, F. S., HAMMOND, B. G., FUCHS, R. L. (2000): Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32: 156-173.
- BOHN, T., PRIMICERIO, R., HESSEN, D.O., TRAAVIK, T. (2008): Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a *Bt*-transgenic maize variety. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.* 55: 584-592.
- BOHN, T., TRAAVIK, T., PRIMICERIO R. (2009): Demographic responses of *Daphnia magna* fed transgenic *Bt*-maize. *Ecotoxicology* 19: 419- 430.
- BRAVO, A., GILL, S. S., SOBERÓN, M. (2007): Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
- BURNS, H.A., ABEL, C.A. (2003): Nitrogen fertility effects on *Bt* delta-endotoxin and nitrogen concentrations of maize during-early growth. *Agron. J.* 95: 207-211.
- CLARK, B.W., COATS, J.R. (2006): Subacute Effects of Cry1Ab *Bt* Corn Litter on the Earthworm *Eisenia fetida* and the Springtail *Folsomia candida* *Environmental Entomology* Vol. 35. no. 4: 1121- 1129.
- CLARK, B.W., PRIHODA, K.R., COATS, J.R. (2006): Subacute effects of transgenic Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* corn litter on the isopods *Trachelipus rathkii* and *Armadillidium nasatum*. *Environ Toxicol Chem* 25(10): 2653-2661.
- CRECCHIO, C., STOTZKY, G. (1998): Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* bound to humic acids from soil. *Soil Biol. Biochem.* 30: 463-470.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D. R., SCHNEPF, E., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J, BRAVO, A., DEAN, D. H. (2009): *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature.
http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/
- DARVAS B. (1999): Baktériumok. (*Bacillus thuringiensis* Berliner). In: Polgár A. L. (ed.) *A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon*. OMFB, Budapest. pp. 83-91.
- DARVAS B., CSÓTI A., GHARIB, A., PEREGOVITS L., RONKAY L., LAUBER É., POLGÁR A. L. (2004): Adatok a *Bt*-kukoricapollen és védett lepkefajok lárváinak magyarországi rizikóanalíziséhez. *Növényvédelem*, 40: 441-449.
- DARVAS B. (2006): A növényvédő szerek heveny toxicitása gerinceseken In: Darvas B. és Székács A. (eds.): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. L'Harmattan Kiadó, Budapest. pp. 123-125.
- DARVAS B., LAUBER É. (2006): Genetikailag módosított szervezetek a növénytermesztésben. In: Darvas B. & Székács A. (2006): *Mezőgazdasági ökotoxikológia* L'Harmattan Kiadó, Budapest. pp. 315-319.

- DARVAS B., LÖVEI G. (2006): A genetikailag módosított szervezetek környezeti hatásai. In: Darvas B. és Székács A. (eds.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. L'Harmattan Kiadó, Budapest, pp. 320–326.
- DARVAS B., SZÉKÁCS A., BAKONYI G., KISS I., BIRÓ B., VILLÁNYI I., RONKAY L., PEREGOVITS L., LAUBER É., POLGÁR A. L. (2006): Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal GMO Paneljének a magyarországi környezetanalitikai és ökotoxikológiai vizsgálatokkal kapcsolatos állásfoglalásáról. Növényvédelem, 42: 313–325.
- DARVAS B., LAUBER É. (2007): A Cry1-toxinrezisztenciáról. In: Darvas B.: Mezőgazdasági géntechnológia – első generációs GM-növények. Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest. pp. 64–66.
- DARVAS B., LAUBER É., TAKÁCS E., SZÉKÁCS A. (2009): A GM-növények mérlege a növény- és környezetvédelemben. I–II. Környezetvédelem, 17: (1): 24–25. p.; 17 (2): 26–27.
- FEKETE G. (2005): Növényi kivonatok hatása a rovarok metamorfózisára. Ph.D. dolgozat. Veszprémi Egyetem, Interdiszciplináris Doktori Iskola, Keszthely
- HERMAN, R.A., WOLT, J.D., HALLIDAY, W.R. (2002): Rapid degradation of the Cry1F insecticidal crystal protein in soil. J. Agr. Food Chem. 50: 7076–7078.
- HESZKY L. (2005a): A növényi géntechnológia alapjai In: Heszkyl L., Fésűs L., Hornok L. (2005): Mezőgazdasági Biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest, pp. 161.
- HESZKY L. (2005b): Első generációs transzgenikus növények. In: Heszkyl L., Fésűs L., Hornok L. (2005): Mezőgazdasági Biotechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest, pp. 163–165.
- HESZKY L. (2006): Kell-e félnünk a transzgenikus növényektől? Mag. Kutatás, Fejlesztés és Környezet. 2006/2-3: 5–8.
- HESZKY L. (2007): Génáramlás, génmegszökés várható következményei. In: Darvas B.: Mezőgazdasági géntechnológia – első generációs GM-növények. Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest. 20–23.
- HESZKY L. (2008): A GMO kukorica hibridek termesztésének előnyei és hátrányai. Agro napló 2008/04: 20–21.
- HESZKY L. (2011a) : A gazdasági növények genetikai módosításának tudományos jelentősége és stratégiái. Agro fórum 2011/12: 62–63.
- HESZKY L. (2011b): A transzgén és funkciói. Agro fórum 2011/1: 90–91.
- HESZKY L. (2011c): A transzgén integrációjának bizonyítása. Agro fórum 2011/5: 50–54.
- HESZKY L. (2011d): A transzgén működésének és öröklődésének bizonyítása. Agro fórum 2011/6: 21–24.
- HESZKY L. (2011e): Géntranszfer technikák. Agro fórum 2011/2: 91–94.
- HESZKY L. (2012a): Transzgenikus (GM) fajták globális termesztésének eredményei és következményei. Agro fórum 2012/1: 58.
- HESZKY L. (2012b): Transzgenikus (GM) fajták termesztésének helyzete Magyarországon. Agro fórum 2012/5: 83–86.
- HESZKY L. (2012c): Transzgenikus (GM) fajták termesztésének tapasztalatai az Egyesült Államokban. Agro fórum 2012/2: 55–56.
- HILBECK, A., BAUMGARTNER, M., FRIEND, P.M., BIGLER, F. (1998): Effect of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea*. Environ. Entomol. 27. 480–487.
- HÖSS, S., ARNDT, M., BAUMGARTE, S., TEBBE, C.C., NGUYEN, H.T., JEHL, J.A. (2007): Effects of transgenic corn and Cry1Ab protein on the nematode, *Caenorhabditis elegans* Ecotoxicology and Environmental Safety 70: 334–340.
- KEMÉNY S., DEÁK A., KOMKA K., VÁGÓ E. (2004): Statisztikai elemzés a STATISTICA programmal. Műegyetemi Kiadó, Budapest, 71.
- KOSKELLA, J., STOTZKY, G. (1997): Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3561–3568.

- KUBASSEK J. (2004): Érd földrajza, Érd földrajzi helyzete, közlekedési adottságai, kutatástörténete, geológiai felépítése, természetföldrajzi különlegességei, éghajlati-időjárási érdekességei, vízrajzi sajátosságai. In: Kubassek J. (szerk.): (2004): Érdi krónika 2. bővített kiadás. Érd Város Önkormányzata, Érd, pp. 11-37.
- LAMBERT, B., BUYSSE, L., DECOCK, C., JANSSENS, S., PIENS, C., SAEY, B., SEURINCK, J., VAN AUDENHOVE, K., VAN RIE, J., VAN VLIET, A., PEFFEROEN, M. (1996): A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family *Noctuidae*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 80-86.
- LAUBER É., POLGÁR A. L., DARVAS B. (2007): A MON 810-es kukorica pollene és a védett lepkék.. In: Darvas B. (ed.) Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények. Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest. pp. 39–42.
- LEHEL J., LACZAY P. (2011a): Általános toxikológia. In: Lehel J., Laczay P. (2011): Toxikológia. Szent István Egyetemi Kiadó, Budapest, pp. 2-29.
- LEHEL J., LACZAY P. (2011b): Toxikológiai vizsgálatok. In: Lehel J., Laczay P. (2011): Toxikológia. Szent István Egyetemi Kiadó, Budapest, pp. 50-60.
- LIU, C.M., TZENG, Y.M. (2001): Quantitative analysis of parasporal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* by capillary electrophoresis. J. Food Drug Anal. 9: 79-83.
- LOSEY, J.E., RAYOR, L.S., CARTER, M.E. (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae. Nature 399: 214.
- MENDELSON, M., KOUGH, J., VAITUZIS, Z., MATTHEWS, K. (2003): Are *Bt* crops safe? Nature Biotechnol 21(9): 1003-1009.
- MIRANDA, R., ZAMUDIO, F.Z., BRAVO, A. (2001): Processing of Cry1Ab δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: role in protoxin activation and toxin inactivation. Insect Biochem. Molec. Biol. 31: 1155-1163.
- MSZ EN ISO 6341 VÍZMINŐSÉG. A mobilitásgátlás meghatározása *Daphnia magna* Strausson (Cladocera, Crustacea). Akut toxicitási teszt (ISO 6341:1996). Magyar szabvány. Magyar Szabványügyi Testület
- MSZ EN ISO 28692 VÍZMINŐSÉG. Édesvízi alga növekedésgátlási tesztje. *Scenedesmus subspicatus* és *Selenastrum capricornutum* algafajokkal (ISO 8692:1989). Magyar szabvány. Magyar Szabványügyi Testület
- MSZ ISO 10706 VÍZMINŐSÉG. Anyagok hosszú távú mérgező hatásának meghatározása *Daphnia magna* Strausson (Cladocera, Crustacea). Magyar szabvány. Magyar Szabványügyi Testület
- NGUYEN, T.H., JEHLE, J.A. (2007): Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON 810. J Plant Dis Prot 114: 82-87.
- PALM, C. J., DONEGAN, K., HARRIS, D., SEIDLER, R. J. (1994): Quantification in soil of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* δ -endotoxin from transgenic plants. Mol. Ecol. 3: 145-151
- PALM, C. J., SCHALLER, D. L., DONEGAN, K. K., SEIDLER, R.J. (1996): Persistence in soil of transgenic plant produced *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* delta-endotoxin. Can. J. Microbiol. 42: 1258-1262
- POLGÁR A. L. (2006): Akut toxicitás In: Darvas B. és Székács A. (eds.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. L'Harmattan Kiadó, Budapest. pp. 117.
- POLGÁR A. L., SCHMERA D. (2006): Toxicitás alacsonyabb rendű hasznos élő szervezeteken. In: Darvas B. és Székács A. (eds.): Mezőgazdasági ökotoxikológia. L'Harmattan Kiadó, Budapest. pp. 129-132.
- PROMDONKOY B., ELLAR D. J. (2003): Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Biochem. J., 374: 255–259.
- PUSZTAI Á., BARDÓCZ ZS. (2006): Genetikailag módosított élelmiszerek táplálkozási hatásai. In: Darvas B. és Székács A. (eds.) Mezőgazdasági ökotoxikológia. L'Harmattan Kiadó, Budapest. pp. 327–333.
- RAMIREZ-ROMERO, R., DESNEUX, N., DECOURTYE, A., CHAFFIOL, A., PHAM-DELEGUE, M.H. (2008): Does Cry1Ab protein affect learning performances of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae)? Ecotoxicol Environ Saf 70: 327-333.

- RITCHIE, W.W, HANWAY, J.J., BENSON, G.O. (1992): How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology, Cooperative Extension Service, Special report 48.
- ROH, J. Y., CHOI, J. Y., LI, M.S., JIN, B. R., JE, Y. H. (2007): *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microbiol. Biotech., 17: 547–559.
- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K., RASMUSSEN, O.F. (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA- extraction solutions. International Journal of Food Microbiology, 17 37-45.
- ROSI-MARSHALL, E. J., TANK, J. L., ROYER, T. V., WHILES, M. R., EVANS-WHITE, M., CHAMBERS, C., GRIFFITHS, N. A., POKELSEK, J., STEPHEN, M. L. (2007): Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 104: 16 204–16 208.
- SCHNEPF, E., CRICKMORE, N., VAN RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., FEITELSON, J., ZEIGLER, D. R., DEAN, H. D. (1998): *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62: 775–806.
- SINGER, V.L., JIN, W., JONES, J.L., YUE, S., HAUGLAND, R.P. (1994): Sensitive fluorescent stains for detecting nucleic acids in gels and solutions. BioProbes, 20: 12.
- SIMS, S.R., REAM, J.E. (1997): Soil inactivation of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIIA insecticidal protein within transgenic cotton tissue: laboratory and field studies. J. Agr. Food Chem. 45: 1502-1505
- SPIEGELHALTER, F., LAUTER, F.-R., RUSSEL, J.M. (2001): Detection of Genetically Modified Food Products in a Commercial Laboratory. Journal of Food Science, 66 (5) 634-640.
- SZÉKÁCS A., DARVAS B. (2007): A MON 810-es kukorica Cry1-toxintermelése és annak tarlómaradványokon való bomlása. In: Darvas B.: Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények. Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest. pp. 27–30.
- SZÉKÁCS A., LAUBER É., JURACSEK J., DARVAS B. (2010a): Cry1ab toxin production of MON 810 transgenic maize Environmental Toxicology and Chemistry Volume 29, Issue 1, 182-190.
- SZÉKÁCS A., LAUBER É., TAKÁCS E., DARVAS B. (2010b): Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize. Anal. Bioanal. Chem. 396: 2203-2211.
- SZÉKÁCS A., TAKÁCS E., LAUBER É., JURACSEK J., DARVAS B. (2010c): A Cry1-toxin eloszlásának mérése MON 810 kukoricában – ELISA módszerek alkalmazhatósága. In Kőmíves T., Haltrich A., Molnár J. (szerk): (2010) Növényvédelmi Tudományos Napok 2010, Budapest, pp. 54.
- SZÉKÁCS A., WEISS, G., QUIST, D., TAKÁCS E., DARVAS B., MEIER, M., SWAIN, T., HILBECK, A. (2011): Inter-laboratory comparison of Cry1Ab toxin quantification in MON 810 maize by enzyme immunoassay. Food Agric. Immunol. 23: 99-121.
- TAKÁCS E., LAUBER É., BÁNÁTI H., SZÉKÁCS A., DARVAS B. (2009): *Bt*-növények a növényvédelemben. *Növényvédelem*, 45: 549-558. <http://www.ecotox.hu/kutatok/idn131>
- TAKÁCS E., FEJES Á., FEKETE G., DARVAS B., SZÉKÁCS A. (2010): Cry4 toxin vízi hatástartam- és lebomlásvizsgálata immunoassay és *Aedes aegypti* lárvateszt segítségével. Acta Biol. Debr. Oecol. Hung. 21: 223-232.
- TAKÁCS E., DARVAS B., SZÉKÁCS A. (2012a): Analytical Difficulties and Certain Biological Aspects of Cry1Ab Toxin Determination in MON 810 Genetically Modified Maize. Act. Phytopath. et Entom. Hungarica 47 (2). 293-306.
- TAKÁCS E., FÓNAGY A., JURACSEK J., KUGLER N., SZÉKÁCS A. (2012b): Characterisation of tritrophic effects of DAS-59122-7 maize on the seven-spotted ladybird (*Coccinella septempunctata*) feeding on the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). GMOs Integrated Plant Production IOBC/wprs Bulletin Vol. 73: 121-134.
- TAPP, H., STOTZKY, G. (1998): Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. Soil. Biol. Biochem., 30: 471-476.

- UJHELYI G. (2009): Szójatartalmú élelmiszerekben előforduló glifozát toleráns szója szennyezés és a szervezetbe kerülés kockázatának vizsgálata PCR módszerrel. Ph.D. dolgozat. Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Doktori Iskola, Budapest
- VAN FRANKENHUYZEN, K. (2009): Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. J. Invertebr. Pathol., 101: 1–16.
- VÍZÜGYI ÉS KÖRNYEZETVÉDELMI KÖZPONTI IG., KÖZÉP-DUNÁNTÚLI KÖRNYEZETVÉDELMI ÉS VÍZÜGYI IG. (2010): A Víz Keretirányelv hazai megvalósítása, Vízyűjtő- gazdálkodási terv, 1-14. Velencei-tó. 26.
- WHO (2007): Specifications and evaluations for public health pesticides; *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* strain AM65-52. WHO ajánlás. World Health Organization
- YAMAMOTO, T. (1983): Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. J. Gen. Microbiol. 129: 2595-2603.
- ZÖLDI V., FEKETE G. ÉS DARVAS B. (2005): Szelektív hatású lárváölo készítmények összehasonlító vizsgálata *Aedes aegypti* (Linnaeus) és *Culex pipiens* Linnaeus csípőöszönyög (Culicidae) fajokon *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.* 13:259-267.
- ZWAHLEN, C., HILBECK, A., HOWALD, R., NENTWIG, W. (2003): Effects of transgenic corn litter on the earthworm *Lumbricus terrestris*. Mol. Ecol. 12: 1077-1086.

NYILATKOZAT

Alulírott, a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi KarSzak nappali/levelező tagozat végzős hallgatója nyilatkozom, hogy a szakdolgozat/diplomadolgozat saját munkám, melynek elkészítése során a felhasznált irodalmat korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezeltem. Hozzájárulok ahhoz, hogy szakdolgozatom/diplomadolgozatom egyoldalas összefoglalója felkerüljön a Kar / Intézet / Szak honlapjára.

A szakdolgozat/diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2009.hó.....nap

.....
hallgató aláírása

A dolgozat készítőjének konzulense nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a felhasznált irodalmat a hallgató korrekt módon, a jogi és etikai szabályok betartásával kezelte, a szakdolgozatot/diplomadolgozatot záróvizsgán történő védelemre javaslom.

A szakdolgozat/diplomadolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem.

Gödöllő, 2009.hó.....nap

.....
témavezető aláírása