

**SZENT ISTVÁN EGYETEM**

**IMMUNANALITIKAI MÓDSZEREK KIDOLGOZÁSA  
*BACILLUS THURINGIENSIS* ENDOTOXIN(OK)  
KIMUTATÁSÁRA**

**DOKTORI (*PHD*) ÉRTEKEZÉS**

Készítette:

**TAKÁCS ESZTER**

Gödöllő

2015

**A doktori iskola****Megnevezése:** Környezettudományi Doktori Iskola**Tudományága:** Környezettudomány

**Vezetője:** Csákiné Prof. Dr. Michéli Erika  
 tanszékvezető, egyetemi tanár  
 Szent István Egyetem  
 Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar  
 Környezettudományi Intézet  
 Talajtani és Agrokémiai Tanszék

**Témavezető:** Prof. Dr. Székács András  
 intézetigazgató, c. egyetemi tanár, tudományos tanácsadó  
 Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ  
 Agrár-környezettudományi Kutatóintézet

**Társtémavezető:** Dr. Szoboszlai Sándor  
 tanszékvezető-helyettes, egyetemi docens  
 Szent István Egyetem  
 Mezőgazdasági és Környezettudományi Kar  
 Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet  
 Környezetvédelmi és Környezettoxikológiai Tanszék

.....  
 Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
 A témavezetők jóváhagyása

*„Az egyetlen, ugye, csakis egybehangzó lehet; régóta tudjuk, hogy a második állítás mindig a kísértés maga.”*

Darvas Béla

*Szüleimnek és testvéreimnek*



## TARTALOMJEGYZÉK

<b>JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>9</b>
<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>11</b>
<b>2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....</b>	<b>15</b>
2.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt) Berliner 1915 .....	15
2.2. Kristályos ( <i>Crystalline</i> vagy <i>Cry</i> ) toxinok .....	15
2.2.1. A <i>Cry</i> -toxinok csoportosítása.....	16
2.2.2. A <i>Cry</i> -toxinok szerkezete .....	16
2.2.3. A <i>Cry</i> -toxinok hatásmechanizmusa.....	17
2.3. Géntechnológiai úton módosított (GM) növények .....	19
2.4. A <i>MON 810</i> genetikai eseményt hordozó kukorica <i>Cry</i> -toxintermelése.....	21
2.5. A <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> jellemzése, a <i>Cry</i> 4-toxintartalmú készítmények alkalmazása .....	25
2.6. A <i>DAS-59122</i> genetikai eseményt hordozó kukorica <i>Cry</i> 34/35Ab1-toxintermelése .....	27
2.7. A <i>Cry</i> -toxinok analitikai mérési módszerei .....	29
2.7.1. Műszeres analitikai eljárások .....	29
2.7.2. Immunanalitikai eljárások .....	30
2.7.3. Az <i>ELISA</i> eljárások Bt-növények toxintartalmának meghatározásában való alkalmazásainak problémái.....	31
2.8. Az analitikai eljárások belső minőségellenőrzésének módszerei .....	33
<b>3. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>37</b>
3.1. A vizsgálatok során alkalmazott pufferoldatok, műszerek és számítógépes programok ...	37
3.2. Kereskedelmi forgalomban kapható, <i>Cry</i> 1Ab-toxin kimutatására alkalmas <i>ELISA</i> tesztsomagok kalibrációjának vizsgálata .....	37
<b>3.3. Kereskedelmi forgalomban kapható, <i>Cry</i>1Ab-toxin kimutatására alkalmas <i>ELISA</i> tesztsomagok belső minőségellenőrzése .....</b>	<b>39</b>
3.4. <i>Cry</i> 1Ab-toxin kimutatására alkalmas <i>ELISA</i> rendszerek alkalmazhatóságának összehasonlítása nemzetközi körmérés keretében .....	39
3.4.1. Minták .....	40
3.4.2. Minta-előkészítés.....	40
3.4.3. <i>ELISA</i> módszer.....	41
3.4.4. Statisztikai elemzés.....	41
3.5. Mátrixhatás vizsgálata kukoricelevél- és sertésszövetekben.....	44
3.6. <i>Cry</i> 4-toxin kimutatására alkalmas <i>ELISA</i> rendszer fejlesztése .....	45
3.6.1. <i>Cry</i> 4-specifikus antitest és jelölő enzim összekapcsolása.....	45

3.6.2. <i>Optimális ELISA rendszer kialakítása</i> .....	46
3.7. Cry34/35Ab1-toxinok kimutatására alkalmas ELISA rendszer kalibráló görbéinek vizsgálata .....	47
3.8. A <i>MON 810 GM</i> kukorica Cry1Ab-toxintermelését befolyásoló tényezők.....	48
3.8.1. A <i>Cry1Ab</i> -toxintartalom horizontális és vertikális eloszlása .....	48
3.8.2. A <i>Cry1Ab</i> -toxintartalom változása különböző termesztési körülmények között .....	49
3.8.3. <i>Műtrágyakezelés hatása a Cry1Ab-toxintermelésre</i> .....	50
3.9. <i>DAS-59122</i> kukorica környezeti kockázatelemzése nem célszervezeten .....	51
3.9.1. A <i>DAS-59122 GM</i> kukorica termesztése .....	51
3.9.2. A hétpettyes katicabogár ( <i>Coccinella septempunctata</i> L.) tenyészetben tartása .....	51
3.9.3. A hétpettyes katicabogár életsiklus-vizsgálta .....	52
3.9.4. Táplálékfogyasztás.....	53
3.9.5. A <i>Cry34/35Ab1</i> -toxinok hatása hétpettyes katicabogár ( <i>Coccinella septempunctata</i> ) lárváira.....	54
3.9.6. A <i>Cry34/35Ab1</i> -toxinok hatása hétpettyes katicabogár ( <i>Coccinella septempunctata</i> ) teljes egyedfejlődésére, illetve szaporodására .....	55
<b>4. EREDMÉNYEK</b> .....	<b>61</b>
4.1. A <i>Cry1Ab</i> -kimutatására alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA rendszerek kalibrációjának vizsgálata.....	61
4.2. <i>Cry1Ab</i> -toxin kimutatására alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA rendszer belső minőség ellenőrzése .....	64
4.3. <i>Cry1Ab</i> -toxin kimutatására alkalmas ELISA rendszerek összehasonlítása körméréses vizsgálat keretében .....	69
4.3.1. <i>Közös protokoll</i> .....	69
4.3.2. <i>Saját protokoll</i> .....	72
4.4. Mátrixhatás vizsgálata <i>Cry1Ab</i> -meghatározás során növényi és állati szövetekben .....	76
4.4.1. <i>Kukorica</i> -levélszövetben jelentkező mátrixhatás .....	76
4.4.2. <i>Sertés</i> különböző szöveiben jelentkező mátrixhatások.....	77
4.5. <i>Cry4</i> -toxin kimutatásra alkalmas optimalizált ELISA rendszer.....	78
4.6. <i>Cry34/35Ab1</i> -kimutatására alkalmas ELISA rendszerek standard görbéinek stabilizálása, alkalmazhatóságának vizsgálata .....	81
4.7. A <i>MON 810 GM</i> kukorica <i>Cry1Ab</i> -toxintermelését befolyásoló tényezők.....	83
4.7.1. A toxin eloszlása a levélben.....	83
4.7.2. A termesztési körülmény hatása a <i>Cry1Ab</i> -koncentrációra .....	86
4.7.3. Nitrogén-foszfor-kálium kevert műtrágya hatása a toxintermelésre .....	89

4.8. A DAS-59122 GM kukorica hatása hétpettyes katicabogár ( <i>Coccinella septempunctata</i> ) fejlődésére.....	91
4.8.1. A hétpettyes katicabogár lárvális fejlődése a táplálék és hőmérséklet függvényében .	91
4.8.2. A hétpettyes katicabogár táplálékfogysztása a lárvális fejlődés során .....	93
4.8.3. A DAS-59122 GM kukorica hatás a hétpettyes katicabogár L1 stádiumú lárváira.....	95
4.8.4. A DAS-59122 GM kukorica hatása a hétpettyes katicabogár L2 stádiumú lárváira..	96
4.8.5. A DAS-59122 GM kukorica hatása a hétpettyes katicabogár élelciklusára .....	98
<b>5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>103</b>
<b>6. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>105</b>
<b>7. SUMMARY.....</b>	<b>109</b>
<b>8. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....</b>	<b>113</b>
<b>I. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>117</b>
<b>2. MELLÉKLET: PUBLIKÁCIÓS LISTA .....</b>	<b>137</b>
Az értekezés témakörében megjelent publikációk .....	137
Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk .....	139
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>141</b>





**JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

ANOVA	varianciaanalízis (analysis of variance)
BBS	bikarbonátpuffer-oldat ( <i>bicarbonate buffered saline</i> )
BBST	Tween 20 detergenst tartalmazó BBS
BSA	fetális borjúsérumból származó albumin fehérje ( <i>bovine serum albumin</i> )
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CERA	Környezeti Kockázatelemzési Központ ( <i>Center of Environmental Risk Assessment</i> )
Cry-toxin	kristályos ( <i>crystalline</i> ) <i>Bt</i> -toxin
CR	keresztreakció ( <i>cross-reactivity</i> )
DAS-59122-7	a Dow/DuPont (Pioneer) cégek által kifejlesztett genetikai esemény kódszáma
DK440	a DeKalb cég kukoricahibridje, közel izogenikus vonal
DK440-BTY	MON 810 genetikai eseményt hordozó DeKalb hibrid
ELISA	enzimjelzéses <i>immunoassay</i> ( <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
EFSA	az Európai Unió Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatala ( <i>European Food Safety Authority</i> )
FAO	Mezőgazdasági és Élelmezési Szervezet ( <i>Food and Agricultural Organization</i> )
GM	géntechnológiai úton módosított
GMO	géntechnológiai úton módosított élőlény ( <i>genetically modified organism</i> )
HRP	tormaperoxidáz ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IgG	immunglobulin G
IPM	integrált növényvédelem ( <i>integrated pest management</i> )
IQC	belső minőségellenőrzés ( <i>Internal Quality Control</i> )
ISO	Nemzetközi Szabványügyi Szervezet ( <i>International Organization of Standardization</i> )
L1, L2	első és második lárvastádium
LCL, LWL	alsó és felső szabályozási határ ( <i>Lower and Upper Control Limit</i> )
LWL, UWL	alsó és felső figyelmeztetési határ ( <i>Lower and Upper Warning Limit</i> )
MON-ØØ 81Ø-6	a Monsanto cég által kifejlesztett genetikai esemény kódszáma
OD	optikai sűrűség ( <i>optical density</i> )
PBS	foszfátpuffer-oldat ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	Tween 20 detergenst tartalmazó PBS
PR36D79	a Pioneer cég kukoricahibridje, közel izogenikus vonal

PR37N01, PR37M34, PR36V52	a Pioneer cég kukoricahibridjei
TGO	transzgenikus élőlény ( <i>transgenic organism</i> )
Ti	tumorindukáló
US EPA	az USA Környezetvédelmi Hivatala ( <i>Environmental Protection Agency</i> )
WHO	Egészségügyi Világszervezet ( <i>World Health Organization</i> )
A kukorica fenológiai stádiumai:	
R1	a kukorica fenológiai stádiuma: nővirágzás
R2	a kukorica fenológiai stádiuma: „hólyagszem” állapot
R4	a kukorica fenológiai stádiuma: viaszérés
R5	a kukorica fenológiai stádiuma: „fog” állapot
R6	a kukorica fenológiai stádiuma: fiziológiai érés
Vn	a kukorica fenológiai stádiuma: <i>n</i> kifejlődött levél
VT	a kukorica fenológiai stádiuma: címerhányás

## 1. BEVEZETÉS

A *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) endotoxinjait tartalmazó rovarellenes készítmények (*Bt*-inszekticidek) a biológiai növényvédő szerek egyik mind jelentősebb felhasználású csoportját képviselik, melyeknek hatékonysága hazánkban is jól dokumentált (DARVAS *et al.* 1979). Az orális hatású *Bt*-szerek mellett a mezőgazdasági biotechnológiai fejlesztések során dolgozták ki a Cry-toxinokat termelő, géntechnológiai úton módosított (GM) *Bt*-növényeket is, melyek Magyarország számára figyelemre méltóan kukoricában jelentek meg, kukoricamoly- és kukoricabogár-rezisztens fajták formájában. A *Bt*-növények előnyei specifikus hatásukon alapul: a *cry*-génnek természetben előforduló nagy száma, az általuk termelt fehérjetoxin sokfélesége biztosítja a különböző rovarrendek elleni alkalmazhatóságukat. A permetező szerekhez képest – melyeknek kedvezőtlen tulajdonsága, hogy nem egyenletesen oszlanak el a védeni kívánt növény felületén, UV-fényben lebomlanak, illetve az esővel lemosódhatnak (ROH *et al.* 2007) – a *Bt*-növények sejtjeiben folyamatosan termelődő Cry-toxinok állandó védelmet jelentenek a célkártevőkkel szemben, és nincsenek kitéve a kedvezőtlen időjárási körülményeknek. A folyamatos Cry-toxintermelés azonban állandó környezeti terhelést jelent, és mint növényvédelmi technológia, nem felel meg az integrált növényvédelem alapelveinek. Előnyként említik, hogy a *Bt*-növények alkalmazása elejét veszi a széles hatásspektrumú rovarölő szerek használatának, azonban hazánkban ez a kukoricamoly-rezisztens fajtacsoportokra nem igazolható, hiszen a kártevő számottevő terméskiesést okozó népszerűségben történő előfordulása tízévenként egyszeri-kétszeri, általában hazánk déli részein és csak foltokban jelentősebb, így a gazdák nem védekeznek ellene (DARVAS *et al.* 2007). Ugyanezen okból a 0–5%-os terméshozam-növekedés az izogénikus kontrollhoz képest sem a fajta saját előnye, hiszen a terméshozam a kukoricamoly-kártétel függvénye (BETZ *et al.* 2000, FÜSTI MOLNÁR 2007).

A GM növények használata során fontos probléma az esetleges génmegszökés, melynek során a módosított növény pollenje más fajták (intraspecifikus hibridképződés) vagy rokon növények (interspecifikus hibridképződés) virágait porozza be (HESZKY 2007). További problémát jelent, hogy a konstitutív promóternek köszönhetően olyan növényi részeken is termelődik a Cry-toxin, ahol védekezés szempontjából nem indokolt. A *MON 810* kukoricamoly-rezisztens kukorica például még a gyökerében is jelentős mennyiségű Cry1Ab-toxint termel, s a növényben termelt toxinmennyiség 1–8%-a a talómaradványban egy év múlva is visszamérhető (SZÉKÁCS és DARVAS 2007), ezzel szintén megnövekedett és felesleges környezeti terhelést okozva.

Nem célzott szervezetek táplálkozásuk során kerülhetnek kapcsolatba a *Bt*-növény által termelt toxinnal. Fitofágok a *Bt*-növény fogyasztásán vagy az elsodródott, tápnövényüket szennyező pollenen; ragadozók és parazitoidok a Cry-toxint elfogyasztó zsákmány- és gazdaállaton; lebontó szervezetek a növényi maradványokon; megporzó szervezetek viráglátogatásukon; szimbióta szervezetek kölcsönösségi kapcsolataikon keresztül lehetnek kitéve a Cry-toxinok hatásának (DARVAS és LÖVEI 2006). Kiemelkedő problémát jelent a célkártevő rokonsági körébe eső nem célzott fajok érintettsége.

A szubletális behatások hozzájárulhatnak az esetleges Cry-toxinrezisztencia, illetve - keresztrezisztencia kialakulásához, mely *Plodia interpunctella* (Hübner) modellállaton, laboratóriumi körülmények között már a 10. nemzedékben kialakul *MON 810* GM kukorica esetén (DARVAS és LAUBER 2007). A Cry1-rezisztencia kezelésére izogenikus vonallal történő 20–50% arányú szegélyvetést ajánlanak a fajtulajdonosok, ami fenntartja az érzékeny kártevőnépességet.

A jelenleg takarmányként és táplálékként forgalomban lévő GM növényeket az ún. lényegi azonosság elve alapján engedélyezték. A GM növények élelmiszer-biztonságában való kételkedést Pusztai Árpád és munkatársainak kísérletei alapozták meg, melyek során patkányokban a hóviráglektin génjét tartalmazó GM burgonya fogyasztásának hatására visszamaradt növekedést, immunrendszeri zavarokat és több szerv szöveti rendellenességeit tapasztalták (EWEN és PUSZTAI 1999, PUSZTAI *et al.* 2003). *Bt*-készítmények alkalmazása után a mezőgazdaságban dolgozóknál allergén és immunogén hatásokat (BERNSTEIN *et al.* 1999), patkányok és egerek esetében az elfogyasztott Cry-toxin hatására a különböző fiziológiás paraméterek normálistól való eltérését, meddőséget és az utódok túlélésének csökkenését figyelték meg (SÉRALINI *et al.* 2007, VELIMIROV *et al.* 2008).

Minden növényvédelmi technológia alkalmazása során fontos, hogy a megfelelő, a hatóanyagok kimutatására kellő érzékenységgel rendelkező analitikai módszerrel rendelkezünk. A Cry-toxinok mind a környezetkímélő növényvédelem, mind a mezőgazdasági géntechnológia számára fontos hatóanyagok. Kimutatásuk fehérje jellegük (lektinfehérjék) és az ezzel járó bomlékonysági és adszorptív jellemzőik miatt fokozott nehézséget jelentenek a szermaradék-analitikában. A növényvédelmi technológiák környezeti biztonságának vizsgálatában azonban elengedhetetlen a hatóanyag eloszlásának és környezeti sorsának felmérése. A Cry-toxinok kimutatásának elterjedt módszerét képviselik az enzimjelzéses *immunoassay* (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) eljárások.

Munkám során a *MON-ØØ81Ø-6* (továbbiakban *MON 810*) és *DAS-59122-7* (továbbiakban *DAS-59122*) *Bt*-kukoricák által termelt Cry1Ab- és Cry34/35Ab1-toxinok, illetve a szúnyoglárva-gyérítéskor alkalmazott Cry4-toxinok kimutatásra alkalmas ELISA rendszerek vizsgálatával foglalkoztam. PhD-munkám célkitűzései az alábbiak voltak:

- a kereskedelmi forgalomban kapható, Cry1Ab-toxin kimutatására alkalmas EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate és QualiPlate, Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA és Agdia Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA rendszerek analitikai összehasonlítása (kalibráció, megbízhatóság, ismételhetőség),
- az ELISA, mint széles körben elterjedt analitikai eljárás alkalmazásából eredő, a szakmai irodalomban tapasztalható Cry1Ab-koncentrációra vonatkozó nagyfokú szórások mértékének körmérésben történő meghatározása,
- a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA rendszerek (tesztcsomagok) növényi és állati szövetek Cry1Ab-tartalmának meghatározására való alkalmazhatóságának vizsgálata mátrixhatások leírásával,
- Cry4-toxin kimutatására alkalmas ELISA rendszer fejlesztése,
- A *MON 810* genetikai eseményt hordozó GM kukorica toxintermelését befolyásoló környezeti tényezők meghatározása,
- a *DAS-59122* genetikai eseményt hordozó GM kukorica környezeti hatásvizsgálata hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) lárvális fejlődésére és teljes életciklusára és reprodukciós paramétereire vonatkozóan.



## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. *Bacillus thuringiensis* (Bt) Berliner 1915

A *B. thuringiensis* aerob, Gram-pozitív, endospóráképző, rovarpatogén (entomopatogén) baktérium. Ishiwata fedezte fel 1901-ben, majd 1915-ben Berliner írta le (ROH *et al.* 2007). A környezetben való elterjedése igen széleskörű, több ezer törzset izoláltak különböző földrajzi régiókból (LERECLUS *et al.* 1993). Talajlakó baktériumként tartják számon (MARTIN és TRAVERS 1989), de számos törzset kimutattak már gabonaraktárakból (MEADOWS *et al.* 1992), levélfelszíni (filloplán) élőhelyről (SMITH és COUCHE 1991, DAMGAARD *et al.* 1997), illetve felszíni vizekből (ICHIMATSU *et al.* 2000). A növényvédelmi gyakorlatban felhasznált *B. thuringiensis*-törzsek sporulációjuk során parasporális testet formálnak, melyek  $\delta$ -endotoxinból állnak. Az  $\alpha$ -exotoxint (lektináz C) és  $\beta$ -exotoxint (hőstabil adenin-nukleotid, az RNS-polimeráz gátlója) termelő törzseket az utóbbi súlyos mellékhatása (mutagén és teratogén) miatt kizárták a hasznosításból (DARVAS 1999). A vegetatív növekedési fázis alatt különböző *B. thuringiensis*-törzsek ún. „vegetatív rovarító fehérjéket” (*vegetative insecticidal protein*, Vip) választanak ki a környezetükbe, melyek szintén rendelkeznek rovarölő hatással lepkefélék (*Lepidoptera*), bogárfélék (*Coleoptera*) és félfedelesszárnyúak (*Hemiptera*) fajain (CHOUGULE és BONNING 2012, LÓPEZ-PAZOS és CERÓN 2013, PALMA *et al.* 2014). A Vip fehérjékhez hasonlóan a kevésbé ismert ún. „szekretált inszekticid fehérjék” (*secreted insecticid protein*, Sip) szintén a vegetatív növekedési szakaszban termelődnek és választódnak ki. A Vip fehérjék letális hatásúak krumplibogár (*Leptinotarsa decemlineata*) lárváira, illetve gátolják a foltos uborkabogár (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) és az amerikai kukoricabogár (*Diabrotica virgifera virgifera*) fejlődését (DONOVAN *et al.* 2006). A fentiek mellet további, a *B. thuringiensis*-törzs által termelt fehérje ismert (szferolizin, alvelizin, enhanszin-szerű fehérje, P19 és P20 segítőfehérjék, 41,9 kDa fehérje), melyeknek toxicitása szekvenciájuk és szerkezetük alapján valószínűsíthető (PALMA *et al.* 2014). Genomszintű és patogenitási spektrumbeli jellegzetességek alapján a fajon belül több változatot különböztetnek meg, melyeket *varietas*-nak (var.) neveznek (pl.: var. *thuringiensis*, var. *kurstaki*, var. *israelensis*).

### 2.2. Kristályos (*Crystalline* vagy *Cry*) toxinok

A  $\delta$ -endotoxinok két nagy csoportja ismert, a pórusképző hatású Cry (*crystalline*)- és Cyt (*cytolytic*)-toxinok. A Cry-toxinok a speciális középbeli receptorokhoz kötődve (SCHNEPF *et al.* 1998), míg a Cyt-toxinok a membránlipidekkel közvetlen kapcsolatba lépve formálnak

pórusokat a sejthártyán (PROMDONKOY és ELLAR 2003). A növényvédelemben nem hasznosított Cyt-toxinok citolitikus és hemolitikus aktivitást mutatnak, és főleg kétszárnyú lárvákra hatnak önmagukban, illetve a Cry-toxinokat szinergizálják (BRAVO *et al.* 2007).

### 2.2.1. A Cry-toxinok csoportosítása

A Cry-toxinok egyik csoportját rovarölő hatásuk miatt a mezőgazdasági gyakorlatban *Bt*-készítmények (*Bt*-bioinszekticidek) formájában növényvédelmi célokra használják (SANCHIS és BOURGUET 2008). Másik csoportjuk, az ún. parasporinok (pl.: Cry31A, Cry41A, Cry45A stb.) nem rendelkeznek rovarpatogén tulajdonsággal, viszont citocid aktivitást mutatnak különböző eredetű humán rákos sejtek ellen (OHBA *et al.* 2009, OKUMURA *et al.* 2010).

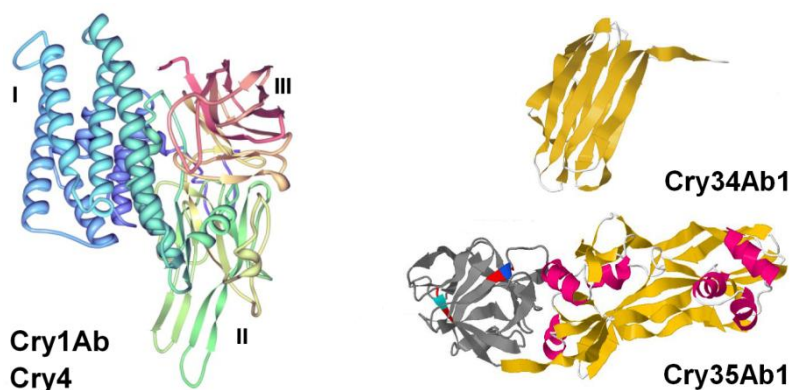
Az elmúlt évtizedekben több mint 700 *cry*-gént azonosítottak. A Cry-toxinokat, illetve a megfelelő *cry*-géneket szerkezeti hasonlóságuk és célszervezeteik alapján csoportosítják. Az első rendszer négy nagy csoportot különített el (CryI–CryIV), melyek a génszekvenciák homológiája alapján további alcsoportokra bonthatók (pl.: CryIA, CryIB) (HÖFTE és WHITELEY 1989). Néhány, újabban izolált Cry-toxinnak ezen osztályozás szerinti beillesztése problémába ütközött. Számos törzs többféle toxint is termel (pl. a *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 törzs Cry1Aa-, Cry1Ab-, Cry1Ac-, Cry2A- és Cry2B-toxinokat), illetve bizonyos homológ fehérjék nem toxikusak. Ezen problémák kiküszöbölésére új rendszert vezettek be, mely kizárólag aminosav-szekvencián alapul. A római számokat arab számokra cserélték, ezentúl minden toxin számokból és betűkből álló 4 rangú jelölést kapott (pl.: Cry1Ab1), melyek sorrendben az aminosav-szekvencia <45%, <78%, <95%, illetve >95% hasonlóságát mutatják. A napjainkig leírt 783 Cry-toxint elsődleges szerkezeti hasonlóságuk (aminosav-szekvenciájuk) alapján 73 (Cry1–Cry73) főtípusba és több altípusba sorolták (CRICKMORE *et al.* 1998, 2009).

### 2.2.2. A Cry-toxinok szerkezete

A *B. thuringiensis* törzsek által termelt Cry-toxinok többsége 7 doménből felépülő fehérjemolekula (protoxin), melyek a célszervezet béltraktusában emésztő enzimek hatására egy 3-doménes konformációvá aktiválódnak (EVDOKIMOV *et al.* 2014). A 3-domén szerkezetű fehérjecsaládba tartozó Cry-toxinok aminosav-szekvenciájuk alapján jól elkülöníthetők egymástól, azonban harmadlagos szerkezetük (térbeli konformáció) megegyezik. Fehérjealegységeik egy 7  $\alpha$ -hélixből álló „perforációs domén” (I), mely a membránba épülésben és pórusképzésben játszik szerepet, egy 3  $\beta$ -lemezből felépülő „centrális domén” (II), melynek a toxin–receptor-kölcsönhatásban van szerepe, illetve egy 2  $\beta$ -lemezt tartalmazó „galaktózkötő



domén” (III), mely egyaránt részt vesz a receptorhoz való kötődésben és a membránba épüléssel a pórusképzésben (SCHNEPF *et al.* 1998, JENKINS és DEAN 2000, LÓPEZ-PAZOS és CERÓN 2007, XU *et al.* 2014). A nem 3-domén szerkezetű toxinok az ETX\_MTX2 (Cry15, Cry23, Cry33, Cry38, Cry45, Cry51, Cry60, Cry64), a Toxin\_10 (Cry35, Cry36) és az Aegerolyzin (Cry34) fehérjecsaládokba tartoznak (GONZALES *et al.* 2008, KELKER *et al.* 2014). Utóbbi három fehérjecsalád tagjai néhány esetben nem önmagukban fejtik ki toxikus hatásukat adott célszervezetekkel szemben, hanem ún. toxinpárokat (bináris toxinok) alkotnak (pl. Cry34/Cry35, Cry23/Cry37). Ezen toxinpárok csak egymás jelenlétében képesek kifejteni inszekticid hatásukat, hatásmechanizmusuk azonban még ismeretlen (DE MAAGD *et al.* 2003). A PhD-munkám során vizsgált Cry-toxinok (Cry1Ab, Cry4, Cry34/35Ab1) térbeli szerkezetét az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra. A PhD-munkám során vizsgált Cry-toxinok sematikus térbeli szerkezete (PALMA *et al.* 2014). Az aktivált Cry1Ab- és Cry4-toxin a 3-doménés fehérjecsaládba tartoznak. Fehérjealegységeik: perforációs domén (I), centrális domén (II), galaktózkötő domén (III). A Cry34/35Ab1 bináris toxinok az Aegerolyzin és Toxin\_10 családokba tartozó fehérjék, melyek entomopatogén hatásukat együttesen fejtik ki a célszervezet tápcsatornájában.

### 2.2.3. A Cry-toxinok hatásmechanizmusa

A Cry-toxinok *per os* típusúak, hatásmechanizmusukat két, egymástól eltérő folyamattal magyarázzák. Az ún. „egymást követő kötődés” modell (*sequential binding model*) szerint a rovarok belébe kerülő, a *B. thuringiensis* által termelt parasporális kristályokat összetartó diszulfidhidak az ott található lúgos pH mellett (pH 9–12) elbomlanak. A kristályos szerkezetből kiszabaduló 70–130 kDa tömegű protoxin-molekulákat a bélben termelődő proteázok (tripszin, kimotripszin stb.) kb. 55–65 kDa méretű toxinokká aktiválják. Az aktivált Cry-toxinmolekulák (lektin természetű vegyület) a bélhám sejthártyájában található transzmembrán kadherinszerű

fehérjéhez kötődnek és oligomerizálódnak. A kialakult oligomer másodlagos receptorokhoz kötődve beékelődik a lipidmembránba, így nem szelektív pórusokat nyit a sejthártyán, melyen keresztül bejutó szerves ionok, aminosavak, illetve cukormolekulák megzavarják a sejt ionháztartását és a sejtek pusztulását okozzák. A bél perisztaltikája leáll, és a rovar felhagy a táplálkozással. A keletkező mikrosebzéseken jut be a lárvák testüregébe a *B. thuringiensis* vegetatív teste, de a kialakuló szepszist ekkor már bármely, a bélben élő mikroorganizmus elő tudja idézni (KNOWLES és DOW 1993, SCHNEPF *et al.* 1998, KIROUAC *et al.* 2002, VACHON *et al.* 2012). A „jelátviteli modell” szerint a kadherinreceptorhoz való kötődés hatására a sejten belül egy  $Mg^{2+}$ -függő adenilát cikláz – protein kináz A fehérje alapú jelátviteli út indul be, melynek eredménye a sejt nekrotikus sejthalála (ZHANG *et al.* 2006a, BRAVO és SOBERÓN 2008). Gyapjaslepkén (*Lymantria dispar*) végzett vizsgálatok kimutatták, hogy a béltraktusban élő baktériumok jelenléte is szükséges a *B. thuringiensis* rovarölő hatásának kifejeződéséhez. A lárva szervezetébe kerülő *B. thuringiensis* baktériummal szemben az ott jelenlévő *Enterobacter* sp. és *Escherichia coli* képes szaporodni a lárva hemolimfájában, így a halált okozó szepszist elsősorban természetes bélmikroflóra eredményezi (BRODERICK *et al.* 2006).

A Cry-toxinok gyakorlati szempontból rendszintű specificitást mutatnak. Ennek alapján öt csoportba oszthatók: Cry1 – főként lepkefélék (*kurstaki*, *thuringiensis*, *aizawai*, *entomocidus* stb.), Cry2 – lepkefélék és kétszárnyúak (*kurstaki*), Cry3 – bogárfélék (*tenebrionis*, *morrisoni*, *san diego* stb.), Cry4 – kétszárnyúak (*israelensis*) lárváin fejtik ki hatásukat, Cry5 – fonálférgekre ható specifikus toxinok (CRICKMORE *et al.* 2009, VAN FRANKENHUYZEN 2009). Mivel rovarpatogén hatásukat a célszervezetek lárvális fejlődési stádiumában fejtik ki, a *B. thuringiensis* endotoxinjait tartalmazó rovarellenes készítmények (*Bt*-inszekticidok) növényvédelmi gyakorlatban a környezetkímélő biológiai növényvédő szerek egyik mind jelentősebb felhasználású csoportját képviselik. Az orális hatású *Bt*-szerek (*B. thuringiensis* var. *kurstaki* – DIPEL, BIOBIT, FORAY; var. *aizawai* – FLORBAC, AGREE, XENTARI; var. *tenebrionis* – NOVODOR; var. *israelensis* – VECTOBAC, TEKNAR, BACTIMOS) nem élő baktériumokat tartalmaznak, hanem a *B. thuringiensis* sporulációja során formálódott spórákat és parasporális testeket, melyek tartalmazzák a  $\delta$ -endotoxinokat. Az egyes törzsek általában többféle toxint is termelnek, így a belőlük előállított készítmények is különféle toxinokat tartalmaznak (pl.: DIPEL: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2Aa) (LI *et al.* 2005).

A *Bt*-készítmények mellett a mezőgazdasági biotechnológiai fejlesztések során dolgozták ki a Cry-toxinokat termelő GM *Bt*-növényeket is, melyek Magyarország számára figyelemre méltóan kukoricában jelentek meg, kukoricamoly- és kukoricabogár-rezisztens fajták formájában.

### 2.3. Géntechnológiai úton módosított (GM) növények

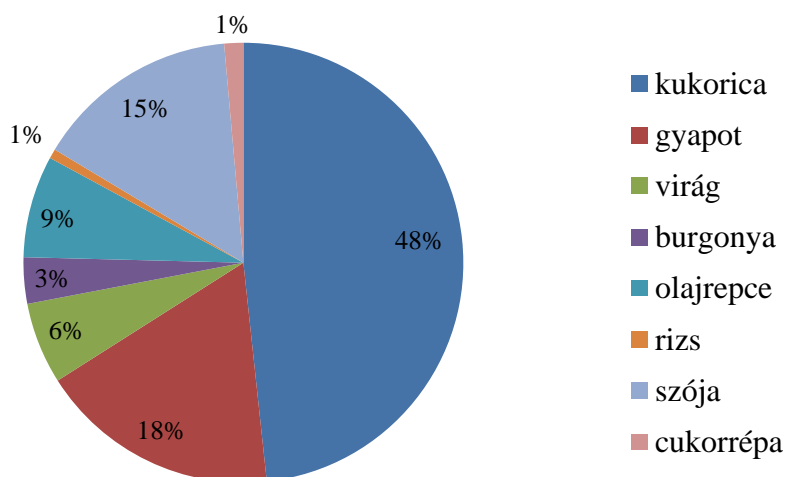
A GM élőlény (*genetically modified organism*, GMO) olyan szervezet, mely esetében a génkészlet módosítása az ivarsejtekre is kiterjed, tehát az élőlény öröklődő megváltoztatásáról van szó. A transzgenikus élőlény (*transgenic organism*, TGO) olyan távoli rendszertani egységből származó örökletes információval (transzgénnel) rendelkezik, amely nem fordult elő az eredeti fajban. A géntechnológiai úton való módosítás során a transzgént egy vektort tartalmazó génkonstrukció részeként juttatják az átalakítandó (recipiens) szervezet genomjába. A genom transzformációjának két legelterjedtebb formája (a) a génpuska, mely esetben apró wolframrészecskék felületét a génátvitelre szánt génkonstrukcióval bevonják, majd ezeket nagy sebességgel (több száz km/óra) belövik a sejtbe, illetve (b) az *Agrobacterium – Ti* (tumorindukáló) plazmid rendszerrel való fertőzés, ahol az *Agrobacterium tumefaciens* nevű talajbaktérium *Ti* plazmidjét megszabadítják a tumorképző képességétől, és összekapcsolják a bevitelre szánt gént tartalmazó vektorral (PUSZTAI és BARDÓCZ 2006).

A mezőgazdasági termesztésbe vont GM növények legnagyobb csoportját világszinten az elsőgenerációs GM növények képviselik, melyek genomjának mesterséges úton való módosítása növényvédelmi célokat szolgál, illetve növényvédőszer-felhasználáson alapul. Legnagyobb csoportjuk toleráns különböző (elsősorban *glyphosate* és *glufosinate*) gyomirtó hatóanyagokkal szemben, míg kisebb hányaduk a *B. thuringiensis* valamely Cry-toxinjának termeléséért felelős *cry*-gént tartalmazza (TAKÁCS *et al.* 2009), így azok bizonyos kártevőkkel szemben ellenállóak (DARVAS és LAUBER 2006, DARVAS *et al.* 2013).

Transzgenikus növényt először 1983-ban állítottak elő, miután dohánysejteket *Agrobacterium – Ti* plazmid rendszerrel módosítottak. A legkorábbi termesztési célú kibocsátás dátuma 1993, amikor Kína vírusellenálló dohány termesztését kezdte meg. A kereskedelmi forgalomba is került transzgenikus növényfajta, a FLAVR SAVR paradicsom 1994-ben jelent meg az Egyesült Államokban (DARVAS 1997, DARVAS 1999). Az első köztermesztésbe vont GM növény megjelenése óta évről évre egyre több GM növény kerül mezőgazdasági felhasználás alá (DARVAS *et al.* 2014).

2014-ben a világon 181,5 millió hektáron termesztettek GM növényeket, mely a 2013-as 175,2 millió hektárhoz viszonyítva 3,6%-os növekedést jelent. Az összes terület 89,7%-át az Egyesült Államok (73,1 millió ha), Brazília (42,2 millió ha), Argentína (24,3 millió ha), India (11,6 millió ha) és Kanada (11,6 millió ha) termesztése fedi le. A köztermesztésbe vont GM növények többsége szója-, kukorica-, gyapot-, olajrepcé- és burgonyafajtákat érint. A világvezető GM-fajtatulajdonos cégek: Monsanto, Syngenta, Sanofi-Aventis, DuPont, Dow és BASF (CLIVE 2014).

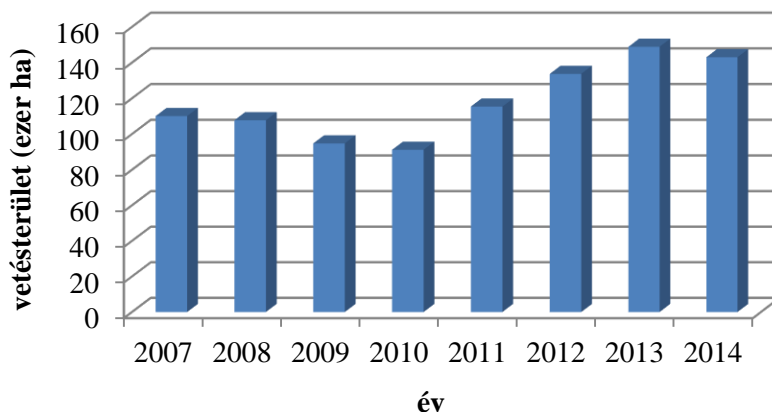
Európa hozzáállása a GM növényekhez, illetve azok köztermesztésbe vonásához alapvetően elutasító. Nincs ez így a takarmányként és az élelmiszerekben való felhasználást illetően, bár ragaszkodik a GMO-tartalmú termékek jelöléséhez (DARVAS és SZÉKÁCS 2010). A GM termékek engedélyezésére vonatkozó döntéshozatalban részt vesz az Európai Bizottság, (*European Commission*) az EU tudományos tanácsadó testülete, az Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal (*European Food Safety Agency, EFSA*) GMO-panelje és a tagállamok. A döntés előtt értékelik az adott termék környezeti és egészségügyi biztonságosságát, majd az EFSA tudományos és szakmai véleményt ad a termesztethezetőségről (*cultivation*), élelmiszerként és takarmányként való felhasználhatóságról (*food and feed*), illetve behozatali és feldolgozási (*import and processing*) lehetőségről. A korábbi engedélyezési folyamat során az engedélyezésre az Európai Bizottság az EFSA véleménye alapján tett javaslatot, amelyről a tagállamok szavaztak. Magyarországnak ebben a rendszerben 12 szavazata volt a 27 tagállam 345 szavazata között. Az Európai Unió Tanácsa ötéves jogalkotási eljárása során 2015. március 2-án elfogadta, hogy a GM szervezetek termesztését a tagállamok saját területükön szabadon korlátozhatják, vagyis az Európai Unió szintjén engedélyezett GMO-k termelésének korlátozásáról vagy megtiltásáról a tagállamok nemzeti szinten dönthetnek (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2015). Jelenleg 147 egyszeresen vagy többszörösen módosított GM fajtacsoport halad az európai engedélyezés útján, melyek növényfajták szerinti eloszlását a 2. ábra szemlélteti. A genom módosításának célja 49%-ban valamilyen gyomirtó szer (*glyphosate* 28%, *glufosinate* 20%, egyéb 1%) toleranciát, 44%-ban rovarrezisztenciát (*Lepidoptera* 27%, *Coleoptera* 11%, egyéb 6%), 7%-ban összetételváltozást eredményez (GMO COMPASS 2015).



2. ábra. Az Európai Unió engedélyezési eljárásában résztvevő, géntechnológiai úton módosított növények fajta szerinti eloszlása.

Az engedélyezési eljárás az Egyesült Államokban az ún. lényegi azonosság elvén alapul, amely kimondja, hogy ha a GM növény beltartalmi értékei beleesnek elterjedési területén belül a fajta összetételére jellemző adattartományba, akkor lényegileg azonosnak kell tekinteni a hagyományossal (HESZKY 2012), míg az EU-ban az ún. elővigyázatosság elve van érvényben, mely a lehetséges kockázat esetén megelőző jellegű döntéshozatallal biztosítja a környezet magas szintű védelmét. Az Európai Unióban eddig csak a *MON 810* genetikai eseményt hordozó GM kukorica (1998) és *Amflora* GM burgonya (2010) köztermesztésbe vonását engedélyezték. Magyarországon a *MON 810* kukoricára 2005 óta, az *Amlflora* burgonyára 2010 óta vetési moratórium van érvényben (VM RENDELET 53/2013. (VI. 17.)). Az *Amflora* GM burgonya engedélyét 2013-ban Magyarország által kezdeményezett jogi per eredményeként visszavonták (GENERAL COURT OF THE EU 2013, GMO COMPASS 2015).

Az EU elzárkózó magatartása ellenére a termesztés alá vont területek nagysága Európában 2010 óta, kis mértékben, de folyamatosan emelkedett, 2014-ben az előző évhez képest 3% csökkenés volt megfigyelhető (3. ábra). A termesztő országok közé tartozik Spanyolország, Portugália, Csehország, Szlovákia és Románia (CLIVE 2014).



3. ábra. Az Európai Unió területén, a géntechnológiai úton (GM) növények termesztése alá vont területek nagysága. 2014-ben a legnagyobb területen (100000 hektár) Spanyolország vetett GM kukoricát, melynek GM vetésterülete a világ teljes GM területének 0,05%-a.

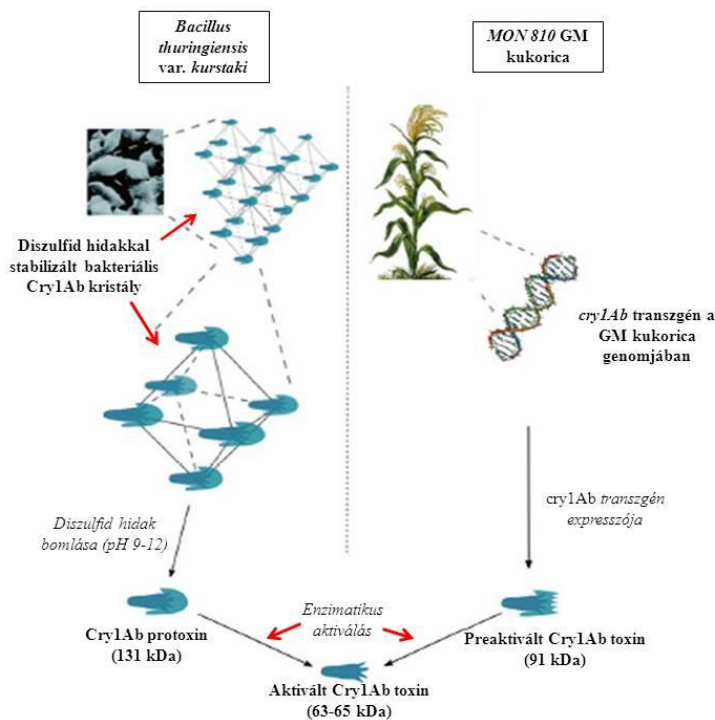
#### 2.4. A *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukorica Cry-toxintermelése

A Monsanto Company (St. Louis, MO, USA) által kifejlesztett, YIELDGARD márkanéven forgalmazott, a *MON 810* genetikai eseményt hordozó GM kukorica genomjába a *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Berliner) *cry1Ab*-génjének rövidített változatát integrálták, így a kukorica ellenálló az európai kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis*, Hübner) lárváival szemben. A

*cry1Ab*-transzgén tartalmazó PV-ZMBK07 plazmid a karfiol-mozaikvírus konstitutív 35S promóterét tartalmazza, mely a hozzá tartozó gén folyamatos átírását biztosítja, így a kifejeződő Cry1Ab fehérje folyamatosan jelen van a növényi sejtben. Az alkalmazott promóter nem szövetspecifikus, a növény minden sejtjében bekapcsolt állapotban van (ODELL *et al.* 1985, ANDOW *et al.* 2004). A Syngenta Seeds Inc. (Minneapolis, MN, USA) *SYN-EV176-9* és *SYN-BTØ11-1* GM kukoricák genomja szintén a *B. thuringiensis* var. *kurstaki cry1Ab*-génjét tartalmazza, azonban az eltérő géntechnológiai eljárás következményeként mégsem ugyanazt a fehérjét termelik. Mindhárom genetikai esemény *cry1Ab*-génje a bakteriális Cry1Ab-prototoxinnál (131 kDa, 1155 aminosav) kisebb, míg az aktivált toxinnál (60–65 kDa, 594 aminosav) nagyobb molekulatömegű toxinformát kódol (GILL *et al.* 1992, CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY 1997, HILBECK 2001, SZÉKÁCS *et al.* 2010, THEN 2010, CERA 2015). A GM növények által termelt ún. preaktivált toxinforma a genetikai esemény függvényében eltérő molekulákat jelent. A *MON 810* 91kDa (816 aminosav), a *SYN-EV176-9* 72,6 kDa (648 aminosav), a *SYN-BTØ11-1* 65 kDa molekulatömegű fehérjét termel (KOZIEL *et al.* 1993, CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY 1997, ANDOW *et al.* 2004, CERA 2015). Így ezen a *Bt*-növények környezeti hatásai, az expozíciós útvonalak, a termelt preaktivált toxinforma aktivitása eltérőek lehetnek a megfelelő *Bt*-bioinszekticid-készítményekhez képest. A *MON 810* GM kukorica által termelt és a DIPEL *Bt*-bioinszekticidben jelen levő Cry1Ab-toxin közötti különbséget a 4. ábra szemlélteti. További különbség a két technológia között, hogy míg a DIPEL készítmény a Cry1Ab mellett Cry1Ac és Cry2 endortoxinokat tartalmazó kristályokat is tartalmaz, addig a *Bt*-növény kizárólag a Cry1Ab-toxin preaktivált formáját termeli. A transzgénben alkalmazott konstitutív promóter eredménye, hogy a *Bt*-növény minden szövetében, a tenyészidőszak teljes ideje alatt termeli a Cry1Ab-toxint, így a környezeti terhelés 625–1930-szor magasabb a *MON 810* növények esetében, mint a DIPEL alkalmazásakor (SZÉKÁCS és DARVAS 2012b), melyet a kártevők mennyiségének függvényében, szükség esetén, évente legfeljebb néhány alkalommal használnak. Ennek következménye, hogy a GM növény nem teljesíti az integrált növényvédelem feltételeit (*integrated pest management*, IPM). Az IPM felismeri, hogy az agroökoszisztémák – azon belül is elsősorban a mezőgazdasági monokultúrák – ökológiailag instabil rendszerek, ahol a természetes élőhelyek csökkenésével, kiterjedt homogén mezőgazdasági élőhelyek létrejöttével, a kémiai növényvédelmi eljárások alkalmazásával és a nagy terméshozamú fajták kizárólagos termesztésével a biodiverzitás csökkent. Az IPM célja az agrobiocönózis minden résztvevőjének megtartása, a kártevő életciklusának és az ökológiai kapcsolatrendszerben elfoglalt helyének ismeretével a kialakult ökológiai rendszer megzavarásának minimálisra csökkentése (STERN *et al.* 1959, JERMY 1975, DARVAS 1986, ALTIERI 1994). Ennek részeként az IPM a növényvédelmi módszerek (kémiai,

biológiai stb.) olyan kombinált alkalmazási gyakorlata, amely a technológia által kifejtett környezetterhelést – a növényvédelmi hatékonyság fenntartása mellett – a minimálisra törekszik szorítani. Az agrobiocönózis természetes szabályzó tényezőit megkülönböztetett szerephez juttatja, és azokat az agrokémiai módszereken túl más típusú, szelektív eljárásokkal egészíti ki. A kémiai növényvédelemben egyrészt kerüli a széles hatásspektrumú vagy kedvezőtlen mellékhatást gyakorló szerek használatát, másrészt visszafogja az alkalmazott növényvédő szerek mennyiségét a kijuttatott dózisok minimálisra csökkentésével és az alkalmazások számának visszaszorításával. Utóbbi tekintetében, szem előtt tartva azt, hogy minden kijuttatás a nem célzott szervezetekre is hatást gyakorol, alkalmazási elvként leszögezi, hogy nem lehet cél a kártevőnépesség teljes kiirtása (eradikáció), csupán egy, a technológia működtetéséhez elfogadható, kritikus kártételi küszöbszint alá történő szorítására, vagyis a kártevőnépesség szabályozására szabad törekedni. Ehhez a kritikus kártételi szinthez tartozó kritikus kártevőnépességi szinteket állapít meg, s a kémiai növényvédelmi beavatkozást csak akkor engedi, ha az aktuális kártevőnépesség eléri vagy meghaladja ezt a kritikus szintet. Mindez a vonatkozó hazai – és Európai Unió – jogszabályokban is tükröződik: a 43/2010 FVM rendelet a növényvédelmi tevékenységről kimondja, hogy „*A földhasználónak és a termelőnek törekednie kell a 8. mellékletben szabályozott integrált növényvédelem általános elveinek betartására*”, melynek általános elve, a biológiai, biotechnikai, agrotechnikai, mechanikai, fizikai és kémiai védekezési eljárások a kártevők megjelenésének megelőzése az erre jellemző időszakban, illetve megjelenése után azok gazdasági kárt nem okozó szintre való csökkentése a cél (FVM RENDELET 43/2010 (IV. 23.)). Mindezen különbségek alapján a *Bt*-növények és *Bt*-bioinszekticidek nem tekinthetők egymásnak megfelelő, egymást helyettesítő növényvédelmi technológiának (SZÉKÁCS és DARVAS 2011, 2012b).

A *MON 810* GM kukorica toxintartalmára vonatkozóan a hivatalos dokumentumok a levélre 7,93–10,34 µg/g, a teljes növényre 3,65–4,65 µg/g, a betakarított szemtermésre 0,19–0,39 µg/g és a pollenre 0,09 µg/g Cry1Ab-tartalmat határoznak meg (EFSA 2009, CERA 2015). A leírt toxinkoncentrációk egy 1994-es mintavételi sorozat eredményei, melynek során az Amerika Egyesült Államok területén, hat helyszínen termesztett *MON 810* fajta szöveteit mintázták, reprezentálva így a különböző termesztési feltételeket. A dokumentumban azt is leírják, hogy a tenyészidőszak során a toxin kifejeződése csökken, illetve a növény által termelt Cry1Ab-toxin lebomlásának DT<sub>50</sub>-értéke 2, DT<sub>90</sub>-értéke 15 nap. A Monsanto Inc. által nyilvánosságra hozott, korlátozott információtartalmú koncentrációtartományok megítélése azonban az alkalmazott ELISA eljárás paramétereinek ismerete nélkül nem lehetséges.



4. ábra. A DIPEL *Bt*-bioinszekticid és a *MON 810 Bt*-növény Cry1Ab-toxinjai közötti lényeges különbségek (SZÉKÁCS és DARVAS 2012b).

A *MON 810* genetikai esemény engedélyezése óta, annak ellenére, hogy a Cry1Ab-toxin eloszlása a növényben nem ismert, alig néhány tudományos vizsgálat irányult a *Bt*-kukorica Cry1Ab-tartalmának meghatározására, melyeket az I. táblázat részletez.

I. táblázat. A Cry1Ab-toxin eloszlása a *MON 810* fajtacsoportozó GM kukoricák szöveteiben.

fajta	növényi szerv	Cry1Ab-tartalom (µg/g)	hivatkozás
AGRIGOLD A6609Bt	levél	0,76–2,30	ABEL és ADAMCZYK (2004)
ASGROW RX799Bt	levél	0,77–2,39	ABEL és ADAMCZYK (2004)
Pioneer P31B13Bt	levél	0,66–2,20	ABEL és ADAMCZYK (2004)
Pioneer P33V08Bt	levél	0,66–2,17	BRUNS és ABEL (2003)
Monsanto NOVELIS	levél	0,44–11,07	NGUYEN (2004) NGUYEN és JEHLE (2007)
	gyökér	0,34–2,31	NGUYEN (2004)
	szár	0,35–2,06	
	portokfal	0,30–6,65	
	mag	0,01–0,51	
	gyökér	0,27–4,17	NGUYEN és JEHLE (2007)
	szár	0,08–2,61	
	portokfal	0,30–6,65	
mag	0,01–0,51		



Az irodalmi adatok bizonyítják, hogy a Cry1Ab-toxintermelés szövetspecifikus a *MON 810* GM kukorica esetében. DK440-BTY *Bt*-kukorica különböző szerveinek toxintartalma levél > szár > termés > gyökér > portok > pollen sorrendben alakul. A növényi részekkel a növény által termelt Cry1Ab-mennyiség 8%-a visszamérhető silómaradványként 11 hónap után is, majd tartós 10% maradékszint alakul ki 200 nap után. Tarlómaradványban ugyanezen érték 1–4% egy év után (SZÉKÁCS és DARVAS 2007). A növényi sejtekben termelődött toxin siló- vagy tarlómaradványként bezárva a sejtekben tovább jelen van a környezetben, mert a sejtfa megvédi a különböző bomlási folyamatoktól. A tenyésztési időszak során a legintenzívebb Cry1Ab-termelés DK440-BTY levél esetében az ötlevelés vegetatív szakaszban (V5)<sup>1</sup> volt (17,15±1,66 µg/g), mely folyamatos csökkenést mutatott az viaszéréses (R4) generatív stádiumig. Gyökér esetében kevésbé intenzív változások figyelhetők meg, a mag csírázását követően 5,32±0,49 µg/g koncentrációt mértek, mely körülbelül felére csökkenve a tenyésztési időszak végéig azonos szinten mozgott. Szárban is állandó Cry1Ab-koncentráció mutatkozott, 2,25±0,30 µg/g szinten (SZÉKÁCS *et al.* 2010).

A talaj típusa, elsősorban annak nitrogéntartalma is nagyban befolyásolja a toxintermelést, nitrogénműtrágya alkalmazása mellett a Cry1Ab-koncentráció másfélszeresére emelkedett (BRUNS és ABEL 2003). A nitrogénműtrágya emelkedett nitrogénszintet eredményez a talajban, mely serkenti a fotoszintézis folyamatát (LEMCOFF és LOOMIS 1986, BERZSENYI 1988). A fotoszintézis és Cry1Ab-termelés közti pozitív korrelációt pedig ABEL és ADAMCZYK (2004) írták le.

A géntechnológiai úton való többszörös módosítás (*multistack* fajták) hatására a *MON 862* x *MON 810* eseményeket egyaránt hordozó kukorica Cry1Ab-tartalma kétszer akkora, mint az egyszeresen módosított, *MON 810* eseményt hordozó kukoricának (EFSA 2005).

## **2.5. A *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* jellemzése, a Cry4-toxintartalmú készítmények alkalmazása**

A csípőszúnyog elleni védekezésnek lehetséges módja az imágók elleni permetezés (főként szintetikus piretroidok alkalmazásával) az imágó megjelenés helyén; illetve a lárvaállomány gyérítése a vizes élőhelyeken. Szúnyoglárvaállomány-gyérítésre lehetőség van egyrészt a juvenoid (juvenilhormon-analóg) *S-methoprene* hatóanyagú készítmények használatával, azonban a nem célzott szervezetre gyakorolt jelentős toxicitása miatt ezen hatóanyagot tartalmazó készítményeket csak zárt rendszerekben (természetes vizekkel összeköttetésben nem álló területen) lehet csak alkalmazni (DARVAS és POLGÁR 1998,

<sup>1</sup> A kukorica fenológiai stádiumait RITCHIE *et al.* (1992) szerint adom meg a disszertációban.

ERDŐS *et al.* 2008). A gyakorlatban a *B. thuringiensis* var. *israelensis*-tartalmú szerek terjedtek el, melyeket elsősorban a maláriával fertőzött területeken alkalmazzák.

A *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) az első törzs, melyről toxikus hatást mutattak ki kétszárnyúak (Diptera) lárváival szemben (GOLDBERG és MARGALIT 1977, DE BARJAC 1978, MARGALITH és BEN-DOV 2000). A toxikus hatás kifejtéséért a Cry4Aa (134 kDa, 1180 aminosav), a Cry4Ba (128 kDa, 1136 aminosav), a Cry11Aa (72 kDa, 643 aminosav) és Cyt1Aa (27 kDa, 248 aminosav) fehérjék felelősek (BEN-DOV *et al.* 1999). A Cry4Aa-toxin erősen toxikus *Culex*, a Cry4Ba-toxin *Anopheles* és *Aedes*, a Cry11Aa *Aedes* és *Culex* lárváival szemben (OTIENO-AYAYO *et al.* 2008, PONCET *et al.* 1995). A hatások a toxinok együttes jelenlétében szinergens módon erősödnek mindhárom nemzetség esetében (CRICKMORE *et al.* 1995). Az Európai Unióban jelenleg a H-14 szerotípus SA-3, EG 2215, AM65-52 és SA3A törzseket alkalmazzák ACROBE (BASF), BACTIMOS, GNATROL, SKEETAL, TEKNAR és VECTOBAC (Valent BioSciences) márkaneven (MACBEAN 2012).

A *Bti*-készítmények esetében az egységre vonatkoztatott tiszta hatóanyag-tartalom (pl.: g/l, v/v%, m/m%) értékének megadását nehezítik a hatóanyag Cry-toxinok bomlékonyságából és szilárd felületeken való erős megkötődési hajlamából adódó analitikai pontatlanság és a munkaigényes minta-feldolgozás miatti költségesség. Emiatt, bár a forgalmazóknak a nyolcvanas évek végéig a *Bt*-készítményekre is meg kellett adniuk a pontos hatóanyagtartalmat, ezen a helyzeten változtatott az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatalának (US EPA) 1988-ban hozott határozata (US EPA 1988), amely elégségesnek mondta ki az elterjedt mennyiségi jelölés, a nemzetközi toxinegyenértékben mért biológiai hatékonyság (*International Toxic Units*, ITU/mg) használatát (TOMPKINS *et al.* 1990). A gyártók azóta élnek is a jogi szabályozás nyújtotta lehetőséggel, s a *Bt*-készítmények tényleges toxintartalmát és -összetételét nem adják meg, csak biológiai aktivitását. Ennek következtében az egyes gyártási tételek csak rovarellenes hatáserősségükben egyeznek, tényleges biokémiai összetételükben – különösen a sok *Bt*-toxint tartalmazó készítmények esetében – nem. A helytelenül hatóanyagként feltüntetett *B. thuringiensis* var. *israelensis* mennyiségi jellemzése értelmetlen a vizsgálatok során, hiszen nem a baktérium felelős a hatásért, hanem az általa termelt toxinok, így azok mennyisége jellemzi ténylegesen a készítmény várható hatását. A lárvagyérítés kivitelezésének ellenőrzése és a környezeti kockázatok értékelése miatt alapvető fontosságú a felhasznált szerek kimutathatósága. A hatóanyag kimutatására két lehetséges megoldás létezik: biokémiai eljárás alkalmazásával vizsgálni a Cry4-toxin mennyiségét; és biológiai hatásvizsgálatban mérni a tényleges aktivitást, meghatározott körülmények között, standardnek tekintett csípőszúnyogfajok alkalmazásával (DULMAGE 1981, WHO 2007). Mivel jelenleg a szúnyogállomány-gyérítés gyakorlatában nincs rendelkezésre álló specifikus analitikai módszer az endotoxin mennyiségének

kimutatására, a meghatározás főként biotesztek segítségével történik (FEKETE és ZÖLDI 2009). Mindez kiemelkedő fontosságúvá tette a kvantitatív meghatározást lehetővé tevő analitikai módszerek fejlesztését.

## 2.6. A *DAS-59122* genetikai eseményt hordozó kukorica *Cry34/35Ab1*-toxintermelése

A *Cry34Ab1* (14 kDa)- és *Cry35Ab1* (44 kDa) toxinokat 2002-ben izolálták a *B. thuringiensis* PS149B1 törzséből (NARVA *et al.* 2000, ELLIS *et al.* 2002). Az izolátum toxikus hatású volt amerikai kukoricabogár (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) lárváival szemben, de nem volt hatásos az európai kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner), a gyapottok-bagolylepke (*Helicoverpa armigera* Hübner), a kukorica-bagolylapke (*Helicoverpa zea* Boddie) és az ipszilon bagolylepke (*Agrotis ipsilon* Hufnagel) lárváira. A két toxin ún. bináris toxinok, a kukoricabogár elleni toxikus hatásukat együtt fejtik ki (ELLIS *et al.* 2002). A két toxint kódoló génszakaszok ugyanazon expressziós szabályozás alá esnek (operon), egymástól 100 bázispár távolságra helyezkednek el. *Pseudomonas fluorescens* genomjába bevitt génszakasról kifejeződő *Cry34/35Ab1*-toxinok, illetve a kukoricabogár-rezisztens, *DAS-59122* genetikai eseményt hordozó *Bt*-növények (HERCULEX RW) által termelt toxinok molekulatömegüket, immunogén felismerhetőségüket, illetve *N*-terminális szekvenciájukat tekintve nem különböznek egymástól (MOELLENBECK *et al.* 2001, GAO *et al.* 2004, HUANG *et al.* 2007, US EPA 2010), továbbá a molekulák egyik esetben sem glikolizáltak. Hatásmechanizmusukat tekintve a *Cry34/35Ab1* bináris toxinok is pórusképző hatásúak. A toxinokra érzékeny szervezetek tápcsatornájában a *Cry35Ab1*-toxin a *C*-terminális szakaszán hasítódik, az így keletkezett 40 kDa nagyságú molekula erősíti a *Cry34Ab1*-toxin hatását (GAO *et al.* 2004). A két toxin megfelelő aránya azonban eddig még nem tisztázott (HERMAN *et al.* 2002). A pórusképző tulajdonság mindkét toxinra jellemző, azonban csak a két toxin együttes jelenléte eredményez állandóan nyitvatartó ioncsatorát, mely a bélhám ionháztartásának felborulását okozza. A *Cry35Ab1*-toxin *C*-terminális szakaszának lehasítása kulcslépése a hatás kifejtésének. A folyamat pH 5,5–6,0 körülmények között optimális, mely körülmény a bogárfélék lárváira jellemző (MOELLENBECK *et al.* 2001, MASSON *et al.* 2004). A lepkefélék lárváinak bélcsatornájában a pH magasabb (pH 8,0–12,0), feltételezhetően ez okozza a *Cry34/35Ab1*-toxinok bogárfélékre gyakorolt specifikus hatását (MASSON *et al.* 2004).

A *DAS-59122* genetikai eseményt hordozó, a Dow/DuPont (Pioneer) tulajdonában álló GM kukoricát 2005-ben engedélyezte, majd a regisztrációt 2010-ben 5 évre meghosszabította az USA Környezetvédelmi Hivatala (US EPA 2010). Az Európai Tanács 2007-ben adta ki a 2007/702/EC döntését, melyben a *DAS-59122* GM kukorica behozatalra és feldolgozásra,

valamint takarmányként és élelmiszerként vagy ezek alapanyagaként engedélyezi (EUROPEAN COMMISSION 2007). A hivatalos dokumentumok a *DAS-59122* GM kukorica esetében is ismertetik a növény toxintartalmát, mely adatok levél-, mag-, gyökér-, és pollenszövetre vonatkoznak a növény V9 (kilencleveles állapot), VT (pollenszórás), R1 (nővirágzás), R4, R5 („fog” állapot) és R6 (fiziológiai érés) fejlődési stádiumában (CERA 2013). Az ismertetett értékek közül a legmagasabbakat a II. táblázat mutatja be.

II. táblázat. A *DAS-59122* GM kukorica különböző szöveteiben mért legmagasabb Cry34/35Ab1-koncentrációk a hivatalos engedélyezési dokumentumok alapján.

növényi szövet	ng Cry34Ab/mg száraz tömeg (fejlődési stádium)	ng Cry35Ab/mg száraz tömeg (fejlődési stádium)
levél	302 (R4)	126 (R4)
mag	117 (R6)	3,7 (R6)
gyökér	102 (R6)	15,4 (V9)
pollen	87,2 (VT)	0,15 (VT)
teljes növény	88 (R6)	18,1 (R1)

Az engedélyezési eljárások során a GM *Bt*-növények, így *DAS-59122* genetikai eseményt hordozó kukorica környezeti kockázatelemzése során az adott Cry-toxin rekombináns formájának nem célszervezetekre gyakorolt hatását, illetve magán a kukoricánövényen végzett vizsgálatok eredményeit értékelik és veszik figyelembe. A növény által termelt toxin nem áll rendelkezésre a vizsgálatokhoz. A *DAS-59122* esetében a nem célszervezetek közül a bogarak rendjébe tartozó *Hippodamia convergens* (Guérin-Méneville) és *Coleomegilla maculata* (De Geer) katicabogárfajok lárváin végzett akut etetési vizsgálatok során nem volt mortalitás a toxinok esetében, még a növény által termelt koncentrációsinteket meghaladó mennyiségénél sem. A *Coleomegilla maculata* esetében azonban a lárvák fejlődésében 80%-os visszamaradást figyeltek meg. Rekombináns toxinra vonatkozóan  $LC_{50}(\text{Cry34Ab1}) > 900 \mu\text{g/ml}$ ,  $LC_{50}(\text{Cry35Ab1}) > 2 \mu\text{g/ml}$ , a növényi toxinokra vonatkozóan pedig  $LC_{50}(\text{Cry34Ab1}) > 58,50 \mu\text{g/g}$  és  $LC_{50}(\text{Cry35Ab1}) > 0,02 \mu\text{g/g}$  értékeket határoztak meg *C. maculata* katicabogárfajra. A növényi toxinra vonatkozó értékeket pollenetetéses vizsgálat során határozták meg (US EPA 2010). Az EFSA tudományos állásfoglalásában kijelentette, hogy a Cry34/35Ab1-toxinok toxikusak lehetnek *C. maculata* lárváira, azonban csak a természetes kitettséget meghaladó szinten; káros hatás nem volt tapasztalható, amikor a lárvák GM kukorica pollenjét fogyasztották természetes táplálékukhoz keverve. A szakmai állásfoglalásban azonban további, szubletális hatásokat célzó vizsgálatok eredményeit kérte az EFSA az engedélyt kérő cégtől. A cég két, hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) egyedein végzett vizsgálat eredményét – melyből az egyik triatófikus rendszerben történt – nyújtotta be. A kiegészítő vizsgálatok

eredményei alapján az EFSA véleménye szerint a *DAS-59122* kukorica nem jelent veszélyt sem a *C. septempunctata*, sem más katicabogárfaj egyedeire vonatkozóan, s a katicabogárfajok esetspecifikus vizsgálata nem szükséges (EFSA 2013). A tritrófikus rendszerben való hatásvizsgálat — melynek során a *Bt*-növényen élő levéltetveket fogyasztó katicabogár-egyedek a tesztszervezetek — jelentősége abban áll, hogy a Cry34/35Ab1-toxinok indirekt hatását vizsgálja. Bizonyított, hogy a *Bt*-növény által termelt toxin a levéltetveken keresztül magasabb trófikus szinteken is kifejti kedvezőtlen hatását (ZHANG *et al.* 2006b).

## 2.7. A Cry-toxinok analitikai mérési módszerei

### 2.7.1. Műszeres analitikai eljárások

A Cry-toxinok – mint fehérje jellegű célvegyületek – kimutatására és mennyiségi meghatározására számos műszeres analitikai eljárás áll rendelkezésre, melyek gyakorlati alkalmazhatóságának azonban sok esetben korlátot szabnak a lektin típusú Cry-toxinfehérjék egyedi jellegzetességei (nagyfokú adszorptív jelleg, bomlékonyság). Kimutatásuk lehetséges nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás (YAMAMOTO 1983, WITTEWERT *et al.* 1990, MASSON *et al.* 1998, KRAMAZ *et al.* 2007), ionkromatográfiás (WU *et al.* 2001), illetve kapilláris elektroforézis (LIU és ZHENG 2001, LUNG *et al.* 2004) és gélelektroforézis (CRESPO *et al.* 2008, BRUSSOCK és CURRIER 2009) technikákkal, s emellett a toxinfehérje nagy pontosságú azonosítása megtörténhet molekulatömeg vagy aminosav-szekvencia alapján, mátrixasszociált lézereszorpciós és ionizációs technika segítségével repülésiidő-analizátorral (RANASINGHE és AKHURST 2002, GUIDI *et al.* 2013,) vagy proteomikával kombinálva (NGUYEN és RUSSEL 2010). A nagyteljesítményű folyadékkromatográfiás eljárásokat, azon belül is a fordított fázisú és anioncserélő elválasztáson alapuló módszereket első sorban a *Bt*-toxinok elválasztására és azonosítására írták le, az UV detektorral történő azonosítás hátránya a jelentkező interferencia (CLARK *et al.* 2005), a tandem tömegspektrométerrel kapcsolt eljárás alkalmas a *Bt*-toxinok azonosítására (SUN *et al.* 2013, ZHANG *et al.* 2014).

A *Bt*-toxinok méret szerinti elválasztására és azonosítására a gélelektroforézis-technika is széleskörben alkalmazott eljárás, melynek leggyakoribb változata a nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid-gélelektroforézis (SDS-PAGE), illetve az SDS-kapilláris elektroforézis (SDS-CE). Denzitometriával kapcsolva a gélelektroforetikus eljárás alkalmas mennyiségi meghatározásra is (CRESPO *et al.* 2008, BRUSSOCK és CURRIER 2009). Az SDS-PAGE módszerrel meghatározott Cry1Ab-koncentráció ugyanazon mintára vonatkozóan nem különbözik az enzimjelzéses *immunoassay* eljárással (melyet a 2.7.2. fejezet mutat be) meghatározott értéktől, a

két módszer relatív hibája sem tér el szignifikánsan egymástól (CRESPO *et al.* 2008). A GIOVANNOLI és mtsai. (2008) által kidolgozott versengő kapilláris elektroforézis-módszer *immunoassay* lézerindukált fluoreszcens detektálással 0,5 nM kimutatási határral alkalmas Cry1Ab-koncentráció meghatározásra, mely – aktivált Cry1Ab-toxin esetén – 33 ng/ml koncentrációnak felel meg.

A műszeres eljárások problémája, hogy szükséges minta-előkészítésük pénz- és időigényes, hiszen a Cry-toxinok lektin típusú fehérjék, így – biológiai funkciójukból is adódó – igen erős adszorptív, kitapadási képességük miatt a minta-előkészítés nemcsak munkaigényes, de nehezen reprodukálható is (az edényzet falán megkötődő toxinmennyiségből adódó veszteség számottevő és változó, vagyis a visszanyerés kedvezőtlen és pontatlan) (TOMPKINS *et al.* 1990, WITTEWER *et al.* 1990). A műszeres eljárásokat a Cry-toxinok azonosítására és elválasztására leírják ugyan a szakirodalomban, azonban ezen módszerekkel történő mennyiségi kimutatásukra vonatkozó tanulmány kevés van. Azon vizsgálatok, melyek műszeres analitikai módszert alkalmaznak mennyiségi meghatározásra, nem részletezik a használt eljárás analitikai jellemzőit (pl. kimutatási határ), így egymással való összehasonlításuk csak a gyakorlatban lehetséges.

### **2.7.2. Immunanalitikai eljárások**

A műszeres analitikai módszerek gyakorlati nehézségei (ld. fent) miatt a Cry-toxinok kimutatásának elterjedt módját az ELISA eljárások képezik (HUBER-LUKAC *et al.* 1983, WALSCHUS *et al.* 2002, GROTHAUS *et al.* 2006, WANG *et al.* 2007), továbbá olyan immunanalitikai eljárások, mint a *dot blot* (TAPP és STOTZKY 1995), áramló oldatos (ERMOLLI *et al.* 2006a) és mikrogyöngy alapú (ERMOLLI *et al.* 2006b, FANTOZZI *et al.* 2007) *immunoassay* eljárások, illetve elektrokémiai szenzor (VOLPE *et al.* 2006).

Az ELISA rendszerek mérési alapelve az, hogy a mérendő anyaggal (célvegyülettel) szemben állati szervezetből nyert antitestet alkalmaz a célvegyület szelektív felismerésére. Az antitest és az antigén között specifikus kapcsolat alakul ki, az antitest felismeri és hozzákötődik a megfelelő epitóphoz. A poliklonális antitest (nyúl, kecske, birka eredetű) több B-sejtvonalból származó immunoglobulinok kombinációja, amelyek az antigén több epitópját ismerik fel. Ezzel szemben a monoklonális antitest (egér vagy patkány eredetű) egyetlen B-sejtvonalból származó immunoglobulinok összessége, amelyek az antigén egyetlen epitópját ismerik fel.

Az ELISA eljárás az antigén–ellenanyag-kötésen alapuló jelzések egyik, ma legelterjedtebben alkalmazott módszere. Alkalmas antigének vagy ellenanyagok kimutatására és mennyiségi mérésére. A módszer lényege, hogy a szilárd fázishoz kötött egyik immunkomponens (antigén vagy ellenanyag) és az oldatban lévő másik komponens (ellenanyag

vagy antigén) kapcsolódását az oldott komponenshez kovalensen kötött enzim működése jelzi. Az antigén–ellenanyag-kapcsolódás kimutatásához olyan kromoforra van szükség, amely az enzimreakció következtében színváltozáson megy át. Így az átalakított kromogén mennyisége az abszorbancia (optikai sűrűség; *optical density*, OD) mérésével követhető, és arányos az enzimaktivitással, ami a megkötött antigén vagy ellenanyag mennyiségének függvénye. A módszerek két típusát különítjük el. A direkt ELISA során az enzimjelölést közvetlenül az antigén–ellenanyag reagenspár egyikén helyezzük el; az antigént vagy az ellenanyagot szilárd fázishoz kötött formában, míg a másik, oldott fázisban lévő komponenst jelölt formában alkalmazzuk. Az indirekt eljárás során a szilárd fázison lezajló antigén–ellenanyag-reakciót enzimmel jelzett második, előhívó reagenssel mutatjuk ki. Ez lehet a reakció ellenanyag-komponense ellen irányuló jelzett ellenanyag (az ellenanyagot szolgáltató faj immunglobulinjaival reagáló, enzimmel jelzett ellenanyag) vagy pedig olyan enzimmel jelzett fehérjék, amelyek nagy kötése erősséggel képesek ellenanyagokhoz kötődni. Több antigéndetermináns csoporttal (epitóppal) rendelkező, nagy molekulatömegű célvegyületek (mint a Cry-toxinok) esetén mód nyílik a kettős ellenanyag-szendvics módszer alkalmazására: ennek során a szilárd fázishoz kötött ellenanyaghoz kapcsolódó antigén kimutatására egy másik, ugyanazzal az antigénnel kapcsolódni képes, enzimmel jelzett ellenanyagot használnak. A két ellenanyagnak ebben az esetben az antigén két eltérő epitópja ellen kell irányulnia. Az ELISA eljárást széleskörben alkalmazzák Cry-toxin meghatározásra mikrobiális készítményekben (TAKAHASHI *et al.* 1998, CRESPO *et al.* 2008), illetve Cry-toxint termelő GM növényekben és az ezeket tartalmazó élelmiszerekben (SIMS és BERBERICH 1996, STAVE 1999, 2002, ADAMCZYK *et al.* 2001, XIE és SHU 2001, BRUNS és ABEL 2003, MENDELSON *et al.* 2003, ZWAHLEN *et al.* 2003, CHILCUTT és TABASHNIK 2004, BAUMGARTE és TEBBE 2005, DOUVILLE *et al.* 2005, HARWOOD *et al.* 2005, EZEQUIEL *et al.* 2006, MARGARIT *et al.* 2006, NGUYEN és JEHLE 2007, CHEN *et al.* 2009).

A Cry-toxinok kimutatására alkalmasak a szintén szelektív antigén–antitest-kapcsolaton alapuló, kapilláris elektroforézissel kapcsolt *immunoassay* (GIOVANNOLI *et al.* 2008) (ld. fent) és immunszenzorikai eljárások, melyek előnye a nagyságrendekkel alacsonyabb kimutatási határ. Utóbbiak alkalmazása a Cry-toxin analitikában, így a *Bt*-növények környezetanalitikájában jelenleg kevésbé elterjedt. Az alkalmas módszer kifejlesztése Cry-toxinok kimutatására és alkalmazásuk a környezeti hatásvizsgálatokban indokolt lenne.

### **2.7.3. Az ELISA eljárások Bt-növények toxintartalmának meghatározásában való alkalmazásainak problémái**

A GM növények többsége, így a *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukorica is, a Cry1Ab-toxin egy kurtított formáját (preaktivált toxin) termeli. A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztsomagok (*kitek*) azonban analitikai standardként a Cry1Ab protoxin formáját alkalmazzák, és a felismerésre alkalmas antitest is protoxin-specifikus. Analitikai szempontból tehát ezen ELISA rendszerek nem alkalmasak a növényi toxin minőségi vagy mennyiségi meghatározására. Megoldást jelentene a növényi toxin analitikai standardként való alkalmazása vagy a protoxin enzimátikus emésztés útján való aktiválása az analitikai meghatározást megelőzően. Az első megoldás kivitelezése technikailag nem oldható meg, ugyanis a növény által termelt toxin – szellemi tulajdon-védelmi okokból – nem áll rendelkezésre sem analitikai, sem környezeti kockázatelemzési vizsgálatokhoz. A protoxin enzimátikus úton való aktiválása részleteiben ismert folyamat, ilyen típusú eljárásokra kidolgozott protokollok léteznek (LILLEY *et al.* 1980, LAMBERT *et al.* 1996, SHAO *et al.* 1998, MIRANDA *et al.* 2001, MOHAN és GUJAR 2003). A hivatalos engedélyezési dokumentumokban foglaltak szerint a mikrobiális protoxin és a növényi preaktivált toxin enzimátikus hasítása ugyanazt a 63 kDa molekulatömegű, aktivált toxinmolekulát eredményezi (EFSA 2005). Továbbá az is bizonyított, hogy az aktivált toxint és a növényi preaktivált toxint a Cry1Ab-specifikus antitest ugyanolyan mértékű keresztreaktivitással<sup>2</sup> ismeri fel (US EPA 2001). Az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate és az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag esetében határozta meg SZÉKÁCS *et al.* (2010) a protoxin kimutatására alkalmas rendszerek aktivált toxinnal való keresztreakcióját. A CR-érték EnviroLogix ELISA rendszer esetében 0,412, az Abraxis ELISA eljárásnál 0,564. Cry1Ab-toxint termelő *Bt*-növények toxinkoncentrációjának meghatározásakor az eredményeket, amennyiben az alkalmazott analitikai eljárás a protoxin kimutatására alkalmas ELISA rendszer, ezen CR-értékekkel korrigálni szükséges. Fontos hangsúlyozni, hogy a szakirodalomban közölt adatok többsége (köztük a fajtatulajdonosok által az engedélyezéshez készített fajtadokumentációk is!) ezt a korrekciót nem tartalmazza, így a tényleges toxintartalmakat – a megfelelő keresztreaktivitásoktól függő mértékben – alulértékeli.

A Cry1Ab-koncentrációk meghatározásában ugyanazon standard növényi minta esetében is szignifikánsan eltérő toxintartalmat mér két, felépítésében eltérő ELISA rendszer. Az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate ELISA rendszert a 2005-ben történt piaci visszavonása előtt széleskörűen alkalmazták a *Bt*-növények által termelt Cry1Ab-toxinok mennyiségi meghatározására, illetve a toxin élelmiszeripari termékekben és állati szövetekben való nyomon követésére (ADAMCZYK *et al.* 2001, HILBECK 2001, XIE és SHU 2001, BAUMGARTE és TEBBE 2005, HARWOOD *et al.* 2005, ERMOLLI *et al.* 2006b,

<sup>2</sup> Keresztreakciónak (CR) nevezzük azt a jelenséget, mikor egy adott analitikai rendszer a molekulák hasonlósága miatt a célvegyülethez hasonló molekulákat is valamilyen mértékben felismer és mennyiségileg kimutat.



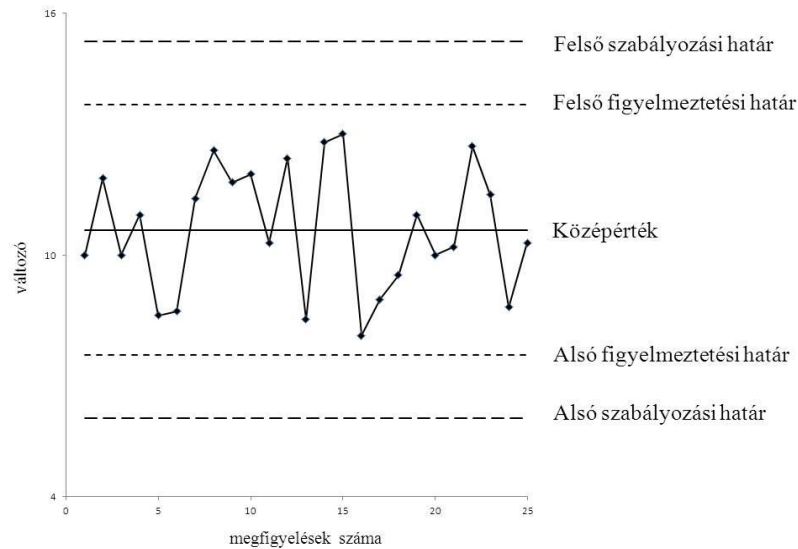
GROTHAUS *et al.* 2006, MARGARIT *et al.* 2006, CHEN *et al.* 2009). A visszavonás után kereskedelmi forgalomban, mennyiségi kimutatásra az Abraxis (Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztcsomag) által fejlesztett módszer állt rendelkezésre hasonló vizsgálatokhoz (CRESPO *et al.* 2008). Mindkét cég által piacra hozott eljárás szendvics típusú ELISA rendszer, melyek protoxin analitikai standard oldatokat és protoxin-specifikus antitesteket alkalmaz. A különbség, hogy míg az Abraxis poliklonális nyúl antiszérumot és anti-nyúl IgG-peroxidáz konjugátumot használ, addig az EnviroLogix antiszérum-peroxidáz konjugátumot, tehát ez utóbbi esetben a kimutatás folyamata két lépéssel rövidebb. Az immunkomplex felépülésében jelenlévő különbség megmutatkozik az aktivált toxinnal való CR-értékben is. Standard növényi minta Cry-toxintartalmának meghatározásakor az EnviroLogix ELISA tesztcsomag 2,36-szor, míg a CR-értékkel korrigált szinten 3,24-szer magasabb toxinkoncentrációt eredményezett (SZÉKÁCS *et al.* 2010).

## 2.8. Az analitikai eljárások belső minőségellenőrzésének módszerei

A laboratóriumi belső minőségellenőrzés (*Internal Quality Control, IQC*) célja az analitikai eljárások reprodukálhatóságának (pontosságának) és torzításmentességének vizsgálata. Ennek egyik eszköze a készülékhez, analitikai módszerhez alkalmazott reagenskészletben található, a tesztcsomag gyártója által szolgáltatott kontrollanyag. Ez standardként szolgál, amelynek pontos (nominális) koncentrációértékét a kvantitatív tesztekhez a gyártó megadja, míg kvalitatív tesztekhez nem.

Annak vizsgálata, hogy egy mérési módszer több mérés során a standard minta nominális értékét kellő pontossággal adja meg, statisztikai szabályozó kártyák segítségével történik, melyek kialakítása *Walter A. Shewhart* nevéhez fűződik (SHEWHART 1931). A *Shewhart*-féle kétoldali szabályozó kártyák az alábbi részekből állnak (5. ábra):

- Pontok, melyek a független mérések során meghatározott változók (átlag, tartomány, arány) értékei
- Középpérték, mely a független mérésekből származó változók, vagyis az ábrázolt pontok átlaga
- Alsó és felső figyelmeztetési határ (*Lower and Upper Warning Limit, LWL and UWL*), mely a középpértéktől 2 szórásnyi távolságra vannak
- Alsó és felső szabályozási határ (*Lower and Upper Control Limit, LCL and UCL*), mely a középpértéktől 3 szórásnyi távolságra vannak



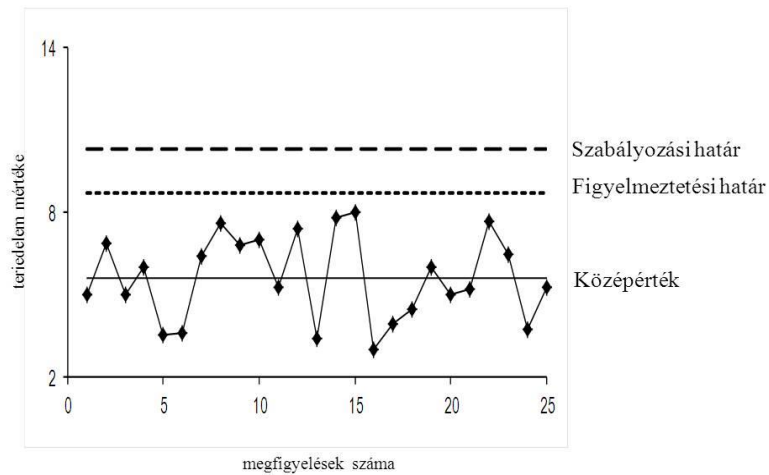
5. ábra. A *Shewhart*-féle kétoldali átlagkártya sematikus képe. A pontok a független mérések során meghatározott változó értékei, a középérték a változók átlaga, a figyelmeztetési határok a középértéktől 2 szórásnyi, a szabályozási határok a középértéktől 3 szórásnyi távolságra helyezkednek el.

A *Shewhart*-féle szabályzó kártyák a vizsgált adatsor szórását, eloszlását elemzik az átlag körül. A vizsgált rendszert akkor tekinthetjük stabilnak vagy statisztikailag kézben tartottnak, ha középértéke és szórása időben állandósult. A gyakorlatban ha a pontok 95%-a a figyelmeztetési határok közé, illetve 99,7%-a a szabályozási határok közé esnek, az analitikai rendszer reprodukálhatónak és torzításmentes eredményeket biztosítónak minősül. Bármilyen szisztematikus mintázat vagy a határokon kívül eső pont esetén a rendszer bizonytalan, az eredmények megkérdőjelezhetőek (FAO 1998).

A méréses ellenőrző kártyák másik típusa az egyoldali terjedelmekártya, mely az alábbi részekből áll (6. ábra):

- Pontok, melyek egy adott mérés során mért változók legmagasabb és legalacsonyabb értékei közti különbség mértékét mutatják
- Középérték, mely a független mérésekből származó változók, vagyis az ábrázolt pontok különbségeinek átlaga
- Figyelmeztetési határ (*Warning Limit, WL*), mely a középértéktől 2 szórásnyi távolságra van
- Szabályozási határ (*Control Limit, CL*), mely a középértéktől 3 szórásnyi távolságra van

A terjedelmekártya legalacsonyabb értéke nulla, mely esetben az adott mérés során nincs különbség az ismétlések között. A rendszer stabilitásának megítélése ebben az esetben megegyezik a *Shewhart*-féle kártya kritériumaival.



6. ábra. Az egyoldali terjedelmkártya sematikus képe. A pontok az egy adott mérés során mért változók legmagasabb és legalacsonyabb értékei közti különbségek, a középérték a független mérések során meghatározott különbségek átlaga, a figyelmeztetési és szabályozási határok elhelyezkedése megegyezik a *Shewhart*-féle kártya azonos határainak helyzetével.

Az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztcsomag és EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate az analitikai megbízhatóságának vizsgálata során rendre az 1 ng/ml és 2,5 ng/ml koncentrációjú standard oldatok minőségellenőrzése során mindkét analitikai pont megbízhatónak és jól reprodukálhatónak bizonyult, átlagosan a nominális koncentrációtól 4,39% 4,82%-ban tért el a számított koncentráció a független mérések során (SZÉKÁCS *et al.* 2010).



### 3. ANYAG ÉS MÓDSZER

#### 3.1. A vizsgálatok során alkalmazott pufferoldatok, műszerek és számítógépes programok

A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztsomagok kalibrációjának vizsgálata, illetve a körmérés során a szigmoid kalibráló görbéket Tween 20 detergenst tartalmazó vagy nem tartalmazó foszfátpuffer-oldatban (PBST vagy PBS) vettük fel az Abraxis vagy az Envirologix cégtől vásárolt toxinnal. A foszfátpuffer összetétele a következő volt 5 literre vonatkoztatva: 57,75 g dinátrium-hidrogén-foszfát ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ ), 200 g nátrium-klorid (NaCl), 5 g kálium-dihidrogén-foszfát ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 5 g kálium-klorid (KCl), 5 l desztillált víz. A pH-t 7,2–7,4 értékre állítottuk be. A Tween 20 detergenst 0,05% (v/v) arányban adtuk a pufferoldathoz.

A lineáris, illetve szigmoid kalibrációs görbéket Cry1Ab-toxin meghatározására alkalmas ELISA tesztsomagok esetében *Origin v. 7* (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA), míg a Cry34/35-toxinok esetében *Microsoft Excel v. 2010* programcsomaggal ábrázoltuk. Az ELISA mérések kiértékelése során az optikai sűrűséget (denzitást) iEMS MF lemezolvasóval (LabSystems, Helsinki, Finnország) és *Ascent v. 4.2* szoftverrel (LabSystems, Helsinki, Finnország) mértük és értékeltük. A *Shewhart*-féle kétoldali átlagkártyát és az egyoldali terjedelmkártyát szintén *Origin v. 7* szoftverrel ábrázoltuk. A statisztikai elemzéseket *Statistica v. 6.1* programcsomaggal végeztük el.

#### 3.2. Kereskedelmi forgalomban kapható, Cry1Ab-toxin kimutatására alkalmas ELISA tesztsomagok kalibrációjának vizsgálata

A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA rendszerek kalibrációjának vizsgálata során összehasonlítottuk a mennyiségi kimutatásra alkalmas Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag (#PN 51001, Warminster, PA, USA) (<http://www.abraxiskits.com/moreinfo/PN510001USER.pdf>) és az EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate (#AP 003; Portland, ME, USA) (<https://www.yumpu.com/en/document/view/18625470/quantiplatetm-kit-for-cry1ab-cry1ac-envirologix>.) által biztosított standard oldatokkal felvett kalibrációs görbét a szendvics típusú rendszerekre általánosan jellemző, négyparaméteres szigmoid kalibráló görbével. Összehasonlítottuk továbbá a minőségi kimutatásra alkalmas az Agdia Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA tesztsomag (#PSP 06200, Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) (<https://orders.agdia.com/Documents/m172.pdf>) szigmoid kalibráló görbét – melyet az

Abraxis Inc. cégtől vásárolt standard oldattal vettünk fel — az Abraxis és EnviroLogix ELISA eljárások hasonló paramétereivel.

Az Abraxis tesztesetében a szigmoid kalibráló görbét három különböző forrásból származó (Abraxis Inc.; Szent István Egyetem, MKK, Környezetvédelmi és Környezettoxikológiai Tanszék – Szoboszlai Sándor; Nemzeti Kutatási Tanács, Biotechnológiai Kutatóintézet, Kanada – Luke Masson) Cry1Ab-standard oldatból hígítottuk és vettük fel 0 és 50 ng/ml koncentrációtartományban, PBS pufferben. A teszteset által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris standard görbe sokkal szűkebb tartományban (0–4 ng/ml) teszi lehetővé az analitikai meghatározást. A 37 független mérés során felvett lineáris görbék értékeit az  $(OD-OD_{\min})/(OD_{\max}-OD_{\min})$  képlet alapján normalizáltuk, majd reprodukálhatóságukat vizsgáltuk. A normalizálás nem befolyásolja a kimutatási határt, azonban lehetővé teszi a független mérések során felvett egyenesek összehasonlíthatóságát. Meghatároztuk minden mérés esetében a kapott görbe meredekségét, tengelymetszetét, illetve a regressziós együtthatót, mely megmutatta, hogy mennyire illeszkedik a pontokra a lineáris regressziós egyenes. A következő lépésben összesítettük a 37 mérés lineáris kalibráló egyenesét, és meghatároztuk az átlagegyenes ugyanazon paramétereit. A kimutatási határ<sup>3</sup> értékét is leírtuk, mely a gyakorlatban a háttér átlagos válaszelőjele és a hozzá tartozó tapasztalati szórás háromszorosának összege. Az átlagegyenest az egyes pontokban mért koncentrációk átlaga és szórása jelentette. A szigmoid regressziót a különböző forrásból származó Cry1Ab-toxinok esetében 3 független mérés során határoztuk meg, a kalibráló görbéket normalizáltuk, majd meghatároztuk az átlaggörbék IC<sub>50</sub>-értékét, mely a görbe áthajlási (inflexiós) pontjában mért koncentráció. A kimutatási határ értékét összehasonlítottuk a lineáris regresszióval kalibrált rendszer értékével.

Agdia Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA teszteset és EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate esetében a szigmoid görbéket az Abraxis Inc. cégtől vásárolt Cry1Ab-toxinnal vettük fel szintén 0 és 50 ng/ml koncentrációtartományban. Mindkét teszteset esetében 3 független mérés átlagának szigmoid regresszióját hasonlítottuk az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA teszteset ugyananezen forrásból származó toxinnal felvett görbéjéhez. Meghatároztuk az IC<sub>50</sub> és a közel egyenes szakaszra illesztett egyenes meredekségét. A felvett szigmoid regressziót EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate esetében a teszteset által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris kalibrációhoz hasonlítottuk, melyek legmagasabb koncentrációja 5 ng/ml volt.

---

<sup>3</sup> A kimutatási határ azt a koncentrációsíntet jelenti, amelyhez tartozó válaszelőjele egyértelműen megkülönböztethető a háttértől.

### 3.3. Kereskedelmi forgalomban kapható, Cry1Ab-toxin kimutatására alkalmas ELISA tesztsomagok belső minőségellenőrzése

Vizsgálataink során a 2005-ben a piacról visszavont (SZÉKÁCS *et al.* 2010) EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate 0,5, 2,5 és 5 ng/ml koncentrációjú standard oldatainak, illetve a jelenleg is forgalomban lévő EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate (<http://www.envirologix.com/wp-content/uploads/2015/05/AP003-CRBS-QualiPlate-Cry1Ab-Cry1Ac-011615.pdf>) pozitív és negatív kontroll oldatainak belső minőségellenőrzését végeztük el. Ez utóbbi esetben az EnviroLogix cégtől vásárolt Cry1Ab-toxin alkalmazásával lineáris kalibráló egyenest vettünk fel (0, 0,5, 2,5 és 5 ng/ml), és segítségével meghatároztuk mindkét kontrollpont koncentrációját. A reprodukálhatóság és pontosság elemzésekor a kontrollként használt standard oldatok koncentrációját határoztuk meg az Abraxis ELISA tesztsomag esetében 37, míg az EnviroLogix ELISA tesztsomagok esetében 36 egymástól független mérés során. A meghatározás során a kalibráló egyenest az adott kalibráló pont kihagyásával vettük fel, és az egyedi mérésekben mért átlagkoncentrációkat ábrázoltuk a *Shewhart*-féle ellenőrző kártyán. A Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate pozitív és negatív kontrolljainak egy lemezen való ismételhetségét a méréses ellenőrző kártyák közül a terjedelmkártyával elemeztük (*Control Chart of the Range of Duplicates*). Ebben az esetben az adatok ábrázolásakor a mérés folyamán meghatározott OD-értékeket tüntettük fel.

### 3.4. Cry1Ab-toxin kimutatására alkalmas ELISA rendszerek alkalmazhatóságának összehasonlítása nemzetközi körmérés keretében

Nemzetközi együttműködés keretében vizsgáltuk különböző ELISA rendszerek alkalmazhatóságát *MON 810* genetikai eseményt hordozó GM kukorica Cry1Ab-tartalmának meghatározásában. A vizsgálatban négy laboratórium vett részt: (a) Magyar Tudományos Akadémia (MTA) Növényvédelmi Kutatóintézete (NKI) (Budapest, Magyarország), (b) Genøk Centre of Biosafety (Tromsø, Norvégia), (c) Ecostrat GmbH (Berlin, Németország) és (d) Department of Environmental Sciences, Institute of Integrative Biology, ETH (Zürich, Svájc). A körmérési vizsgálat célja annak számszerűsítése volt, hogy a toxintartalom meghatározásakor alkalmazott ELISA rendszerek különbözősége mennyiben magyarázza a szakirodalomban előforduló Cry1Ab-koncentrációk nagymértékű változékonyságát. Meghatároztuk az emberi és műszeres forrásból származó, illetve a mérés különböző szintjein (lemezen belüli, lemezek közötti, laboron belüli és laborok közötti) fellépő hibák mértékét ugyanazon ELISA rendszer alkalmazása esetén. Három labor az ún. közös protokoll mellett saját ELISA eljárással is

meghatározta ugyanazon minták toxintartalmát, így lehetővé vált a különböző módszerek összehasonlítása.

### 3.4.1. Minták

A *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-toxintermelését számos tényező befolyásolja (pl. fajta, talajtípus, levélszint stb.), így a körmérés során standard növényi minták toxintartalmát határoztuk meg, elkerülve így a biológiai tényezők okozta eltéréseket. Négy különböző *MON 810* kukoricafajta és két megfelelő közel izogenikus vonal levélmintái liofilizálást vagy levegőn szárítást és fagyasztást követő homogenizálás után vettek részt a vizsgálatban. Az „A” és „D” jelű minták üvegházi körülmények között termesztett kukorica V9 fenológiai stádiumának 5. leveléről származtak, az „F” minta V6 (hatleveles állapot) fenológiai stádium 6. levélszintjéről, míg az „L” minta R1 stádium nővirág szintjének levélmintái voltak. Az „F” és „L” minták szabadföldön termesztett kukoricáról származtak (III. táblázat). A levélminták toxintartalmát lemezenként hármas ismétlésben, összesen hat lemezen határoztuk meg.

III. táblázat. A körmérés során mért standard levélminták kódjai, illetve Cry1Ab-meghatározás előtti kezelésük listája.

<b>minta kódja</b>	<b>minta tulajdonságai</b>
„A”	liofilizált és homogenizált levélminta – <i>MON 810</i>
„B”	liofilizált és homogenizált levélminta – <i>közel izogenikus vonal</i>
„C”	liofilizált és homogenizált levélminta – <i>közel izogenikus vonal</i>
„D”	liofilizált és homogenizált levélminta – <i>MON 810</i>
„F”	szárított, fagyasztott és homogenizált levélminta – <i>MON 810</i>
„L”	liofilizált és homogenizált levélminta – <i>MON 810</i>

### 3.4.2. Minta-előkészítés

A toxintartalom-meghatározás első lépéseként a résztvevő laboratóriumok standard minta-előkészítési eljárást alkalmaztak.  $20 \pm 1$  mg vagy  $40 \pm 2$  mg liofilizált vagy szárított levélmintához 8:1 arányban (2,5 vagy 5 ml) PBST pufferbe adagoltunk. Laboratóriumtól függően extrakciós zsákban (Bioreba AG, Reinach, Svájc; #90002) vagy dörzsmozsárban homogenizáltuk a mintákat és vontuk ki a mérendő Cry1Ab-toxint (IV. táblázat). Az extraktumból 1 ml térfogatnyi részt Eppendorf-csőben 12000 1/min fordulatszámra, 10 percig, szobahőmérsékleten centrifugáltuk, majd mértük a toxintartalmat.



### 3.4.3. ELISA módszer

A Cry1Ab-tartalom mérésekor az ún. közös ELISA eljárás alapjaként mind a négy laboratórium a Bt-Cry1Ab-1Ac ELISA tesztsomagot (#PSP06200, Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) használta a toxintartalom meghatározásakor. Analitikai standardként a *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 törzsének *Escherichia coli* baktériumban termeltetett, majd enzimátikus (tripszin) úton aktivált Cry1Ab-toxinját alkalmaztuk, melyet liofilizált formában Marianne Pusztay-Carey (Biochemistry Department, Case Western University, Cleveland, OH, USA) biztosított a vizsgálathoz. A mennyiségi meghatározáshoz szükséges kalibrátor oldatokat minden laboratórium az előzetesen szétosztott standard Cry1Ab-oldatból hígította és vette fel a tesztsomag által biztosított hígító pufferben. A mennyiségi meghatározás során szigmoid kalibrációs görbét alkalmaztunk, melyet 16 pontból vettünk fel 0 és 50 ng/ml koncentrációk között (0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,31, 0,56, 1,6, 2,7, 4,4, 6,8, 10, 20 és 50 ng/ml). A mintákat lemezenként hármas ismétlésben, minimum 2 lemezen, eltérő napokon mértünk meg.

A saját ELISA módszerek alkalmazásakor a közös protokolltól eltérő eljárások eredményeit hasonlítottuk a közös protokoll eredményeihez. Az eltérések adott esetben a minta-előkészítési eljárásban (pl. Tween 20 detergenst tartalmazó bikarbonát extrakciós puffer, BBST), más esetben más gyártó ELISA eljárásának (Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag) alkalmazásában, illetve a kalibráló görbe tulajdonságaiban (szigmoid, lineáris) nyilvánult meg. Az eltéréseket, illetve a laborok által használt leolvasók és szoftverek listáját a IV. táblázat részletezi. (A körmérésekhez előírt anonimitás biztosítására a résztvevő laboratóriumokat Lab1, Lab2, Lab3 és Lab4 néven említtem.)

### 3.4.4. Statisztikai elemzés

A független mérések során felvett kalibrációs görbék összehasonlításakor első lépésként normalizáltuk a szigmoid görbéket az  $(OD-OD_{\min})/(OD_{\max}-OD_{\min})$  képlet alapján, kiküszöbölve ezzel az esetleges háttérzajt, illetve a leolvasásig eltelt idő hatását. A kalibráló görbék felvétele során az 50 ng/ml Cry1Ab-oldat esetében a szigmoid görbe felső platóján visszaesést tapasztaltunk mind a négy laboratóriumban, ezért a normalizálás során a legmagasabb kalibráló pont a 20 ng/ml koncentrációjú oldat volt. A szigmoid görbék esetében meghatároztuk az áthajlási pontokra vonatkozó normalizált értékeket. Egyutas varianciánalízissel (ANOVA) és Tukey *post hoc* teszttel összehasonlítottuk a görbék értékeit három koncentrációsinten: (a) a közel egyenes szakasz kezdeti pontjában (10% — 0,56 ng/ml), (b) az áthajlási pont körül (50% — 4,40 ng/ml), illetve a közel egyenes szakasz tetején (80% — 10 ng/ml). A három pontot azon

analitikai megfontolás alapján választottuk, hogy a mennyiségi meghatározás az áthajlási pont közelében, illetve a közel egyenes szakaszon a legmegbízhatóbb.

A négy laboratórium analitikai méréseiből származó eredményeket az ISO 5725-2 szabvány szerint értékeltük ki (ISO 1994). A minták Cry1Ab-tartalmára vonatkozó statisztikai elemzéseket a négy mintára párhuzamosan végeztük el. A 95%-os konfidenciaintervallumon mért első (adott laboratóriumon belül mért koncentrációk kiugró értékei) és második (a négy laboratóriumban mért koncentrációk átlagainak sorából kilógó adatok) típusú kiugró adatokat Grubb-féle teszt segítségével szűrtük ki, és indokolt esetben kizártuk az elemzésből. Az adatsorok normális eloszlását Shapiro–Wilk-teszttel ellenőriztük  $p=0,05$  valószínűségi szinten. Normális eloszlás esetén az összehasonlítást egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) és Tukey *post hoc* teszttel végeztük el  $p=0,01$  szignifikanciaszinten. Amennyiben az adatsor nem mutatott normális eloszlást, a nem paraméteres eljárások közül a Kruskal–Wallis-rangsoroláson alapuló próbával elemeztük az adatsorokat  $0,01$  szignifikanciaszinten.

Meghatároztuk minden mintára a közös ELISA eljárással mért koncentrációk tapasztalati szórását (*standard deviation, SD*) és a becslés hibájának nagyságát (*standard error, SE*) az egy lemezen mért hármas ismétlések között, a lemezek között, adott laboratóriumon belül, illetve a laboratóriumok között. Az adott laboratóriumon belül a közös protokollal és a saját módszerrel kapott Cry1Ab-koncentrációkat páros t-próbával  $p=0,01$  szignifikanciaszinten hasonlítottuk össze.

IV. táblázat. A körmérésben résztvevő laboratóriumok minta-előkészítési eljárásainak, illetve az alkalmazott analitikai eljárások paraméterei.

	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4
<b>minta-előkészítés</b>				
homogenizálás	extrakciós zsák (Bioreba AG, Reinach, Switzerland)			dörzsmozsár
puffer				
közös módszer	PBST	PBST	PBST	PBST
saját módszer	BBST	-	PBST	Abraxis puffer
<b>analitikai mérés</b>				
ELISA tesztcsomag				
közös módszer	Agdia	Agdia	Agdia	Agdia
saját módszer	Agdia	-	Agdia	Abraxis
ELISA lemezolvasó	Synergy HT (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)	VersaMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)	MR5000 (Dynatech Laboratories, Chantilly, VA, USA)	iEMS MF (LabSystems, Helsinki, Finnország)
szoftver	KC4 v3.4 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)	SoftMax Pro v.5.0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)	MikroWin 2000 (Mikrotek Laborsysteme, Overath, Németország)	Ascent v.4.2 (LabSystems, Helsinki, Finnország)
kalibráció				
közös módszer	szigmoid	szigmoid	szigmoid	szigmoid
saját módszer	szigmoid	-	szigmoid	szigmoid+lineáris

### 3.5. Mátrixhatás vizsgálata kukoricalevél- és sertésszövetekben

Kukoricalevél-szövetben jelentkező esetleges mátrixhatásokat két független vizsgálat során is meghatároztuk. A 3.1. fejezetben részletezett kalibrációra vonatkozó mérések során, az Abraxis Inc. cégtől vásárolt Cry1Ab-toxinnal felvett szigmoid kalibráló görbét DK440, géntechnológiai úton nem módosított kukorica levélmátrixban is felvettük, és  $IC_{50}$ -értékét hasonlítottuk a foszfátpufferben felvett görbe azonos paraméteréhez. Meghatároztuk levélszövetre a kimutatási határt is. Ugyanezen vizsgálat soralkalmával standard addíciós módszerrel is ellenőriztük az esetleges mátrixhatást (KEBEKKUS és MITRA 1998). A mérésnél az MTA NKI Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályának *MON 810* GM kukorica referenciamintáját használtuk, mely R1 fenológiai stádiumban gyűjtött, liofilizált levélminta volt. A  $15,61 \pm 0,41$   $\mu\text{g/g}$  Cry1Ab-toxint tartalmazó liofilizált levélőrlemény extraktumát 1:500-ra hígítottuk foszfátpufferben. 250  $\mu\text{l}$ ,  $1,25 \pm 0,03$  ng/ml toxintartalmú hígított extraktumhoz 100, 200 és 250  $\mu\text{l}$  4 ng/ml koncentrációjú standard oldatot adagoltunk, majd a térfogatot 500  $\mu\text{l}$  térfogatra egészítettük ki. A kapott oldatok Cry1Ab-tartalma így 0,8, 1,6, illetve 2 ng/ml voltak. ELISA mérés után meghatároztuk a regressziós együtthatót, illetve *Student*-féle t-próbával  $p=0,01$  szignifikanciaszinten statisztikailag ellenőriztük a kalibrációs görbével, illetve a standard addícióval mért koncentrációkat.

A Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (jelenleg: Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ (NAIK), Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (ÉKI), Biológiai Osztály) az Európai Unió 7. Kutatási Keretprogramján belül elnyert pályázat keretében (FP7/2007-2013), nemzetközi együttműködésben rövid (31 nap) és hosszú (110 nap) távú etetéses kísérlet során vizsgálta *MON 810* (PR34N44) genetikai eseményt hordozó kukorica és közel izogénikus vonalának (PR34N43) hatását sertéseggedeken. A kísérletben szív, vese, lép, máj, izom, nyirokcsomó, agy és vérszérum Cry1Ab-tartalmát határozták meg kezelésenként 10-10 egyed esetében. A méréseket EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate ELISA rendszerrel végezték el, ahol a kalibrációhoz szükséges standard oldatokat szintén az EnviroLogix cégtől vásárolták meg. A mennyiségi meghatározás 0 és 5 ng/ml koncentrációtartományban volt lehetséges (WALSH *et al.* 2011, WALSH *et al.* 2012, BUZOIANU *et al.* 2012). A mátrixhatások leírásánál a NAIK ÉKI Biológiai Osztályával együttműködve a kísérletben a közel izogénikus kukoricát fogyasztó egyedek szövetmintáinak mérési eredményeit használtuk fel. Meghatároztuk 3 független mérés eredményeként minden vizsgált szervre a kimutatási határt, illetve a legmagasabb standard oldathoz (5 ng/ml) viszonyított relatív abszorbanciaértéket ( $OD/OD_{\text{max}}$ ).

### 3.6. Cry4-toxin kimutatására alkalmas ELISA rendszer fejlesztése

A szendvics típusú ELISA rendszer fejlesztéséhez szükséges Cry4 fehérjét a New York Egyetem, Mikrobiális Ökológia Laboratóriuma (New York, NY, USA), a Cry4-specifikus antiszérumot az EnviroLogix Inc. (Portland, ME, USA) biztosította. A Cry4-toxin Cry4A- (128 kDa) és Cry4B- (135 kDa) fehérjék keveréke volt, melyet a TEKNAR folyékony készítményből izolált *B. thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) kultúrából tisztított az Abbot Laboratórium (Chicago, IL, USA) LEE *et al.* (2003) által közölt módszer alkalmazásával. A fehérjék tisztaságát 1% nátrium-dodecil-szulfát/10% poliakrilamid-gélen végzett elektroforézistechnikával ellenőriztük. A *B. thuringiensis* var. *israelensis* NRRL HD-968 törzsből származó fermentált mintát (U.S. *Standard Bti isolate*) Howard T. Dulmage (USDA, Bronsville, TX, USA) biztosította a módszerfejlesztési munkához, melyet a Corax-Bioner Zrt. (Budapest, Magyarország) tartott fenn. A dialízishez Spectra/Por MWCO: 12–14 kDa membránt használtunk (Spectrum Laboratories, Houston, TX, USA). A többi reagenst a Sigma-Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be.

#### 3.6.1. Cry4-specifikus antitest és jelölő enzim összekapcsolása

Az antitest–tormaperoxidáz (*horsereddish peroxidase*, HRP)-konjugátumot HARLOW és LANE (1988) alapján az alábbi két módszerrel szintetizáltuk:

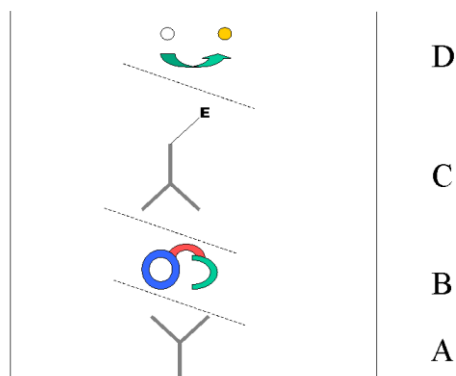
Az első módszer esetében glutáraldehidet használtunk, mely Schiff-bázis keresztkötéseket létesít a különböző láncokon lévő lizinoldalláncok között. 10 mg (250 nmol) HRP enzimet adtunk 0,2 ml 1,25%-os glutáraldehidet tartalmazó, 0,1 M nátrium-foszfát-oldathoz. A keveréket szobahőmérsékleten, 18 órán keresztül ráztattuk, majd géliszűréssel szétválasztottuk a frakciókat. A gélfiltrációt 20–50 kDa molekulatömegű gélmátrix-szal töltött PD-10 oszlopon (Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország) végeztük el, mozgó fázisként 0,15 M nátrium-klorid-oldatot használtunk. Az oszlop alján az eluátumot 150 µl frakciókban gyűjtöttük. Az oldott fehérjét tartalmazó frakciókat 405 nm hullámhosszon mért abszorbanciaértékek alapján válogattuk ki. A legtöbb fehérjét tartalmazó frakciót 24-órás dialízissel választottuk ki, ahol dializáló oldatként 0,05 M nátrium-karbonátot, 0,05 M nátrium-hidrogénkarbonátot és 0,83 M szacharózt tartalmazó oldatot (pH 9,5) használtunk. A dializáló oldatot 4 óránként cseréltük. A dializált oldatot vákuumcentrifugával 1 ml térfogatra töményítettük, 0,1 ml Cry4-specifikus antiszérumot cseppenként hozzáadtunk, majd 4°C-on 24 óráig ráztattuk. A kondenzációs folyamatot 0,1 ml 0,2 M etanolamin-oldattal (pH 7,0) állítottuk le, majd további két órán keresztül 4°C-on ráztattuk a keveréket. A nyers konjugátumoldatot

szintén gélszűrőssel tisztítottuk tovább. A fehérjefrakciót ebben az esetben is 405 nm hullámhosszon mért abszorbanciaértékek alapján választottuk ki.

A második módszer során 1 mg (25 nmol) HRP enzimet oldottunk fel 0,25 ml ioncserélt vízben, majd 1,26 mg (6  $\mu$ mol) nátrium-perjodátot tartalmazó nátrium-foszfát-oldatba (60  $\mu$ l, 0,01 M) szuszpendáltuk. A szuszpenziót 20 percig szobahőmérsékleten ráztuk. A kapott oldatot 4°C-on dializáltuk 0,01 M nátrium-acetát (pH 4,0) dializáló oldattal, melyet 4 óránként cseréltünk. A Cry4-specifikus antitestet 0,1 ml 0,4 M nátrium-karbonát-oldathoz adagoltuk, majd a dializált HRP-oldatot csepenként hozzáadtuk. A keveréket 2 órán keresztül szobahőmérsékleten ráztuk. Az oxidatív folyamatot 0,02 ml 0,1 M nátrium-borohidrid-oldattal állítottuk le, majd az oldatot további 2 órán keresztül szobahőmérsékleten ráztuk. Az antitest–enzim-konjugátumot tartalmazó oldatot gélszűrőssel tisztítottuk PD-10 oszlopon, a mozgó fázis ioncserélt víz volt. A tisztított oldatot mindkét eljárásban 1:1 (v/v) arányban hígítottuk etilén-glikollal és felhasználásig -20°C-on tároltuk.

### 3.6.2. Optimális ELISA rendszer kialakítása

Az ELISA rendszert 96-lyukú mikrotiterlemezen (Nunc, Roskilde, DK, #442404), a direkt, szendvics típusú *immunoassay* elve alapján építettük fel (TIJSSEN 1985) (7. ábra). A mikrotiterlemezt 100  $\mu$ l/lyuk Cry4-specifikus antitesttel érzékenyítettük 4°C-on egy éjszakán keresztül a Cry4 antitest 0,1 M karbonátpufferben hígított (pH 9,6) sorozatával 1:100, 1:200 és 1:625 koncentrációkban. A lemez felületére nem kötődött antitesteket mosással távolítottuk el, melyhez PBST puffert használtunk. A mosási szakaszt négyszer ismételtük meg 250  $\mu$ l/lyuk mosófolyadékkal. A lemezen üresen maradt felületet 1% zselatint tartalmazó PBS pufferrel blokkoltuk 38°C-on egy órán keresztül. A lemezre pipettázott analitikai standardot (0,06–1000 ng/ml koncentráció tartományban 7 koncentráción) és a mintákat (50  $\mu$ l/lyuk) 37°C-on 1 órán keresztül inkubáltuk, majd mosást követően a PBST pufferben hígított antitest–HRP-konjugátumot (50  $\mu$ l/lyuk) 1:50 és 1:30000 hígítási tartományban, 8 koncentrációsinten vizsgáltuk. A lemezt 37°C-on egy órán keresztül inkubáltuk. Mosás után 200 mM kálium-dihidrogénfoszfát-pufferben oldott 1,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és 3 mM 1,2-fenilén-diamint (OPD) adtunk a rendszerhez. Az enzimatis reakció eredményeként bekövetkező színreakciót a megfelelő színintenzitás elérése után (10–60 perc) 4 N kénsavval állítottuk le (50  $\mu$ l/lyuk). A színintenzitást 492 nm hullámhosszon, iEMS mikrotiterlemez-olvasóval határoztuk meg (LabSystems, Helsinki, Finnország). A kalibrációs görbét a standard oldatok nyers eredményeire illesztett négyparaméteres szigmoid görbe adta. Meghatároztuk a kimutatási határt.



7. ábra. A direkt ELISA rendszer működési elve. Az ábra 96-üreges mikrotálca egy üregét jelképezi, melybe az immunreagenseket adagoljuk. A kialakuló immunkomplex szerkezete: az üreg falán rögzített Cry-specifikus antitest (A), Cry-toxin a mintában (B), enzimjelzett Cry-specifikus antitest (C), kolorimetriás szubsztát (D). A szaggatott vonalak mosási lépést jelképeznek az ELISA meghatározás kivitelezése során.

Az analitikai standard görbét VECTOBAC WDG (granulátum) és VECTOBAC 12AS (szuszpenzió) *Bti*-készítménnyel is felvettük, majd a tiszta Cry4-toxint tartalmazó szigmoid görbéhez hasonlítottuk. A VECTOBAC 12AS esetében maga a szuszpenzió, míg VECTOBAC WDG esetében a granulátumokról desztillált vízzel lemosott Cry4-oldat hígítási sorát vizsgáltuk. A vizsgálat célja az volt, hogy meghatározzuk, hogy a két Cry4-tartalmú készítmény, melyek pontos toxintartalma nem ismert, mely hígítási tartományban alkalmasak analitikai standard görbének. Mindkét készítmény esetében meghatároztuk a kimutatási határokat.

### 3.7. Cry34/35Ab1-toxinok kimutatására alkalmas ELISA rendszer kalibráló görbéinek vizsgálata

A vizsgálat során Cry34Ab1 kimutatására a QualiPlate for Cry34Ab1 (#AP054, EnviroLogix Inc., Portland, ME, USA), Cry35Ab1 kimutatására pedig a Cry35Ab1 Plate tesztcsomag (#ABS-011, Acadia BioScience LLC, Portland, ME, USA) ELISA rendszereket alkalmaztuk, melyek kereskedelmi forgalomban kapható, minőségi kimutatásra alkalmas eljárások. A mennyiségi meghatározáshoz a Dow AgroSciences LLC (Indianapolis, IN, USA) biztosította az analitikai standard oldatokat mindkét toxin esetében. Az alkalmazott eljárást pollen-, szár- és levélmintákra a Pioneer Hi-Bred International Inc. (Ankeny, IS, USA) GLP laboratóriuma fejlesztette ki és validálta. Munkánk során vizsgáltuk a PBST pufferben felvett standard görbék stabilitását mindkét toxinra. A kapott analitikai standerdeket fagyasztóban (-

20°C), illetve hűtőben (4°C) StabilZyme SELECT oldattal stabilizált formában tároltuk, majd hasonlítottuk össze ismételhetőségüket a mérések során. A StabilZyme SELECT oldatot (SurModics Inc., Eden Prairie, MN, USA) – mely egy olyan biológiailag aktív összetevő, ami biztosítja az ELISA rendszerben a tormaperoxidáz-antitest konjugátum aktivitásának állandóságát – 25%-ban adtuk a foszfát-pufferhez. A kalibráló görbéket 0, 0,3, 0,6, 1,2, 2,4, 3,6, 4,8 és 6,0 ng/ml standard oldatokkal vettük fel. A 3.8. fejezetben ismertetett kísérletsorozat alkalmával mértük a pollen, a levélalap és a levéllemez toxintartalmát, meghatároztuk az esetleges mátrixhatásokat, illetve a jelentkező mátrixhatások elkerüléséhez szükséges minimális hígításokat. A szabadföldi kísérleti parcellákról gyűjtött kontrollkukoricák pollen és zöld levél növényi szövetmintákat mesterségesen szennyeztük a kalibráló görbe 0, 0,6 és 4,8 ng/ml koncentrációjú Cry34Ab1 és Cry35Ab1 toxinoldataival. A szövetmintákat hígítatlanul, illetve 1:10, 1:100, és 1:1000 hígításokban vizsgáltuk. A különböző mátrixokban felvett standard görbéket a foszfát-pufferben felvett standard görbékkel hasonlítottuk össze, illetve meghatároztuk kimutatási határokat mindkét mátrixra. A mérés végén az abszorbanciát, vagyis az OD-értékeket iEMS mikrotiterlemez-olvasóval (Labsystem Oy, Helsinki, Finnország) és Ascent v.2.4. szoftverrel detektáltuk, 450 nm hullámhosszon. A standard görbék összehasonításához a kapott OD-értékeket normalizáltuk az  $(OD - OD_{\min}) / (OD_{\max} - OD_{\min})$  képlet alapján, majd másodfokú polinómot illesztettünk rájuk.

### **3.8. A *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-toxintermelését befolyásoló tényezők**

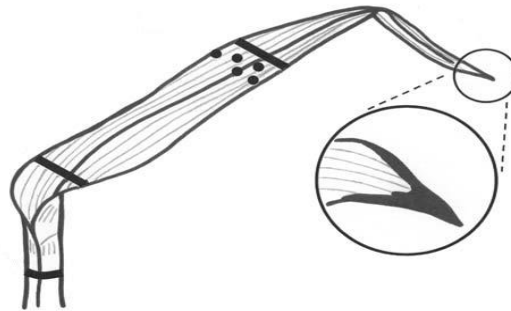
#### ***3.8.1. A Cry1Ab-toxintartalom horizontális és vertikális eloszlása***

A vizsgálat során meghatároztuk, hogyan változik a *MON 810* GM kukorica egyes levélszintjeinek a Cry1Ab-toxintermelése (vertikális eloszlás), illetve hogyan változik egy adott levélszinten belül a toxinkoncentráció (horizontális eloszlás). Tanulmányoztuk továbbá a levél öregedési folyamatának hatását a Cry1Ab-termelésre vonatkozóan, melynek során zöld, sárga (félig elhalt) és barna (elhalt) levelek toxintartalmát mértük. A levelek toxintartalmát Abraxis ELISA tesztsomag segítségével, a benne meghatározott protokoll alapján határoztuk meg. A vizsgálathoz a *MON 810* (DK440-BTY) és közel izogénikus vonalának (DK440) magjait a Monsanto Hungária Kft. (Budapest, Magyarország) biztosította számunkra. A növényeket szabadföldi körülmények között, az MTA NKI Ökológiai Kísérleti Állomásán termesztettük (Julianna-major, Nagykovácsi, Magyarország). A beültetett terület 400 m<sup>2</sup> volt, ahol köpenyvetésnek 6 sor izogénikus kukoricát vetettünk. A termesztés 25 cm-es tőtávval és 70 cm-es sortávval történt.



Az egyes levélszintek Cry1Ab-tartalmának vizsgálatához a kukorica R3 fenológiai stádiumában vettünk mintát, minden levél középső részéből egy körülbelül 5 mm vastag keresztirányú csíkot, melynek tömege megközelítőleg 80 mg volt. A mintákat mérésig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

Az adott levélen belüli toxineloszlás vizsgálatához a kukoricanövények alulról számított 10. levélszintjét mintáztuk, mely az első nővirágot tartó levelet jelentette. A mintákat R4 fenológiai stádiumban vettük. A toxineloszlást hosszirányú és keresztirányú minták Cry1Ab-toxintartalmának mérésével határoztuk meg. Hosszirányban 5 mm vastag keresztirányú csíkokat, míg keresztirányban 5 mm átmérőjű korongokat vágunk ki a levélből (8. ábra). A levél csúcsi részét a már félig vagy teljesen elhalt szöveggel együtt, illetve anélkül is mintáztuk. A mintákat mérésig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.



8. ábra. A Cry1Ab-toxin levélen belüli eloszlásának vizsgálatokor vett minták elhelyezkedése a levéllemezen és a levélhüvelyen. Az 5 mm vastag keresztirányú csíkok mérésével a hosszanti, míg az 5 mm átmérőjű korongok vizsgálatával a keresztirányú toxineloszlást határoztuk meg. A levél csúcsi részén a félig vagy teljesen elhalt szövetet a levél még zöld részével, illetve anélkül is mintáztuk. (rajz: Kugler Nikolett)

A kukorica későbbi (R4) fenológiai stádiumában zöld, sárga (félig elszáradt) és barna (elszáradt) levélmintákat gyűjtöttünk, hogy a száradási folyamat Cry1Ab-termelésre gyakorolt hatását vizsgáljuk. A mintavétel során olyan levelekből vettünk mintákat, ahol mindhárom elszáradási fázis jelen volt. A Cry1Ab-koncentrációt Abraxis ELISA tesztsomag segítségével mértük, a mintákat mérésig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

### 3.8.2. A Cry1Ab-toxintartalom változása különböző termesztési körülmények között

Vizsgálatunk során két *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukorica (*MON 810* „A” és *MON 810* „B”) Cry1Ab-toxintermelésének változását elemeztük szabadföldi (Nagykovácsi,

Julianna-major), „félszabadszíri” és üvegházi körülmények között. Az üvegházi kísérlet során mindkét *MON 810* GM kukoricavonalat tenyészedeényekben (d=30 cm cserepekben), virágszíriben neveltük (FLORIMO általános virágszíri, pH 6,4–6,9), mely *Sphagnum* mohatözege, síkláptözege, biohumusz, komposztált marhatrágya, agyag és mütrágya keveréke. A „félszabadszíri” körülmény esetén tenyészedeényekben virágszíriben és agyagbemosódásos barna erdőtalajban is vetettünk kukoricát. Ezen talajtípusnál a humuszosodás, a kilúgzás és az agyagosodás folyamatait az agyagos rész vándorlása és a közepes mértékű savanyosodás kíséri. Jellemző továbbá a kedvező vízgazdálkodás, illetve a közepes tápanyag-gazdálkodás. „Félszabadszíri” körülményt jelentett a tenyészedeények kihelyezése a szabadszíri parcella mellé. A tenyészedeényekbe 1-1 kukoricamagot ültettünk. A szabadszíri parcellába, mely agyagbemosódásos barna erdőtalaj, csak a *MON 810* „B” kukoricát vetettük 25 cm-es tőtávolsággal és 70 cm-es sortávolsággal. Minden vizsgált kezelést 10-10 ismétlésben végeztünk el. A mintavétel során a kukoricánövények vegetatív (levél, levélhüvely, szár, gyökér, csuhélevél) és generatív (bibe, címer) részeit is mintáztuk a kukorica R2 fenológiai stádiumában. A toxintartalom tenyészidőszak során bekövetkező változásának vizsgálatához a Cry1Ab-koncentrációt a levelek száradási folyamatában is nyomon követtük. A zöld levélmintát a nővirág szintjén, a félig nekrotizálódott (sárga) levelet a nővirág alatti 2., a teljesen nekrotizálódott (barna) levelet a nővirág alatti 4. szinten lévő levél jelentette. A mintákat az analitikai mérésig -20°C-on tároltuk, a Cry1Ab-toxintartalmat Abraxis tesztsomag segítségével határoztuk meg. Az eredményeket egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) és Tukey *post hoc* teszttel értékeltük, mivel az adatsorok eloszlása minden esetben normálisnak adódott (Shapiro–Wilk-teszt, p=0,05).

### 3.8.3. Mütrágyakezelés hatása a Cry1Ab-toxintermelésre

Vizsgálatainkat *MON 810* (DK440-BTY) kukoricán végeztük, „félszabadszíri” tenyészedeényes (d=30 cm) kísérletben (Julianna-major, Nagykovácsi. Magyarország). A cserepeket barna homoktalajjal töltöttük meg (Örbottyán), tenyészedeényenként 1-1 kukoricamagot ültettünk. A kísérletet 10 ismétlésben végeztük. A Cry1Ab-toxin méréséhez R4 fenológiai állapotban az első nővirág levélszintű friss levélközépi mintákat Abraxis ELISA tesztsomag segítségével mértük. Körülbelül 5 tonna/ha termésre beállítva 130 kg N/ha (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), 60 kg P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/ha és 110 kg K<sub>2</sub>O/ha mütrágyát adagoltunk, melyet az MTA Talajtani és Agrokémiai Kutatóintézetete határozott meg a vizsgált talaj tápanyagtartalmának megfelelően.

### 3.9. DAS-59122 kukorica környezeti kockázatelemzése nem célszervezeten

#### 3.9.1. A DAS-59122 GM kukorica termesztése

A környezeti hatásvizsgálat a Pioneer Hi-Bred International Inc. (Ankeny, IA USA) megbízásával valósult meg, aki biztosította a vetőmagokat, illetve a szükséges felszerelések beszerzését. Az általuk biztosított vetőmagok az alábbiak voltak: DAS-59122 GM kukorica és PR36D79 közel izogenikus vonala, továbbá PR36V52, PR37N01 és PR37M34 (Ribera) hibridfajták. A vizsgálatok szabadföldi körülmények között valósultak meg Julianna-majorban (Nagykovácsi, Magyarország), az MTA NKI Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályán. A magokat minden esetben 25 cm-es tőtávval és 70 cm-es sortávval vetettük. A vetések alkalmával a GM kukoricák köré 6 sor szegélyt ültettünk nem GM fajtával.

#### 3.9.2. A hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata* L.) tenyésztésben tartása

A hétpettyes katicabogár levéltetveket fogyasztó, ragadozó szervezet, így táplálásukra két levéltetűfajt neveltünk üvegházban. A zselnicemeggy-levéltetű (*Rhopaloiphum padi* L.) (1. kép) tenyésztését árpan (*Hordeum vulgare* L.) neveltük. A növényeket háromleveles stádiumban fertőztük, majd az erre a célra kialakított, hálóval borított ketrecben tartottuk (2. kép). A tápváltás okozta stressz elkerülése érdekében, minimum 10 nappal a kísérletek beállítása előtt az árpan nevelt levéltetvek 500 egyedét szabadföldi kukorica-tápnövényre vittük át. A zöldborsó-levéltetű (*Acyrtosiphon pisum* Harris) (1. kép) tenyésztését lóbab (*Vicia faba* L.) tápnövényen neveltük szintén hálóval borított ketrecben.



1. kép. A DAS-59122 GM kukorica hétpettyes katicabogár L1 és L2 lárváira és a nem célszervezet teljes életciklusára gyakorolt hatásának vizsgálata során táplálékként nevelt levéltetvek. Balra a zselnicemeggy-levéltetű (*R. padi* L.) (forrás: <http://www.pbase.com>), jobbra a zöldborsó-levéltetű (*A. pisum* Harris) (forrás: <http://www.potatovirus.com>).



2. kép. A levéltetű-tenyészetek tápnövényei, balra az árpa (*Hordeum vulgare*, L.), jobbra a lóbab (*Vicia faba* L.), illetve a tenyészet fenntartására használt, erre a célra kialakított, hálóval borított ketrecek (40x40x80 cm) (PIONEER HI-BRED INC. 2010).

A hétpettyes katicabogár tenyészetét ökológiai gazdaságból származó felnőtt (imágó) egyedek begyűjtésével indítottuk el (Fejér megye, Magyarország). Az üvegházba szállított egyedeket a 2. képen látható ketrecekben neveltük, melyekben a levéltetűvel fertőzött árpa- vagy lóbabnövények voltak. Az imágók által lerakott tojásokat eltávolítottuk a ketrecből, és a nevelőszobában (L:D 16:8, 20°C) keltettük. A kikelt L1 és L2 stádiumú lárvák egy részét a kísérletekben használtuk fel, másik részével a tenyészetet tartottuk fenn.

### 3.9.3. A hétpettyes katicabogár életsiklus-vizsgálta

A hétpettyes katicabogár lárvális fejlődése függ a hőmérséklettől, illetve a fogyasztott táplálék minőségétől. Három különböző hőmérsékleten (állandó 20°C, állandó 30°C, változó 18–30°C) vizsgáltuk a két tenyészetben tartott levéltetűfajnak (*A. pisum*, *R. padi*) a katicabogár fejlődésére gyakorolt hatását. A kísérletet 10-10 ismétlésben végeztük el fémvázra rögzített hálóval borított, ún. cserépizolátorokban (magasság: 25 cm, átmérő: 10 cm) (3. kép), melyekbe a frissen kelt L1-es lárvákat egyesével helyeztük el.



3. kép. A hálóval borított cserépizolátorok alkalmasak egy cserépbe ültetett növény teljes izolálására (PIONEER HI-BRED INC. 2010).

Napfény spektrum-lámpákat használtunk mindhárom hőmérsékleten a növények normális fejlődése érdekében, a megvilágítás hosszú nappalos (16:8) volt. A katicabogár lárvák etetése *ad libitum* volt, melyet minden nap ellenőriztünk. A fejlődési ütemet a 20°C-os és a 18–30°C-os beállítás esetében kétnaponta, míg 30°C-on naponta jegyeztük fel. A kísérlet végén a bábokból kikelt, szklerotizálódott (fedőszárny megkeményedése) és melanizálódott (végleges színezet kialakulása) imágók tömegét mértük. Utóbbi két folyamat meglehetősen gyorsasága (1-2 óra) miatt a kikelés után a tömegmérésig a felnőtt egyedek nem kaptak táplálékot, így az összehasonlítás lehetséges volt.

### 3.9.4. Táplálékfogyasztás

A vizsgálat célja az volt, hogy a meghatározzuk a katicabogár lárvális fejlődése során elfogyasztott levéltetvek számát annak érdekében, hogy a későbbi kísérleteink során a megfelelő mennyiségű táplálékot tudjuk biztosítani a fejlődő egyedeknek (pl.: *ad libitum* etetés). A vizsgálat során zöldborsó-levéltetű (*A. pisum*) L1 lárváit, illetve a kisebb méretű zselnicemeggy-levéltetű (*R. padi*) L4 lárváit kínáltuk fel a katicabogár-lárváknak. A tojásokból frissen kelt, egyesével cserépizolátorba helyezett katicabogár-lárváknak naponta 20 L1 *A. pisum* és 30 L4 *R. padi* levéltetvet adtunk. A napi ellenőrzések során nyomon követtük az elfogyasztott táplálék mennyiségét, és *ad libitum* etetésnek megfelelően emeltük a napi adagot (V. táblázat). Az elfogyasztott levéltetvek számolása során binokuláris mikroszkóp alatt számoltuk a katicabogár-lárvák által kiszívott egyedeket, melyek kutikulája sötét, így jól elkülöníthető a levedlett, szinte átlátszó kültakarótól. Meghatároztuk a teljes lárvális fejlődés alatt fogyasztott levéltetvek számát, illetve a lárvastádiumonként fogyasztott prédaállatok mennyiségét. A kísérletet levéltetűfajonként 10-10 ismétlésben végeztük, 25±1°C-on és hosszú nappalos megvilágítás mellett (L:D 16:8).

V. táblázat. A hétpettyes katicabogár táplálékfogyasztásának vizsgálata során, a különböző lárvális fejlődési stádiumokban (L1-L4) adagolt levéltetvek faja és száma.

A katicabogár fejlődési stádiuma	Levéltetűfaj	Naponta felkínált levéltetvek száma (db) és fejlődési stádiuma
L1	<i>A. pisum</i>	~ 20 L1
L2	<i>A. pisum</i>	~ 40 L1
L3	<i>A. pisum</i>	~ 60 L1
L4	<i>A. pisum</i>	~ 100 L1
L1	<i>R. padi</i>	~ 30 L4
L2	<i>R. padi</i>	~ 40 L4
L3	<i>R. padi</i>	~ 70 L4
L4	<i>R. padi</i>	~ 120 L4

### 3.9.5. A *Cry34/35Ab1*-toxinok hatása hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) lárváira

A kétéves vizsgálat első évében a *DAS-59122* GM kukorica és közel izogenikus vonalának (PR36D79) katicabogár L1 és L2 stádiumú lárváira gyakorolt hatását vizsgáltuk tritrófikus rendszerben. A kísérlethez 4-4 kísérleti parcellát vetettünk, egyenként 10 x 10 m nagyságú területen. A beállítások során a megfelelő kukoricán előnevelt zselnicemeggy-levéltetvek szolgálták táplálékul a nevelőszobában keltetett L1 és nevelt L2 lárváknak.

Az L1 lárvák vizsgálata során 4 különböző táplálék-kombinációt kínáltunk fel a lárvák számára: levéltetű + pollen, csak pollen, csak levéltetű, illetve mindkettő hiánya. A szabadföldön termesztett kukoricák közül, kísérleti parcellánként 7 GM és 7 közel izogenikus kukoricát izoláltunk teljesnövény-izolátorral (magasság: 5 m, átmérő: 0,5 m ) (4. kép balra), melyek közül 2-2 még a címerhányás előtti fejlettségi állapotban volt, 5-5 tő pedig a VT fenológiai stádiumban. Az izolált növényekre 3 levélszinten (címer alatti levélszint, első nővirág melletti levélszint, legalsó zöld levélszint) összesen 21 levéltetű-izolátort (4. kép jobbra) helyeztünk el a levelek fonákjára.



4. kép. Balra a teljesnövény-izolátor, mellyel minden kísérletbe bevont kukoricaegyedet izoláltunk; jobbra a levéltetű-izolátor, melyet a hétpettyes katicabogár L1 és L2 lárvastádiumainak vizsgálata során alkalmaztunk a levéltetvek és a katicabogár lárvák izolálásához (PIONEER HI-BRED INC. 2010).

Izolátoronként 2 *R. padi* szárnyatlan nőtényt helyeztünk el egy héttel a kísérlet előtt. A nőtények utódprodukciója sok esetben nem volt megfelelő a kísérlet beállításához, ezért a szabadföldön, a megfelelő kukoricafajtán nevelt tenyészetből 5 szárnyatlan nőtényt és 10 L1-L4 lárvát helyeztünk a levéltetű-izolátorokba egy héttel a beállítás előtt. A pollent is tartalmazó kezelésekből ecsettel nedves szűrőpapírra vittük fel az adott levélszintnek megfelelő

pollenmennyiséget: 800–1000 pollen/cm<sup>2</sup> a címer alatti levélszinten, 500–600 pollen/cm<sup>2</sup> az első nővirág melletti levélszinten, illetve 200–300 pollen/cm<sup>2</sup> a legalsó zöld levélszinten. Az ecsettel kiszórt pollenmennyiségeket minden esetben mikroszkóp alatti számolással ellenőriztünk. A kísérlet beállításakor minden levéltetű-izolátorba 1 L1 stádiumú katicabogár-lárva került. Négy nappal később az izolátorokat hordozó leveleket levágtuk a növényekről, és a laboratóriumban mortalitást, fejlettségi stádiumot, illetve az elfogyasztott levéltetvek számát jegyeztük fel. Az eredményeket normalitásvizsgálat után egyutas varianciánálízissel (ANOVA) és Tukey *post hoc* teszttel, illetve t-teszttel értékeltük.

A második kísérletben mindkét kukoricafajta L2 lárvákra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A levéltetű-izolátorokat az L1-es vizsgálatban részletezett 3 levélszinten, kukoricafajtánként 21 egyeddel helyeztük el, a levelek színi részén. A korábbi tapasztalatoknak megfelelően ezen vizsgálat esetében is egy héttel a katicabogár-lárvák kísérletbe vonása előtt 5 *R. padi* szárnyatlan nőtényt és 10 L1-L4 stádiumú lárvát helyeztünk az izolátorokba. A nevelő szobában frissen kelt L1 lárvákat 20°C-on, L:D 16:8 megvilágítás mellett neveltük, és vedlés után vontuk be a kísérletbe. Ezen vizsgálat során nem vizsgáltunk különböző táplálékkombinációkat: a lárvák minden esetben *R. padi* levéltetvet és a levél felszínén előforduló, természetesen szóródó pollenmennyiséget fogyasztottak. A kísérlet beállítása előtt polleneloszlást számoltunk a vizsgálatban használt levélszinteken. Három nap elteltével, a kísérlet értékelésekor az L2 lárvák mortalitását, az elért lárvastádiumokat, illetve az elfogyasztott levéltetvek számát határoztuk meg binokuláris mikroszkóp alatt. A statisztikai elemzés során a szignifikáns különbségeket egyutas varianciánálízissel (ANOVA) és Tukey *post hoc* teszttel határoztuk meg.

### **3.9.6. A Cry34/35Ab1-toxinok hatása hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) teljes egyedfejlődésére, illetve szaporodására**

A szabadföldi kísérlet során, szintén tritrófikus rendszerben vizsgáltuk a Cry34/35Ab1-toxinokat termelő DAS-59122 GM kukoricának, közel izogenikus vonalának (PR36D79), illetve három egyéb hibridnek (PR36V52, PR37N01, PR37M34) a hétpettyes katicabogár teljes életciklusára gyakorolt hatását, a tojásból való kikeléstől az imágóvá fejlődésig. A nőtény egyedek termékenységét (fertilitás) és tojásrakási sikerességét (fekunditás) is összehasonlítottuk a kukoricafajták esetében, mint szaporodást meghatározó tényezőket. A kísérleti parcellák ebben az esetben is az MTA NKI Ökológiai Kísérleti telepén, Julianna-majorban (Nagykovácsi, Magyarország) kerültek kialakításra, Wintersteiger szemenkénti precíziós vetőgéppel. A 5 kukoricafajtát 4-4, egyenként 14,25 m x 14,25 m nagyságú parcellákba ültettük. A fajták elosztása a 20 kísérleti parcella között véletlenszerűen történt. A parcellák között 1,5 m széles

izolációs folyosót hagytunk, a teljes terület köré 6-8 sor DK440 hibridkukoricát vetettünk szegélyszávnak (5. kép).



5. kép. Légi felvétel az MTA NKI Ökológiai Kísérleti telepen, Julianna-majorban (Nagykovácsi, Magyarország) kialakított kísérleti parcellákról. A kísérlet során *DAS-59122 GM*, közel izogenikus vonala (*PR36D79*), illetve további 3 hibrid (*PR36V52*, *PR37N01*, *PR37M34*) parcellái kerültek kialakításra (*PIONEER HI-BRED INC.* 2010).

Teljesnövény-izolátorok segítségével parcellánként 2-2, azaz kukoricafajtánként összesen 8-8 növényt izoláltunk a pollenszórási fejlődési stádium előtt. A növényeket a parcellák közepén jelöltük ki, hogy elkerüljük a fellépő szegélyhatásokat. Az izolált növényeket az üvegházban fenntartott *R padi*-tenyészetből körülbelül 500-500 egyeddel fertőztünk csőizolátorok segítségével. Az erősen fertőződött árpaleveleket a csőizolátorokba helyeztük, majd a kísérletben résztvevő kukoricák csőkezdeményeire, illetve az ahhoz tartozó levélre húztuk (6. kép). A csőizolátorokat nem rögzítettük a szárhoz semmilyen módon, lehetőséget adva így levéltetvek elterjedésének az izolált növényen.



6. kép. A kukoricák levéltetűvel való fertőzésekor használt csőizolátorok (*PIONEER HI-BRED INC.* 2010).



Az izolált növények csőkezdeményei és a hozzájuk tartozó levelek 2 hét után teljes fertőzöttséget értek el, így a csőizolátorokat eltávolítottuk. Egy héttel később minden izolált növényre 20-20, frissen kelt, a genetikai változatosság érdekében minimum három különböző tojáscsomóból származó, L1 stádiumú katicabogár-lárvát helyeztünk ki. A lárvákat finom ecsettel, egyesével raktuk ki a kukorica levéltetvekkel erősen fertőzött részére (7. kép). A kirakás már a kukorica pollenszórási fázisának végén történt, így a kísérletben résztvevő egyedek táplálékkaként a pollen is jelen volt.



7. kép. Az életciklus-vizsgálat során az L1 stádiumú katicabogár-lárvákat a kukorica erősen fertőzött részére (csuhélevél, bibe) raktuk ki (*balra*) finom ecset segítségével (*jobbra*) (PIONEER HI-BRED INC. 2010).

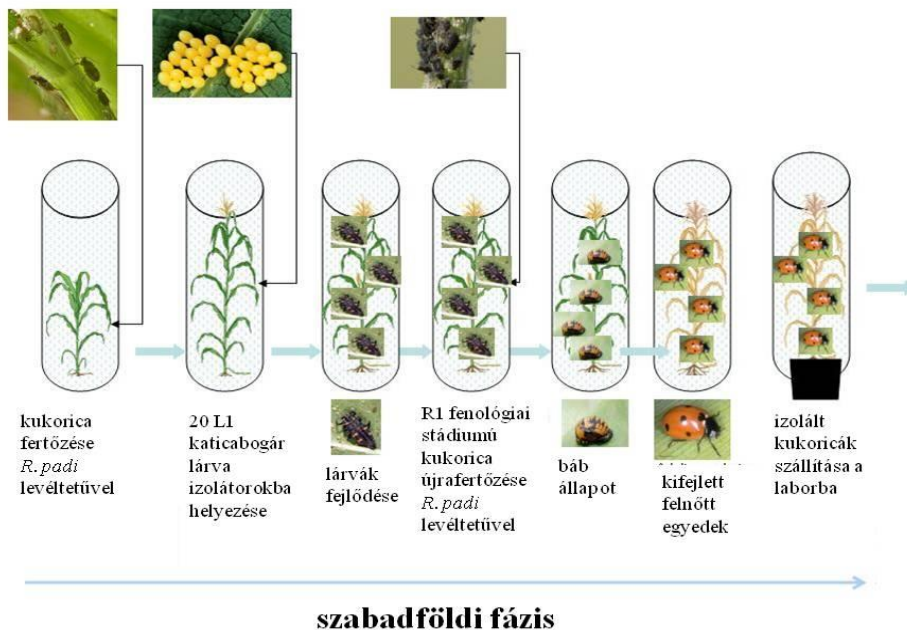


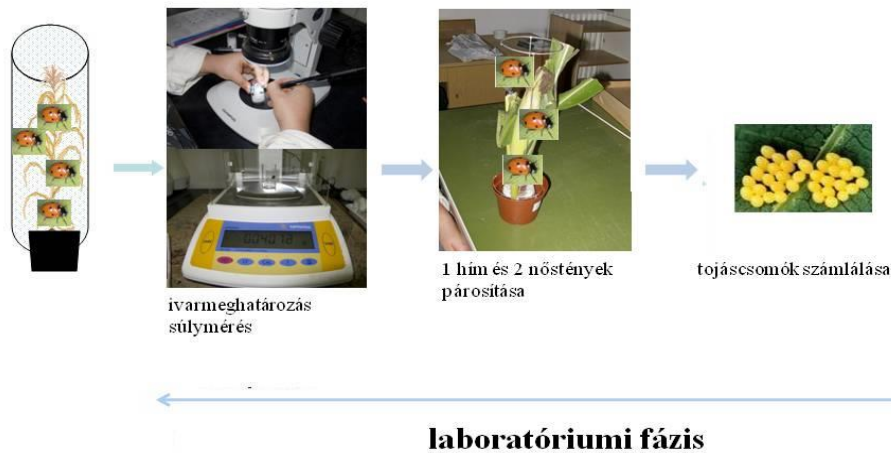
8. kép. Az életciklus-vizsgálat után behozott teljesnövény-izolátorok feldolgozása során az imágó katicabogár-egyedeket kezelésként külön összegyűjtöttük (*balra*), tömegmérés és ivarmeghatározás után egy nőstény és két hím egyedeket raktunk levéltetűvel fertőzött kukoricacsővekre. A kukoricacsőveket Erlenmeyer-lombikokba tettük, majd hálóval izoláltuk (*jobbra*) (PIONEER HI-BRED INC. 2010).

A katicabogár-lárva bábosodásáig, majd az imágók keléséig két hét telt el. Két héttel a kelést követően az izolált növényeket a laboratóriumba szállítottuk. A katicabogár-imágókat összegyűjtöttük az izolátorokból, majd meghatároztuk minden egyed tömegét, illetve ivarát. A termékenységi (fertilitás) és tojásrakási sikerességi (fekunditás) vizsgálathoz a megfelelő kukoricafajták érett csöveit, az azokat borító csuhéleveleket, illetve a zöld levelet *R. padi* levéltetűvel fertőztük. A fertőzött növényi részt Erlenmeyer-lombikba helyeztük, majd hálóval borítottuk (8. kép). Minden Erlenmeyer-lombikban lévő kukoricára, azonos kezeléssel származó 1 nőtény és 2 hím hétpettyes katicabogár-imágót raktunk.

A tojásrakást naponta ellenőriztük, a lerakott tojáscsomók méretét meghatároztuk, majd Petri-csészében a nevelőszobában (L:D 16:8, 20°C) keltettük. Kelést követően feljegyeztük a kikelt egyedek számát. Minden tojáscsomó egy adott nőtényhez tartozott, így a fekunditás nőtény egyedekre visszavezethető volt.

A kísérlet szabadföldi (kukorica fertőzése levéltetűvel, katicabogár-lárva kirakása, fejlődése) és laboratóriumi (fertilitás és fekunditás vizsgálata) szakaszainak lépéseit a sematikus 9. ábra foglalja össze:





9. ábra. A szabadföldi és laboratóriumi szakasz fő lépései a teljes életciklus-vizsgálat során.

A kísérlet során a kukoricánövények R1 és R2 fejlődési stádiumában levél-, levélhüvely- és pollenmintákat gyűjtöttünk, melyekben immunanalitikai eljárással meghatároztuk a Cry34Ab1- és Cry35Ab1-toxinok koncentrációját. A mintavétel során kukoricafajtánként 5-5 egyedet a laboratóriumba szállítottunk, majd az első nővirág szintjén 3–5 cm széles sávot vágunk ki a zöld levéllemez, illetve a levélhüvely középső részéből. A pollenmintákat 50 cm x 50 cm méretű papírzacskókba gyűjtöttük reggel, mielőtt a címerok elszórták volna a friss pollenszemeket. A mintákat folyékony nitrogénben fixáltuk, majd liofilizálás után (5-shelf Apha 12LD) a mérésig  $-20^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A minták tömegét friss és liofilizált állapotban is feljegyeztük. A toxinkoncentrációt a 3.6. fejezetben bemutatott ELISA eljárással határoztuk meg. A minta-előkészítés során a pollen és zöld levél esetében 100 mg, a levélhüvely esetében 300 mg liofilizált mintát 6 ml foszfátpufferben – mely 0,05% Tween 20 detergenst tartalmazott – extraháltuk, majd 4000 fordulatszám, 10 percig,  $4^{\circ}\text{C}$ -on centrifugáltuk. A felülúszó toxintartalmát PBST pufferben való hígítás után meghatároztuk.

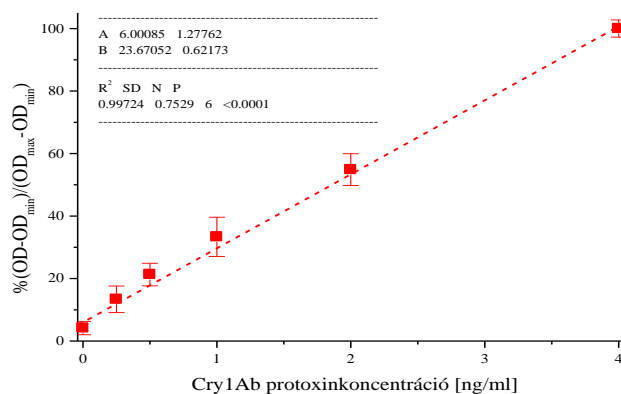
Az adatok statisztikai elemzését normalitásvizsgálat után (Shapiro–Wilk-teszt,  $p=0,05$ ) faktoriális egyutas varianciaanalízissel ( $p=0,05$ ) és Tukey *post hoc* ( $p=0,05$ ) teszttel végeztük, ahol a faktor az imágó katicaegyedek ivara volt.



## 4. EREDMÉNYEK

### 4.1. A Cry1Ab-kimutatására alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA rendszerek kalibrációjának vizsgálata

Az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag és az EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris kalibrációt (0–4 ng/ml Abraxis és 0–5 ng/ml EnviroLogix esetében) hasonlítottuk a szendvics típusú ELISA rendszerekre jellemző, négyparaméteres szigmoid görbével való kalibrációhoz. Az összehasonlító vizsgálatok során az Abraxis Inc., a Szent István Egyetem MKK Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék és a Kanadai Nemzeti Kutatási Tanács Biotechnológiai Kutatóintézete által biztosított analitikai Cry1Ab-standardoldatokkal vettük fel a szigmoid görbéket 0–50 ng/ml koncentrációtartományban. A mérésekhez minden esetben az Abraxis ELISA tesztsomag mikrotiterlemezét használtuk. 37 független mérés során megállapítottuk, hogy a tesztsomag által biztosított standard oldatokkal felvett kalibráló egyenes jól reprodukálható, az átlag normalizált egyenes regressziós koefficiense ( $R^2$ ) 0,997 volt, mely az egyes mérések során 0,964 és 0,999 között változott (10. ábra).



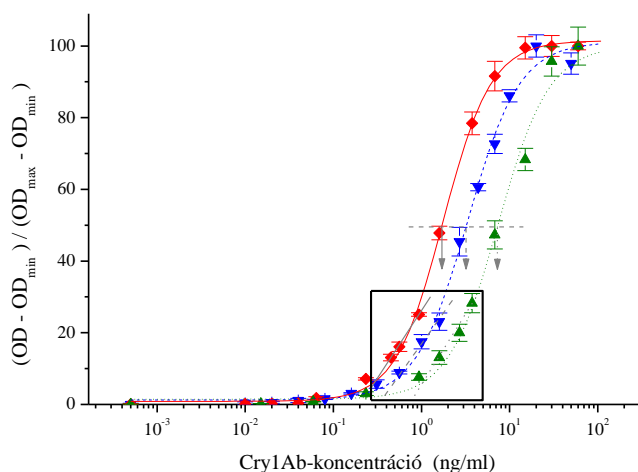
10. ábra.. Az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag által biztosított standard oldatokkal 37 független mérés során felvett, átlagos kalibráló egyenes.

A kimutatási határ 0,125 ng/ml a kereskedelmi tesztsomag által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris regressziót alkalmazva. A 3 különböző forrásból származó Cry1Ab-toxinnal felvett szigmoid görbék  $IC_{50}$ -értékei nem különböztek egymástól (VI. táblázat). A kimutatási határ mindhárom toxinforrás esetében 5 ng/ml volt.

VI. táblázat. Az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag alkalmazásával kapott szigmoid görbék paraméterei és IC<sub>50</sub>-értékük. A görbék 0–50 ng/ml koncentrációtartományban vettük fel.

ELISA tesztsomag	analitikai standard forrása	IC <sub>50</sub> (ng/ml)
Abraxis	Abraxis Inc.	12,28±0,53
Abraxis	Szent István Egyetem	12,61±0,63
Abraxis	Kanadai Nemzeti Kutatási Tanács Biotechnológiai Kutatóintézet	13,25±0,37

Együtt ábrázolva az Abraxis ELISA tesztsomag által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris és a rendszerre jellemző szigmoid kalibráló görbéket látható, hogy a tesztsomag egyenese a szigmoid görbe alsó görbületére esik. A 4 ng/ml koncentráció még a közel egyenes szakaszon helyezkedik el, azonban az alacsonyabb koncentrációk már nem. Agdia és EnviroLogix tesztsomagok vizsgálatakor a szigmoid görbéket minden esetben az Abraxis Inc. cégtől vásárolt Cry1Ab-toxinnal vettük fel, majd IC<sub>50</sub>-értéküket hasonlítottuk az Abraxis tesztsomag esetében tapasztalt IC<sub>50</sub>-értékhez (VII. táblázat). A szigmoid görbéket és a tesztsomagok által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris regresszió elhelyezkedését a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra. Az Abraxis Inc. Cry1Ab analitikai standard-jével felvett szigmoid görbék az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag (#PN 51001, Warminster, PA, USA) (◆), az Agdia Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag (#PSP 06200, Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) (▼) és az EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate (#AP 003; Portland, ME, USA) (▲) esetében. A négyzet jelöli a gyártók által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris kalibráció helyzetét a szigmoid görbén, mely Abraxis esetében 0–4 ng/ml, EnviroLogix esetében 0–5 ng/ml koncentrációtartományt jelent.

VII. táblázat. Az Abraxis Inc. Cry1Ab analitikai standardjével felvett szigmoid görbék  $IC_{50}$ -értékei az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag, az Agdia Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag és az EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate esetében.

ELISA tesztsomag	analitikai standard forrása	$IC_{50}$ (ng/ml)
Abraxis	Abraxis Inc.	12,28±0,53
Abraxis	Abraxis Inc./BSA	1,76±0,06
Agdia	Abraxis Inc. /BSA	3,34±0,20
EnviroLogix	Abraxis Inc. /BSA	7,5±0,57

A kimutatás lehetséges analitikai torzításának fontos tényezői a Cry-toxinok bomlékonysága és jelentős felületi megkötődő képessége (adszorptivitása). Annak érdekében, hogy az analitikai standardban (illetve a mintákban) a Cry1Ab-toxin célvegyület koncentrációja az ELISA kivitelezése során ne csökkenjen, a standard oldatokat (és mintákat) hűtve szükséges tárolni, s a beméréseket minél rövidebb idő alatt szükséges végezni. Annak érdekében, hogy a standard- és minta-előkészítési lépések során a Cry1Ab-toxin a tárolóedények (pl. Eppendorf-cső) falára történő megkötődését visszaszorítsuk, a standard oldatokhoz indifferens stabilizáló fehérje (fetális borjúszérum-albumin, BSA) hozzáadása célszerű (FERNANDO RUBIO, Abraxis Inc., személyes közlés). A Cry1Ab-toxin standard törzsoldathoz kb. tízszeres koncentrációjú BSA védőfehérjeként történő hozzáadása a kimutatást jelentősen javította (hétszeres javulás az  $IC_{50}$ -értékben (VII. táblázat).

A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztsomagok által biztosított standard oldatokkal felvett kalibrációs tartomány a rendszerre jellemző szigmoid görbével meghatározott kimutatási határ alatt biztosít mennyiségi meghatározást, ez azonban analitikai szempontból igen jelentős kompromisszumot tükröz. Habár a kimutatási határ a kivitelezés pontosságától függ, az alkalmazott kalibrációs görbe befolyásolhatja annak mértékét. A gyártók által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris kalibráció meredeksége nem olyan nagy, mint a szigmoid görbe esetében a közel egyenes szakaszon, így a háttér ugyanakkora szórása mellett is magasabb kimutatási határt kapunk szigmoid görbeillesztés esetén, mint a lineáris kalibrációnál. Így tulajdonképpen indirekt módon, a gyártók a lineáris kalibráció alkalmazásával csökkentik a kimutatási határt. Annak érdekében, hogy az adott ELISA tesztsomag minél többféle – csekély *Bt*-toxintartalmú – növényi mintában is alkalmazható legyen, a forgalmazók a lineáris kalibrációval a kimutatási határt mind alacsonyabb értékre állítják be. Azonban a kereskedelmi érdekeket támogatva a kimutatási határ ilyen mértékben való csökkentése (lineáris kalibráció esetében 40-szer alacsonyabb, mint szigmoid görbeillesztés esetében) a mérés pontosságát csökkenti, torzítását pedig növeli.

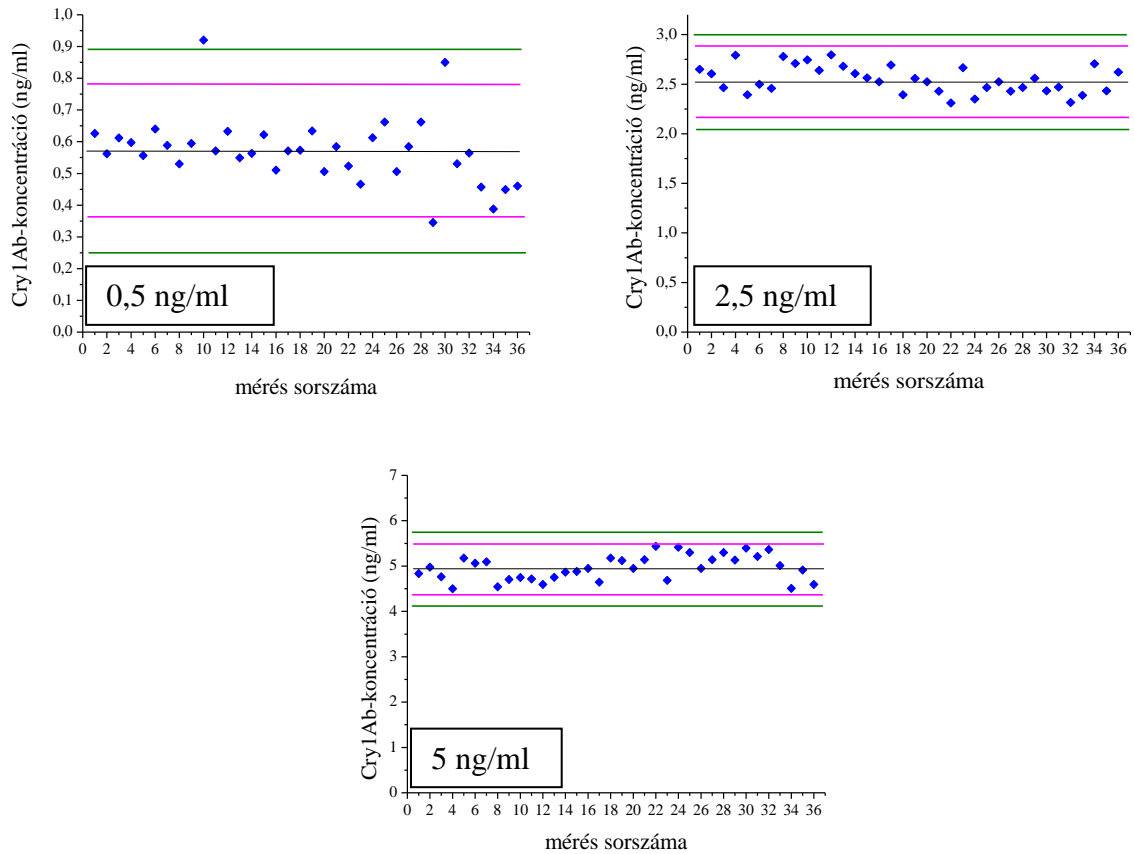
A kereskedelmi eljárás lineáris regressziójának 4 vagy 5 ng/ml és 2,5 ng/ml koncentrációjú kalibráló oldataink — melyek a szigmoid görbe közel lineáris szakaszára esnek — vonatkozó számított érték relatív hibája 5,5%, illetve 5,4%. A mennyiségi meghatározás relatív hibája a szigmoid alsó görbületi szakaszára eső kalibráló pontok esetében viszont 18,5% és 8722% voltak. A felvett szigmoid görbék esetében a számított  $IC_{50}$ -érték relatív hibája 2,8–7,6% közé esett. Ez is bizonyítéka annak az elméleti analitikai szempontnak, hogy a meghatározás a legpontosabb az  $IC_{50}$  közelében. Vagyis a kimutatási határ csökkentésének „ára” a mérés jószágának csökkenése. Ezt mutatják a kereskedelmi rendszerek belső minőségellenőrzése során kapott eredmények (ld. 4.2. fejezet) is.

#### **4.2. Cry1Ab-toxin kimutatására alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA rendszer belső minőség ellenőrzése**

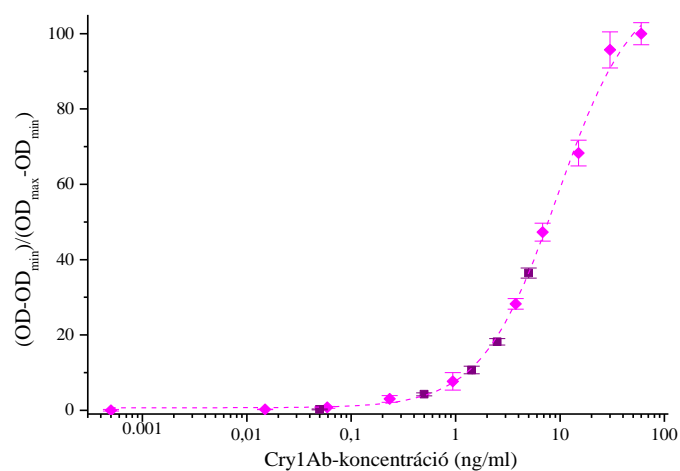
Az EnviroLogix Cry1Ab-toxin kimutatásra alkalmas ELISA módszerének (Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate ELISA) belső minőségellenőrzése során a tesztsomag által biztosított pozitív (C+) és negatív (C-) kontroll oldatok, illetve az EnviroLogix cégtől külön vásárolt Cry1Ab-toxin 0,5, 2,5 és 5 ng/ml koncentrációjú oldatának (mely a 2005-ben a piacról visszavont EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate standard oldatait voltak) ismételhetségét ellenőriztük *Shewhart*-féle kétoldali átlagkártya segítségével. A pozitív és negatív kontroll esetében egyoldali terjedelmekártyával ellenőriztük a független méréseink során a lemezen belüli ismételhetséget.

A 0,5, 2,5 és 5 ng/ml koncentrációjú Cry1Ab-oldatok minőségellenőrző kártyáit az 12. ábra mutatja be, jól szemléltetve a 4.1. fejezetben ismertetett analitikai szempontot a Cry1Ab-meghatározás során. Az 5 ng/ml standard a szigmoid görbe közel egyenes szakaszának alsó részére esik (13. ábra), így ezen koncentráció közelében a koncentrációmeghatározás megbízható. A kereskedelmi forgalomban kapható tesztsomagok standard oldataival felvett kalibráló egyenes ábrázolásakor az abszcissa lineáris, míg a szigmoid görbe ábrázolásakor logaritmikus. A 13. ábra mindkét görbét logaritmikus skálájú abszcissa mellett ábrázolja, melynek célja az egymáshoz viszonyított helyzetük szemléltetése.





12. ábra. Az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate kalibráló pontjainak (0,5, 2,5 és 5 ng/ml koncentrációjú Cry1Ab-oldatok) belső minőségellenőrzése *Shewhart*-féle átlagkártya alkalmazásával.



13. ábra. A lineáris (■) és szigmoid (◆) kalibrációs görbék viszonya az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate esetében logaritmikus skálájú abszcissa mellett ábrázolva. A kalibrációs görbéket a gyártótól vásárolt Cry1Ab-toxinnal vettük fel.

A *Shewhart*-féle kártya is ezt támasztja alá: 36 független mérés során a számított koncentráció  $4,96 \pm 0,27$  ng/ml, a méréssorozat során fellépő relatív hiba 5,5%, mely az analitikai mérések során elfogadható mértékű. A 36 pontból egy sem esett kívül a figyelmeztetési és szabályozási határokon, a rendszer ezen standard oldat esetében statisztikai kontroll alatt volt. Ugyanezt tapasztaltuk a 2,5 ng/ml standard esetében is, mely szintén még a szigmoid görbe közel egyenes szakaszára esik. A számított koncentráció ebben az esetben  $2,54 \pm 0,14$  ng/ml volt, mely 5,4%-os relatív hibának felel meg. A 0,5 ng/ml koncentráció esetében azonban már tapasztalható volt az analitikai bizonytalanság. Három pont esett a figyelmeztetési határokon kívülre, melyek közül egy a szabályozási határon is kívül volt. Ebben az esetben a rendszer nem volt statisztikai kontroll alatt, így az eredmények megkérdőjelezhetők. A meghatározott számított koncentráció  $0,57 \pm 0,11$  ng/ml, mely 18,5% relatív hibát jelent. Az egyedi mérések során a fellépő relatív hiba 0,0 és 141,4% között változott a mért OD szintjén, a számított koncentrációk esetében -1326,9%—595,3% volt. A *Shewhart*-féle kártya értékeit mind az 5 vizsgált pontra vonatkozóan a VIII. táblázat részletezi.

VIII. táblázat. A *Shewhart*-féle minőségellenőrző kártyák statisztikai paraméterei a vizsgált referencia Cry1Ab-oldatok esetében (0,5, 2,5 és 5 ng/ml koncentrációjú standard oldatok, pozitív és negatív kontroll). Az első oszlopban a 36 független mérés során mért, számított koncentrációk átlagértékei láthatók ( $\pm$ szórás). A figyelmeztetési határok 2 szórásnyi, a szabályozási határok 3 szórásnyi távolságra vannak az átlagtól.

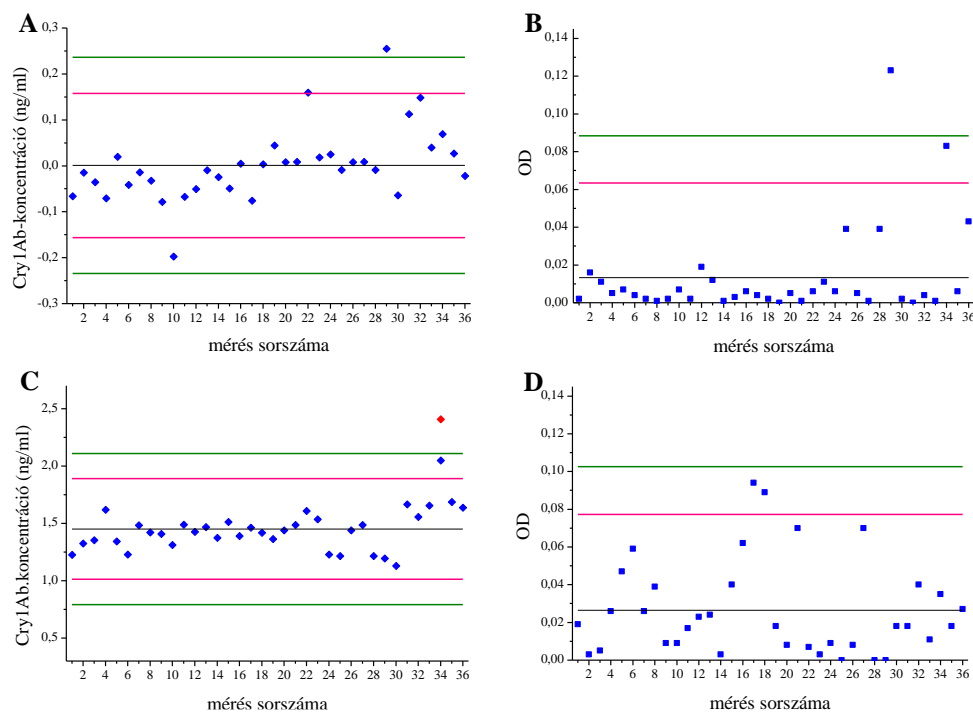
	Cry1Ab-koncentráció (ng/ml)				
	átlag	felső szabályozási határ	felső figyelmeztetési határ	alsó figyelmeztetési határ	alsó szabályozási határ
St 0,5	$0,57 \pm 0,11$	0,89	0,78	0,36	0,25
St 2,5	$2,55 \pm 0,14$	2,96	2,82	2,27	2,13
St 5	$4,96 \pm 0,27$	5,78	5,51	4,41	4,14
C-	$0,0009 \pm 0,0785$	0,24	0,16	-0,16	-0,23
C+	$1,45 \pm 0,22$	2,11	1,89	1,01	0,79

A negatív kontroll esetében, melynek nominális értéke 0 ng/ml, szintén 3 pont esett a figyelmeztetési határokon kívülre, közülük 1 pedig a szabályozási határon is kívül is (14. ábra). A 0,5 ng/ml koncentrációjú standard oldathoz hasonlóan ebben az esetben is a pontok 91,7%-a esett a figyelmeztetési határokon belül, így a rendszer a negatív kontrollra nézve sincs statisztikai

kontroll alatt. A számított koncentrációérték  $0,0009 \pm 0,0785$  ng/ml volt. Habár a nominális 0,00 ng/ml koncentrációtól való eltérés átlagosan csak a negyedik tizedesjegy szintjén jelentkezett, a relatív tapasztalati szórás 8722% volt. Ez a kiugróan magas hibataromány azt mutatja, hogy ebben a minőségi meghatározásra alkalmas ELISA rendszerben a negatív kontroll alkalmatlan referenciapontnak, és a nagy tapasztalati szórás eredményeként hamis negatív eredményt szolgáltathat adott mérés során.

A pozitív kontroll esetében 1 pont esett a szabályozási határon kívül (14. ábra), mely alapján a rendszert ebben az esetben is megbízhatatlannak kellene tekintenünk. A kilógó pontot eltávolítva a rendszerből, a negatív kontrollal ellentétben, további pontok nem estek sem a figyelmeztetési, sem a szabályozási határokon kívül, így ez a pont nem szisztematikus hiba része. A mérések utólagos ellenőrzése során kiderült, a kiugró mérés alkalmával pipettázásból eredő emberi hiba lépett fel. A számított koncentráció a pozitív kontroll esetében 1,45 ng/ml volt 15,1%-os relatív hibával (IX. táblázat). Az egyedi méréseknél jelentkező hiba mértéke OD-szinten 0,0%–14,1%, míg a számított koncentrációk szintjén 0,0%–28,8% volt.

Az egyoldali terjedelmekártyák értékeit a IX. táblázat részletezi. Negatív kontroll esetében az adott lemezen mért ismétlések között kisebb eltérések adódtak, mint a pozitív kontroll esetében, azonban előbbi esetben egy pont szintén kívül esett a szabályozási határon (14. ábra).



14. ábra. Az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate tesztsomag pozitív (C, D) és negatív (A, B) referenciaoldatainak belső minőségellenőrzése. *Shewhart*-féle átlagkártya (A, C) az adatok eloszlását vizsgálja az átlag körül, az egyoldali terjedelmekártya (B, D) az adott lemezen belüli hibatarományok eloszlását vizsgálja.

IX. táblázat. Az egyoldali terjedelmekártyák statisztikai paraméterei a pozitív és negatív kontroll Cry1Ab-oldatok esetében. Az első oszlop a 36 független mérés során, a lemezen belüli ismétlések között fellépő eltérések átlagát tartalmazza. A figyelmeztetési határ 2 szórásnyi, a szabályozási határ 3 szórásnyi távolságra van az átlagtól.

	Cry1Ab-koncentráció (ng/ml)		
	eltérések átlaga	szabályozási határ	figyelmeztetési határ
C–	0,01	0,09	0,06
C+	0,03	0,10	0,08

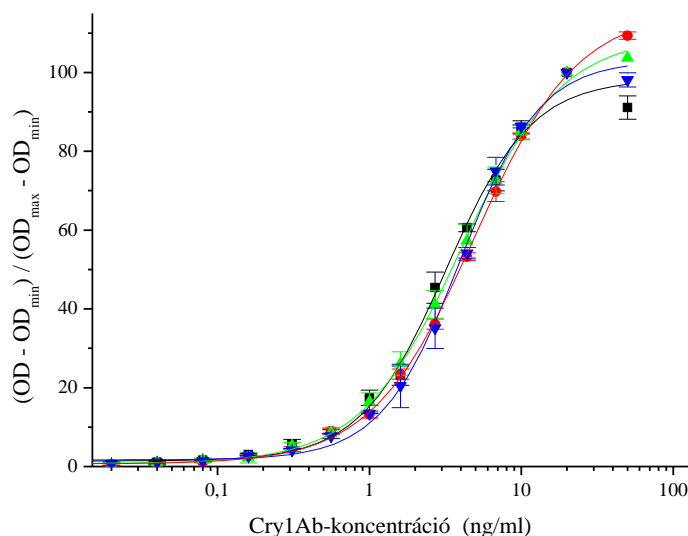
A mennyiségi meghatározásra alkalmas, kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztsomagok esetében az általunk vizsgált 0,5 ng/ml koncentrációjú standard oldat esetében tapasztalt analitikai megbízhatatlanság, a jelentkező magas tapasztalati szórások a standard oldatokkal felvett lineáris regresszió paramétereit is befolyásolja. 36 független mérés során az egyenesek meredeksége  $0,36 \pm 0,05$ , míg a tengelymetszet  $0,03 \pm 0,02$  volt. A levélextraktumok toxintartalmának meghatározása során, azonos minta-előkészítési eljárás és hígítás mellett, 14,0%–52,5% relatív hibák adódtak, melyek a lineáris regresszió paramétereinek eltéréseiből erednek.

A minőségi kimutatásra alkalmas ELISA tesztsomagok estében kimutatási határ nem értelmezhető, a kapott mérési eredményből csupán jelenlét/hiány választ kapunk. A belső minőségellenézés során megállapítottuk, hogy a negatív kontroll referenciaként való alkalmazása statisztikailag bizonytalan. Bizonyos, hogy egy analitikai meghatározás során az alacsonyabb koncentrációk meghatározása nagyobb tapasztalati szórással jár, az eredmények azonban arra is rávilágítottak, hogy olyan esetben, ahol csak negatív és pozitív referenciaoldatokat biztosít a tesztsomag, a kimutatás magas tapasztalati szórás mellett nem megbízható.

### **4.3. Cry1Ab-toxin kimutatására alkalmas ELISA rendszerek összehasonlítása körmérési vizsgálat keretében**

#### ***4.3.1. Közös protokoll***

A körmérés során a közös protokollal való mérésnél a standard görbét aktivált Cry1Ab-toxinnal vettük fel, 15 pontban, 0,01–50 ng/ml koncentrációtartományban. A kalibrációs görbét, mely a szendvics típusú ELISA rendszerekre jellemző négyparaméteres szigmoid görbe, foszfátpufferben és a közel izogenikus kukoricavonal levélszövetében is minden résztvevő laboratórium felvette (15. ábra). A független mérések során nyert standard görbéket az egyes laboratóriumokon belül átlagoltuk, majd a laboratóriumok között a mért OD-értékek normalizálásával hasonlítottuk össze. A mérések során néhány esetben a legmagasabb (50 ng/ml) koncentrációjú standard esetében a görbén visszahajlást tapasztaltunk, így a normalizálás során a második legmagasabb (20 ng/ml) standard oldatot tekintettük a szigmoid görbe felső platójaként. A görbék ábrázolása során látható, hogy a résztvevő laboratóriumok mindegyikében jól reprodukálható volt, illetve a laborok között sem volt különbség. Az analitikai meghatározás a görbe közel egyenes szakaszán a legmegbízhatóbb, így a 10, 50 és 80%-os normalizált koncentrációértékeknek megfelelő 0,56, 4,4 and 10 ng/ml koncentrációknál mért értékeket hasonlítottuk össze. Az  $IC_{50}$ -értékek  $3,19 \pm 0,23$ ,  $4,92 \pm 0,12$ ,  $4,01 \pm 0,10$  és  $3,98 \pm 0,17$  ng/ml voltak sorrendben a Lab1, Lab2, Lab3 és Lab4 esetében. A statisztikai vizsgálat során nem találtunk szignifikáns eltéréseket a foszfátpufferben felvett standard görbék között. Ez azt jelentette, hogy a körmérés során a résztvevő laboratóriumok egyforma módon mérték a kalibrációs görbe pontjainak Cry1Ab-koncentrációját, így a minták mérése során fellépő esetleges eltérések nem a kalibrációból eredtek. A közel izogenikus levélmátrixban felvett standard görbe sem különbözött a pufferben felvett görbétől, így a GM kukoricák mérése során nem kellett mátrixhatással számolnunk.



15. ábra. A körmérés során a közös protokoll esetében felvett normalizált standard görbék a résztvevő laboratóriumokban: Lab1 — ■, Lab 2 — ●, Lab 3 — ▲ és Lab 4 — ▼.

A *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukorica standard levélmintáiban („A”, „D”, „F” és „L”), a közös ELISA protokollal mért Cry1Ab-toxinkoncentrációk értékeit (átlag±szórás) a X. táblázat mutatja be. A táblázat utolsó oszlopa az egyes laboratóriumokban mért koncentrációk átlagát (laboratóriumok közötti átlag) tartalmazza, az egyes laboratóriumok esetében a zárójelben található %-os érték, pedig az ezen átlagtól való eltérést. A laboratóriumok között átlagtól való eltérés -33,5% (Lab3, „A” jelű minta) és +60,1% (Lab4, „D” jelű minta) között változott, vagyis az egyes laboratóriumokban mért koncentrációk a közös átlag kétharmada és másfélszerese között változtak. A statisztikai elemzés is számos esetben szignifikáns különbségeket eredményezett, bár az eltérések nem voltak konzekvensek az egyes minták esetében. Az „A” jelű minta esetében a Lab1 ( $12,17 \pm 91,77 \mu\text{g/g}$ ) és Lab2 ( $11,66 \pm 0,75 \mu\text{g/g}$ ) statisztikailag hasonló Cry1Ab-koncentrációt határozott meg, míg a Lab3 ( $8,34 \pm 1,40 \mu\text{g/g}$ ) szignifikánsan alacsonyabb, a Lab4 ( $19,67 \pm 1,59 \mu\text{g/g}$ ) pedig szignifikánsan magasabb értékeket. A „D” jelű minta mérésekor mind a négy laboratórium egymástól eltérő koncentrációkat határozott meg. Az „F” minta esetében nem találtunk szignifikáns eltérést a Lab3 ( $29,18 \pm 3,96 \mu\text{g/g}$ ) és Lab 4 ( $29,03 \pm 1,35 \mu\text{g/g}$ ) esetében, míg a Lab1 ( $19,74 \pm 1,13 \mu\text{g/g}$ ) jelentősen alacsonyabb értékeket mért. Az „L” mintára vonatkozóan a Lab1 által mért  $49,05 \pm 2,15 \mu\text{g/g}$  és a Lab3 által mért  $55,67 \pm 6,66 \mu\text{g/g}$  koncentrációk szignifikánsan nem különböztek, ezzel szemben a Lab4  $83,37 \pm 7,10 \mu\text{g/g}$  értéket határozott meg.

X. táblázat. A közös ELISA protokollal meghatározott Cry1Ab-koncentráció a *MON 810* GMkukorica standard levélmintáiban az egyes laboratóriumokban

minta kódja	Cry1Ab-koncentráció (µg/g)				laborok közötti átlag
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4	
„A”	12,17±1,77 (-2,9%)* b <sub>A</sub> **	11,66±0,75 (-7,0%) b <sub>A</sub>	8,34±1,40 (-33,5%) a <sub>A</sub>	19,67±1,59 (+56,9%) c <sub>A</sub>	12,54±3,95
„D”	17,32±0,97 (+13,4%) c <sub>D</sub>	14,32±0,88 (-6,2%) b <sub>D</sub>	10,53±1,05 (-31,0%) a <sub>D</sub>	24,44±0,89 (+60,1%) d <sub>D</sub>	15,26±4,58
„F”	19,74±1,13 (-28,9%) a <sub>F</sub>	n.a.***	29,18±3,96 (+5,1%) b <sub>F</sub>	29,03±1,35 (+4,5%) b <sub>F</sub>	27,76±4,29
„L”	49,05±2,15 (-32,5%) a <sub>L</sub>	n.a.	55,67±6,66 (-23,4%) a <sub>L</sub>	83,37±7,10 (+14,8%) c <sub>L</sub>	72,64±17,73

\* a laborok közötti átlagtól (utolsó oszlop) való relatív eltérés

\*\* a különböző kisbetűk egy mintára vonatkozóan szignifikáns eltérést jelentenek

\*\*\* nincs adat

A független mérések eredményeiből adott mintára vonatkozóan az egy lemezen mért triplikátumokon belüli, a lemezek közötti, az adott laboratóriumon belüli és a laboratóriumok közötti hibák mértékét határoztuk meg, melyeket a relatív tapasztalati szórással (*standard deviation, SD*) és a becslés hibájának relatív nagyságával (*standard error, SE*) jellemeztünk (XI. táblázat).

Az adott lemezen mért triplikátumokon belül jelentkező hibák a pipettázás pontosságát és megbízhatóságát tükrözik. Az SD-értékek a triplikátumok esetében 0,4–7,0%, 0,0–4,7%, 0,3–10,5% és 0,1–7,7% között alakultak rendre a Lab1, Lab2, Lab3 és Lab 4 esetében. mindössze egy esetben (Lab3, „L” jelű minta) tapasztaltunk kiugró, 10,5%-os hibát, mely azt jelenti, hogy ezen a szinten az alkalmazott ELISA eljárás során az egyes laboratóriumok kis hibahatárok között vitték fel az adott mintát az egyes lemezekre. A mérés hibája ezen a szinten az analitikai mérések során elfogadott hibahatárok között mozgott.

Az adott laboratóriumon belüli független mérések, vagyis a lemezek közötti hiba mértéke minden esetben a triplikátumok esetében tapasztalt hibahatárok között maradtak, kivéve „F” minta esetében a Lab3 és Lab4, illetve a „D” minta Lab4 mérései során. A minden esetben 10% alatti hiba az ELISA protokoll jó ismételhetségét mutatja.

XI. táblázat. A közös ELISA eljárás alkalmazása során fellépő hibák (relatív tapasztalati szórás, %SD és a becslés hibájának relatív nagysága, %SE) mértéke.

minta kódja	hiba forrása <sup>a</sup>	Lab 1 %SD (%SE)	Lab 2 %SD (%SE)	Lab 3 %SD (%SE)	Lab 4 %SD (%SE)
„A”	triplikátum	0,8–6,5 (0,4–3,7)	0–4,4 (0–2,5)	1,4–2,9 (0,8–1,7)	0,1–1,4 (0,1–0,8)
	lemezek között	5,0 (3,6)	0,6 (0,4)	2,7 (1,6)	4,6 (3,2)
	laboron belül	14,5 (3,2)	6,4 (1,2)	16,8 (4,0)	8,1 (2,1)
	laborok között	31,6 (3,5)			
„D”	triplikátum	1,2–7,0 (0,7–4,1)	0–4,7 (0–2,7)	0,3–4,2 (0,2–2,4)	0,8–1,8 (0,4–1,0)
	lemezek között	3,3 (2,3)	4,6 (2,7)	2,3 (1,3)	4,3 (3,0)
	laboron belül	5,3 (1,2)	6,1 (1,2)	9,9 (1,9)	3,6 (1,0)
	laborok között	29,9 (3,2)			
„F”	triplikátum	0,4–0,6 (0,3–0,4)	n.a.	0,6–3,7 (0,3–2,2)	0,9–2,5 (0,5–1,4)
	lemezek között	–	n.a.	6,2 (3,6)	4,0 (2,3)
	laboron belül	5,7 (2,3)	n.a.	13,6 (3,2)	4,6 (1,1)
	laborok között	15,5 (2,4)			
„L”	triplikátum	0,6–2,4 (0,3–1,4)	n.a.	0,8–10,5 (0,5–6,1)	0,6–7,7 (0,4–5,5)
	lemezek között	–	n.a.	2,8 (1,6)	6,6 (3,8)
	laboron belül	4,4 (1,8)	n.a.	12,0 (2,9)	8,5 (1,5)
	laborok között	22,5 (3,0)			

Az adott laboratóriumon belül adódó hibák mértéke, mely egy típusú minta összes mért eredményére vonatkozik, már magasabb eltéréseket mutat. Lab1 esetében 4,4–14,5%, Lab2 esetében 6,1–6,4%, Lab3 esetében 9,9–16,8% és Lab4 esetében 6,3–8,5% között változtak a relatív hibaértékek mintától függően.

A négy laboratórium eredményeit összesítve az A jelű minta esetében 31,6%, a „D” jelű mintánál 29,9%, az „F” mintánál 15,5% és az „L” mintánál 22,5% relatív hiba adódott a Cry1Ab-koncentráció meghatározása során.

#### 4.3.2. Saját protokoll

A közös protokoll mellett a Lab1, Lab3 és Lab4 saját ELISA módszerével is megmérte a vizsgálatban résztvevő *MON 810* kukoricalevelek Cry1Ab-toxintartalmát. A saját protokollok eredményeinek eltéréseit a közös módszerhez képes a XII. táblázat részletezi (átlag±szórás), a táblázatban a zárójelben lévő relatív értékek az ugyanabban a laboratóriumban, a közös ELISA módszerrel mért átlageredményektől való eltérést mutatja. A statisztikai elemzés eredményét, vagyis, a próbastatisztikák p értékét is bemutatja a táblázat. Szignifikáns volt az eltérés  $p < 0,01$  esetén.



XII. táblázat. A saját ELISA protokollal meghatározott Cry1Ab-toxinkoncentráció a *MON 810* GMkukorica standard levélmintáiban az egyes laboratóriumokban

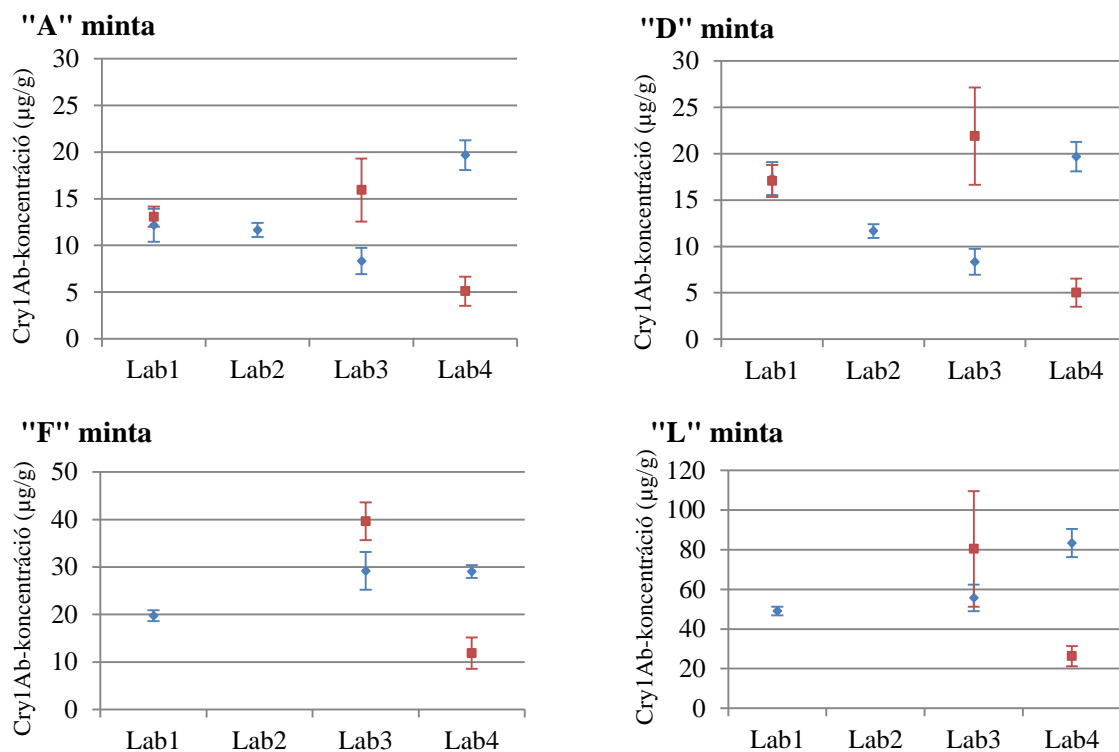
minta kódja	Cry1Ab-koncentráció (µg/g)			
	Lab1	Lab2	Lab3	Lab4
„A”	13,07±1,08 (+7,5%)* p=0,1661**	n.a.	15,93±3,39 (+91,7%) p<0,0001	5,10±1,57 (-74,1%) p<0,0001
„D”	17,05±1,72 (-1,5%) p=0,5828	n.a.	21,89±5,24 (+107,8%) p<0,0001	5,00±1,52 (-79,5%) p<0,0001
„F”	n.a.	n.a.	39,64±3,96 (+35,9%) p<0,0001	11,86±3,28 (-59,1%) p<0,0001
„L”	n.a.	n.a.	80,41±29,17 (+44,4%) p=0,0022	26,28±5,13 (-68,5%) p<0,0001

\* a közös ELISA protokollal meghatározott koncentrációértékek laborok közötti átlagától (táblázat utolsó oszlop) való relatív eltérés

\*\* a relatív eltérés statisztikai mértéke, a különbség szignifikáns p<0,01 esetben

Az 16. ábrán összesítve láthatók a közös és saját protokollal mért Cry1Ab-koncentrációk eredményei. A Lab1 statisztikailag ugyanazt a koncentrációt mérte az „A” és „D” jelű minták esetében, mely eredmény egyértelműen mutatja, hogy a közös ELISA rendszerben használt foszfátpuffer lecserélése bikarbonátpufferre nem befolyásolta a mérés eredményét. Ezzel szemben a Lab3 szignifikánsan magasabb Cry1Ab-toxinkoncentrációkat mért a saját eljárásával, mint a közös protokollal. Ezen túlmenően a relatív tapasztalati szórás (%SD) jelentősen magasabb volt a saját protokoll esetében, mely azt a tényt erősíti, hogy a közös ELISA eljárás megbízhatóbb és reprodukálhatóbb adatokat eredményez, mint a Lab3 saját módszere. Ennek magyarázata, hogy a körmérés során minden laboratórium által alkalmazott közös protokoll a Lab3 saját protokolljának optimalizált verziója volt. A Lab4 mind a négy standard minta esetében szignifikánsan alacsonyabb Cry1Ab-toxinkoncentrációkat mért a saját módszerrel, mely ebben az esetben egy másik gyártó (Abraxis Inc.) által forgalmazott Cry1Ab kimutatására alkalmas ELISA tesztcsomag volt. A legalapvetőbb és analitikai szempontból nagyon fontos különbség Lab4 esetében a két ELISA eljárás között az analitikai standardként használt Cry1Ab-toxin formája volt. A közös protokollként használt Agdia Bt-Cry1Ab-1Ac ELISA tesztcsomag protoxin-specifikus antitesteket tartalmaz, de az optimalizált közös eljárás során az analitikai standard a Cry1Ab aktivált formája volt. A Lab4 saját protokollja az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztcsomag esetében szintén protoxin-specifikus antitestek vesznek részt az immunkomplex kialakításában, azonban ebben az esetben az analitikai standard is protoxin volt. A meghatározás Abraxis esetében protoxin-ekvivalens, és minden esetben korrigálni szükséges a

protoxin-toxin CR-értékével (SZÉKÁCS *et al.* 2010). További különbség a kalibrációban lelhető fel. Agdia esetében a kalibráció szigmoid görbével történt, melyet 0 és 50 ng/ml koncentrációtartományban vettünk fel. Abraxis esetében a gyártó által biztosított standard oldatokkal felvett kalibráló oldatok lineáris kalibrációt tesznek lehetővé a 0–4 ng/ml koncentrációtartományban. A kimutatásra alkalmas alacsony koncentrációtartomány következménye, hogy az Abraxis tesztsomag esetében a magas toxintartalmú levélminták nagyobb hígítása szükséges. A 4.1. fejezetben részletezett eredmények és kalibrációs problémák Cry1Ab-meghatározásban megnyilvánuló hatása jelentkezett itt is, vagyis a szigmoid görbe alsó görbületi szakaszán a meghatározás bizonytalan és rosszul reprodukálható.



16. ábra. A közös (◆) és saját (■) ELISA eljárások által meghatározott Cry1Ab-toxinkoncentrációk (átlag±szórás) a standard *MON 810* GM kukorica levélmintáiban.

A mérés különböző szintjein fellépő hibák mértékét a XIII. táblázat tartalmazza. A hibák mértékei is jól mutatják a saját protokollok eltéréseinek fontosságát a közös ELISA eljáráshoz képest. A Lab1 esetében, ahol a mérés során használt pufferoldat volt a különbség, nem tapasztaltunk közös módszerhez képest nagymértékű eltérést a hibatarományokban. A Lab3 esetében a laboron belüli hiba nagyobb volt a saját protokoll esetében, mely a közös ELISA rendszer még nem optimalizált változata volt. A legnagyobb különbséget a Lab4 esetében tapasztaltuk, ahol a lineáris kalibráció sajátosságai miatt, vagyis hogy a kalibráció a szigmoid görbe alsó szakaszára esik, illetve a minták nagyfokú hígítását igényli, a meghatározás is bizonytalan, a hibatarományok már a triplikátum szintjén is kiugróan magasak (4,1–18,2%).

XIII. táblázat. A saját ELISA eljárások alkalmazása során fellépő hibák (relatív tapasztalati szórás, %SD és becslés hibájának relatív nagysága %SE) mértéke.

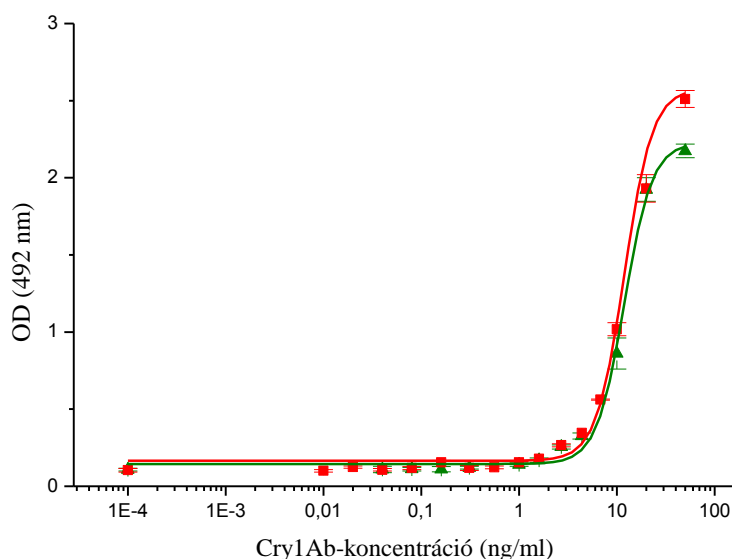
minta kódja	hiba forrása <sup>a</sup>	Lab 1 %SD (%SE)	Lab 2 %SD (%SE)	Lab 3 %SD (%SE)	Lab 4 %SD (%SE)
„A”	triplikátum	2,9–10,2 (1,6–5,9)	n.a.	2,1–4,7 (1,2–2,7)	4,1–15,6 (2,4–9,0)
	lemezek között	–	n.a.	4,2 (3,0)	35,3 (24,9)
	laboron belül	8,3 (2,8)	n.a.	21,3 (5,5)	30,9 (7,3)
	laborok között*			n.a.	
„D”	triplikátum	2,0–5,1 (1,2–3,0)	n.a.	1,7–7,0 (1,0–4,0)	5,9–10,9 (3,4–6,3)
	lemezek között	–	n.a.	3,0 (2,1)	35,6 (25,2)
	laboron belül	10,1 (3,4)	n.a.	9,8 (2,4)	30,5 (8,8)
	laborok között			n.a.	
„F”	triplikátum	n.a.	n.a.	2,8–7,8 (1,6–4,5)	2,7–8,4 (1,6–4,8)
	lemezek között	n.a.	n.a.	11,6 (8,2)	35,2 (24,9)
	laboron belül	n.a.	n.a.	13,2 (3,8)	27,7 (11,3)
	laborok között			n.a.	
„L”	triplikátum	n.a.	n.a.	13,5–19,6 (7,8–13,9)	3,3–18,2 (1,9–10,5)
	lemezek között	n.a.	n.a.	46,4 (32,8)	13,5 (9,6)
	laboron belül	n.a.	n.a.	36,3 (10,9)	19,5 (4,6)
	laborok között			n.a.	

Az általunk elvégzett körmérésben, a közös protokollok alkalmazása mellett 15,5-30%-os relatív szórások mutatkoztak ugyanazon *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukoricaminta esetében, egységes, standardizált ELISA tesztsomag alkalmazása mellett. A tapasztalt relatív hibák, melyek egyébként szigifikáns eredményeket eredményeznek a meghatározott toxintartalmakban, az általunk végzett körmérésben alacsonyabbak, mint egy hasonló szisztematikus vizsgálat esetében, ahol a laborok közötti relatív hiba mértéke 36,3% volt (NGUYEN *et al.* 2008). Az eredmények értékelésekor figyelembe kell venni, hogy a mi vizsgálatunk során a standardizált ELISA módszer mellett a minta-előkészítési folyamat és a teszt végén az optikai sűrűség mérésére alkalmazott ELISA olvasók egymástól eltértek, ugyanúgy, ahogy a kiértékelő szoftver is. Ennek függvényében a tapasztalt hibák a műszerezettség standardizálásával esetlegesen tovább csökkenthetők, de úgy vélem nem számottevő mértékben. A Cry-toxint termelő GM növényeknél a Cry-toxin termelésében való eltérések megjelennek fajtaszinten is, mikoris ugyanazon fajtához tartozó, ugyanazon genetikai eseményt hordozó növények esetében egymástól eltérő toxintartalmak mérhetők (THEN és LORCH 2008). Az egyedi különbségek mértéke azonban nem nagyobb, mint a körmérésben tapasztalt hibaértékek, így ilyen esetben nem egyértelmű, hogy az egyedi jelleg vagy az analitikai eljárás okozza-e az eltéréseket.

#### 4.4. Mátrixhatás vizsgálata Cry1Ab-meghatározás során növényi és állati szövetekben

##### 4.4.1. Kukorica-levélszövetben jelentkező mátrixhatás

A 4.1. fejezetben bemutatott eredmények mellett, ugyanazon kísérletsorozat keretében vizsgáltuk DK440 kukorica levélszövetében fellépő mátrixhatást. A levélmátrix extraktumában felvett szigmoid kalibráló görbe  $IC_{50}$ -értékét hasonlítottuk a pufferben felvett standard görbéhez, az analitikai standard az Abraxis Inc. cégtől vásárolt Cry1Ab-toxin volt (17. ábra). A géntechnológiai úton nem módosított DK440 kukorica levélszövetében, az Abraxis Inc.-től vásárolt Cry1Ab-toxinnal felvett standard görbe  $IC_{50}$ -értéke  $11,93 \pm 0,55$  ng/ml volt, mely nem különbözött szignifikánsan a pufferben felvett szigmoid görbe azonos paraméterétől ( $12,28 \pm 0,53$  ng/ml), mutava ezzel, hogy kukoricalevél esetében nem jelentkezik mátrixhatás Cry1Ab-toxin meghatározása során. A kimutatási határ kukoricalevél esetében 6 ng/ml.



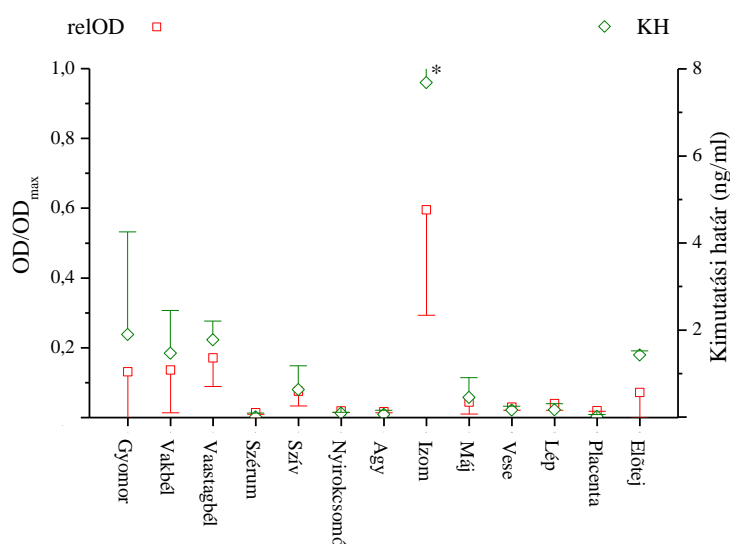
17. ábra. Mátrixhatás vizsgálata DK440 kukorica levélszövetében. A Cry1Ab analitikai standardet (Abraxis Inc.) 0–50 ng/ml koncentrációtartományban vettük fel foszfátpufferben (■) és kukoricalevélszövet-extraktumban (▲).

A mátrixhatást standard addíciós módszerrel is vizsgáltuk, melyhez az Abraxis ELISA tesztcsomag által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris kalibráló görbét használtuk (0–4 ng/ml). A MTA NKI Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályának R1 fenológiai stádiumban gyűjtött, liofilizált kukoricalevél referenciamintáját használtuk a mátrixhatás vizsgálata során. A levélminta extraktumának (1:500 hígítás) toxintartalma  $1,25 \pm 0,03$  ng/ml volt, mely a liofilizált mintára vonatkoztatva  $15,61 \pm 0,41$  µg/g Cry1Ab-toxint jelent. A friss

kukoricalevél szárazanyagtartalma  $19,2 \pm 1,1\%$ , így a friss levél toxintartalma  $3,00 \pm 0,08 \mu\text{g/g}$  volt. A mesterséges szennyezéshez az Abraxis ELISA tesztsomag  $4 \text{ ng/ml}$  koncentrációjú standard oldatát használtuk, melyet  $0, 0,8, 1,6$  és  $2 \text{ ng/ml}$  koncentrációban adagoltunk a hígított levélextraktumhoz. A mesterségesen szennyezett levélmátrixban felvett kalibrációs görbére illesztett egyenes regressziós együtthatója ( $R^2=0,9982$ ) igen jó illeszkedést mutatott. A mérés után, a szennyezés mértékével számolva, a kukoricalevél-extraktum Cry1Ab-toxintartalma  $1,29 \pm 0,04 \text{ ng/ml}$  értékűnek adódott, mely a liofilizált mintára vonatkoztatva  $16,20 \pm 0,47 \mu\text{g/g}$ , friss levélre pedig  $3,12 \pm 0,09 \mu\text{g/g}$ . A statisztikai elemzés során (*Student*-féle t-teszt,  $t=1,56$ ,  $p<0,01$ ) a levélextraktum Cry1Ab-toxintartalma között talált  $3,9\%$ -os különbség nem mutatkozott szignifikánsnak az extraktum  $1:500$  hígítása esetében. Tehát az általunk vizsgált hígítás mellett nem jelentkezik mátrixhatás a levélszövet esetében.

#### 4.4.2. Sertés különböző szöveteiben jelentkező mátrixhatások

A sertésszövetekben fellépő esetleges mátrixhatások vizsgálata során sertésszervek közül szív-, vese-, lép-, máj-, izom-, nyirokcsomó-, agy- és vérszérumszöveteket, valamint a tápcsatorna tartalmát vizsgáltuk a gyomorban, a vakbélben és a vastagbélben. Három független mérésből meghatározott relatív OD-értékek ( $OD_{rel}$ ), melyek az  $5 \text{ ng/ml}$  koncentrációjú standard esetén mért OD-érték százalékos arányai, illetve a kimutatási határok a 18. ábrán láthatók a vizsgált szövetekre vonatkozóan.



18. ábra. Különböző sertésszövetben meghatározott kimutatási határ (KH) és relatív OD-értékek ( $OD_{rel}$ ) Cry1Ab-toxin koncentrációjának meghatározása során EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate tesztsomag esetében. (\* az izomszövet kimutatási határára vonatkozó  $7,99 \text{ ng/ml}$  relatív tapasztalati szórás az ábra skálázása miatt nem látható.)

A vérszérum esetében a 0 ng/ml koncentrációjú standard oldat esetében meghatározott kimutatási határnál alacsonyabb értéket tapasztaltunk. Az ELISA módszer kivitelezése során az első lépés az érzékenyítés, melynek során specifikus antitestet vagy antigént kötünk a mikrotiterlemez felszínére. Második lépés az érzékenyítés után, a lemez felületén esetlegesen maradt üres kötőhelyek hatékony blokkolása, hogy megelőzzük a mért mátrix különböző, nem mérendő elemeinek kötődését. Ez a blokkolási folyamat sokszor nem tökéletes, egyéb molekulák (pl.: antitest–enzim-konjugátum, nem célvegyület) bekötődése következtében minimális háttérjel a vakminta esetében is tapasztalható a kereskedelmi tesztsomagok esetében is. A plazma esetében a minta számos különböző antitestet tartalmazott, amely az állat életében az öröklött és szerzett immunitás során termelődött a szervezetben.

A legmagasabb átlagos kimutatási határt ( $7,95 \pm 7,99$  ng/ml) az izomszövet esetében határoztuk meg. A rendkívül magas szórás azt mutatja, hogy ez a szövettípus bonyolult mátrixot jelent a Cry1Ab-koncentráció meghatározásának szempontjából. Ez a nehézség a toxintartalom pontos meghatározásában fontos problémaként jelentkezik élelmiszer-biztonsági esetekben: minőségellenőrzés vizsgálat során, ahol a húsipari termék GMO-mentességének igazolása a cél, a magas mátrixhatás miatt nem mutatható ki a húsban esetlegesen megjelenő Cry1Ab-toxintartalom.

#### **4.5. Cry4-toxin kimutatásra alkalmas optimalizált ELISA rendszer**

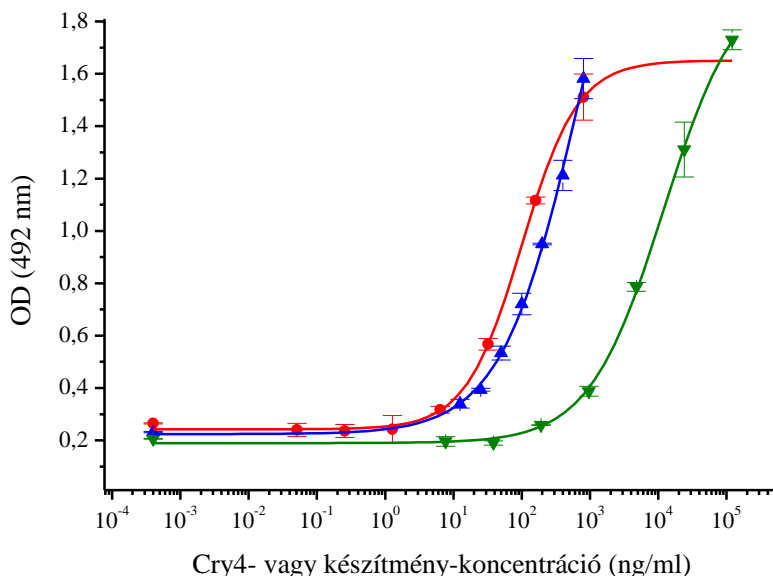
Az immunanalitikai eljárások alapja a vizsgált célvegyület kötése gerinces szervezetben termelődő specifikus ellenanyaggal. A módszer az immunrendszer azon sajátosságát használja ki, hogy egy idegen anyag ellen olyan ellenanyagot termel védekezésképpen, mely szelektíven képes az idegen anyagot felismerni és hozzákapcsolódni. Minthogy Cry4-toxinspecifikus ELISA tesztsomag kereskedelmi forgalomban a mai napig nem kapható, a Cry4-toxin kimutatásra alkalmas szendvics típusú ELISA módszert fejlesztettünk, melyhez a Cry4-specifikus, nyúlszérumból tisztított antitestet enzimmel jelöltük meg. A jelöléshez az ELISA rendszerekben leggyakrabban alkalmazott tormaperoxidáz (*horseradish peroxidase*, HRP) enzimet használtuk, melynek enzimatis aktivitása magas és kevésbé sérülékeny a biológiai minták vizsgálata során esetlegesen fellépő gátló hatásokkal szemben (TIJSEN 1985). A Cry4-specifikus antitesthez kovalens kötéssel rögzítettük a HRP enzimet kétlépéses glutáraldehydes konjugációval, illetve perjodátos módszerrel. Az HRP enzimaktivitását a konjugáció előtt és után, a gélszűrést és dialízist követően is meghatároztuk előbb szubsztráttal, majd az optimalizált ELISA rendszer eredményei által. A HRP enzimatis aktivitása nem csökkent a konjugációs folyamatok során sem a glutáraldehydes, sem a perjodátos módszer esetében. A konjugáció

hatékonyságát a direkt ELISA rendszer analitikai paramétereivel jellemeztük, az optimalizált ELISA rendszer felépítéséhez szükséges konjugátum hígítási arányával, mellyel a lehető legérzékenyebb rendszert tudtuk felépíteni.

A glutáraldehides módszer során — HARLOW és LANE (1988) eredményeivel megegyezően — a Cry4-specifikus antitest és HRP konjugáció hatékonysága alacsonyabb volt a korlátozott számú, a kötődés kialakításához szükséges aminocsoportok száma miatt. A konjugátum, 1:100 hígítású érzékenyítő Cry4-specifikus antitest mellett, a direkt ELISA rendszerben hígítatlanul minimális analitikai jelet adott, mely már 1:2 hígításnál nem volt mérhető. A perjodátos módszerrel szintetizált konjugátumot 8 koncentrációban 1:50 és 1:30000 hígítási tartományban vizsgáltuk, melyek közül optimálisnak az 1:100 hígítás adódott. A fejlesztett direkt ELISA rendszer analitikai paramétereit rosszabbak voltak a glutáraldehides konjugálási módszer esetében, mint a perjodátos eljárás során, így az optimalizált ELISA rendszer kialakításában ez utóbbi módszerrel létrehozott Cry4-specifikus-antitest–HRP-konjugátumot használtuk.

Az analitikai standard görbét 7 pontban, 0,06 és 1000 ng/ml koncentrációtartományban vettük fel analitikai tisztaságú Cry4-toxinnal. Negatív kontrollként foszfátpuffert használtunk. A standard görbét a Cry4-specifikus antitest 1:100, 1:200 és 1:625 hígításával érzékenyített lemezen vizsgáltuk. Az optimális kalibrációs görbét az érzékenyítő antiszérum 1:500, az antitest–HRP-konjugátum 1:100 hígítása mellett értük el.

A VECTOBAC WDG *Bti*-készítménnyel felvett standard görbe 10 és 1000 ng/ml, míg a VECTOBAC 12 AS készítmény 8 és 10000 ng/ml koncentrációtartományban eredményezett szigmoid görbét (19. ábra). A granulátum formátumú készítménnyel felvett szigmoid görbe a tiszta Cry4-toxin görbéjével együtt fut, ennek oka, hogy a granulátum esetében a hígítási sort a granulátumok felszínéről leoldott tömény toxinoldattal készítettük el. A kimutatási határ tiszta Cry4-toxin esetében 2 ng/ml értékűnek adódott.



19. ábra. Analitikai standard görbe az optimalizált ELISA rendszerben: tiszta Cry4-toxin (●), Cry4-tartalmú, granulátumkészítmény (VETOBAC WDG) (▲) és Cry4-tartalmú, szuszpenzió készítmény (VETOBAC 12 AS) (▼). Az optimalizált ELISA rendszer paraméterei: érzékenyítő Cry4-specifikus antitest 1:500 hígításban, antitest-HRP konjugátum 1:100 hígításban.

A *Bti*-készítmények Cry4-tartalma között 40-szeres különbséget mértünk, VETOBAC WDG esetében  $54,5 \pm 2,02\%$ , míg VETOBAC 12 AS  $1,23 \pm 0,21\%$  volt a Cry4-toxin koncentrációja. A szuszpenzió esetében jelentős mátrixhatást tapasztaltunk, melynek oka valószínűleg a készítményhez adott antikoaguláns adalékanyag volt. Biológiai hatékonyságuk 3000 ITU/mg a granulátum és 1200 ITU/mg a szuszpenzió esetében.

Felszíni vízben fellépő esetleges mátrixhatás vizsgálatokor mindkét *Bti*-készítmény standard görbéjét felvettük, a granulátum esetében 0,192–2000  $\mu\text{g/ml}$ , a szuszpenzió esetében 0,128–3000  $\mu\text{g/ml}$  koncentrációtartományban. A vízmintát Hévízről hoztuk a mátrixhatás vizsgálatához. A granulátum esetében csekély mértékű mátrixhatást tapasztaltunk, ezzel szemben – hasonlóan a foszfátpufferben felvett kalibrációs görbéhez – a szuszpenziónál a nominális koncentráció mindössze  $26,3 \pm 4,3\%$ -át tudtuk visszamérni. A gyakorlati kimutatási határ granulátum esetében az optimalizált ELISA rendszer esetében 170 ng/ml, szuszpenzió esetében 900 ng/ml. A fejlesztett ELISA rendszer magas kimutatási határának oka (2 ng/ml tiszta Cry4-toxin esetében), hogy a mérés során a lemez érzékenyítéséhez, illetve az antitest–HRP-konjugátum kialakításához ugyanazt a Cry4-specifikus antitestet használtuk. A kimutatási határ ELISA rendszerek esetében egy nagyságrenddel csökkenthető, amennyiben különböző eredetű



antitesteket alkalmazunk az érzékenyítési és antitest–enzim-konjugációs folyamatok során. Jelen ELISA-fejlesztési munkánk során nem álltak rendelkezésünkre különböző eredetű antitestek, így a kidolgozott módszer környezeti vízminták Cry4-tartalmának meghatározására csak koncentrált követően alkalmazható, mivel a gyakorlatban alkalmazott dózis granulátum esetében 0,4 µg/ml, szuszpenzió esetében 1 µg/ml.

A környezeti vízmintákat szilárd fázisú extrakcióval, C18-as oszlopon (#20515, SepPak Plus C18; Waters Associates, Milford, MA, USA) koncentráltuk először. A Cry-toxinok lektin típusú fehérjék, így kitapadási képességük igen magas. Ezen tulajdonságuk miatt a C18 oszlopon való koncentráltatás nem eredményezett visszamérhető Cry4-koncentrációt a mintákban. Ezért a minták sűrítését liofilizálást követő (Alpha 12LD liofilizáló berendezés; Christ GmbH Osterode, Németország), desztillált vízben való visszaloldással érték el. A vizsgált 11 vízminta szárazanyag-tartalma  $1,47 \pm 0,19$  mg/ml volt, a módszer 250-szeres töményítést eredményezett.

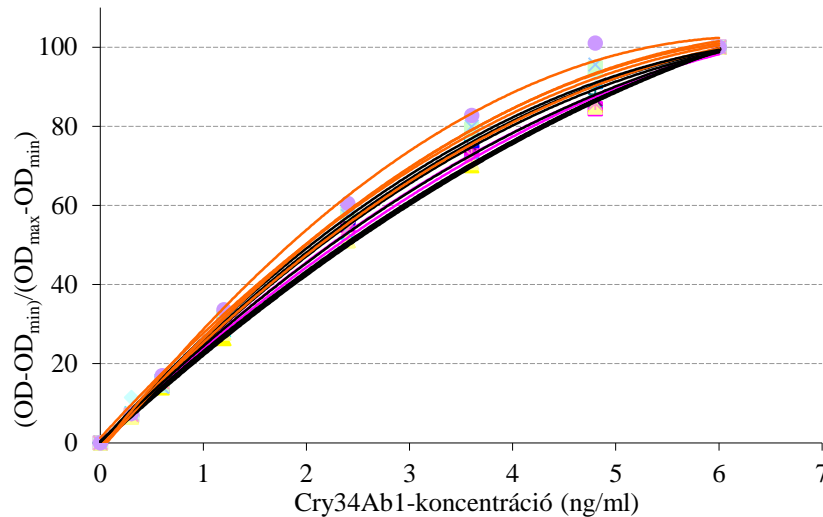
A kidolgozott, Cry4-toxin kimutatására alkalmas ELISA eljárás jelentősége abban áll, hogy jelenleg kereskedelmi forgalomban nem kapható ezen toxin kimutatására alkalmas immunanalitikai eljárás.

#### **4.6. Cry34/35Ab1-kimutatására alkalmas ELISA rendszerek standard görbéinek stabilizálása, alkalmazhatóságának vizsgálata**

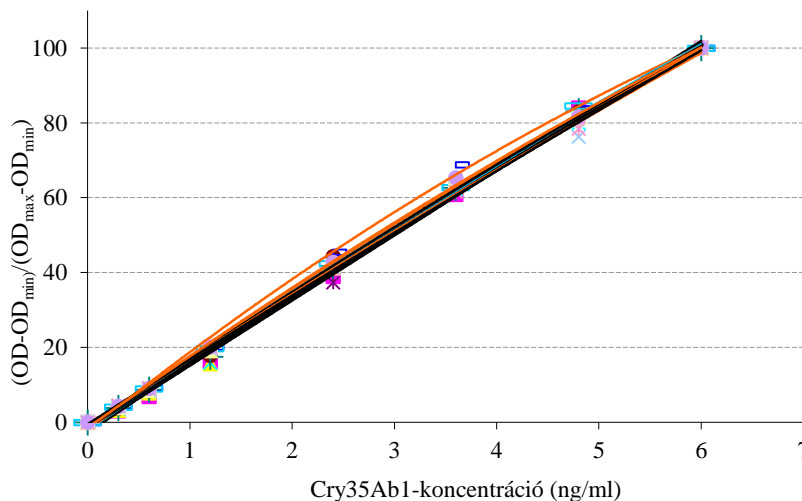
A 4.8. fejezetben bemutatásra kerülő környezeti hatásvizsgálat része volt a Cry34/35Ab1 toxinok mennyiségének meghatározása a kukoricánövénnyel levelében és a pollenben. A három szerv kiválasztásánál figyelembe vettük, mely növényi részekben kezdődik, illetve hol a legintenzívebb a fertőzőség. A toxinkoncentrációkat ELISA eljárással határoztuk meg (EnviroLogix QualiPlate™ for Cry34Ab1 és Acadia BioScience Cry35Ab1 Plate), melyhez az analitikai standardet a Dow AgroSciences biztosította.

A mérés során fellépő esetleges mátrixhatások csökkenthetők vagy megszüntethetők a minták megfelelő hígításával. A két választott levélszövet esetében a közel izogenikus kukoricáról származó mintákat szennyeztük mesterségesen az analitikai standard 0, 0,6 és 4,8 ng/ml koncentrációjú oldataival. A szövetmintákat hígítatlan és 1:1000 hígításban vizsgáltuk. A pufferben felvett standard görbéhez hasonlítva a mért abszorbanciaértékeket, mindhárom szövettípus esetében 1:10 minimális hígítást állapítottunk meg, melynél mátrixhatás már nem jelentkezik. A kimutatási határ a két szövettípusra Cry34Ab1-toxin esetén 0,22 ng/ml, Cry35Ab1-toxin esetén 0,12 ng/ml. Ez utóbbi alacsonyabb érték a Cry35Ab1-toxin mérésekor jelentkező alacsonyabb háttérjelnek köszönhető. A független mérések során felvett kalibrációs görbék stabilitásának vizsgálatakor a standard oldatokat fagyasztóban -20°C-on, illetve

StabilZyme SELECT hozzáadásával hűtőben 4°C-on tároltuk. Az összehasonlításához a kalibrációs görbéket normalizáltuk. Mindkét toxin esetében a standard görbék jól reprodukálhatók mindkét tárolás esetén, illetve a tárolási módok különbözősége nem eredményez eltérő kalibrációs görbét a frissen készített standard oldatokhoz képest (20. és 21. ábrák).



20. ábra. EnviroLogix QualiPlate kit for Cry34Ab1 ELISA eljárással mért Cry34Ab1 analitikai standard (Dow AgroSciences) foszfátpufferben (PBST) felvett másodfokú polinóm kalibrációs görbéje: — frissen készített, — -20°C-on tárolt, — StabilZyme SELECT hozzáadásával 4°C-on tárolt.

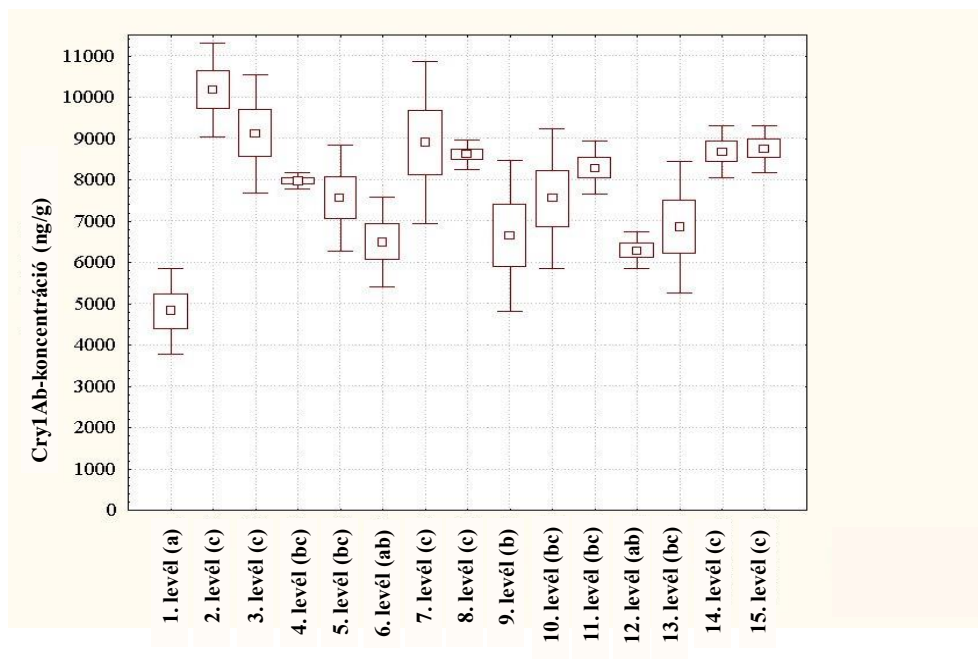


21. ábra. Acadia BioScience Cry35Ab1 Plate tesztcsomag ELISA eljárással mért Cry35Ab1 analitikai standard (Dow Agro-Sciences) foszfátpufferben (PBST) felvett másodfokú polinóm kalibrációs görbéje: — frissen készített, — -20°C-on tárolt, — StabilZyme SELECT hozzáadásával 4°C-on tárolt.

#### 4.7. A *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-toxintermelését befolyásoló tényezők

##### 4.7.1. A toxin eloszlása a levélben

A *MON 810* GM kukorica különböző levélszintjein, Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag segítségével meghatározott átlagos Cry1Ab-toxintartalom az R3 fenológiai stádiumban 4821–10054 ng/g koncentrációtartományban változott (22. ábra). A közel izogénikus vonal levélmintáiban, melyet negatív kontrollként használtunk, nem mutattuk ki a Cry1Ab-toxint. Az Abraxis ELISA tesztsomag, gyártó által állított kimutatási határa 0.12 ng/ml, ami azt jelenti, hogy 156 ng Cry1Ab/g friss tömeg alatt kukorica-levélszövetben nem mutatható ki a toxin. A Cry1Ab-koncentrációk meghatározásakor 0,6–6,2% relatív hiba adódott egy növény mintájának egyszeri mérése során, az előkészített minta három ismétlésben való mérésekor. Ugyan ezen minta több, egymástól független mérése során 19,2–21,4%-os relatív hiba adódott. Mindkét esetben a hibaforrás a minta-előkészítési folyamatot, a személyi munkafolyamatokat, illetve az Abraxis tesztsomag által mért eredmények ismételhetségét jelentette. Az ugyanazon genetikai eseményt hordozó kukoricák több egyedéről vett minták között a hiba mértéke 22,3% volt. A statisztikai elemzés során megállapítottuk, hogy a legalsó levél Cry1Ab-tartalma szignifikánsan alacsonyabb volt a többi levélszinthez képest. Az átlag-toxinkoncentráció  $4821 \pm 1042$  ng Cry1Ab toxin/g, míg a többi levélszintet nézve a toxinkoncentráció 5090 és 11050 ng Cry1Ab toxin/g közötti érték (átlag:  $7990 \pm 1530$  ng/g). A levélszintek közötti különbségeket a 22. ábra szemlélteti.



22. ábra. A *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukorica által termelt Cry1Ab-toxintartalom az egyes levélszinteken. A zárójelben lévő betűk eltérése szignifikáns különbséget jelöl, a szignifikáns differencia 1823 ng Cry1Ab toxin/g friss levéltömeg  $p=0,01$  szignifikanciaszinten.

A *MON 810* GM kukorica levélszöveiteiben termelődő Cry1Ab-toxin eloszlásának vizsgálata során meghatároztuk a kukorica első nővirágját hordozó levélen belül a toxinkoncentráció változását. Kereszt- és hosszirányú eloszlást vizsgáltunk, melynek eredményeit a XIV. táblázat részletezi. A keresztirányú mintákat a levéllemez közepén vettük, a levélértől a levél széle felé. A mért koncentrációk 8200 és 10550 ng Cry1Ab toxin/g friss levél tartományban változtak. A statisztikai elemzés során megállapítottuk, hogy a levél széle felé haladva 20%-os csökkenés mutatkozik a Cry1Ab-toxinkoncentrációkban, mely szignifikáns eltérést jelent (a szignifikáns differencia 1155 ng Cry1Ab toxin/g friss levél  $p=0,01$  szignifikanciaszinten).

A hosszirányú toxineloszlás vizsgálata során a legalacsonyabb koncentrációt a levélhüvely-mintákban határoztuk meg  $1892 \pm 223$  ng/g értékkel, míg a legmagasabb érték a zöld levéllemez közepén vett mintában adódott ( $8924 \pm 1507$  ng/g). A statisztikai analízis a négy mintázott hely között szignifikáns különbséget mutatott (a szignifikáns differencia 2220 ng Cry1Ab toxin/g friss levél  $p=0,01$  szignifikanciaszinten). A levél csúcsi részéről vett mintában, eltávolítva az elszáradt barna szöveti részeket, a mért koncentráció a levéllemez közepén mért koncentrációmennyiséghez közelít, de nem tér el szignifikánsan a levélalagnál vett minták toxintartalmától sem. A jelentkező  $59,1 \pm 24,1\%$ -os növekedés a Cry1Ab-tartalomban az elszáradt rész eltávolítását követően jól korrelál az elszáradt rész nagyságával, mely a mintázott részek  $39,9 \pm 4,3\%$ -át tette ki.

XIV. táblázat. A *MON 810* GM kukorica R3 fenológiai stádiumában mért Cry1Ab-toxintartalma a nővirág szintjén elhelyezkedő levél kereszt- és hosszirányú mintáiban, illetve az R4 fenológiai stádiumban mintázott zöld, sárga és barna levélminták toxintartalma.

Mintázott levélrész		Cry1Ab.koncentráció (ng/g)
keresztirányú minták <sup>a</sup>	levélér	9885±877 (b)
	közvetlen a levélér mellett	10552±1065 (b)
	2 cm-re a levélértől	8509±351 (a)
	3 cm-re a levélértől	8571±480 (a)
	levélszél	8194±480 (a)
hosszirányú minták <sup>b</sup>	levélhüvely	1892±223 (c)
	levélalap	5535±1073 (e)
	levéllemez közepe	8924±1507 (f)
	levélcsúcs*	4579±1864 (d)
	zöld levélcsúcs	7749±1598 (ef)
szár		1071±101
száradási minták <sup>c</sup>	zöld levél	9023±1697 (i)
	sárga levél	6089±1229 (h)
	barna levél	2550±153 (g)

<sup>a</sup> A mért Cry1Ab-koncentrációk (átlag±szórás) mögött, a zárójelben lévő betűk (a,b) eltérése szignifikáns különbségeket jelöl. A szignifikáns differencia  $p=0,01$  szignifikanciaszinten 1,155 ng Cry1Ab toxin/g friss levéltömeg

<sup>b</sup> A mért Cry1Ab-koncentrációk (átlag±szórás) mögött, a zárójelben lévő betűk (c-f) eltérése szignifikáns különbségeket jelöl. A szignifikáns differencia  $p=0,01$  szignifikanciaszinten 2,220 ng Cry1Ab toxin/g friss levéltömeg

<sup>c</sup> A mért Cry1Ab-koncentrációk (átlag±szórás) mögött, a zárójelben lévő betűk (g-i) eltérése szignifikáns különbségeket jelöl. A szignifikáns differencia  $p=0,01$  szignifikanciaszinten 2,230 ng Cry1Ab toxin/g friss levéltömeg

\* A levélcsúcs tartalmazta az elszáradt, barna szövetrészt is

Az elszáradási folyamat Cry1Ab-toxinszintekre gyakorolt hatásának vizsgálatok a mintázott három fázis (zöld, sárga, barna) között minden esetben szignifikáns különbség adódott a statisztikai elemzés során (a szignifikáns differencia 2230 ng Cry1Ab toxin/g friss levél,  $p=0,01$  szignifikanciaszinten). A zöld levél toxintartalmához képest (9023±1697 ng/g) átlagosan 32%-os (6089±1229 ng/g) és 72%-os (2550±153 ng/g) csökkenés mutatkozott a száradási folyamat során. A folyamat fiziológiai magyarázata még ismeretlen, feltételezhető a toxin bomlása a száradás során, illetve lehetséges folyamat, hogy a száradó részekből a növény a többi fehérjével együtt a Cry-toxint is transzportálja a még élő szövetekhez (CHRISTENSEN *et al.* 1981). Eredményeink jól egyeznek szakirodalmi adatokkal, mely szerint a Cry1Ab-toxinkoncentráció arányos a növényi szövet klorofilltartalmával gyapot esetében (ABEL és ADAMCZYK 2004).

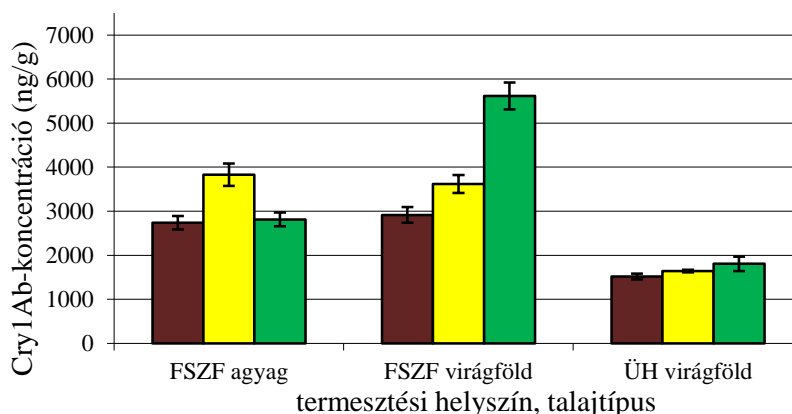
Az eltérő toxintartalmak magyarázata lehet a klimatikus viszonyok változása a kukorica fejlődése során. A korai növekedési szakaszban a növény Cry-toxintermelését bizonyítottan befolyásolja a talaj nitrogéntartalma (BRUNS és ABEL 2003). Különböző mennyiségű, biológiailag hozzáférhető nitrogénmennyiség többszörös különbséget okoz a növény Cry1Ab-toxintartalmában. A változó csapadékmennyiség következtében a kukorica levélszintjeinek fejlődése során változik a talajban a hozzáférhető nitrogén mennyisége, így ezzel párhuzamosan a fejlődő levél toxintartalma is. A jelen vizsgálatban mért toxinkoncentrációk egyezést mutatnak a *MON 810* hivatalos dokumentációjában közölt adatokkal (CERA 2015) és bizonyos szakirodalmi eredményekkel, melyekben a mért Cry1Ab-koncentrációk az általunk mért tartományba esnek, habár a fellépő szórások meglehetősen nagyok (NGUYEN 2004, NGUYEN és JEHLE 2007). Az alsó és felső levelek toxintartalmában jelentkező szignifikáns különbséget NGUYEN és JEHLE leírta (2007). Más vizsgálatok azonban alacsonyabb Cry1Ab-koncentrációkról számolnak be, levél esetében pl. 350–534 ng/g (BRUNS és ABEL 2003).

A *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-termelése tehát nem egységes adott növényi szövetre vonatkozóan sem. A környezeti hatásvizsgálat során fontos, hogy megfelelő, egymással összehasonlítható mintákat elemezzünk. Vizsgálataink eredményei felhívják a figyelmet a pontosan megtervezett mintavételi folyamat fontosságára, illetve esetlegesen megkérdőjelezhetik a szakirodalomban már publikált eredményeket.

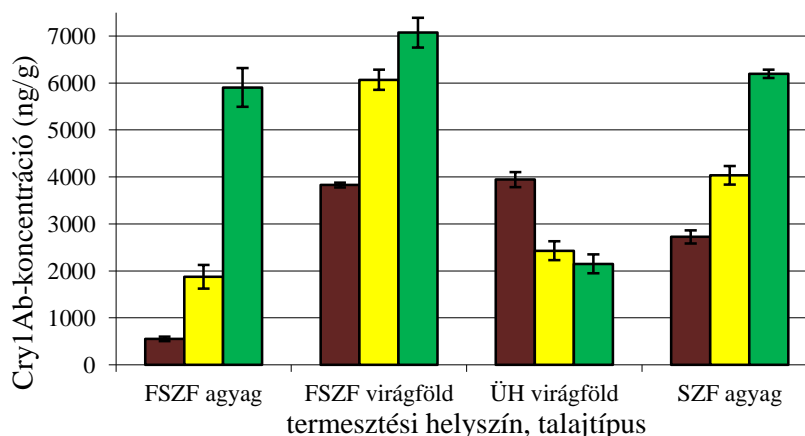
#### **4.7.2. A termesztési körülmény hatása a Cry1Ab-koncentrációra**

A különböző talajtípusok Cry1Ab-termelésre gyakorolt hatását két *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukoricavonal esetében vizsgáltuk (*MON 810* „A”, *MON 810* „B”). Mintáztuk a vegetatív (levél, szár, gyökér, csuhélevél) és genaratív (csutka, címer, bibe) szerveket. A levelek esetében a száradási folyamatot is vizsgáltuk, mintáztuk a zöld, sárga (félig elszáradt) és barna (elszáradt) leveleket. A vizsgált talajtípusok a virágföld és az agyagbemosódásos barna erdőtalaj (III<sub>3</sub>) (továbbiakban: agyag) voltak, melyeket két termesztési körülmény, így üvegházi (tenyészedenyben) és félszabadföldi (tenyészedenyben szabadföldi kitettség mellett) viszonyok között vizsgáltunk. A *MON 810* „B” fajtát szabadföldi körülmények között is termesztettük, agyagtalajban. A levél száradási folyamata hasonlóképpen befolyásolta a Cry1Ab-toxinszinteket a vizsgált *MON 810* fajták esetében, mint a 4.7.1. fejezetben bemutatott kísérlet során, kivéve két esetben. A toxintartalom csökkenő sorrendben: zöld levél > sárga levél > barna levél. A zöld levelek toxintartalmát tekintve a *MON 810* „B” fajta esetében mindkét talajtípus és mindhárom termesztési körülmény esetében magasabb toxinszintet mértünk. A virágföldben nevelt

kukoricák toxintartalma magasabb volt, mint az agyagos talajban ugyanazon termesztési körülmény mellett. Az üvegházi körülmények melletti termesztés alacsonyabb Cry1Ab-toxinkoncentrációt eredményezett zöld és sárga levél esetében (23. és 24. ábrák). Ennek oka az üvegházban fellépő korlátozott fényviszonyok, melyek alacsonyabb fotoszintetikus aktivitást eredményeznek a levélszövetben. Az eredmények felhívják a figyelmet a GM kukorica környezeti hatásvizsgálata során a talajtípus és termesztési körülmény megfontolt kiválasztására, mert nagyban befolyásolhatják a hatásvizsgálat eredményét, ezen keresztül pedig engedélyezési indokokat is.

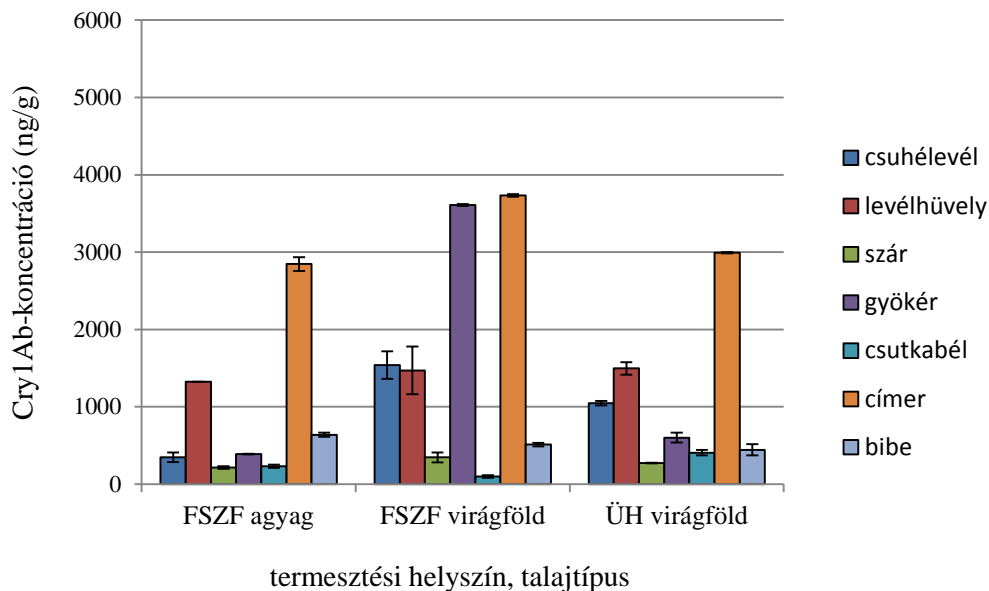


23. ábra. A *MON 810* „A” géntechnológiai úton módosított kukoricafajta levélmintáiban mért Cry1Ab-toxinkoncentrációk a vizsgált talajtípusok és termesztési körülmények (FSZF=„főlszabadföld”, ÜH= üvegház) során. ● barna (elszáradt) levél, ● sárga (félig elszáradt) levél, ● zöld levél

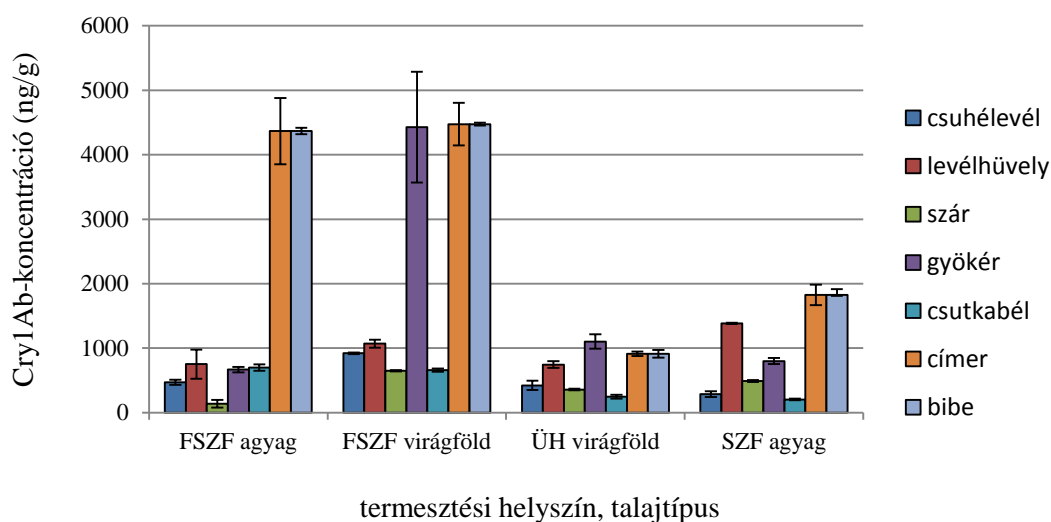


24. ábra. A *MON 810* „B” géntechnológiai úton módosított kukoricafajta levélmintáiban mért Cry1Ab-toxinkoncentrációk a vizsgált talajtípusok és termesztési körülmények (FSZF=„főlszabadföld”, ÜH= üvegház, SZF=szabadföld) során. ● barna (elszáradt) levél, ● sárga (félig elszáradt) levél, ● zöld levél

A levélszövet mellett mintázott és vizsgált vegetatív és generatív szervek Cry1Ab-toxintartalmának változását a különböző kísérleti körülmények között a két *MON 810* fajta esetében a 25. ábra és 26. ábra szemlélteti.



25. ábra. A *MON 810* „A” géntechnológiai úton módosított kukoricafajta vegetatív (csuhélevél, levélhüvely, szár, gyökér) és generatív (csutkabél, címer, bibe) szerveiben mért Cry1Ab-toxinkoncentrációk a vizsgált talajtípusok és termesztési körülmények (FSZF=„félszabadsföld”, ÜH= üvegház) során.

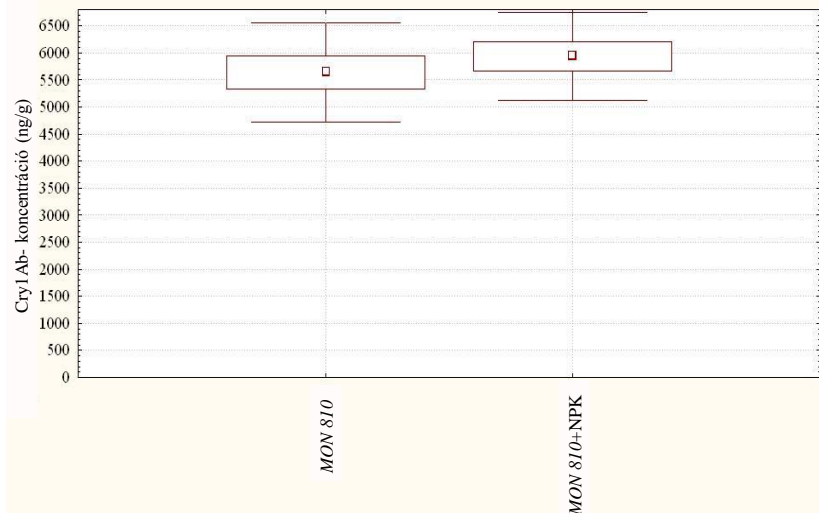


26. ábra. A *MON 810* „B” géntechnológiai úton módosított kukoricafajta vegetatív (csuhélevél, levélhüvely, szár, gyökér) és generatív (csutkabél, címer, bibe) szerveiben mért Cry1Ab-toxinkoncentrációk a vizsgált talajtípusok és termesztési körülmények (FSZF=„félszabadsföld”, ÜH= üvegház, SZF=szabadsföld) során.



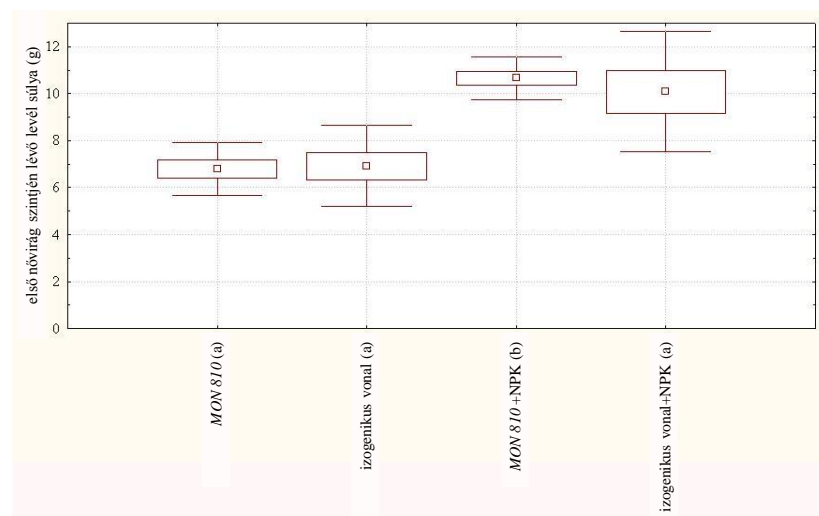
#### 4.7.3. Nitrogén-foszfor-kálium kevert műtrágya hatása a toxintermelésre

Méréseink során kismértékű emelkedést tapasztaltunk az egységnyi nedves levéltömegre eső Cry1Ab-toxinkoncentrációban a műtrágyázott *MON 810* GM kukorica esetében, azonban az emelkedés nem jelentett szignifikáns különbséget (27. ábra).

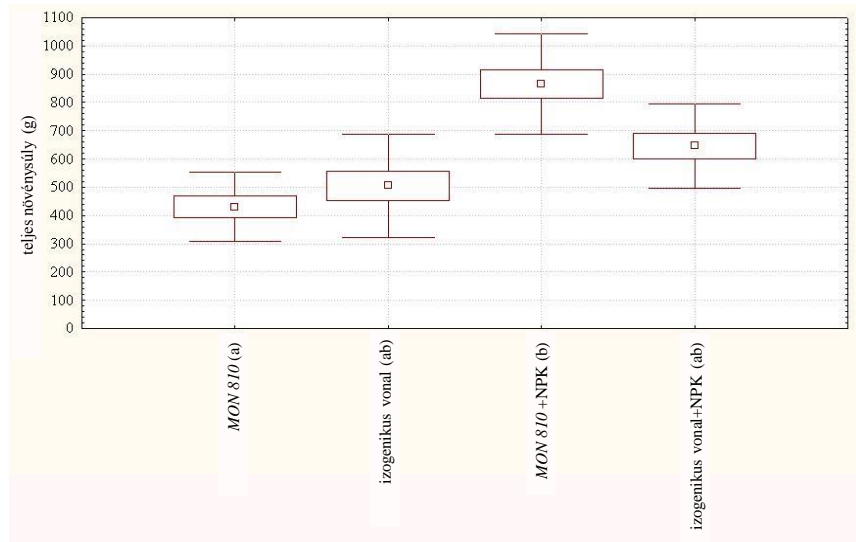


27. ábra. A műtrágya nélküli és műtrágyázott *MON 810* GM kukorica nedves levélmintáiban mért Cry1Ab-toxinkoncentrációk.

A nedves levéltömeg ugyanakkor szignifikánsan eltért, amennyiben mind a *MON 810* és mind a közel izogenikus vonalának tömege is közel másfélszeresére emelkedett optimális NPK adása után (28. és 29. ábrák).



28. ábra. Az első nővirág szintjén lévő levél nedves tömege a GM és közel izogenikus vonal esetében a műtrágya nélküli és nitrogén-foszfor-kálium (NPK) kevert műtrágyát tartalmazó kezelésekben. A zárójelben lévő betűk különbözősége szignifikáns eltérést jelöl.



29. ábra. A GM és közel izogenikus vonal teljes növénytömege a műtrágya nélküli és nitrogén-foszfor-kálium (NPK) kevert műtrágyát tartalmazó kezelésekben. A zárójelben lévő betűk különbözősége szignifikáns eltérést jelöl.

BRUNS és ABEL (2003) vizsgálataik során pozitív korrelációt állapítottak meg a N-műtrágya és a *MON 810 Bt*-kukorica toxintermelése között, azonban az általuk adagolt műtrágyamennyiség az általunk vizsgált mennyiség 0,9, 1,7, illetve 2,6-szorosa volt. Az általunk vizsgált nitrogén-foszfor-kálium műtrágyamennyiség hatására a levélszövetben tehát nem emelkedett a megtermelt Cry1Ab-toxinkoncentráció, azonban a műtrágyázás hatására közel másfélszeresére emelkedett biomasszával ilyenkor is emelkedik a területegységen megtermő Cry1Ab-toxintartalom (9. kép).



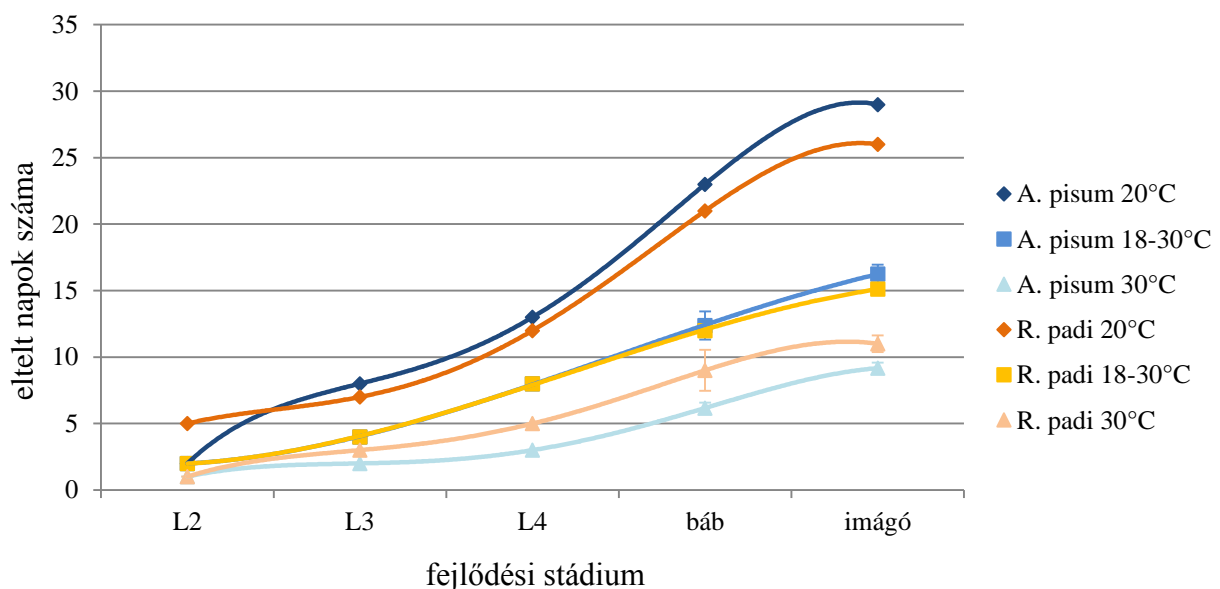
9. kép. A tenyészedényes kísérlet során az nitrogén-foszfor-kálium (NPK) kevert műtrágya esetében, mind a GM, mind a közel izogenikus vonal növényeinek biomasszája megközelítőleg másfélszeresére emelkedett. (fotó: Takács Eszter)

#### 4.8. A DAS-59122 GM kukorica hatása hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) fejlődésére

Természetes körülmények között a hétpettyes katicabogár egyedei a kukoricán élő prédaállatok (indirekt kitettség) és a kukoricapollen (direkt kitettség) fogyasztásával lehetnek kitéve a DAS-59122 GM kukorica által termelt toxinoknak. A vizsgálatainkban felállított tritrófikus rendszerekben mind a direkt, mind az indirekt kitettség jelen volt, így a valós természeti rendszert tudtuk vizsgálni a lárvális fejlődés korai szakaszában, illetve az egyedek teljes élettartamára vonatkozóan egyaránt.

##### 4.8.1. A hétpettyes katicabogár lárvális fejlődése a táplálék és hőmérséklet függvényében

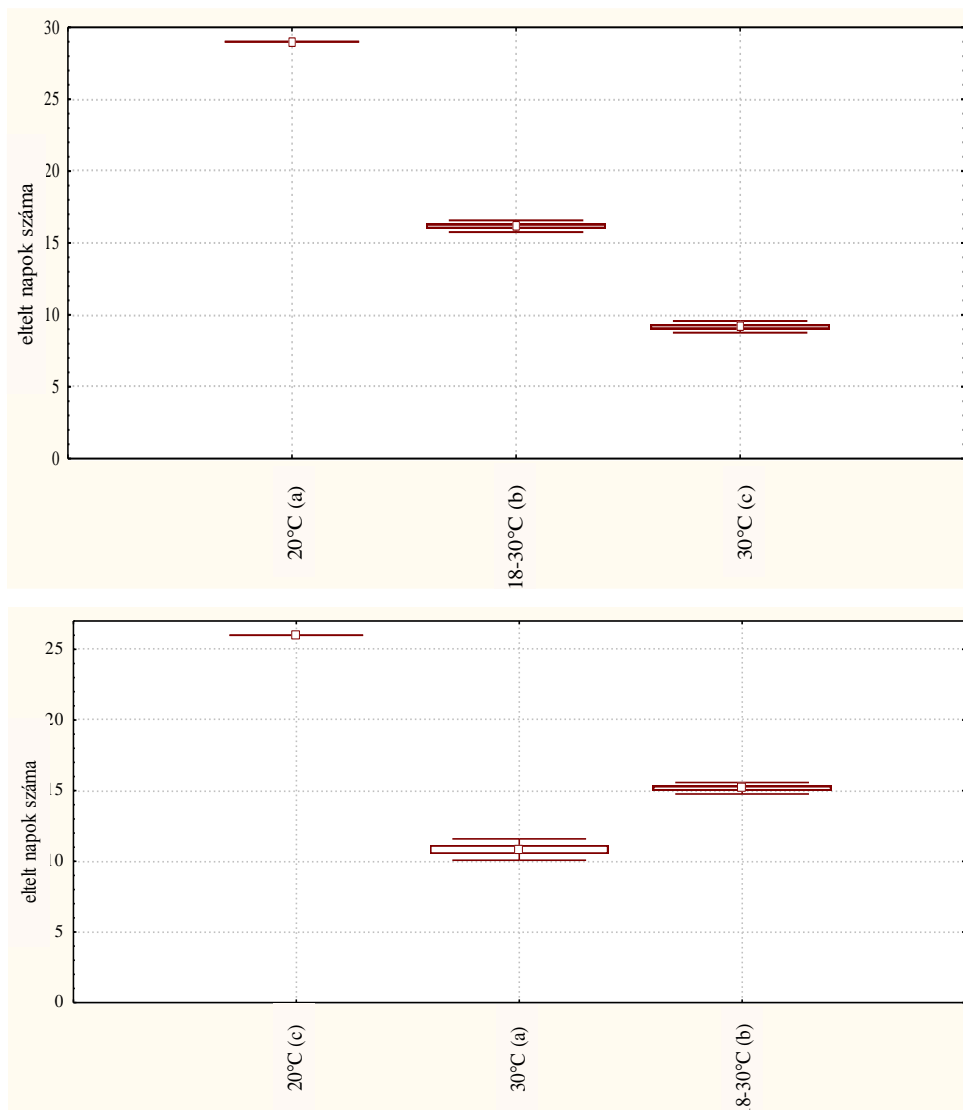
A hétpettyes katicabogár életciklus-vizsgálata során meghatároztuk, hogy két levéltetűfaj fogyasztása esetén hogyan változik a fejlődés üteme. A vizsgálatot 3 hőmérsékleten végeztük el 10-10 ismétlésben. A zöldborsó-levéltetű (*A. pisum*) és a zselnicemeggy-levéltetű (*R. padi*) esetében is egyértelmű hőmérsékletfüggés mutatkozott a katicabogár-egyedek fejlődésében (30. ábra).



30. ábra. A hétpettyes katicabogár lárvális fejlődésének (L1-L4) üteme zöldborsó-levéltetű (*A. pisum*) és zselnicemeggy-levéltetű (*R. padi*) fogyasztása esetén három vizsgált hőmérsékleten.

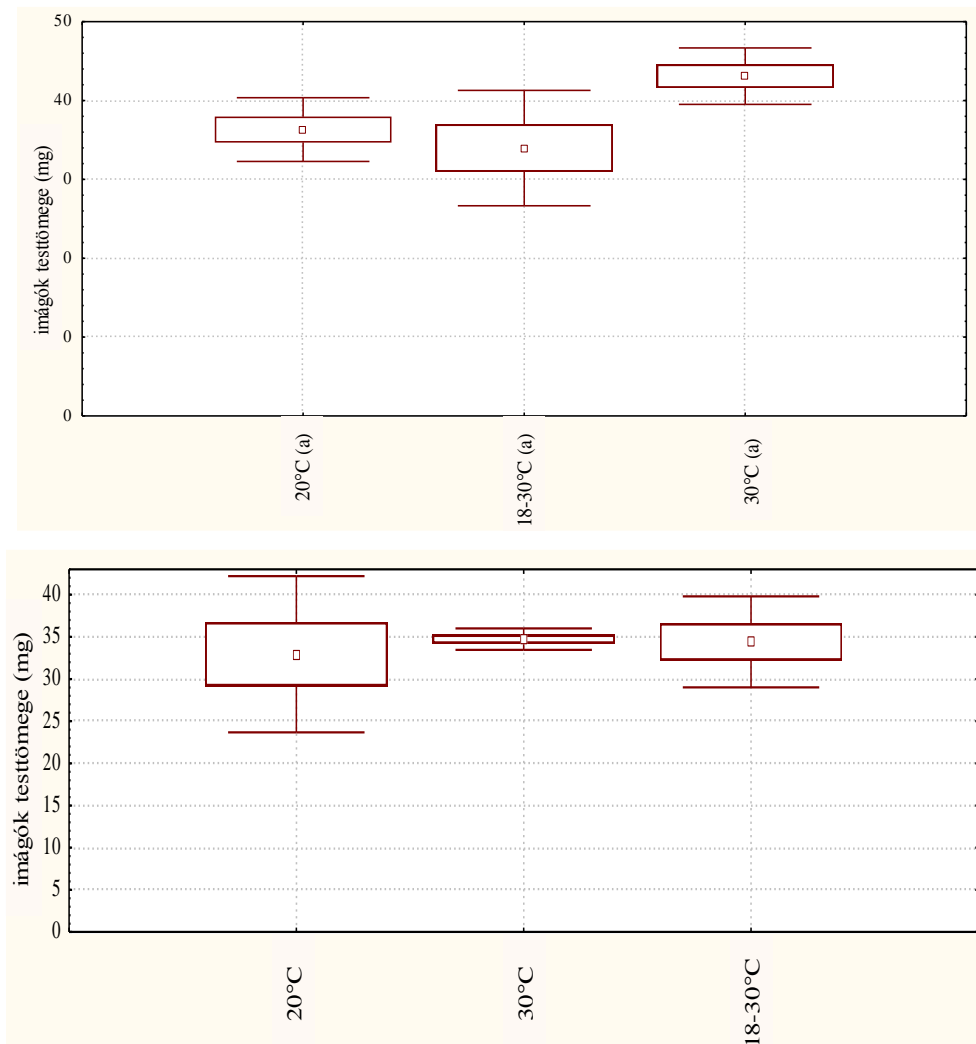
A leglassabban az állandó 20°C-on, míg leggyorsabban az állandó 30°C-on fejlődtek az állatok. Az *A. pisum* 20°C-on rosszabb minőségű tápláléknak minősült, az állatok 29 nap alatt fejlődtek imágóvá, míg *R. padi* esetében a tojáscsomóból való kikeléstől 26 nap telt el a teljes

fejlettség eléréséig. Ezen a hőmérsékleten azonban a 10 egyed fejlődése teljes szinkronban volt: ugyanazokon a napokon érték el a különböző stádiumokat. A 18–30°C-os kezelésnél, mely a kísérlet beállításakor jellemző természetes nyári hőmérsékletviszonyokat tükrözte, a két levéltetűfaj esetében nem volt különbség a katicabogár-egyedek fejlődési ütemében. A *pisum* esetén  $16,3 \pm 0,7$  nap alatt, *R. padi* esetén  $15,1 \pm 0,4$  nap alatt érték el az imágóállapotot. Állandó 30°C-on, mikor a fejlődés a leggyorsabb volt, azonban az *R. padi* bizonyult rosszabb minőségű tápláléknak, a teljes fejlettség  $11,0 \pm 0,6$  nap telt el. A *pisum* esetében ez  $9,2 \pm 0,4$  nap volt. A hőmérséklet szignifikáns eltéréseket ( $p=0,01$  szignifikanciaszinten) okozott a katicabogár-egyedek fejlődésében,  $p<0,01$  volt minden esetben (31. ábra).



31. ábra. Az imágóstádiumig eltelt napok száma a hétpettes katicabogár egyedfejlődésében *A. pisum* (felül) és *R. padi* (alul) esetében. A zárójelekben feltüntetett betűk különbözősége szignifikáns eredményt jelöl  $p=0,01$  szignifikanciaszinten.

A kikelt imágók által elért testtömegek esetében nem találtunk különbséget a két levéltetűfajra vonatkozóan. *A. pisum* fogyasztásakor az elért testtömegek  $36,03 \pm 4,12$  mg,  $33,74 \pm 5,72$  mg és  $43,10 \pm 3,58$  mg voltak rendre a  $20^\circ\text{C}$ ,  $18-30^\circ\text{C}$  és  $30^\circ\text{C}$  esetében. *R. padi* esetében ugyanezen értékek sorrendben  $33,48 \pm 10,25$  mg,  $37,98 \pm 6,34$  mg és  $34,14 \pm 0,87$  mg voltak (32. ábra). A két levéltetűfaj között jelentkező testtömegbeli eltérések csak a  $30^\circ\text{C}$ -os kezelés esetében voltak szignifikánsak  $p=0,01$  szignifikanciaszinten ( $p=0,001$ ).



32. ábra. A kikelt imágók testtömege a három hőmérsékleten végzett egyedfejlődés-vizsgálatban *A. pisum* (felül) és *R. padi* (alul) táplálék fogyasztása esetén. A zárójelekben feltüntetett betűk különbözősége szignifikáns eredményt mutat  $p=0,01$  szignifikanciaszinten.

#### 4.8.2. A hétpettyes katicabogár táplálékfogyasztása a lárvális fejlődés során

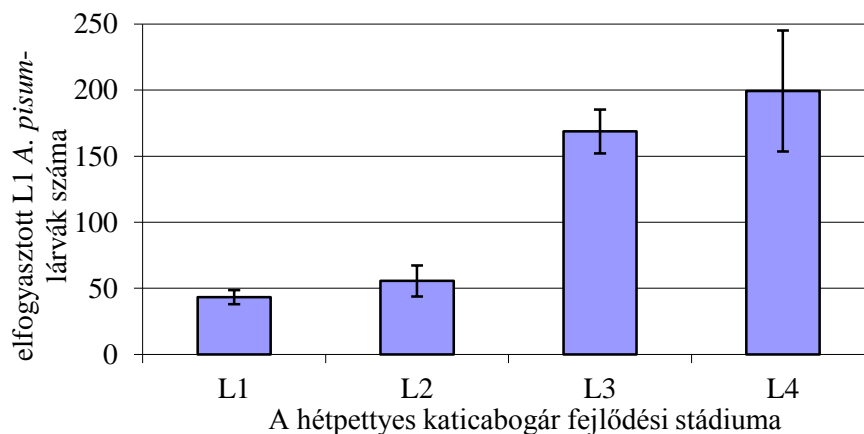
A kísérlet során *A. pisum* L1 stádiumú és *R. padi* L4 stádiumú lárváit kínáltuk fel a hétpettyes katicabogár lárváinak. A kísérleti terv összeállításakor szempont volt, hogy össze tudjuk hasonlítani az elfogyasztott tetvek mennyiségét a két levéltetűfaj esetében, így méretben

megegyező levéltetű lárvastádiumokat választottunk táplálék céljából. A stadiumonként naponta fogyasztott levéltetvek száma jól mutatja, hogy az *R. padi* levéltetű rosszabb minőségű táplálék a katicabogár-lárvák számára (XV. táblázat).

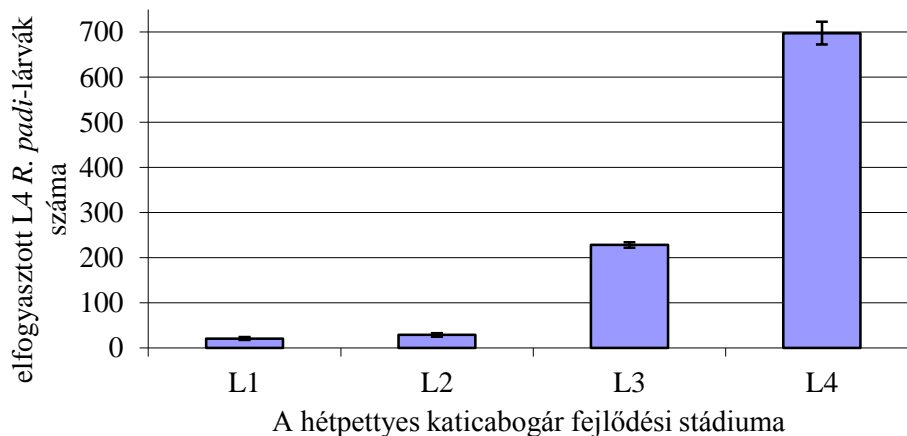
XV. táblázat. A hétpettyes katicabogár lárvális fejlődése során naponta elfogyasztott levéltetvek száma

Levéltetűfaj	A naponta elfogyasztott levéltetvek száma (db) a hétpettyes katicabogár fejlődési állapota szerint			
	L1	L2	L3	L4
<i>A. pisum</i>	13,4±3,8	19,1±7,4	31,1±10,7	51,6±25,4
<i>R. padi</i>	20,8±3,3	29,2±4,1	56,2±4,3	102,0±16,0

A fejlődési stádiumonként összesített adatok mutatják, hogy a korai stádiumok (L1 és L2) *A. pisum* fogyasztása esetén tovább tartottak, míg a későbbi fejlődési (L3 és L4) fázisok *R. padi* táplálék esetén voltak hosszabbak (33. és 34. ábrák).



33. ábra. A hétpettyes katicabogár *A. pisum* L1 levéltetű-fogyasztása a lárvális fejlődés során.



34. ábra.. A hétpettyes katicabogár *R. padi* L4 levéltetű-fogyasztása a lárvális fejlődés során.

A fent bemutatott két kísérletsorozat célja az volt, hogy megállapítsuk a hétpettyes katicabogár fejlődéséhez szükséges napok számát, illetve a fejlődés során lárvastádiumonként elfogyasztott levéltetvek számát. A *DAS-59122* GM kukorica környezeti hatásvizsgálata során az eredmények közül az *R. padi* táplálékra vonatkozó adatok felhasználása a kísérlettervezés során elengedhetetlen volt. Az élelciklus-vizsgálat eredményei közül a 18–30°C-on tapasztalt értékeket vettük alapul, mivel a szabdföldi vizsgálatok esetében ez a hőmérséklettartomány volt releváns. A különböző fejlődési stádiumokban elfogyasztott levéltetvek mennyisége alapján biztosítottunk *ad libitum* etetési körülményt a környezeti hatásvizsgálatok során.

#### **4.8.3. A *DAS-59122* GM kukorica hatás a hétpettyes katicabogár L1 stádiumú lárváira**

A *DAS-59122* GM kukorica és közel izogénikus vonalának vizsgálata során négy táplálékkombinációt kínáltunk fel a hétpettyes katicabogár frissen kelt L1 lárváinak. Azokban a kezeléseknél, ahol a lárvák nem kaptak táplálékot, az összes egyed elpusztult a 4-napos vizsgálati időszak alatt. A csak pollent fogyasztó egyedek 90%-a L1 stádiumban, míg a maradék 10% L2 állapotba vedlést követően elpusztult. A pollen tehát nem létfenntartó táplálékforrás a hétpettyes katicabogár számára a korai fejlődési szakaszban. A levéltetű és pollen+levéltetű táplálékkombinációk között nem volt különbség a lárvák fejlődési állapotában, ahogy a vizsgált kukoricafajták esetében sem találtunk szignifikáns eltérést egyik vizsgált levélszinten sem (XVI. táblázat). A kísérletben résztvevő lárvák mindegyike elérte az L2 stádiumot, három esetben 1 vagy 2 egyed éppen átvedlett L3 stádiumba. A *DAS-59122* GM kukorica Cry34/35Ab1 toxinjai, melyek bogárlárvákon fejtik ki letális hatásukat, nem okoztak pusztulást (mortalitás) hétpettyes katicabogár L1 lárváin tritrofikus rendszerben.

XVI. táblázat. A DAS-59122 GM kukorica és közel izogenikus vonalának hatása hétpettyes katicabogár L1 stádiumú lárváira

kezelés	levélszint	táplálék		elért fejlődési stádium	elfogyasztott levéltetvek száma
		levéltetű	pollen/cm <sup>2</sup>		
DAS-59122	felső	<i>R. padi</i>	-	2,0	10,8±1,7
DAS-59122	nővirág szintje	<i>R. padi</i>	-	2,0	12,3±1,5
DAS-59122	alsó	<i>R. padi</i>	-	2,2*	12,0±2,3
DAS-59122	felső	<i>R. padi</i>	800–1000	2,0	12,0±0,9
DAS-59122	nővirág szintje	<i>R. padi</i>	500–600	2,0	11,2±1,9
DAS-59122	alsó	<i>R. padi</i>	200–300	2,0	11,2±1,5
közel izogenikus	felső	<i>R. padi</i>	-	2,0	10,8±1,7
közel izogenikus	nővirág szintje	<i>R. padi</i>	-	2,0	10,5±1,1
közel izogenikus	alsó	<i>R. padi</i>	-	2,0	11,2±3,9
közel izogenikus	felső	<i>R. padi</i>	800–1000	2,2*	15,2±3,8
közel izogenikus	nővirág szintje	<i>R. padi</i>	500–600	2,3**	15,3±5,4
közel izogenikus	alsó	<i>R. padi</i>	200–300	2,0	14,5±5,4

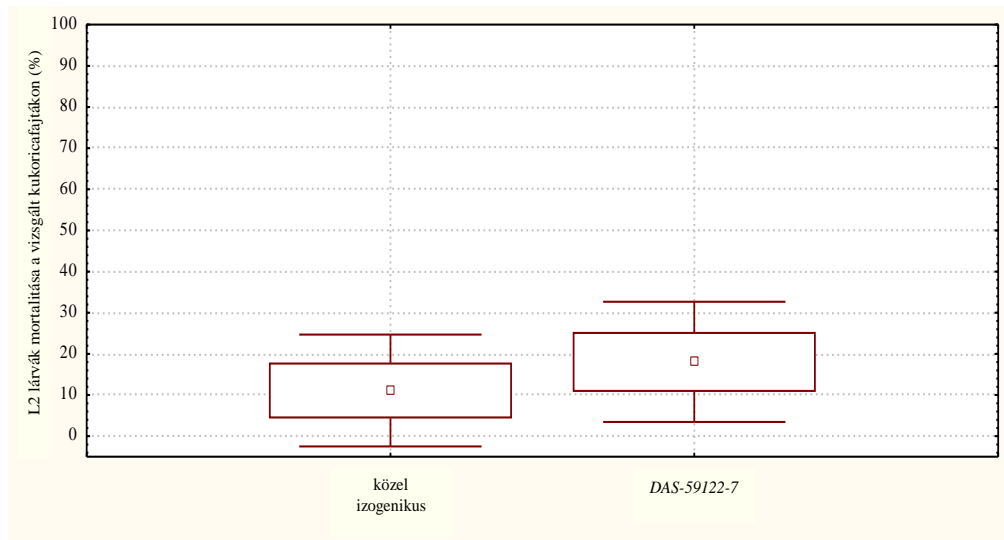
\* egy hétpettyes katicabogár-egyed elérte az L3 stádiumot

\*\* két hétpettyes katicabogár-egyed elérte az L3 stádiumot

#### 4.8.4. A DAS-59122 GM kukorica hatása a hétpettyes katicabogár L2 stádiumú lárváira

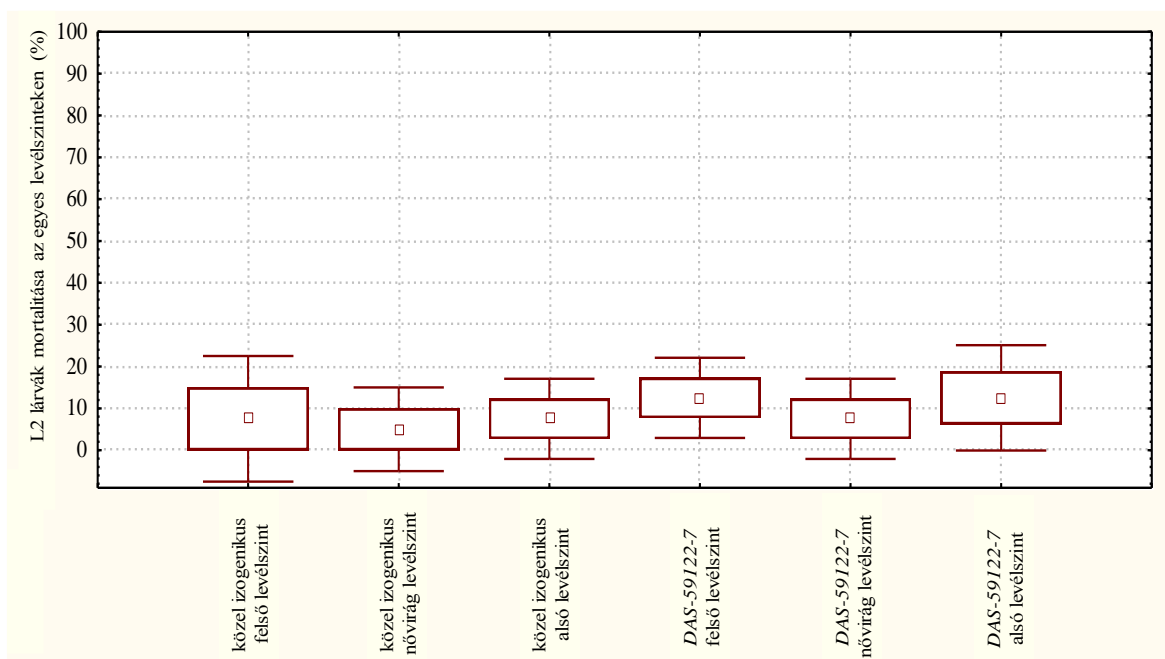
Az L2 lárvastádium vizsgálata során a 4.8.2. fejezetben tapasztalt eredmények alapján a hétpettyes katicabogár lárvái számára táplálékkul minden esetben *R. padi* levéltetvet biztosítottunk. A pollen, mint kiegészítő táplálék szintén a lárvák rendelkezésére állt, mivel a levéltetű-izolátorokat ebben az esetben a levél színi részére helyeztük a kukorica VT fenológiai állapotában. A DAS-59122 genetikai eseményt hordozó kukorica estében magasabb mortalitást (10±4%) tapasztaltunk az L2 lárvák között, azonban a magasabb mortalitás nem volt szignifikáns a közel izogenikus vonalhoz képest (6±4%) (35. ábra).





35. ábra. A hétpettyes katicabogár L2 lárváinak mortalitása a vizsgált kukoricafajtákon. Szignifikáns különbség nem mutatkozott a GM és a közel izogénikus vonal között (ANOVA  $F=0,51$ ).

A különböző levélszinteket is figyelembe véve a *DAS-59122* GM kukorica szintén nem befolyásolta a katicabogár-lárvák fejlődését a beállított tritófikus rendszerben (36. ábra).



36. ábra. A hétpettyes katicabogár L2 lárváinak mortalitása a vizsgált kukoricafajtákon, a különböző levélszinteken. Szignifikáns különbség nem mutatkozott a GM és a közel izogénikus vonal között (ANOVA  $F=0,91$ ).

A kísérlet során az L2 lárvák által elért fejlettségi állapotot és az elfogyasztott levéltetvek számát a XVII. táblázat ismerteti, sem a levélszintek között, sem a kukoricafajták között nem találtunk szignifikáns eltéréseket a statisztikai vizsgálat során (ANOVA,  $F=0,41$  az elért stádiumok esetében;  $F=0,65$  az elfogyasztott levéltetvek esetében).

XVII. táblázat. A *DAS-59122* GM kukorica és közel izogenikus vonalának hatása hétpettyes katicabogár L2 stádiumú lárváira.

kezelés	levélszint	elért fejlődési stádium	elfogyasztott levéltetvek száma
<i>DAS-59122</i>	felső	2,9*	10,8±1,7
<i>DAS-59122</i>	nővirág szintje	3,0**	12,3±1,5
<i>DAS-59122</i>	alsó	3,1***	12,0±2,3
közel izogenikus	felső	3,0	10,8±1,7
közel izogenikus	nővirág szintje	3,0	10,5±1,1
közel izogenikus	alsó	3,0**	11,2±3,9

\* 2 hétpettyes katicabogár-egyed nem érte el az L3 stádiumot (vedlés előtt voltak)

\*\* 1 hétpettyes katicabogár-egyed nem érte el az L3 stádiumot (vedlés előtt voltak)

\*\*\* 2 hétpettyes katicabogár-egyed elérte az L4 stádiumot

A hétpettyes katicabogár L1 és L2 stádiumú lárváin végzett környezeti hatásvizsgálatokhoz kidolgozott módszerek, az alkalmazott izolációs eljárások, illetve vizsgálatok eredményei a Pioneer Hi-Bred Inc. hozzájárulásával tudományos (TAKÁCS *et al.* 2010) és ismeretterjesztő (PIONEER HI-BRED INC. 2010) publikációban jelentek meg.

#### 4.8.5. A *DAS-59122* GM kukorica hatása a hétpettyes katicabogár élelciklusára

A szabadföldi kísérlet során, a parcellákon kihelyezett egésznövény-izolátorok közül a PR36V52 és PR37N01 hibridek esetében a szélsőséges időjárási viszonyok miatt 1-1 izolátor kizárásra került. A szabadföldi szakaszban a vizsgált hibridkukoricák izolálása után a növényeket *R. padi* levéltetűvel fertőztük, majd a megfelelő szintű fertőzöttség elérése után 20 L1 hétpettyes katicabogár-lárvát helyeztünk az izolátorokba. A lárvák fejlődésük során a kukoricán lévő levéltetveket, illetve a kukorica címervirágzása során kiszóródott pollent fogyasztották. A lárvák bábozódása, majd az imágók kelése után az izolátorokat a laboratóriumba szállítottuk, hibridenként az imágókat összegyűjtöttük. A *DAS-59122* GM

kukoricáról 78 imágót, a közel izogenikus vonalról és a 3 egyéb hibridről 59–73 imágót sikerült begyűjteni. Az imágók ivararánya az irodalmi 1:1 arányhoz képest (HODEK és HONEK 1996) a következőképpen alakult: *DAS-59I22* esetében 0,73:1, a kontroll kukoricák esetében 0,71:1 és 0,83:1 között változott (XVIII. táblázat).

XVIII. táblázat. A kísérlet szabadföldi szakasza után kukoricafajtánként begyűjtött katicabogár-egyedek száma és ivararánya.

	<i>DAS-59I22</i>	PR36D79	PR37M34	PR36V52*	PR37N01*
imágók száma	78	73	66	59	65
ivararány (nőstény/hím)	33/45	33/40	30/36	25/34	27/38

\* 1-1 megrongálódott egészszövény-izolátort kizártunk a kísérletből

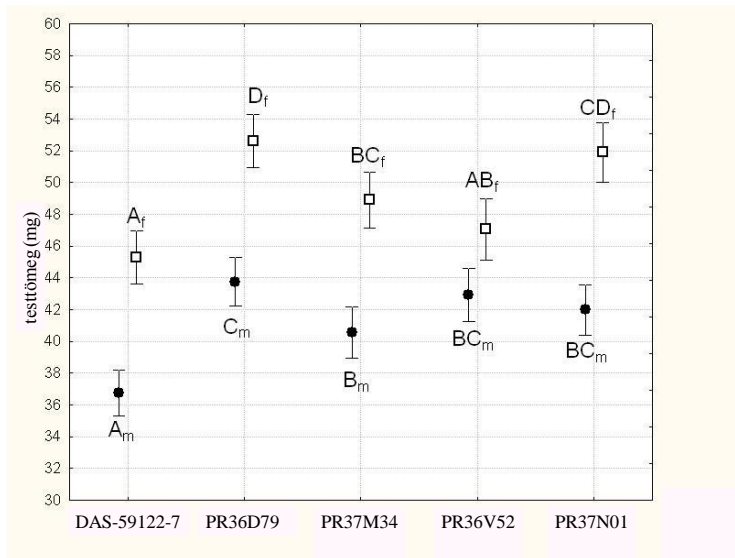
Az imágók testtömege a *DAS-59I22* kukorica esetében szignifikánsan alacsonyabb volt a közel izogenikus vonalhoz és a 3 egyéb hibridhez képest. További szignifikáns eltérések adódtak a kontroll kukoricafajták között is, melynek oka valószínűleg a kukoricafajták beltartalmi összetevőiben jelentkező különbségek lehettek (XIX. táblázat).

XIX. táblázat. A különböző kukoricafajtánkon nevelt hétpettyes katicabogár-imágók testtömege. A zárójelben lévő betűk eltérése szignifikáns különbséget jelent (ANOVA, Tukey *post hoc* teszt  $p=0,05$  szignifikanciaszinten).

kukoricafajta	imágók testtömege (mg)
<i>DAS-59I22</i>	40,35±7,12 (a)
PR36D79	47,76±6,07 (c)
PR37M34	44,34±6,35 (b)
PR36V52	44,69±5,15 (b)
PR37N01	46,10±6,92 (bc)

Irodalmi adatok igazolták, hogy a nőstény egyedek testtömege nagyobb, mint a hímeké (HODEK és HONEK 1996), valamint az ivararányok az általunk végzett kísérletben nem egyeztek meg a kukoricafajták esetében, így ivaronként is elemeztük a testtömegeket. Az irodalmi adatokhoz hasonlóan a mi vizsgálatunkban is minden esetben a nőstények testtömege szignifikánsan nagyobb volt a hím egyedekénél. A nőstények esetében a legalacsonyabb átlagos testtömeget a *DAS-59I22* és PR36V52 hibrid esetében mértünk (45,28±6,18 mg és 47,07±6,34 mg), míg a legmagasabb értékeket a közel izogenikus kontroll (52,61±3,70 mg) és a PR37N01 hibrid (51,90±4,38 mg) esetében. A hím egyedeknél a legalacsonyabb testtömegeket szintén a *DAS-59I22* esetében (36,74±5,42 mg) tapasztaltunk, mely különbség a közel izogenikus vonal

( $43,76 \pm 4,50$ ), a PR37M34 ( $40,54 \pm 4,85$  mg), a PR36V52 ( $42,94 \pm 3,14$ ) és a PR37N01 ( $41,98 \pm 5,20$ ) hibridek értékeihez képest szignifikáns eltérést jelentett (37. ábra).



37. ábra. A hím (m—●) és nőstény (f—□) hétpettyeskaticabogár-imágók átlagos testtömege a vizsgált kukoricafajtákon. Az ábrán az átlag és a 95%-os konfidenciaintervallumok láthatók. Az eltérő betűk szignifikáns eltérést jelölnek külön a hímek ( $p_{A_m-C_m}=0,000017-0,02644$ ) és külön a nőstények ( $p_{A_f-D_f}=0,000017-0,042043$ ) esetében.

A szaporodási paraméterek (termékenység és tojásrakási képesség) vizsgálatához kukoricafajtánként 1 nőstény és 2 hím egyedet párosítottunk össze, majd a tojásrakási periódusban *R. padi* levéltetűvel fertőzött kukoricacsöveken tartottuk az egyedeket. A párzási és tojásrakási folyamatot egy hónapig figyeltük. Az első két hétben a nőstények egyharmada, míg az egyhónapos nyomonkövetési szakaszban a nőstények fele rakott tojást. Az egy tojászsomóban lerakott tojások száma 5 és 80 között változott, a tojászsomók átlagos mérete DAS-59122 esetén 25 tojás volt, a közel izogénikus kukoricán 33, a további 3 hibridkukoricán pedig 25 és 32. A nőstények többsége egy tojászsomót rakott az egyhónapos periódus alatt, minden kezelésben egy olyan nőstény volt, amelyik két tojászsomót, illetve DAS-59122 esetében további egy nőstény 3 tojászsomót is rakott. A tojásokból átlagban 17–30 L1 lárva kelt ki. A fertilitás arányának számítása során a kikelt lárvák számát hasonlítottuk a lerakott tojászsomók méretéhez. A számítás során a tojást nem rakó nőstényeket, illetve a ki nem kelt tojászsomókat elhagytuk. A fertilitás aránya a kezelések között 58 és 77% közé esett, szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk (XX. táblázat).

XX. táblázat. A fertilitás és fekunditás változása a vizsgált kukoricafajtákon. A zárójelben lévő százalékos értékek a relatív tapasztalati szórást mutatják.

	<i>DAS-59122</i>	PR36D79	PR37M34	PR36V52	PR37N01
tojásrakó/tojást nem rakó nőstények száma	11/10	11/9	8/10	8/9	8/11
tojásszám/tojáscsomók száma	25 (38%)	33 (63%)	32 (63%)	25 (54%)	28 (58%)
kikelt L1 lárvák száma	22 (48%)	30 (56%)	25 (72%)	17 (49%)	19 (68%)
fertilitás aránya (%)	77 (65–89) nk: 4*	73 (57–90) nk: 5	67 (47–87) nk: 2	58 (33–84) nk: 3	62 (45–80) nk: 1

\* ki nem kelt tojáscsomók száma

A teljes szabadföldi vizsgálat célja az volt, hogy meghatározzuk a *DAS-59122* GM kukorica esetleges rövid (akut) és hosszú távú (krónikus) hatásait hétpettyes katicabogár egyedein. A kísérlet során a GM kukoricán élő *R. padi* levéltetvet fogyasztó katicabogarak hím imágóinak az elért testtömege szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a közel izogénikus vonalon vagy a 3 másik vizsgált hibriden nevelkedett egyedek esetében. Az alacsonyabb testtömeg csökkent fitnesszértéket eredményez, mely az egyedi túlélést csökkentheti, így a populáció csökkenését, azonban ez a különbség nem eredményezett alacsonyabb utódprodukción, így a fajfenntartást nem befolyásolja.

A kísérlet részeként meghatároztuk a kukorica R1 és R2 fejlettségi stádiumában a Cry34/35Ab1-toxintartalmat a pollenben, illetve a levéllemez középső részén és a levél alapjánál. A levelet a 4.7.1. fejezetben bemutatott eredmények alapján mintáztuk két helyen, mely szerint a *MON 810* GM kukorica adott levelén belül a levélhüvely és a levéllemez középső részén mért Cry1Ab-toxintartalomban 5-szörös különbség adódott. A *MON 810* GM kukoricához hasonlóan mindkét toxin koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt a levél alapi részén, mint a levél közepén. A különbség Cry34Ab1 esetében 3,1-szeres, míg Cry35Ab1 esetében 2,7-szeres. A két fenológiai stádiumban (R1 és R2) mért eredmények között nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A liofilizált száraz tömegre vonatkozó koncentrációkat a XXI. táblázat mutatja be. A várakozásnak megfelelően a közel izogénikus vonal és a 3 másik, kontrollként használt hibrid levél- és pollenszövegekben nem mutattunk ki egyik toxin jelenlétét sem.

XXI. táblázat. Cry34/35Ab1-tartalom a DAS-59122 GM kukorica levél- és pollenszöveiben a kukorica R1 és R2 fenológiai stádiumában

	fenológiai stádium	toxintartalom (ng/mg)		
		levéllemez középső része	levélalap	pollen
Cry34Ab1	R1	81,52±17,73	27,45±10,51	47,44±12,33
	R2	98,21±24,31	30,20±4,67	-
Cry35Ab1	R1	75,14±11,89	28,10±6,13	<KH*
	R2	78,73±16,56	29,14±5,62	-

\* KH=kimutatási határ, mely pollenmátrixra 0,12 ng/mg

ZHANG és munkatársai (2006b) a Cry1Ab/Ac-toxinokat termelő GK-12, és a Cry1Ac-toxint termelő NuCOTN 33B *Bt*-gyapot fajták hatását vizsgálták, szintén tritrofikus rendszerben, *Propylea japonica* (Thunberg) teljes életciklusára. Igazolták a növényi toxinok átjutását és felhalmozódását az uborka-levéltetű (*Aphis gossypii* Glover), illetve az ezen levéltetvet fogyasztó *P. japonica* szervezetében. A katicabogár lárvák túlélését, az imágók párzási viselkedését és a nőstény egyedek tojáskelési paramétereit vizsgálva nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a *Bt*-gyapotok és a kontroll fajta között. Cry1C- és Cry2A-toxinokat termelő *Bt*-ríz pollenjét fogyasztva *P. japonica* lárvális fejlődése szignifikánsan lassabb volt a kontrollhoz képest. A bábozódási arány, a kikelési arány, az imágók testtömege, illetve a tojáskelési paraméterek mindkét *Bt*-ríz esetében alacsonyabbak voltak a kontrollhoz képest, azonban a különbségek egyik esetben sem jelentettek szignifikáns eltérést (LI *et al.* 2014). Rekombináns Cry1Ab- és Cry3Bb-toxinok szignifikánsan magasabb halálozási arányt eredményeztek kétpettyes katicabogár (*Adalia bipunctata* L.) lárvális fejlődése során, a kontrollhoz viszonyítva (SCHMIDT *et al.* 2008). A Cry1Ab-toxint termelő *MON 810* és Cry3Bb-toxint termelő *MON 88017* GM kukorica – különböző atkafajok – kétpettyes katicabogár tritrofikus rendszerben a két GM kukorica azonban nem okozott szignifikáns eltérést a katicabogár lárváinak túlélésében, testtömegében és fejlődési idejében a kontroll kukoricához képest (ALVAREZ-ALFAGAME *et al.* 2010). Az általunk végzett szabadföldi vizsgálat és a szakirodalomban megtalálható tudományos publikációk eredményei mutatják a GM növények környezeti hatásvizsgálata során a vizsgált nem célszervezet és az alkalmazott kísérleti elrendezés megválasztásának jelentőségét. A DAS-59122 GM kukorica Cry34/35Ab1-toxinjainak kimutatására alkalmas immunanalitikai eljárások kalibráló görbéinek stabilizálását célzó vizsgálatok eredményei, illetve a DAS-59122 GM kukorica hétpettyes katicabogár teljes életciklusára és reprodukciós paramétereire gyakorolt hatásának eredményei, a vizsgálati módszerek és izolációs eljárások a Pioneer Hi-Bred Inc. hozzájárulásával tudományos (TAKÁCS *et al.* 2012) és ismeretterjesztő (PIONEER HI-BRED INC. 2010) publikációban jelentek meg.

## 5. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Tézis: A kereskedelmi forgalomban kapható Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztcsomag által biztosított standard oldatokkal felvett lineáris kalibráció a szendvics típusú ELISA rendszerekre jellemző, négyparaméteres szigmoid kalibráló görbe alsó görbületére esik, ahol az analitikai meghatározás megbízhatósága, pontossága és ismételhetősége rosszabb az áthajlási pont környékéhez képest. A független mérések során felvett lineáris kalibráló görbék jól reprodukálhatók, azonban az 5 ng/ml helyett alkalmazott 0,125 ng/ml kimutatási határ a mérés pontosságát csökkenti, torzítását pedig növeli.
2. Tézis: Az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate pozitív és negatív kontroll oldatainak belső minőségellenőrzése során a pozitív kontroll esetében a számított Cry1Ab-toxinkoncentráció  $1,45 \pm 0,22$  ng/ml volt, az egyedi méréseknél jelentkező tapasztalati szórások mértéke OD-szinten 0,0–14,1 %, a számított koncentrációk szintjén 0,0–28,8% volt. A *Shewhart*-féle minőségellenőrző kártya alapján megbízható és pontos referenciapontnak bizonyult. A negatív kontroll nominális Cry1Ab-koncentrációja 0,00 ng/ml, számított értéke  $0,0009 \pm 0,08$  ng/ml volt. A minőségellenőrző kártya alapján a negatív kontroll nem minősült megbízható referenciapontnak.
3. Tézis: Nemzetközi körmérés keretében az analitikai eljárás sajátoságaiból fakadó 15,5–31,6% relatív tapasztalati szórást határoztunk meg a laboratóriumok között ugyanazon standardizált ELISA rendszer alkalmazása esetén *MON 810* GM kukorica levélmintájában a Cry1Ab-toxintartalom meghatározása során. Adott laboratóriumon belül a saját protokollok esetében végzett mérések eredményei a közös protokollal meghatározott átlagértékekhez képest a -66,5%–160,1% tartományba estek.
4. Tézis: Meghatároztam sertés szív-, nyirokcsomó-, agy-, izom-, máj-, vese-, lép-, placentaszövetében, valamint szérumban és előtejben a kimutatási határokat Cry1Ab analitikai standarddel hitelesített EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate ELISA rendszer kvantitatív alkalmazása esetén.
5. Tézis: Cry4-toxin kimutatására alkalmas, direkt, szendvics típusú ELISA rendszert fejlesztettem. Az optimalizált rendszer paraméterei az érzékenyítő Cry4-

specifikus antitest 1:500, antitest-HRP konjugátum 1:100 hígítása. A kimutatási határ tiszta Cry4-toxin esetében 2 ng/ml, VECTOBAC WDG granulátum és VECTOBAC 12 AS szuszpenzió esetében 170 ng/ml és 900 ng/ml.

6. Tézis: Meghatároztam *MON 810* GM kukorica által termelt Cry1Ab-toxint eloszlását az egyes levélszinteken, illetve egy adott levélen belül a levélhüvelytől a levélcúcsig, és a levélértől a levél széléig. Vizsgáltam a levél öregedésének, a virágföldnek és az agyagbemosódásos barna erdőtalajnak, illetve a termesztési körülménynek a hatását a növény Cry1Ab-toxintartalmára vonatkozóan. Nitrogén-foszfor-kálium kevert műtrágya alkalmazásakor nem tapasztaltam szignifikáns emelkedést a Cry1Ab-toxinkoncentrációban, azonban a GM és közel izogenikus vonalának biomasszája másfélszeresére emelkedett, így az egy hektáron megtermelt toxinmennyiség is ilyen mértékben nagyobb műtrágya alkalmazása mellett.
7. Tézis: A *DAS-59122* GM kukorica tritrófikus rendszerben történő környezeti hatásvizsgálata során nem tapasztaltam szignifikáns különbséget a hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) L1 és L2 lárváinak túlélésére vonatkozóan a közel izogenikus vonalhoz (PR36D79) képest. A teljes élelciklus vizsgálata során a hím egyedeknél a legalacsonyabb testtömegeket a *DAS-59122* esetében ( $36,74 \pm 5,42$  mg) tapasztaltam, mely különbség a közel izogenikus vonal, a PR37M34, a PR36V52 és a PR37N01 hibridek értékeihez képest szignifikáns eltérést jelentett. A szaporodási paraméterekben szintén nem tapasztaltam szignifikáns különbségeket.



## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elsőgenerációs GM növények egyre szélesebb körben való mezőgazdasági alkalmazása szükségessé teszi, hogy az általuk termelt vagy termesztésük során alkalmazott növényvédőszer-hatóanyagok kimutatására alkalmas, megfelelő érzékenységű analitikai módszerrel rendelkezünk. Az ún. *Bt*-növények által termelt Cry-toxinok kimutatásnak elterjedt módszerét képviselik az enzimjelzéses *immunoassay* (ELISA) eljárások, melyek a műszeres analitikai módszerekkel szemben gyors és költséghatékony minta-előkészítést és meghatározást tesznek lehetővé. A *Bt*-növények esetében fontos a növény által termelt Cry-toxinok eloszlásának és környezeti sorsának nyomonkövetése környezet- és élelmiszer-biztonság szempontjából egyaránt. A GM növények termesztésekor felmerülő problémák a génmegszökés/génáramlás jelensége, a talómaradványban való megmaradóképesség, a nem célszervezetekre gyakorolt esetleges káros hatások megjelenése, illetve a megnövekedett környezeti terhelés, melyek nyomon követéséhez és a környezeti kockázatok felméréséhez elengedhetetlen a megfelelő analitikai rendszer kialakítása, illetve a meglévő rendszerek korlátainak ismerete. Élelmiszer-biztonsági szempontból a hagyományos termények 0,9%-os, a biotermékek 0,0%-os maximális GMO-tartalmának igazolása elengedhetetlen, illetve a húsipari termékek, melyek GMO-tartalmának jelölése nem kötelező, bevizsgálása során sem elhanyagolható a kellőképpen érzékeny kimutatási eljárás megléte.

A kereskedelmi forgalomban számos, Cry-toxinok kimutatására alkalmas ELISA rendszer érhető el, azonban ezen eljárások a Cry-toxinok bakteriális protoxin formáját használják analitikai standardként, illetve a célvegyület felismerése is protoxin-specifikus antitestekkel történik. *MON 810* GM kukorica esetében azonban a növény a protoxin kurtított változatát termeli, mely molekulaméret tekintetében a protoxin- és az aktivált toxinforma között van. Analitikai szempontból tehát a kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztcsomagok nem alkalmasak a növényben termelődő Cry1Ab-toxin kimutatására.

PhD munkám során Cry1Ab-toxinok kimutatására alkalmas ELISA rendszerek analitikai megbízhatóságát vizsgáltam, melynek során megállapítottam, hogy az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate és QualiPlate, illetve az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA kereskedelmi tesztcsomagok által biztosított standard oldatokkal felvett kalibrációs egyenes az ELISA rendszerekre jellemző szigmoid standard görbék alsó görbületi szakaszára esik, ahol analitikai szempontból a meghatározás megbízhatósága és ismételhetősége nem optimális. A lineáris kalibráció a regressziós koefficiensek alapján jól reprodukálható a mérések során, azonban az alacsony kimutatási határ közelében a relatív tapasztalati szórás nagyobb, mint az

IC<sub>50</sub>-érték közelében, ami – a nagyfokú hígítás figyelembe vételével – a növényi mintákra számított toxintartalom meghatározásának pontosságára is kihat. EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate és QualiPlate esetében belső minőségellenőrzés alátámasztotta a szigmoid görbe alsó görbületi szakaszára eső lineáris kalibrációval történő meghatározás bizonytalanságát. A 0,5 ng/ml koncentrációjú standard oldat esetében meghatározott számított koncentráció  $0,57 \pm 0,11$  ng/ml, mely 18,5% relatív hibát jelent. Az egyedi mérések során a fellépő relatív hiba 0,0 és 141,4% között változott a mért OD szintjén, a számított koncentrációk esetében - 1326,9%–595,4% volt. A *Shewhart*-féle minőségellenőrző kártyán három pont esett a figyelmeztetési határokon kívül, melyek közül egy a szabályozási határon is kívül volt. Ez azt jelenti, hogy az alacsony meghatározási tartományban az ELISA rendszer nincs statisztikai kontroll alatt. Ugyanez volt jellemző az EnviroLogix QualiPlate által biztosított negatív kontroll esetében is, mely esetleges hamis negatív eredményeket eredményezhet.

Nemzetközi körmérés keretében megállapítottuk, hogy standard levélminták toxintartalmának meghatározása során, ugyanazon ELISA eljárás (közös protokoll) alkalmazása mellett is 15,5–31,6% relatív hiba adódik, mely a különböző laboratóriumokban született vizsgálatok eredményeinek összehasonlíthatóságát kérdőjelezi meg. A saját protokollok (melyek minta-előkészítést vagy ELISA rendszer felépítését tekintve tértek el a közös protokolltól) alapján végzett mérések eredményei a közös protokollal meghatározott átlagértékekhez képest a -66,5%–160,1% tartományba estek.

A kereskedelmi ELISA tesztcsomagok alkalmazhatóságának vizsgálata során növényi (kukorica) és állati (sertés) szövetekben fellépő esetleges mátrixhatásokat határoztuk meg. Kukorica-levélszövetben Cry1Ab-toxinmeghatározás során nem jelentkezett mátrixhatás, míg a sertésszövetek közül izomban, három független mérés során meghatározott kimutatási határ  $7,95 \pm 7,99$  ng/ml volt. A rendkívül magas szórás azt mutatja, hogy ez a szövettípus bonyolult mátrixot jelent a Cry1Ab-toxin koncentráció meghatározásának szempontjából, mely élelmiszer-biztonsági szempontból problémaként jelentkezik.

A PhD munkám során a szúnyoglárvagyérítésben alkalmazott Cry4-toxin kimutatásra alkalmas ELISA rendszert fejlesztettünk. Az immunkomplex egyik eleme, egy direkt szendvics típusú eljárás esetében, a célvegyületet specifikusan felismerő antitest és az analitikai jelet adó enzim konjugátuma. A konjugáció során a Cry4-specifikus antitestet glutáraldehid és perjodát alkalmazásával is kapcsoltuk a HRP enzimhez, melynek aktivitása egyik konjugációs módszer esetében sem csökkent. Perjodát esetében a kapcsolat stabilnak bizonyult, így azt a módszert alkalmaztuk az ELISA fejlesztése során. Az optimális kalibrációs görbét az érzékenyítő antiszérum 1:500, az antitest–HRP-konjugátum 1:200 hígítása mellett értük el, melyet analitikai

tisztaságú Cry4-toxinnal, illetve két, a szúnyoglárvaállomány-gyérítési gyakorlatban alkalmazott *Bti*-készítménnyel (VECTOBAC WDG granulátum és VECTOBAC 12 AS szuszpenzió) vettük fel. A kimutatási határ tiszta Cry4-toxin esetében 2 ng/ml-nek adódott. A gyakorlati kimutatási határ granulátum esetében az optimalizált ELISA rendszer esetében 170 ng/ml, szuszpenzió esetében 900 ng/ml.

A *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-termelésének vizsgálatokor meghatároztuk a különböző levélszintek közötti, illetve egy adott levélen belüli toxineloszlást. A DK440-BTY kukoricafajtában a levélszintek toxintartalma 4821 és 10054 ng/g koncentrációtartományban változott, melyek közül a legalsó levél toxintartalma ( $4821 \pm 1042$  ng/g) tért el szignifikáns módon a többi szinten mért eredményektől. Adott levélen belül a levéllemez középső részén mértük a legmagasabb koncentrációt ( $8924 \pm 1507$  ng/g), mely érték szignifikánsan csökkent a levélcsúcs ( $4579 \pm 1864$  ng/g) és levélnyel ( $1892 \pm 223$  ng/g) irányába. A levéllemez közepén a legmagasabb érték a levélérnél ( $9885 \pm 877$  ng/g), míg a legyalacsonyabb a levél szélén ( $8194 \pm 480$  ng/g) volt mérhető. A Cry1Ab-toxinkoncentrációt a növényi levélszövetben jelentősen befolyásolja a levél öregedési folyamata. A félig elszáradt (sárga) levélben a friss levél toxintartalmának átlagosan 68%-a, az elszáradt (barna) levélben pedig 28%-a mérhető.

A termesztési körülmények és talajtípus Cry1Ab-toxintartalomra gyakorolt hatását vizsgáltuk két *MON 810* kukoricafajta esetében. Az üvegházi körülmények között termesztett növények szöveteiben a toxintartalom alacsonyabb volt, mint a szabadföldi körülmény esetében, illetve a két *MON 810* genetikai eseményt hordozó fajta sem egyforma mennyiségű Cry1Ab toxint termelt szöveteiben, annak ellenére, hogy genomjukba ugyanazon genetikai eseményt építették be. Nitrogén-foszfor-kálium kevert műtrágya alkalmazása nem eredményezett magasabb toxinkoncentrációt a *MON 810* GM kukorica levélszövetében, azonban a növények biomasszája mind a módosított, mind a közel izogenikus vonal esetében közel másfélszeresére emelkedett, így az egy hektáron megtermelt Cry1Ab-toxinmennyiség is ilyen mértékben nagyobb műtrágya alkalmazása mellett.

A *DAS-59122* GM kukorica környezeti kockázatelemzése során a hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) L1, L2 lárvastádiumát, illetve a teljes életciklusát vizsgáltuk tritrófikus rendszerben, ahol a növényevő résztvevő a zselnicemeggy-levéltetű (*Rhopalosiphum padi*) volt, a tenyészetek fenntartására pedig zöldborsó-levéltetűt (*Acyrtosiphon pisum*) használtunk. A kísérletsorozat elején meghatároztuk a katicabogár lárválsfejlődésének idejét 3 különböző hőmérsékleten, két levéltetűfaj (*R. padi* és *A. pisum*) fogyasztása esetén. A fejlődés állandó 30°C-on volt a leggyorsabb, *A. pisum* esetében  $9,2 \pm 0,4$  nap, *R. padi* fogyasztásakor

11,0±0,6 nap telt el a teljes fejlettség eléréséig. A kikelt imágók által elért testtömegek esetében nem találtunk különbségeket a két levéltetűfajon történő táplálkozásra vonatkozóan. Meghatároztuk továbbá az egyes lárvastádiumok (L1-L4) által elfogyasztott levéltetvek mennyiségét, mely eredmények a környezeti kockázatelemzés során hasznosultak.

A *DAS-59I22* kukorica és közel izogenikus vonalának (PR36D79) vizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az L1 és L2 lárvák túlélésére és egyedfejlődésére vonatkozóan, egyik vizsgált levélszinten sem. A teljes életsiklus-vizsgálat során a közel izogenikus vonal mellett három másik hibrid (PR36V52, PR37N01, PR37M34) is kontrollként szolgált. A levéltetűvel fertőzött, izolált kukoricanövényeken fejlődő katicabogár-lárvák bábozódását követően a kikelt imágók testtömegét mértük. A nőstények esetében a legalacsonyabb átlagos testtömeget a *DAS-59I22* és PR36V52 hibrid esetében tapasztaltuk (45,28±6,18 mg és 47,07±6,34 mg), míg a legmagasabb értékeket a közel izogenikus kontroll (PR36D79, 52,61±3,70 mg) és a PR37N01 hibrid (51,90±4,38 mg) esetében. A hím egyedeknél a legalacsonyabb testtömegeket szintén a *DAS-59I22* esetében (36,74±5,42 mg) tapasztaltunk, mely különbség a közel izogenikus vonal (43,76±4,50), a PR37M34 (40,54±4,85 mg), a PR36V52 (42,94±3,14) és a PR37N01 (41,98±5,20) hibridek értékeihez képest szignifikáns eltérést jelentett. A szaporodási paraméterek (termékenység és tojásrakási képesség) vizsgálata során az egy tojáscsomóban lerakott tojások száma 5 és 80 között változott, a tojásomók átlagos mérete *DAS-59I22* esetén 25 tojás volt, a közel izogenikus kukoricán 33, a további 3 hibridkukoricán pedig 25 és 32. A tojásokból átlagban 17–30 L1 lárva kelt ki. A fertilitás aránya a kezelések között 58 és 77% közé esett, statisztikailag szignifikáns különbségeket nem tapasztaltunk.

Az eredmények jól mutatják, hogy a Cry-toxinok kimutatása során alkalmazott analitikai eljárás, az egyazon genetikai eseményt hordozó fajták közötti, illetve azonos fajtán belül a növények közötti egyedi különbség, adott növényen belül a toxintermelődés idő- és szövetspecifitása, illetve a különböző termesztési körülmények egyaránt befolyásolják a növényben mért koncentrációértékeket. A szakirodalomban tapasztalható nagymértékű szórások a Cry1Ab-toxin-koncentrációkban többek között ezen okokra vezethetők vissza. Nemzetközi körmérési vizsgálatunk eredményei alapján az analitikai okokból származó hibák mértéke optimalizált és standardizált ELISA eljárás alkalmazásával jelentősen csökkenthető, ahogy a növényi szövetek szisztematikus mintavételezése is csökkenti a hibák mértékét. A befolyásoló tényezők sokfélesége megnehezíti a különböző kutatócsoportok eredményeinek összehasonlítását, ami sok esetben indokolja a GM növények engedélyezése során az eseti vizsgálatok jelentőségét.

## 7. SUMMARY

The expanding worldwide application of first generation genetically modified (GM) crops prompts the need for proper analytical methods feasible for determination of pesticide active ingredients being produced by or applied with GM plants. The method of choice for the analytical determination of Cry toxins produced by so-called *Bt*-crops, are enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) systems that provide, in contrast to instrumental analytical methods, cost-effective and quick sample preparation and analytical determination. Determination of the distribution and the environmental fate of Cry toxins produced by *Bt*-plants is essential regarding both environmental and food safety. Gene flow and gene escape, persistence in stubble, adverse effects on non-target organisms and increased environmental load may occur during GM crop cultivation, thus development of sensitive analytical methods or information on the limitations of existent methods are essential for monitoring the effects and assessment of environmental risks. For food safety and legality issues it is important to confirm GM content not exceeding 0.9% in conventional products and 0.0% GM content of ecological (organic) agricultural products. In addition, although labelling the GM content of meat products is not obligatory, the availability of analytical methods of sufficient sensitivity is far not negligible for meat product inspection, either.

Numerous commercial ELISA systems are available on the market for detection of Cry toxins, however, these methods apply bacterial protoxin as analytical standard and protoxin-specific antibodies in determination. GM corn belonging to the *MON 810* genetic event produce a truncated version of the protoxin, called preactivated toxin form, which is smaller in molecule size than the protoxin, but larger than the activated toxin form. Thus, commercial ELISA systems for Cry1Ab toxin are not directly appropriate, in the analytical sense, for determination the plant produced toxin.

The objective of my PhD work was to investigate analytical reliability of different commercial ELISA systems feasible for Cry1Ab toxin determination. On the basis of ELISA method assessment, it has been pointed out that manufacturer supplied linear calibration of EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate and QualiPlate, and Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA have located on the lower curvature of the sigmoid calibration curve typical for ELISA systems, where reliability and reproducibility of the determination is not optimal.

Linear calibration is well-reproducible during determinations on the basis of the regression coefficients, but relative standard deviations are higher near the low limit of detection than at the  $IC_{50}$  level, which affects – with the high dilution rate considered – the precision of the

toxin content determination in the plant samples as well. Internal quality control of the EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate és QualiPlate has confirmed the uncertainty of the measurement on the lower curvature of sigmoid calibration. For 0.5 ng/ml standard solution the calculated concentration values were  $0.5724 \pm 0.1061$  ng/ml, corresponding to an 18.5% relative standard deviation. Relative standard deviations in individual measurements ranged between 0.0% and 141.4% and between -1326.9% and 595.4% at the level of OD values detected and concentrations calculated, respectively. On the Shewhart Control Chart 3 points have fallen out of warning limits and 1 point out of control limit, reflecting that the analytical determination in the lower Cry1Ab concentration is not under statistical control. The same phenomenon occurred for the negative control of the EnviroLogix QualiPlate that may lead to false negative results in Cry1Ab determination.

In the scope of an international inter-laboratory ring trial test it was established that the same ELISA method (joint protocol) led to 15.5–31.6% relative standard deviation, making the comparability of the results from different laboratories questionable. Average Cry1Ab toxin content determined in the maize samples in the laboratories by their own protocols (differing from the joint protocol in sample preparation and the setup of the ELISA system) were in the -66.5%–160.1% range compared to the average values determined in the same laboratory with the joint protocol.

Matrix effects were determined in plant (maize) and animal (porcine) tissues in the evaluation of the analytical applicability of commercial ELISA kits. No matrix effect occurred in Cry1Ab determination in maize leaf, however, among porcine tissues, the limit of detection in muscle tissue, determined in three independent measurements, was quantified to be  $7.95 \pm 7.99$  ng/ml. This extremely high standard deviation indicates that this tissue is a complex matrix in Cry1Ab determination, which may cause difficulties in a food safety context.

My PhD work also included the development of an ELISA for quantitative determination Cry4 toxin applied in larval mosquito control. In a direct, sandwich type immunoassay, a conjugate of the analyte-specific antibody to a reporter enzyme is a component of the immunocomplex of major importance. Cry4-specific antibodies were conjugated to horseradish peroxidase (HRP) by two methods: a condensation reaction using glutaraldehyde and an oxidative process using sodium periodate. The enzymatic activity of HRP was retained during the conjugation process in both cases. Conjugation by periodate coupling was found to be stable, thus, it was successfully applied in the sandwich ELISA system. Parameters of the optimal method were: coating Cry4-specific antibody coating dilution 1:500, antibody–HRP conjugate dilution 1:200. Standard curves were obtained with analytical standard of Cry4 toxin, granulated

toxin formulation (VECTOBAC WDG) and suspension toxin formulation (VECTOBAC 12 AS) in water. The limit of detection was found to be 2 ng/ml for pure Cry4 toxin, practical LOD were 170 ng/ml and 900 ng/ml for *Bti* preparations VECTOBAC WDG granulate and VECTOBAC 12 AS suspension, respectively.

Investigating Cry1Ab production in *MON 810* maize we determined toxin distribution among leaf levels and within a single leaf. Average Cry1Ab toxin content in the leaves of *MON 810* maize cultivar DK440-BTY ranged between 4.821 and 10.054 ng toxin/g fresh leaf weight. The lowest Cry1Ab toxin content ( $4.821 \pm 1.042$  ng Cry1Ab toxin/g) determined at the lowest leaf level differed significantly from all other leaf levels. As for longitudinal toxin distribution within a single leaf, the highest toxin concentration ( $8.924 \pm 1.507$  ng Cry1Ab toxin/g fresh leaf weight) was measured in the middle section of the leaf, significantly decreasing towards the leaf tip ( $4579 \pm 1864$  ng/g) and the sheath ( $1.892 \pm 223$  ng Cry1Ab toxin/g fresh leaf weight). As for diagonal toxin distribution within a single leaf, the highest toxin concentration ( $9885 \pm 877$  ng/g) was determined near the leaf vein and the lowest ( $8194 \pm 480$  ng/g) at the leaf edge. Actual Cry1Ab content in leaf tissue is strongly affected by necrotisation: 68% and 28% of fresh green leaf Cry1Ab content was determined in yellow (half-necrotized) and brown (necrotized) leaf tissues, respectively.

Effects of cultivation conditions and soil type were determined on Cry1Ab production of two *MON 810* varieties. Cry1Ab production in plants grown in the greenhouse was lower than that under plants cultivated open field conditions. Moreover, further differences were detected in the toxin production of the two *MON 810* maize varieties as well. Despite of the same genetic event integrated their genome, determined Cry1Ab production were not equal in the tissue samples. Application of nitrogen-phosphor-potassium fertilizer did not cause higher Cry1Ab concentration in *MON 810* maize leaf tissue, however nearly 1.5-fold increase in the biomass of GM and near isogenic lines was detected, thus, Cry1Ab production per hectare was also higher in case of fertilizer application.

Environmental risk assessment of *DAS-59122* GM maize was performed on the L1 and L2 larval development and entire life cycle of the seven-spotted ladybird (*Coccinella septempunctata*) with the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*) as the herbivore species in a tritrophic system and the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) in colony maintaining. Larval development time was determined at three different temperatures on the two aphid prey species (*R. padi* and *A. pisum*). Development was the most intensive at 30°C,  $9.2 \pm 0.4$  days until adult emergence for consumption of *A. pisum* and  $11.0 \pm 0.6$  days for *R. padi*. There were no significant

differences in adult body weights when the predator was raised on these two aphid species. Prey consumption at larval stages (L1-L4) was also determined for both aphid species, results were applied in environmental risk assessment.

No significant differences in survival and development of L1 and L2 *C. septempunctata* at different leaf levels of the isoline (PR36D79) and *DAS-59122* GM maize. Three further negative control hybrids (PR36V52, PR37N01, PR37M34) were also used in the full lifecycle study. Body weights of ladybird imagoes from larvae reared on previously infected maize plants under whole plant isolator were determined. The weight of adult females occurred to be the lowest in the *DAS-59122* and PR36V52 treatment ( $45.28 \pm 6.18$  mg and  $47.07 \pm 6.34$  mg, respectively), while the highest values were determined for the isoline (PR36D79) and PR37N01 treatment groups ( $52.61 \pm 3.75$  mg and  $51.90 \pm 4.38$  mg, respectively). The weights of adult males were the lowest also in the *DAS-59122* maize treatment group ( $36.74 \pm 5.42$  mg), representing a significant decrease relative to the near isogenic ( $43.76 \pm 4.50$  mg), PR37M34 ( $40.54 \pm 4.85$  mg), PR36V52 ( $42.94 \pm 3.14$ ) and PR37N01 ( $41.98 \pm 5.20$  mg) hybrid maize lines. Investigations of the reproduction parameters (fertility and fecundity) showed that egg batch sizes ranged between 5 and 80, average size of eggs batches were 25 eggs for *DAS-59122*, 33 for the near isogenic line, and 25–33 for the three conventional hybrid maize lines. At an average, 17–30 L1 larvae hatched from the eggs. Average fertility rates among treatments on maize lines differed from 58 to 77% with no statistically significant differences.

Results show that toxin concentrations measured in GM plants are influenced by the analytical method applied for Cry toxin determination, by differences among cultivars carrying the same genetic event, by plant-to-plant variation in given cultivars, by time- and tissue-specificity of toxin production and by cultivation circumstances. These factors, among others, account for the high variability in Cry1Ab concentration values reported in the scientific literature. Results of our international ring trial indicated that analytical errors can be significantly reduced by application of an optimised and standardized ELISA method. Systematic sampling of plant tissues also decrease the errors appearing in toxin concentration. Diversity of the affecting factors makes inter-laboratory comparison of results difficult, and justifies case-specific studies during GM crop authorization.



## 8. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Az ELISA tesztsomagokat gyártó cégek piaci érdekektől vezérelve csökkentik a kereskedelmi tesztsomagok kimutatási határát, azonban ezt az elméleti analitikai kémiai megfontolások nem indokolják. A koncentrációmeghatározás a legjobban reprodukálható, a legmegbízhatóbb és a legpontosabb a szendvics típusú ELISA rendszerekre jellemző, négyparaméteres szigmoid kalibrációs görbe közel egyenes szakaszán, vagyis az áthajlási pont ( $IC_{50}$ ) közelében. Az általunk vizsgált, kereskedelmi ELISA rendszerek által biztosított standard oldatokkal felvett kalibráló egyenes 0–4 ng/ml és 0–5 ng/ml koncentrációtartományban biztosít mennyiségi meghatározást. Az analitikai szempontokat figyelembe véve a lineáris kalibráció ismételhetőségének és precizitásának vizsgálata mindenképp indokolt volt. A lineáris regresszió jól ismételhető a független mérések során, azonban a szigmoid görbe alsó görbületi szakaszára esik. Ezen analitikai megfontolást támasztotta alá az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate pozitív és negatív kontroll pontok, illetve az EnviroLogix cégtől vásárolt Cry1Ab-analitikai standard oldataival felvett kalibráló pontok (0,5, 2,5 és 5 ng/ml) esetében elvégzett belső minőség-ellenőrzés. A negatív kontroll (melynek elméleti koncentrációértéke 0 ng/ml) és a 0,5 ng/ml koncentrációjú standard oldat esetében az ELISA rendszer nem volt statisztikai kontroll alatt. A magasabb vizsgált koncentrációk a szigmoid görbe közel egyenes szakaszának alsó részére estek, így ezekben az esetekben a minőségellenőrzés során nem jelentkezett kiugró érték. Az alacsony koncentrációk esetében a kiugróan magas relatív tapasztalati szórások az egyedi mérések között módosíthatják a lineáris regresszió meredekségét, így a mérés eredményét egyaránt. A jelenleg is forgalomban lévő, minőségi kimutatásra alkalmas EnviroLogix ELISA tesztsomag negatív kontrollja sem bizonyult megfelelő referenciapontnak. Ez problémaként jelentkezhet környezet- és élelmiszer-biztonsági esetekben is, ahol egy hamisan GMO-mentesnek ítélt növény vagy élelmiszer esetlegesen tartalmaz Cry-toxint. Élelmiszer-biztonsági vonatkozásban további nehézséget jelent, hogy a sertés izomszövetében, három független mérés során meghatározott kimutatási határ  $7,95 \pm 7,99$  ng/ml volt. A 100%-os relatív hiba azt mutatja, hogy az izomszövet Cry1Ab-meghatározás során bonyolult mátrixot jelent. A jelentkező mátrixhatás csökkenthető a minta kellő mértékű hígításával, azonban Cry-toxint tartalmazó takarmány fogyasztása esetén az izomszövetben jelentkező toxin várható alacsony mennyisége miatt ez nem jelent megoldást. Növényi minta esetében mátrixhatással nem kell számolni az általunk vizsgált levél-, szár-, levélhüvely- gyökér-, portok-, csuhélevél- és pollenszövet vizsgálatok az ELISA tesztsomag által javasolt 1:10 hígítás mellett.

A körvizsgálat eredményei a standardizált ELISA protokollok alkalmazásának fontosságát hangsúlyozzák, melynek eredménye a különböző laboratóriumok által végzett

környezetanalitikai vizsgálatok összehasonlíthatósága. Az eredmények azt is mutatják, hogy még egy standardizált eljárás esetében is adódhatnak szignifikáns eltérések a Cry1Ab-toxinkoncentráció meghatározása során, azonban az adatok varianciája lényegesen alacsonyabb, mint egymástól eltérő módszerek alkalmazása során. A jelen vizsgálatban tapasztalt, egyébként szignifikáns eltéréseket okozó, 15,5–31,6%-os relatív tapasztalati szórások (%SD) azonban alacsonyabbak, mint más hasonló szisztematikus körmérés esetében, ahol Cry3Bb1-toxin kimutatásra alkalmas ELISA rendszer alkalmazhatóságát vizsgálták (NGUYEN *et al.* 2008). Hasonló mértékű variabilitás áll fenn a Cry1Ab-toxinkoncentrációkban a *MON 810* GM kukorica esetében a növény egyedei között is, vagyis a természetes sokféleség a GM növények esetében a megtermelt toxin mennyiségében is megmutatkozik (THEN és LORCH 2008). A saját vizsgálatunkban egységes ELISA tesztsomagot, egységes protokollt és azonos analitikai standard oldatokat alkalmaztunk a mérések során, azonban a tapasztalt relatív hibák tovább csökkenthetők, amennyiben a IV. táblázatban (3.3.3. fejezet) ismertetett fennmaradó különbségeket (minta-előkészítés, mikrotiterlemez-olvasó, szoftver) is egységesítjük. A minta-előkészítés és mérési folyamat automatizálása (automata extraháló berendezés, ELISA-robot) nyilvánvaló módon tovább csökkentené a jelen vizsgálatunkban fellépő tapasztalati szórásokat, mert így az olyan emberi hibák, mint a pipettázás és hígítás kiküszöbölhetők, illetve a dörzsmozsár használatával elért egyenetlen minta-előkészítés is. A jelen vizsgálatban saját protokollként alkalmazott ELISA eljárások által meghatározott, a közös protokolltól sok esetben szignifikánsan eltérő koncentrációk felhívják a figyelmet a kereskedelmi forgalomban kapható tesztsomagok alkalmazásának korlátaira (kalibráció, toxin–protoxin-keresztreakció), illetve az általuk kapott eredmények pontos és átgondolt ismertetésére.

A *MON 810* GM kukorica toxintermelésének vizsgálatakor szignifikáns mértékben különbözött a Cry1Ab-toxinkoncentráció a különböző *MON 810* fajták azonos szerveiben, egyazon fajta esetén a levélszintek között, adott levélen belül a levélalap – levéllemez közepe – levélcúcs irányban, különböző talajtípusokon, eltérő termesztési körülmények között (üvegház és szabadföld) és műtrágya alkalmazása mellett. A befolyásoló tényezők párhuzamos jelenléte fokozott különbségeket eredményezhet a Cry1Ab-koncentráció meghatározása során. A különböző laboratóriumok által végzett vizsgálatok különbözősége – az analitikai eltérésekből adódó hibák mellett – többek között ezen tényezőkre vezethetők vissza, így az eredmények összehasonlítása lehetetlenné válik. Számos tényező, például a talaj típusa vagy a klimatikus viszonyok adott esetben nem kiküszöbölhető eltérések, azonban egy szisztematikus, jól részletezett mintavétel összehasonlításra alkalmassá teheti az eredményeket. Mindezen megfontolások indokolják annak fontosságát, hogy a GM növények engedélyezési folyamatai során az eseti vizsgálatoknak ki kell terjedniük fajtákra, a nem célszervezet fajok kijelölésére,

illetve az adott bioföldrajzi régióra. Jelenleg az EU-ban a tagállamok saját területükön szabadon korlátozhatják bizonyos GM szervezetek termesztését, vagyis az Európai Unió szinten engedélyezett GMO-k termelésének korlátozásáról vagy tiltásáról a tagállamok nemzeti szinten dönthetnek (EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL 2015).

A Cry4-toxin kimutatásra fejlesztett, direkt, szendvics típusú ELISA rendszerünk kimutatási határa tisztított Cry4-toxin esetében 2 ng/ml, míg a Cry4-toxinokat tartalmazó VECTOBAC WDG granulátum- és VECTOBAC 12 AS szuszpenziókészítmények esetén 170 ng/ml és 900 ng/ml. A fejlesztett ELISA rendszer jelentősége abban áll, hogy jelenleg kereskedelmi forgalomban nem kapható Cry4-toxin kimutatására alkalmas ELISA eljárás. Az általunk fejlesztett rendszer kimutatási határai a készítmények esetében meglehetősen magas, így a gyakorlatban alkalmazott dózis bomlásának nyomon követhetősége a kimutatási határ alatt szűnyoglárvatesztek segítségével követhető nyomon (FEJES 2015).

A *DAS-59122* GM kukorica hatását hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) L1, L2 lárvastádiumaiban, illetve a teljes élelciklusban vizsgáltuk tritrofikus rendszerben. A fitofág szervezet a vizsgálati rendszerünkben a kukoricát gyakran fertőző zselnicemeggy-levéltetű (*Rhopalosiphum padi*) volt. Mivel a *Bt*-inszekticidok a célszervezet fiatal lárváin fejtenek ki hatásukat, a nem célszervezetek esetében is a korai lárvastádiumok vizsgálata elsődleges. Vizsgálataink során nem tapasztaltunk mortalitást az L1 és L2 lárvák fejlődése során sem a GM, sem a közel izogenikus kukorica esetében. Akut hatása a nem célszervezet lárváira a *DAS-59122* genetikai eseményt hordozó kukoricának nincs. Teljes élelciklus vizsgálata során a tojásból kikelt lárvák fejlődésük kezdeti szakaszától az imágóvá fejlődésen keresztül egészen a tojásrakási periódusig az adott kukoricafajtán élő levéltetveket fogyasztották. A vizsgálat során az közel izogenikus kukorica mellett 3 konvencionális hibrid is kontrollként szolgált. A kifejlődött imágók számában és ivararányában nem volt különbség az 5 vizsgált kukoricafajta esetében, azonban a hím imágók testtömege szignifikánsan alacsonyabb volt a 4 kontroll kukoricához képest. Nőstények esetében ilyen különbségeket nem tapasztaltunk. A reprodukciós paramétereket (lerakott tojások száma, tojásokból kikelt lárvák aránya) tekintve sem volt különbség a kukoricavonalak között. A környezeti hatásvizsgálatok célja, a GM és nem GM fajták összevetése, melynek alapvető módszere a GM és közel izogenikus vonalának összehasonlítása. A lényegi azonosság elve — melyet az ilyen típusú vizsgálatok során alaptételként kezelnek — hibásan azt feltételezi, hogy egy olyan biotechnológiai eljárás, melynek során a transzgen bejuttatása a növényi sejtbe nem célzott folyamat, a genom bármely részébe beépülve nem hozhat létre olyan változást abban, ami alapvetően megváltoztatja a fajta

tulajdonságait. A GM és közel izogenikus vonalakon végzett vizsgálatok hamar megcáfolták ezt a feltételezést, vizsgálatok eredményei igazoltak szignifikáns különbségeket összetétel vagy biológiai hatás tekintetében. Az EFSA a környezeti kockázatelemzés értelmezésébe az „összehasonlító kockázatelemzés” koncepcióját vezette be, mely előírja a közel izogenikus vonal mellett „élelmiszerként biztonságosak bizonyult”, egyéb fajtákat is bevonni a kockázatelemzésbe. Az értékelés során az izogenikus vonal és a kereskedelmi vonalak közötti eltéréseket beépíti a negatív kontrollba, megnövelve így a „háttér” szórását, ami által leszűkíti a GMO és a háttér közötti szignifikáns eltérések körét (SZÉKÁCS és DARVAS 2012a). A DAS-59122 GM kukorica, hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) teljes életciklusára gyakorolt hatásának vizsgálata során a hím imágók esetében egyértelműen alacsonyabb testtömeget határoztunk meg, mely különbség még a négy negatív kontroll mellett is szignifikánsnak bizonyult, tehát statisztikailag nem a véletlen eredménye. A vizsgálat eredményei a hétpettyes katicabogárra vonatkoznak, általánosításuk és kiterjesztésük más katicabogár-fajokra csak további vizsgálati eredmények alapján lehetséges.

PhD-munkám eredményei felhívják a figyelmet a jelenleg rendelkezésre álló ELISA rendszerek alkalmazhatóságának korlátaira a *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-tartalmának meghatározása során. Analitikai, biológiai és egyéb tényezők egyaránt szerepet játszanak a tudományos szakirodalomban tapasztalható nagymértékű eltérésekben a Cry1Ab-koncentrációk meghatározása során. A különböző kutatócsoportok eredményeinek összehasonlíthatósága nagymértékben nőhet ezen tényezők ismeretével, illetve minimális szintre való csökkentésével.

## I. MELLÉKLET: IRODALOMJEGYZÉK

- ABEL, C.A., ADAMCZYK, J.J. (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. *Journal of Economic Entomology*, 97, 1737-1744. p.
- ADAMCZYK, J.J., JR ADAM, L.C., HARDEE, D.D. (2001): Field efficacy and seasonal expression profiles for terminal leaves of single and double *Bacillus thuringiensis* toxin cotton genotypes. *Journal of Economic Entomology*, 94, 1589-1593. p.
- ALITIERI, M.A. (1994): Biodiversity and Pest Management in Agroecosystems. New York, USA: Haworth Press, 185 p.
- ALVAREZ-ALFAGEME, F., BIGLER, F., ROMEIS, J. (2010): Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effect of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae): the importance of study design. *Transgenic Research*, 20, 467-479. p.
- ANDOW, D.A., SOMERS, D.A., AMUGUNE, N., ARAGAO, F.J.L., GHOSH, K., GUDU, S., MAGIRI, E., MOAR, W. J., NJIHIA, S., OSIR, E. (2004): Transgene locus structure and expression of *Bt* maize. 83-116. p. In: HILBECK A., ANDOW D.A. (Eds.): *Environmental risk assessment of genetically modified organisms*. Oxfordshire, UK: CABI Publishing, 289. p.
- BAUMGARTE, S., TEBBE, C.C. (2005): Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab I-toxin produced by transgenic maize (*MON 810*) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology*, 14, 2539-2551. p.
- BEN-DOV, E., NISSAN, G., PELEG, N., MANASHEROB, R., BOUSSIBA, S., ZARITSKY, A. (1999): Refined, circular restriction map of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* plasmid carrying the mosquito larvicidal genes. *Plasmid*, 42, 186-191. p.
- BERNSTEIN, I.L., BERNSTEIN, J.A., MILLER, M., TIERZIEVA, S., BERNSTEIN, D.I., LUMMUS, Z., SELGRADE, M.K., DOERFLER, D. L., SELIGY, V L. (1999): Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environmental Health Perspectives*, 107, 575-582. p.
- BERZSENYI, Z. (1988): A N-műtrágya hatása a kukorica (*Zea mays* L.) növekedésének és növekedési jellemzőinek dinamikájára. *Növénytermelés*, 37, 527-540. p.

- BETZ, F.S., HAMMOND, B.G., FUCHS, R.L. (2000): Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32, 156-173. p.
- 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. p.
- BRAVO, A., SOBERÓN, M. (2008): How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? *Trends in Biotechnology*, 26, 573-579. p.
- BRODERICK, N.A., RAFFA, K.F., HANDELSMAN, J. (2006): Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 15196-15199. p.
- BRUNS, H.A., ABEL, C.A. (2003): Nitrogen fertility effects on *Bt* deltaendotoxin and nitrogen concentrations of maize during-early growth. *Agronomy Journal*, 95, 207-211. p.
- BRUSSOCK, S.M., CURRIER, T.C. (2009): Use of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis to quantify *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -Endotoxins. 78-87. p. In: HICKLE, L.A., FITCH, W.L. (Eds.): *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*, Washington DC, USA: American Chemical Society, 148 p.
- BUZOIANU, S.B., WALSH, M.C., UJHELYI, G., SZABÓ, E., REA, M.C., O'DONOVAN, O., NAGY, A., ROSS, R.P., GARDINER, G.E., GELENCSÉR, É., LAWLOR, P.G. (2012): Effects of feeding *Bt* maize to sows during gestation and lactation on maternal and offspring immunity and fate of transgenic material. *PLoS ONE*, 7, e47851. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0047851>.  
Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: doi:10.1371/journal.pone.0047851. Lekérdezés időpontja: 2015.01.29.
- CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY (1997): Decision document 97-19: Determination of the safety of Monsanto Canada Inc.'s Yieldgard™ insect resistant corn (*Zea mays* L.) line *MON 810*. 1-8. p. <http://www.cera-gmc.org/docs/decdocs/01-290-034.pdf>.  
Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: CFIA, *MON 810*, decision 97-19. Lekérdezés: 2014.11.25.
- CERA (2013): A Review of the Environmental Safety of the Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Proteins. ILSI Research Foundation, CERA, Washington D.C., USA. [http://www.cera-gmc.org/files/cera/uploads/Cry3435\\_en\\_rev1.pdf](http://www.cera-gmc.org/files/cera/uploads/Cry3435_en_rev1.pdf). Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: CERA, Cry34/35Ab1, review. Lekérdezés: 2015.05.25.
- CERA (2015): GM crop database. MON-ØØ81Ø-6 (*MON 810*). CERA, Washigton D.C., USA. <http://www.cera-gmc.org/GmCropDatabaseEvent/MON810>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: CERA, *MON 810*. Lekérdezés: 2014.11.24.

- CHEN, M., YE, G., LIU, Z., FANG, Q., HU, C., PENG, Y., SHELTON, A.M. (2009): Analysis of Cry1Ab toxin bioaccumulation in a food chain of *Bt* rice, an herbivore and a predator. *Ecotoxicology*, 18, 230-238. p.
- CHILCUTT, C.F., TABASHNIK, B.E. (2004): Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 7526-7529. p.
- CHOUGULE, N.P., BONNING, B.C. (2012): Toxins for transgenic resistance to hemipteran pests. *Toxins*, 4, 405-429. p. DOI: 10.3390/toxins4060405. <http://www.mdpi.com/2072-6651/4/6/405>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: toxins, hemiptera. Lekérdezés időpontja: 2015.03.09.
- CHRISTENSEN, L.E., BELOW, F.E., HAGEMAN, R.H. (1981): The effects of ear removal on senescence and metabolism of maize. *Plant Physiology*, 68, 1180-1185. p.
- CLARK, B.W., PHILLIPS, T.A., COATS, J.R. (2005): Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a Review, *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53, 4643-4653. p.
- CLIVE J. (2014): Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: *ISAAA Brief*, No. 49. ISAAA: Ithaca, NY.
- CRESPO, A.L.B., SPENCER, T.A., NEKL, E., PUSZTAI-CAREY, M., MOAR, W.J., SIEGFRIED, B.D. (2008): Comparison and validation of methods to quantify Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis* for standardization of insect bioassays. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 130-135. p.
- CRICKMORE, N., BONE, E.J., WILLIAMS, J.A., ELLAR, D.J. (1995): Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiological Letters*, 131:249-254. p.
- CRICKMORE, N., ZEIGLER, D.R., FEITELSON, J., SCHNEPF, E., Van RIE, J., LERECLUS, D., BAUM, J., DEAN, D.H. (1998): Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 807-813. p.
- 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/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Bt nomenclature. Lekérdezés időpontja: 2015.02.12.
- DAMGAARD, P.H., PEDERSEN, J.C., EILENBERG, J. (1997): Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. *Journal of Applied Microbiology*, 82, 253-258. p.

- DARVAS, B. (1986): Az integrált növényvédelmi technológia elve és módszerei növényházakban. 50-59 p. In: BUDAI CS. (Szerk.): *Biológiai védekezés növényházak kártevői ellen*. Budapest: Mezőgazdasági Kiadó, 177 p.
- DARVAS, B. (1997): A genetikailag módosított élőszervezetek kibocsátásának környezeti kockázatai. 1-64. old. A Fenntartható Fejlődés Bizottság kiadványa. KTM, Budapest.
- DARVAS, B. (1999): Baktériumok (*Bacillus thuringiensis* Berliner). 83-91. p. In: POLGÁR A. L. (Szerk.): *A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon*. Budapest: OMFB, 277 p.
- DARVAS, B., DELI, SZ., NÉMETH, GY., BÁNÁTI, H., FÜLEKI, L., SZÉKÁCS A. (2013): Géntechnológiai úton módosított növényekkel 1999 és 2012 között végzett szabadföldi kísérletek Európában és Magyarországon. *Növényvédelem*, 49, 491-500. p.
- DARVAS, B., FÜLEKI, L., BÁNÁTI, H., DELI, SZ., SZÉKÁCS, A. (2014): GM-növények engedélyezési stratégiái a világ országaiban. *Növényvédelem*, 50, 121-127. p.
- DARVAS, B., LAUBER, É. (2006): Genetikailag módosított élő szervezetek a növénytermesztésben. 315-319. p. In: DARVAS B., SZÉKÁCS A. (Szerk.): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. Budapest: L'Harmattan Kiadó, 382 p.
- DARVAS, B., LAUBER, É. (2007): A Cry1-toxinrezisztenciáról. 64-66. p. In DARVAS B. (Szerk.): *Mezőgazdasági géntechnológia - elsőgenerációs GM-növények*. Budapest: Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, 167 p.
- DARVAS, B., LAUBER, É., BAKONYI, G., BÉKÉSI, L., SZÉKÁCS, A., PAPP, L. (2007): A MON 810-es GM-kukoricák környezettudományi megítélése. *Magyar Tudomány*, 168, 1047-1056. p.
- DARVAS, B., LÖVEI, G. (2006): A genetikailag módosított szervezetek környezeti hatásai. 320-326. p. In: DARVAS B., SZÉKÁCS A. (Szerk.): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. Budapest: L'Harmattan Kiadó, 382 p.
- DARVAS, B., POLGÁR, L.A. (1998): Novel type insecticides: specificity and effects on non-target organisms. 188-259 p. In: ISHAAYA I., DEGHEELE D. (Eds.): *Insecticides with novel modes of action, mechanism and application*. Berlin: Springer-Verlag, 282 p.
- DARVAS, B., SEPRŐS, I., SZÁNTÓ, J. (1979): Környezetkímélő növényvédelmi eljárások rovarok és atkák ellen. I. Biológiai védekezés: entomopatogén baktériumok, entomofág állatok. Agroinform Kiadó, Budapest. 53 p.
- DARVAS, B., SZÉKÁCS, A. (2010): A géntechnológiai úton módosított növények megítélése az Európai Unió keleti határán. *Biokontroll*, 1, 13-23. p.



- De BARJAC, H. (1978): Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* serotype 14', *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris Ser. D*, 286, 797-800. p.
- De MAAGD, R.A., BRAVO, A., BERRY, A., CRICKMORE, C., SCHNEPF, H.E. (2003): Structure, diversity and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics*, 37, 409-433. p
- DONOVAN, W.P., ENGLEMAN, J.T., DONOVAN, J.C., BAUM, J.A., BUNKERS, G.J., CHI, D.J., CLINTON, W.P., ENGLISH, L., HECK, G.R., ILAGAN, O.M., KRASOMILOSTERFELD, K.C., PITKIN, J.W., ROBERTS, J.K., WALTERS, M.R. (2006): Discovery and characterization of Sip1A: A novel secreted protein from I with activity against coleopteran larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72, 713-719. p.
- DOUVILLE, M., GAGNE, F., MASSON, L., MCKAY, J., BLAISE, C. (2005): Tracking the source of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab endotoxin in the environment. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 219-232. p.
- DULMAGE H.T. (1981): Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. 193-222. p. In: BURGESS H.D. (Eds.): *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*, New York: Academic Press, 949 p.
- EFSA (2005): Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on an application (Reference EFSAGMO-DE-2004-03) for the placing on the market of insect-protected genetically modified maize *MON 863* x *MON 810*, for food and feed use, under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *EFSA Journal*, 252, 23. p.
- EFSA (2009): Scientific Opinion: Applications (EFSA-GMO-RX-MON810) for renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize *MON 810*; (2) feed consisting of and/or containing maize *MON 810*, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize *MON 810*, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto, *EFSA Journal*, 1149, 85. p.
- EFSA (2013): Scientific Opinion on an application from Pioneer Hi-Bred International and Dow AgroSciences LLC (EFSA-GMO-NL-2005-23) for placing on the market of genetically modified maize 59122 for food and feed uses, import, processing and cultivation under Regulation (EC) No 1829/2003. *EFSA Journal*, 11, 3135, 104 p.
- ELLIS, R.T., STOCKHOFF, B.A., STAMP, L., SCHNEPF, H.E., SCHWAB, G.E., KNUTH, M., RUSSEL, J., CARDINEAU, G.A., NARVA, K.E. (2002): Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm,

*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 1137-1145. p.

ERDŐS GY., SZLOBODNYIK J., ZÖLDI V. (2008): Tájékoztató az engedélyezett irtószerekről és az egészségügyi kártevők elleni védekezés szakmai irányelveiről. Budapest: OEK, 324 p.

ERMOLLI, M., FANTOZZI, A., MARINI, M., SCOTTI, D., BALLA, B., HOFFMANN, S., QUERCI, M., PAOLETTI, C., Van Den EEDE, G. (2006a): Food safety: screening tests used to detect and quantify GMO proteins. *Accreditation and Quality Assurance*, 11, 55-57. p.

ERMOLLI, M., PROSPERO, A., BALLA, B., QUERCI, M., MAZZEO, A., Van Den EEDE, G. (2006b): Development of an innovative immunoassay for CP4EPSPS and Cry1AB genetically modified protein detection and quantification. *Food Additives and Contaminants*, 23, 876-882. p.

EUROPEAN COMMISSION (2007): Authorising the placing on the market of products containing, consisting of, or produced from genetically modified maize 59122 (*DAS-59122-7*) pursuant to Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council (notified under document number C(2007) 5141) (Only the French, Dutch and English texts are authentic) (Text with EEA relevance) (2007/702/EC).

EUROPEAN PARLIAMENT AND COUNCIL (2015): Directive (EU) 2015/412 of the European Parliament and of the Council of 11 March 2015 amending Directive 2001/18/EC as regards the possibility for the Member States to restrict or prohibit the cultivation of genetically modified organisms (GMOs) in their territory. [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:JOL\\_2015\\_068\\_R\\_0001](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:JOL_2015_068_R_0001). Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: EUR-lex, GMO, 2015. Lekérdezés: 2015.04.06.

EVDOKIMOV, A.G., MOSHIRI, F., STURMAN, E.J., RYDEL, T.J., ZHENG, M., SEALE, J.W., FRANKLIN, S. (2014): Structure of the full-length insecticidal protein Cry1Ac reveals intriguing of toxin packaging into *in vivo* formed crystals. *Protein Science*, 23, 1491-1497. p.

EWEN, J.W.B., PUSZTAI, Á. (1999): Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *The Lancet*, 354, 1353-1354. p.

EZEQUIEL, M., REGGIARDO, M.I., VALLEJOS, R.H., PERMINGEAT, H.R. (2006): Detection of Bt transgenic maize in foodstuffs. *Food Research International*, 39, 250-255. p.

FANTOZZI, A., ERMOLLI, M., MARINI, M., SCOTTI, D., BALLA, B., QUERCI, M., LANQRELL, S.R., Van Den EEDE G. (2007): First application of a microsphere-based

- immunoassay to the detection of genetically modified organisms (GMOs): Quantification of Cry1Ab protein in genetically modified maize. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1071-1076. p.
- FAO (1998): Guidelines for quality management in soil and plant laboratories. FAO Soils Bulletin, 74.
- FEJES Á. (2015): Perzisztens növényvédő szerek hatástartam- és lebomlásvizsgálatai. *PhD Disszertáció*. Pannon Egyetem Georgikon Kar, Állat- és Agrárkörnyezet-tudományi Doktori Iskola. 1-124. p.
- FEKETE, G., ZÖLDI, V. (2009): A csípőszúnyogok elleni szervezett védekezésben használható készítmények laboratóriumi és szabadföldi vizsgálati módszerei. 51-56. p. In: KENYERES Z. (Szerk.): *Pannónia Füzetek 3.: Csípőszúnyogok gyérítésének gyakorlata Magyarországon*, Keszthely: Pannónia Központ Szakértői és Tanácsadói Koordinációs Kft., 88 p.
- FÜSTI MOLNÁR G. (2007): Az állami elismerés előtt lévő géntechnológiai úton módosított fajtákkal végzett hazai fajtavizsgálatok eredményei. 17-19. p. In: DARVAS B. (Szerk.): *Mezőgazdasági géntechnológia - elsőgenerációs GM-növények*. Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest. 167 p.
- FVM RENDELET 43/2010 (IV. 23.): A növényvédelmi tevékenységről. [http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy\\_doc.cgi?docid=A1000043.FVM](http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A1000043.FVM). Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: FVM rendelet 43/2010. Lekérdezés: 2015.06.13.
- GAO, Y., SCHAFER, B.W., COLLINS, R.A., HERMAN, R.A., XU, X., GILBERT, J.R., NI, W., LANGER V.L., TAGLIANI L.A. (2004): Characterization of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 insecticidal crystal proteins expressed in transgenic corn plants and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8057-8065.
- GENERAL COURT OF THE EU (2013): Judgment in Case T-240/10 Hungary v Commission: The General Court has annulled the Commission's decisions concerning authorisation to place on the market the genetically modified potato Amflora. <http://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2013-12/cp130160en.pdf>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Amflora, EU Court, ban. Lekérdezés: 2015.01.18.
- GILL, S.S., COWLES, E.A., PIETRANTONIO, P.V. (1992): The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annual Review of Entomology*, 37, 615-636. p.
- GIOVANNOLI, C., ANFOSSI, L., BAGGIANI, C., GIRAUDI, G. (2008): Binding properties of a monoclonal antibody against the Cry1Ab from *Bacillus thuringiensis* for the

development of a capillary electrophoresis competitive immunoassay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392, 385-393. p.

GMO COMPASS (2015): <http://www.gmo-compass.org/eng/home/>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: GMO Compass. Lekéredzés: 2015.02.25.

GOLDBERG, L.J., MARGALIT, J. (1977): A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*, *Mosquito News*, 37, 355-358. p.

GONZALES, M.R., BISCHOFBERGER, M., PERNOT, L., Van Der GOOT, F.G., FRECHE, B. (2008): Bacterial pore-forming toxins: The (w)hole story? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65, 493-507. p.

GROTHAUS, G.D., BANDLA, M., CURRIER, T., GIROUX, R., JENKINS, G.R., LIPP, M., SHAN, G., STAVE, J.W., PANTELLA, V. (2006): Immunoassay as an analytical tool in agricultural biotechnology. *Journal of AOAC International*, 89, 913-928. p.

GUIDI, V., LEHNER, A., LÜTHY, P., TONOLLA, M. (2013): Dynamics of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Lysinibacillus sphaericus* spores in urban catch basin after simultaneous application against mosquito larvae. *PLoS ONE*, 8: e55658. DOI:10.1371/journal.pone.0055658.

<http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info:doi/10.1371/journal.pone.0055658&representation=PDF>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Cry34Ab1, Cry35Ab1, structure. Lekéredzés időpontja: 2015.09.25.

HARLOW E., LANE D. (1988): *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Springs Harbor Laboratory, 344-348. p.

HARWOOD, J.D., WALLIN, W.G., OBRYCKI, J.J. (2005): Uptake of *Bt* endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Molecular Ecology*, 14(9), 2815-2823. p.

HERMAN, R.A., SCHERER, P.N., YOUNG, D.L., MIHALIAK, C.A., MEADE, T., WOODSWORTH, A.T., STOCKHOFF, B.A., NARVA, K.E. (2002): Binary insecticidal crystal protein from *Bacillus thuringiensis*, strain PS149B1: effects of individual protein components and mixtures in laboratory bioassays. *Journal of Economic Entomology*, 95(3), 635-639. p.

HESZKY L. (2007): Génáramlás, génmegszökés várható következményei. 20-23. p. In: DARVAS B. (Szerk.): *Mezőgazdasági géntechnológia - elsőgenerációs GM-növények*. Budapest: Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, 167 p.

HESZKY, L. (2012): Tanuljunk "géntechnológiául" (21.): A GM-fajták termesztésének helyzete az Európai Unióban. *Agrofórum*, 4, 108-115. p.

- HILBECK, A. (2001): Implication of transgenic, insecticidal plants for insect and plant biodiversity. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 4, 43-61. p.
- HODEK I., HONEK A. (1996): Ecology of Coccinellidae. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers,. 464 p.
- HÖFTE, H., WHITELEY, H.R. (1989): Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 53, 242-255. p.
- HUANG, K.-X., BADGER, M., HANEY, K., EVANS, S.L. (2007): Large scale production of *Bacillus thuringiensis* PS149B1 insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1 from *Pseudomonas fluorescens*. *Protein Expression and Purification*, 53(2), 325-330.
- HUBER-LUKAC, M., LUTHY, P., BRAUN, D.G. (1983): Specificities of monoclonal antibodies against the activated delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Infection and Immunity*, 40, 608-612. p.
- ICHIMATSU, T., MIZUKI, E., NISHIMURA, K., AKAO, T., SAITOH, H., HIGUCHI, K., OHBA, M. (2000): Occurrence of *Bacillus thuringiensis* in fresh waters of Japan. *Current Microbiology*, 40, 217-220. p.
- ISO (1994): ISO 5725-4:1994 Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 4: Basic methods for the determination of the trueness of a standard measurement method. <http://www.iso.org/iso/home.html>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: ISO. Lekérdezés időpontja: 2014.05.10.
- JENKINS, J.L., DEAN, D.H. (2000): Exploring the mechanism of action of insecticidal proteins by genetic engineering methods. *Genetic Engineering*, 22, 33-54. p.
- JERMY, T. (1975): Az integrált védekezés fogalma és hazai alkalmazása. *Növényvédelem*, 11, 337-352. p.
- KEBEKKUS, B.B, MITRA, S. (1998): Environmental chemical analysis, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 344 p.
- KELKER, M.S., BERRY, C., EVANS, S.L., PAI, R., McCASKILL, D.G., WANG, N.X., RUSSELL, J.C., BAKER, M.D., YANG, C., PFLUGRATH, J.W., WADE, M., WESS, T.J., NARVA, K.E. (2014): Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. *PLoS One*, 9, e112555. DOI: 10.1371/journal.pone.0112555. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0112555>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Cry34Ab1, Cry35Ab1, structure. Lekérdezés időpontja: 2015.03.09.

- KIROUAC, M., VACHON, V. NOEL, J.F., GIRARD, F., SCHWARTZ, J.L., LAPRADE, R. (2002): Amino acid and divalent ion permeability of the pores formed by the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac in insect midgut brush border membrane vesicles. *Bba-Biomembranes*, 1561, 171-179. p.
- KNOWLES, B.H., DOW, J.A.T. (1993): The crystal delta-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* – Models for their mechanism of action on the insect gut. *Bioessays*, 15, 469-476. p.
- KOZIEL, M.G., BELAND, G.L., BOWMAN, C., CAROZZI, N.B., CRENSHAW, R., CROSSLAND, L., DAWSON, J., DESAI, N., HILL, M., KARDWELL, S., LAUNIS, K., LEWIS, K., MADDOX, D., MCPHERSON, K., MEGHJI, M.R., MERLIN, E., RHODES, R., WARREM, G.W., WRIGHT, M., EVOLA, S.V. (1993): Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nature Biotechnology*, 11, 194-200. p.
- KRAMAZ, P.E., VAUFLEURY, A., CAREY, M. (2007): Studying the effect of exposure of the snail *Helix aspersa* to the purified *Bt* toxin, Cry1Ab. *Applied Soil Ecology*, 37, 169-172. p.
- LAMBERT, B., BUYSSE, L., DECOCK, C., JANSENS, S., PIENS, C., SAEY, B., SEURINCK, J., Van AUDENHOVE, K., Van RIE, J., Van VLIET, A., PEFEROEN, M. (1996): A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Applied Environmental Microbiology*, 62, 80-86. p.
- LEE, L.-N., SAXENA, D., STOTZKY, G. (2003): Activity of free and clay-bound insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* against the mosquito *Culex pipiens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4111-4115. p.
- LEMCOFF, J.H., LOOMIS, R.S. (1986): Nitrogen influences on yield determination in maize. *Crop Science*, 26, 1017-1022. p.
- LERECLUS, D., DELÉCLUSE, A., LECADET, M.-M. (1993): Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. 37-69. p. In: ENTWISTLE P.F., CORY J.S., BAILEY M.J., HIGGS S. (Eds.): *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: theory and practice*. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 311 p.
- LI, H., OPPERT, B., HIGGINS, R.A., HUANG, F., BUSCHMAN, L.L., ZHU, K. (2005): Susceptibility of DIPEL-Resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to individual *Bacillus thuringiensis* protoxins. *Journal of Economic Entomology*, 98, 1333-1340. p.
- LI, Y., ZHANG, X., CHEN, X., ROMEIS, J., YIN, X., PENG, Y. (2014): Consumption of *Bt* rice pollen containing Cry1C or Cry2A does not pose risk to *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). *Scientific Reports*, 5, Article number: 7679.

<http://www.nature.com/srep/2015/150108/srep07679/full/srep07679.html#f1>.

Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: *P. japonica*, *Bt* rice. Lekérdezés: 2015.06.14.

- LILLEY, M., RUFFELL, R.N., SOMERVILLE, H.J. (1980): Purification of the insecticidal toxin in crystals of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Generic Microbiology*, 118, 1-11. p.
- LIU, C.-M., ZHENG Y.M. (2001): Quantitative analysis of parasporal crystal protein from *Bacillus thuringiensis* by capillary electrophoresis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 9, 79-83. p.
- LÓPEZ-PAZOS, S.A., CERÓN, J.A. (2013): Biological activity of insecticidal toxins: Structural basis, site-directed mutagenesis and perspectives. 273-302. p. In: FIGURSKI D. (Eds.): *Genetic manipulation of DNA and protein - Examples from current research*. InTech. DOI: 10.5772/55895. <http://www.intechopen.com/books/genetic-manipulation-of-dna-and-protein-examples-from-current-research/biological-activity-of-insecticidal-toxins-structural-basis-site-directed-mutagenesis-and-perspectiv>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: biological activity, insecticidal toxins. Lekérdezés időpontja: 2015.03.09.
- LÓPEZ-PAZOS, S.A., CERÓN, J.A. (2007): Three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* toxins: A review. *Acta Biológica Colombiana*, 12, 19-32. p.
- LUNG, J.H.T., MALE, K.B., MAZZA, A., MASSON, L., BROUSSAU, R. (2004): Analysis of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and recombinant *Escherichia coli* by capillary electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 25, 3292-3299. p.
- MACBEAN C. (Eds.) (2012): *The Pesticide Manual*. Hampshire UK: British Crop Production Council, 1439 p.
- MARGALITH, Y., BEN-DOV, E. (2000): Biological control by *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. 243-301. p. In: RECHCIGL J.E., RECHCIGL N.A. (Eds.): *Insect Pest Management: Techniques for Environmental Protection*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 408 p.
- MARGARIT, E., REGGIARDO, M.I., VALLEJOS, R.H., PERMINGEAT, H.R. (2006): Detection of *Bt* transgenic maize in foodstuffs. *Food Research International*, 39, 250-255. p.
- MARTIN, P.A., TRAVERS, R.S. (1989): Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2437-2442. p.
- MASSON, L., ERLANDSON, M., PUSZTAY-CAREY, M., BROUSSEAU, R., JUÁREZ-PÉREZ, V., FRUTOS, R. (1998): A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4782-4788. p.

- MASSON, L., SCHWAB, G., MAZZA, A., BROUSSEAU, R., POTVIN, L., SCHWARTZ, J.-L. (2004): A novel *Bacillus thuringiensis* (PS149B1) containing a Cry34Ab1/ Cry35Ab1 binary toxin specific for the western corn rootworm *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte forms ion channels in lipid membranes. *Biochemistry*, 43(38), 12349-12357. p.
- MEADOWS, M.P., ELLIS, D.J., BUTT, J., JARRET, P., BURGESS, H.D. (1992): Distribution, frequency and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1344-1350. p.
- MENDELSON, M., KOUGH, J., ZIGFRIDAI, V., MATTHEWS, K. (2003): Are Bt-crops safe? *Nature Biotechnology*, 21, 1003-1009. p.
- MIRANDA, R., ZAMUDIO, F.Z., BRAVO, A. (2001): Processing of Cry1Ab [ $\delta$ ]- endotoxin from *Bacillus thuringiensis* by *Manduca sexta* and *Spodoptera frugiperda* midgut proteases: Role in protoxin activation and toxin inactivation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31, 1155-1163. p.
- MOELLENBECK, D.J., PETERS, M.L., BING, J.W., ROUSE, J.R., HIGGINS, L.S., SIMS, L., NEVSEHAL, T., MARSHALL, L., ELLIS, R.T., BYSTRAK, P.G., LANG, B.A., STEWART, J.L., KOUBA, K., SONDAG, V., GUSTAFSON, V., NOUR, K., XU, D., SWENSON, J., ZHANG, J., CZAPLA, T., SCHWAB, G., JAYNE, S., STOCKHOFF, B.A., NARVA, K., SCHNEPF, H.E., STELMAN, S.J., POUTRE, C., KOZIEL, M., DUCK, M. (2001): Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* protect corn from corn rootworms. *Nature Biotechnology*, 19(7), 668-672. p.
- MOHAN, M., GUJAR, G.T. (2003): Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). *Journal Invertebrate Pathology*, 82, 1-11. p.
- NARVA, K.E., SCHNEPF, H.E., KNUTH, M., POLLARD, M.R., CARDINEAU, G., SCHWAB, G.E. (2000): Pesticidal Proteins. United States Patent (Patent Number: 6677148). United States Patent Office.
- NGUYEN, J., RUSSEL, S.C. (2010): Targeted proteomics approach to species-level identification of *Bacillus thuringiensis* spores by AP-MALDI-MS. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21, 993-1001. p.
- NGUYEN, T.H. (2004): Biosafety research and monitoring methods of *Bt* corn: Expression, detection and effect of recombinant Cry1Ab in heterologous expression systems. *PhD thesis*. Georg August University, Göttingen, Germany.
- NGUYEN, T.H., HUNFELD, H., MEISSE, M., MIETHLING-GRAFF, R., PAGEL-WIEDER, S., RAUSCHEN, S., ZURBRUEGG, C., EBER, S., GESSLER, F., ROMEIS, J., TEBBE,



- C.C., NENTWIG, W., JEHLE, J.A. (2008): Round robin quantitation of Cry3Bb1 using the qualitative PathoScreen ELISA. *IOBC/WPRS Bulletin*, 33, 59-66. p.
- NGUYEN, T.H., JEHLE, J.A. (2007): Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize *MON 810*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 114, 82-87. p.
- ODELL, J.T., NAGY, F., CHUA, N.H. (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810-812. p.
- OHBA, M., MIZUKI, E., UEMORI, A. (2009): Parasporin, a new anticancer protein group from *Bacillus thuringiensis*. *Anticancer Research*, 29, 427-433. p.
- OKUMURA, S., OHBA, M., MIZUKI, E., CRICKMORE, N., COTÉ, J.-C., NAGAMATSU, Y., KITADA, S., SAKAI, H., HARATA, K., SHIN, T. (2010): Parasporin Nomenclature. <http://parasporin.fitc.pref.fukuoka.jp/list.html>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: parasporin nomenclature. Lekérdezés időpontja: 2014.12.15.
- OTIENO-AYAYO, Z.N., ZARITSKY, A., WIRTH, M.C., MANASHEROB, R., KHASDAN, V., CAHAN, R., BEN-DOV, E. (2008): Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis*. *Environmental Microbiology*, 10, 2191-2199. p.
- PALMA, L., MUNOZ, D., BERRY, C., MURILLO, J., CABALLERO, P. (2014): *Bacillus thuringiensis* toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins*, 6, 3296-3325. p. DOI: 10.3390/toxins6123296. <http://www.mdpi.com/2072-6651/6/12/3296>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Bt toxins, overview. Lekérdezés időpontja: 2014.12.03.
- PIONEER HI-BRED INC. (2010): Tudomány a Siker Szolgálatában<sup>TM</sup>/Science with Service Delivering Success<sup>TM</sup>. Akadémiai és vállalati mezőgazdasági technológiai kutatások/Research in Academy and Corporate agricultural technology. együttműködés a Magyar Tudományos Akadémia Növényvédelmi Kutatóintézet és a Pioneer Hi-Bred International, Inc. között./Co-operation between the Plant Protection Institute of Hungarian Academy of Sciences and Pioneer Hi-Bred International, Inc. Kiadvány/Proceeding, Budapest, 1-8. p.
- PONCET, S., DELECLUSE, A., KLIER, A., RAPOPORT, G. (1995): Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66, 131-135. p.
- PROMDONKOY, B., ELLAR, D.J. (2003): Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Journal*, 374, 255-259. p.

- PUSZTAI, Á., BARDÓCZ, ZS. (2006): A genetikailag módosított élelmiszerek biztonsága. Budapest: Természetesten Alapítvány. 152. p.
- PUSZTAI, Á., BARDÓCZ, ZS., EWEN, S.W.B. (2003): Genetically modified foods: Potential human health effects. 342-372. p. In: D'MELLO, J.P.F. (Eds.) *Food Safety: Contaminants and Toxins*. Wallingford, Oxon, UK: CAB International. 452 p.
- RANASINGHE, C., AKHURST, J.R. (2002): Matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for detecting novel *Bt* toxins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 79, 51-58. p.
- 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. <http://www.agronext.iastate.edu/corn/production/management/growth/>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: corn development, Iowa. Lekérdezés: 2015.06.11.
- 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. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 547-559. p.
- SANCHIS, V., BOURGUET, D. (2008): *Bacillus thuringiensis*: Applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 28, 11-20. p.
- SCHMIDT J.E.U., BRAUN, C.U., WHITEHOUSE, L.P., HILBECK, A. (2009): Effects of activated *Bt* transgene products (Cry1Ab , Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 221-228. p.
- 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. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 775-806. p.
- SÉRALINI, G.-E., CELLIER, D., De VENDOMOIS, J.S. (2007): New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 596-602. p.
- SHAO, Z, CUI, Y, LIU, X, Y,I H, JI, J, YU, Z. (1998): Processing of deltaendotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72, 73-81. p.
- SHEWHART, W.A. (1931): Economic control of quality of manufactured product. New York, USA: D Van Nostrand Company, (Reprinted by ASQC Quality Press, 1980). 520 p.

- SIMS, S.R., BERBERIC, S.A. (1996): *Bacillus thuringiensis* CryIA protein levels in raw and processed seed of transgenic cotton: Determination using insect bioassay and ELISA. *Journal of Economic Entomology*, 89, 247-251. p.
- SMITH, R.A., COUCHE, G.A. (1991): The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 311-315. p.
- STAVE, J.W. (1999): Detection of new or modified proteins in novel foods derived from GMO future needs. *Food Control*, 10, 367-374. p.
- STAVE, J.W. (2002). Protein immunoassay methods or detection of biotech crops: Applications, limitations, and practical considerations. *Journal of AOAC International*, 85, 780-786. p.
- STERN, V.M., SMITH, R.F., Van Den BOSCH, R., HAGEN, K.S. (1959): The integrated control concept. *Hilgardia*, 29, 81-101. p.
- SZÉKÁCS A., DARVAS B. (2007): A *MON 810*-es kukorica Cry1-toxintermelése és annak tarlómaradványokban való bomlása. 162. p. In: DARVAS B. (Szerk): *Mezőgazdasági géntechnológia - elsőgenerációs GM-növények*. Budapest: Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest, 167 p.
- SZÉKÁCS A., DARVAS B. (2011): Cry-toxinhasználat összehasonlító elemzése a rovarok elleni védekezésben. 35. p. In: DARVAS, B., SZÉKÁCS, A., (Szerk.): *Az elsőgenerációs géntechnológiai úton módosított növények megítélésének magyarországi háttere*. Budapest: Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, 215 p.
- SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2012a): Álláspontok a *GMO* környezeti kockázatelemzésében alkalmazott statisztikai módszerekről. *II. Ökotoxikológiai Konferencia*, p. 24.
- SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2012b): Comparative aspects of Cry toxin usage in insect control. 195-230. p. In: ISHAAYA, I., PALLI, S:R., HOROWITZ, R. (Eds.): *Advanced technologies for managing insect pests*, Berlin: Springer-Verlag, 326 p.
- SZÉKÁCS, A., LAUBER, É., JURACSEK, J., DARVAS, B. (2010): Cry1Ab toxin production of *MON 810* transgenic maize. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 182-190. p.
- SUN, Y., ZHAO, Q., XIA, L., DING, X., HU, Q., FEDERICI, B.A., PARK, H.W. (2013): Identification and characterization of three previously undescribed crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79, 3364-3370. p.
- TAKÁCS, E., BÁNÁTI, H., FÓNAGY, A., DARVAS, B. (2010): Short term study of *DAS-59122-7* maize on L1 and L2 larvae of seven-spotted ladybird (*Coccinella septempunctata*) feeding on the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *Növénytermelés*, 59 (Suppl.), 625-628. p.

- TAKÁCS, E., FÓNAGY, A., JURACSEK, J., KUGLER, N., SZÉKÁCS, A. (2012): Characterization of tritrophic effects of *DAS-59122-7* maize in the seven-spotted ladybird (*Coccinella septempunctata*) feeding on the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *IOBC Bulletin*, 73, 121-134. p.
- TAKÁCS, E., LAUBER, É., BÁNÁTI, H., SZÉKÁCS, A., DARVAS, B. (2009): *Bt*-növények a növényvédelemben. *Növényvédelem*, 45, 549-558. p.
- TAKAHASHI, Y., HORI, H., FURUNO, H., KAWANO, T., TAKAHASHI, M., WADA, Y. (1998): Enzyme linked immunosorbent assays for rapid and quantitative detection of insecticidal crystal proteins of *Bt* pesticides. *Journal of Pesticide Science*, 23, 386-391. p.
- TAPP, G., STOTZKY, G. (1995): Dot blot enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring the fate of insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 602-609. p.
- THEN, C. (2010): Risk assessment of toxins derived from *Bacillus thuringiensis*-synergism, efficacy and selectivity. *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 791-797. p.
- THEN, C., LORCH, A. (2008): A simple question in a complex environment: How much *Bt* toxin do genetically engineered *MON 810* maize plants actually produce? 17-21. p. In: BRECKLING, B., REUTER, H., VERHOEVEN, S. (Eds.): *Implications of GM-crop cultivation at large spatial scales. Theorie in der Ökologie*: Frankfurt: Peter Lang. 180 p.
- TIJSSEN, P. (1985): Practice and theory of enzyme immunoassays. *Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology*, vol 15, Amsterdam, Hollandia: Elsevier, Biomedical Press, 549 p.
- TOMPKINS, G., ENGLER, R., MENDELSON, M., HUTTON, P. (1990): Historical aspects of the quantification of the active ingredient percentage for *Bacillus thuringiensis* products. 9-13. p. In: HICKLE, L.A., FITCH, W.L. (Eds.): *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*, ACS Symposium Series, vol 432, Washington DC, USA: American Chemical Society, 148 p.
- US EPA (1988) Registration standard for the reregistration of pesticide products containing *Bacillus thuringiensis* as the active ingredient. Case No. 0247, EPA, OPP, 80 p.
- US EPA (2001): Biopesticides Registration Action Document (BRAD) - *Bacillus thuringiensis* plant-incorporated protectant, II.A. Product characterization. Washington, DC, USA: Office of Pesticide Programs, 175 p.
- US EPA (2010): *Bacillus thuringiensis* Cry34Ab1 and Cry35Ab1 Proteins and the Genetic Material Necessary for Their Production in Event *DAS-59122-7* Corn. <http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/pips/cry3435ab1-brad.pdf>. Keresőprogram:

- google. Kulcsszavak: EPA, Cry34/35Ab1, registration document. Lekérdezés: 2015.03.12.
- VACHON, V., LAPRADE, R., SCHWARTZ, J.L. (2012): Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111, 1-12. p.
- Van FRANKENHUYZEN, K. (2009): Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 101, 1-16. p.
- VELIMIROV, A., BINTER, C., ZENTEK, J. (2008): Biological effects of transgenic maize *NK603xMON810* fed in long term reproduction studies in mice. *Forschungsberichte der Sektion IV*, Band 3. Vienna, Austria: Bundesministerium für Gesundheit Familie und Jugend,. 105 p.
- VM RENDELET 53/2013. (VI. 17.): A *MON 810* kukoricavonalból származó beltenyésztett vonalak és hibridek vetőmagjának védzáradáki eljárásáról. [http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy\\_doc.cgi?docid=A1300053.VM](http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A1300053.VM). Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: VM rendelet 53/2013. Lekérdezés: 2015.06.13.
- VOLPE G., AMMID N.H., MOSCONE D., OCCHIGROSSI L., PALLESCHI G. (2006): Development of an immunomagnetic electrochemical sensor for detection of BT-CRY1AB/CRY1AC proteins in genetically modified corn samples. *Analytical Letters*, 39, 1599-1609. p.
- WALSCHUS, U., WITT, S., WITTMANN, C. (2002): Development of monoclonal antibodies against Cry1Ab protein from *Bacillus thuringiensis* and their application in an ELISA for detection of transgenic *Bt*-maize. *Food and Agricultural Immunology*, 14, 231-240. p.
- WALSH, M.C., BUZOIANU, S.G., GARDINER, G.E., REA, M.C., GELENCSEER, É., JÁNOSI, A., EPSTEIN, M.M., ROSS, R.P., LAWLOR, P.G. (2011): Fate of transgenic DNA from orally administered *Bt MON 810* maize and effects on immune response and growth in pigs. *PLoS ONE*, 6, e27177.  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0027177>.  
Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: doi:10.1371/journal.pone.0027177. Lekérdezés időpontja: 2014. 05. 10.
- WALSH, M.C., BUZOIANU, S.G., REA, M.C., O'DONOVAN, O., GELENCSEER, É, UJHELYI, G., ROSS, R.P., GARDINER, G.E., LAWLOR, P.G. (2012): Effects of feeding *Bt MON 810* maize to pigs for 110 days on peripheral immune response and digestive fate of the *cry1Ab* gene and truncated Bt toxin. *PLoS ONE*, 7: e36141.  
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0036141>.

Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: doi:10.1371/journal.pone.0036141. Lekérdezés időpontja: 2014.05.10.

- WANG, S., GUO, A.Y., ZHENG, W.J., ZHANG, Y., QIAO, H., KENNEDY, I.R. (2007): Development of ELISA for the determination of transgenic *Bt*-cottons using antibodies against Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD-73. *Engineering in Life Sciences*, 7, 149-154. p.
- WHO (2007): *Specifications and evaluations for public health pesticides; Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* strain AM65-52, Geneva, Switzerland: World Health Organization. 38 p.
- WITTWER, L., COLBURN, D., HICKLE, L.A., SAMBANDAN, T.G. (1990): Development of a high-performance liquid chromatography assay for *Bacillus thuringiensis* var. *san diego*  $\delta$ -endotoxin. 70-77. p. In: HICKLE, L.A., FITCH, W.L. (Eds.): *Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis*, Washington DC, USA: American Chemical Society, 148 p.
- WU, Z.P., XU, B.J., CHEN, Z.Y. (2001): Separation and purification of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) toxic protein Cry1Ab from transgenic rice by ion-exchange chromatography. *Chromatographia*, 53, 571-573. p.
- XIE, X., SHU, Q. (2001): Studies on rapid quantitative analysis of *Bt* toxin by using Envirologix kits in transgenic rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 34, 465-468. p.
- XU, C., WANG, B.C., YU, Z., SUN, M. (2014): Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*, 6, 2732-2770. p. DOI: 10.3390/toxins6092732. <http://www.mdpi.com/2072-6651/6/9/2732>. Keresőprogram: Google. Kulcsszavak: Cry, Cyt, toxin, structure. Lekérdezés időpontja: 2014.11.29.
- YAMAMOTO, T. (1983): Identification of entomocidal toxins of *Bacillus thuringiensis* by high performance liquid chromatography. *Journal of General Microbiology*, 129, 2595-2603. p.
- ZHANG, X.B., CANDAS, M., GRIKO, N.B., TAUSSIG, R., BULLA, L.A. (2006a): A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 9897-9902. p.
- ZHANG, G.F. WAN, F.H., LÖVEI, G.L. LIU, W.X., GUO, J.Y. (2006b): Transmission of *Bt* toxin to the predator *Propylaea japonica* (Coleoptera: Coccinellidae) through its aphid prey feeding on transgenic *Bt* cotton. *Environmental Entomology*, 35, 143-150. p.
- ZHANG, W., ZHANG, J., CRICKMORE, N., WU, Z., YANG, Y., QIAN, J., WU, H., WANG, R., FANG, X. (2014). Identification of a mosquitocidal toxin from *Bacillus thuringiensis*

using mass spektometry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 3273-3277. p.

ZWAHLEN, C., HILBECK, A., GUGERLI, P., NENTWIG, W. (2003): Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the fields. *Molecular Ecology*, 12, 765-775. p.





## 2. MELLÉKLET: PUBLIKÁCIÓS LISTA

### Az értekezés témakörében megjelent publikációk

#### Idegen nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemények

- Székács A., Lauber É., **Takács E.**, Darvas B. (2010): Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of *MON 810* transgenic maize. *Anal. Bioanal. Chem.* 396: 2203-2211. *IF: 3,841*
- Takács E.**, Bánáti H., Fónagy A., Darvas B. (2010): Short term effect of *DAS-59122-7* maize on L1 and L2 of *Coccinella septempunctata* feeding on *Rhopalosiphum padi*. *Növénytermelés* 59 (Suppl.): 625-628.
- 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. Agr. Immunol.* 23: 99-121. *IF: 0,633*
- Fejes Á., **Takács E.**, Fekete G., Darvas B., Ferguson B.S., Saxena D., Székács A. (2012): Aquatic effect duration and degradation study of Cry4 toxin with immunoassay and *Aedes aegypti* larval biotest. *Aquatic Insects*, 34 (Suppl. 1): 211–226. *IF: 0,325*
- Takács E.**, Darvas B., Székács A. (2012): Analytical difficulties and certain biological aspects of Cry1Ab toxin determination in *MON 810* genetically modified maize. *Acta Phytopathol. Entomol. Hung.* 47: 293-306.
- Takács E.**, Fónagy A., Juracsek J., Kugler N., Székács A. (2012): Characterisation of tritrophic effects of *DAS-59122-7* maize on seven-spotted ladybird (*Coccinella septempunctata*) feeding on the bird cherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *IOBC Bull.* 73: 121-134.
- Takács E.**, Nagy A, Gelencsér É., Székács A. (2015): Internal quality control of an enzyme-linked immunoassay for Cry1Ab toxin detection applied in animal tissues. *Acta Alimentaria*, 44: 593-600. *IF: 0,3998<sup>4</sup>*

#### Magyar nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemény

- Takács E.**, Lauber É., Bánáti H., Székács A., Darvas B. (2009): *Bt*-növények a növényvédelemben. *Növényvédelem*, 45: 549-558.

#### Magyar nyelvű, nem lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemény

- Darvas B., Lauber É., **Takács E.**, Székács A. (2009): A GM-növények mérlege a növény- és környezetvédelemben I. *Környezetvédelem*, 17: (1): 24-25.

<sup>4</sup> a folyóirat elmúlt 5 éves imapkt faktorának átlagával számolva

Darvas B., Lauber É., **Takács E.**, Székács A. (2009): A GM-növények mérlege a növény- és környezetvédelemben II. *Környezetvédelem*, 17 (2): 26-27.

### **Idegen nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók**

Székács A., Fejes Á., Fekete G., **Takács E.**, Nádasy M., Darvas B., Anton A. (2010): Aquatic arthropod biotests for environmental surveys. *Abs. IX. European Congress of Entomology*, p. 93.

Székács A., **Takács E.**, Juracsek J., Lauber É., Darvas B. (2010): Determination of Cry1Ab toxin content of *MON 810* maize pollen by enzyme-immunoassay. *Abs. IX. European Congress of Entomology*, p. 200.

Székács A., Weiss G., Quist D., **Takács E.**, Darvas B., Hilbeck A. (2010): A Round Robin interlaboratory comparison of Cry1Ab toxin determination in *MON 810* maize and biological samples by enzyme-immunoassay. *Abs. IX. European Congress of Entomology*, p. 231.

**Takács E.**, Székács A., Weiss G., Quist D., Darvas B., Hilbeck A. (2011): Inter-laboratory comparison of Cry1Ab toxin quantification in *MON 810* maize by enzyme-immunoassay. *Abs. International Conference on Agri-Environmental Chemistry and Toxicology*, p. 53.

### **Magyar nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók**

Székács A., **Takács E.**, Lauber É., Juracsek J., Darvas B. (2010): A Cry1-toxin eloszlásának mérése *MON 810* kukoricában - ELISA módszerek alkalmazhatósága. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok* (Kömíves T., Haltrich A., Molnár J., szerk.), 54. old.

**Takács E.**, Bánáti H., Fónagy A., Székács A. (2010): A Herculex RW (*DAS-59122-7*) kukorica Cry3-toxinjainak hatása az azon táplálkozó zselnicemeggy-levéltetűn (*Rhopalosiphum padi*) keresztül a hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) fiatal lárváira. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok* (Kömíves T., Haltrich A., Molnár J., szerk.) 59. old.

**Takács E.**, Juracsek J., Gabriele W., David Q., Angelika H., Darvas B., Székács A. (2011): Összehasonlító vizsgálat a *MON 810*-es kukorica Cry1Ab-toxintartalmának mennyiségi meghatározására immunanalitikai módszerrel. In. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok* (Kömíves T., Haltrich A., Molnár J., szerk.), 28. old.

**Takács E.**, Murányi A., Darvas B., Ködöböcz L., Juracsek J., Székács A. (2011): A műtrágyázás hatása a *MON 810*-es kukorica Cry1Ab-toxintermelésére. *Abs. I. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 29. old.

**Takács E.**, Darvas B., Bánáti H., Lauber É., Juracsek J., Székács A. (2012): A *MON 810*-es GM-kukorica Cry1Ab-tartalmának változása a tenyésztési időszak során szabadföldi és üvegházi körülmények között. *Abs. II. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 25. old.

**Összesített hatástényező (impakt faktor): 5,20**

Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk

**Idegen nyelvű, lektorált, tudományos folyóiratban megjelent közlemények**

Darvas B., Bánáti H., **Takács E.**, Lauber É., Szécsi Á., Székács A. (2011): Relationships of *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* and *Fusarium verticillioides* on *MON 810* maize. *Insects* 2: 1-11.

Székács I., Fejes Á., Klátyik Sz., **Takács E.**, Patkó D., Pomóthy J., Mörtl M., Horváth R., Madarász E., Darvas B., Székács A. (2014): Environmental and toxicological impacts of *glyphosate* with its formulating adjuvant. *Intl. J. Agric. Biosyst. Sci. Engineer.* 8 (3): 19-24.

**Idegen nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók**

Székács I., **Takács E.**, Patkó D., Horváth R., Székács A. (2014): Holographic microscopy used in cellular toxicity assessment of agrochemicals. *Abs. In: Korean – Hungarian Workshop on Joint Research for Global Food Security: Ensuring Environmental and Food Safety* (Budapest), 24. p.

**Takács E.**, Defarge N., Séralini G.-E. and Székács A. (2014): Pesticide applications by and with genetically modified (GM) crops: misregulated pesticide issues. *Abs. In: Science in the Eye of the Storm - ENSSER Annual Conference 2014* (Berlin, Germany), 8. p.

**Takács E.**, Fejes Á., Klátyik Sz., Szántai-Kis Cs., Darvas B., Székács A. (2014): Comparative toxicity assessment of a herbicide active ingredient with its formulating adjuvants on human cell lines. *Abs. In: Korean – Hungarian Workshop on Joint Research for Global Food Security: Ensuring Environmental and Food Safety* (Budapest), 23. p.

**Magyar nyelvű konferenciakiadványban megjelent összefoglalók**

Bánáti H., **Takács E.**, Lauber É. és Darvas B. (2009): Növényi örlemények ovipozitáns hatása Cry1-rezisztens aszalványmolyon. *Abs. 8. Magyar Ökológus Kongresszus* (Körmöczi László, szerk) 18. old.

- Fónagy A., Krishnan M., Bánáti H., Lauber É., **Takács E.**, Székács A., Nyiri A., Herman G., Kugler N., Darvas B. (2010): Kukoricafajták virágzása, különös tekintettel az intraspecifikus hibridizációra (*MON 810* x egyéb fajták) [No 1.]. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok* (Kőmíves T., Haltrich A., Molnár J., szerk.), 53. old.
- Bánáti H., Darvas B., Juracsek J., Szécsi Á., Tóth Sz., Lustyik Gy., **Takács E.**, Székács A. (2011): Cry-toxint termelő kukoricák (*MON 810* és *DAS-59122*) és *Fusarium*-fajok mikotoxin-termelése. *Abs. I. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 8. old.
- Darvas B., Bánáti H., **Takács E.**, Vajda B., Neszlényi K., Székács A. (2011): Kukorica fajtahibrid-képződés – GM x nem-GM fajta [No 2]. *Abs. I. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 11. old.
- Murányi A., **Takács E.**, Bánáti H., Székács A., Darvas B. (2011): A *MON 810*-es kukorica hatása a rizoszféra talajra és együtt termesztett növényekre [N o 1]. *Abs. I. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 20. old.
- Fejes Á., **Takács E.**, Juracsek J., Klátyik Sz., Fekete G., Székács A., Darvas B. (2012): Cry-toxin tartalmú kukoricák vízben való lebomlásának vizsgálata és toxikológiai értékelése. *Abs. II. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 11. old.
- Takács E.**, Darvas B., Fejes Á., Nicolas D., Gilles-Éric S., Székács A. (2013): Többszörös kölcsönhatások növényvédőszer-hatóanyagok és formázási segédanyag között: a *glyphosate* gyomirtószer-hatóanyag, a formulálására alkalmazott polietoxilált faggyúaminok és a Cry1Ab-toxinfehérje kombinált citotoxikus hatásai. *Abs. III. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 39. old.
- Bánáti H., Füleki L., Klátyik Sz., Tóth Á., Kardos C., **Takács E.**, Szternácsik K., Magor Cs., Székács A., Darvas B. (2014): A Magyarországon 1962-2014 között fitopatogén gombák ellen alkalmazott hatóanyagok [No 2]. *Abs. IV. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 5. old.
- Berke J., Bánáti H., Baktay B., Szalkovszki O., Szabó R., **Takács E.**, Darvas B., Gyulai F. (2014): Höfelvétel-alapú vizsgálati módszerrel való elkülönítés lehetőségei *MON 810*-es *Bt*-kukorica fajtacsoport utódmagvain [No 5]. *Abs. IV. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 7. old.
- Füleki L., Klátyik Sz., Gyurcsó G., Bánáti H., Kardos C., Szternácsik K., **Takács E.**, Magor Cs., Székács A., Darvas B. (2014): A Magyarországon 1962-2013 között gyomok ellen alkalmazott hatóanyagok [No 3]. *Abs. IV. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 11. old.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt szeretném megköszönni témavezetőmnek, *Prof. Székács Andrásnak* a munkám során nyújtott szakmai irányítást, a rengeteg tanítást és biztatást, amik nélkül ez a munka nem jött volna létre.

Kiemelt köszönetem illeti *Prof. Darvas Bélát*, aki hasznos szakmai tanácsaival hozzájárult a kutatói gondolkodásmód megismeréséhez, és akinek tanácsaira munkám során gyakran támaszkodtam. Köszönettel tartozom *Dr. Szoboszlai Sándornak*, a SZIE MKK Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet Környezetvédelmi és Környezettoxikológiai Tanszék tanszékvezető-helyettesének, hogy biztosította a vizsgálatokhoz a tisztított Cry1Ab-toxint. Továbbá köszönöm *Prof. Luke Masson-nak*, a Nemzeti Kutatási Tanács, Biotechnológiai Kutatóintézet munkatársának a mérésekhez biztosított rekombináns Cry1Ab-fehérjét.

Köszönettel tartozom a Monsanto Hungária munkatársának *Dr. Czepó Mihálynak (MON 810)* és a Pioneer Magyarország képviselőjének *Máté Józsefnek (DAS-59122)*, hogy munkámhoz vetőmagot biztosítottak. A Cry34/35-toxinok méréséhez biztosított az analitikai standard oldatokért a Dow AgroSciences LLC-t (Indianapolis, IN, USA) illeti köszönet. A Cry4-toxin méréséhez a Cry4-fehérjéért a New York Egyetem Mikrobiális Ökológia Laboratórium (Laboratory of Microbial Ecology) és az Abbot Laboratórium (Abbot Laboratories) munkatársait, a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* NRRL HD-986 törzsből származó fermentált mintáért *Howard T. Dulmage-t* és a Corax-Bioneer Zrt. munkatársait illeti köszönet.

Köszönettel tartozom *Juracsekne Nádasdi Juditnak*, aki gyakorlati tapasztalatával bevezetett az ELISA eljárásokba és aki nagy segítségemre volt a kísérletes mérések kivitelezésében. Hálás vagyok *Kugler Nikolettnek*, aki a kísérletekhez szükséges tenyészetek fenntartásával segítette a munkám, illetve a kukoricalevél mintázását ábrázoló rajzával hozzájárult az eredmények publikálásához. Szeretném megköszönni *Dr. Fejes Ágnesnek* és *Bánáti Hajnalkának* szakmai támogatásukat és segítségüket a kísérletek megvalósításában. Köszönet illeti *Nádas Józsefet* és *Nyíri Gyöngyit*, akik a növények gondozásával járultak hozzá a munkámhoz, *Dr. Mörthl Máriát* és *Dr. Fónagy Adrient*, akik tanácsaikkal segítették a kísérletek megvalósulását.

Vizsgálataim az alábbi kutatási pályázatokhoz kapcsolódtak: K-36-01-00017/2002, NTE-725/2005, NTE-1029/2006, NTE-750/2008 (KvVM), GOP-1.3.1-07/1-2008-0049 (NFÜ), Stiftung Gekko – European Network of Scientists for Social and Environmental Responsibility (ENSSER), GMSAFood EU FP7 #211820, AD005 2014-2016 (FM).