



SZENT ISTVÁN EGYETEM

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

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

TARTALOMJEGYZÉK

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK.....	4
2. ANYAG ÉS MÓDSZER	7
3. EREDMÉNYEK	10
4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	14
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	16
6. HIVATKOZÁSOK	21
7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK....	23

1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, A KITŰZÖTT CÉLOK

A *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) endotoxinjait tartalmazó rovarellenes készítmények (*Bt*-inszekticidek) a biológiai növényvédő szerek egyik jelentős felhasználású csoportját képviselik, melyek 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. 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 *Bt*-növények sejtjeiben folyamatosan termelődő Cry-toxinok állandó védelmet jelentenek a célkártevőkkel szemben, és nincsenek kitéve a kedvezőtlen időjárási körülményeknek. A folyamatos 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 kukoricamolylezisztens fajtacsoportokra nem igazolható, hiszen a kártevő számottevő termés kiesést okozó népességsűrűségben történő előfordulása tízévenként egyszeri-kétszeri, így a gazdák nem védekeznek ellene (DARVAS *et al.* 2007). Ugyanezen okból a 0–5%-os terméshozam-növekedés az izogenikus kontrollhoz képest sem a fajta saját előnye, hiszen az a terméshozam a kukoricamolylezisztens függvénye (BETZ *et al.* 2000, FÜSTI 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 részekben is termelődik a Cry-toxin, ahol védekezés szempontjából nem indokolt. A *MON 810* kukoricamolylezisztens kukorica például még a gyökerében is jelentős mennyiségű Cry1Ab-toxint termel, s a növényben termelt toxinmennyiség

1–8%-a a tarlómaradványban egy év múlva is visszamérhető (SZÉKÁCS és DARVAS 2007).

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 fajtatulajdonosok, 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 hóvirágлектin génjét tartalmazó GM burgonya fogyasztásának hatására visszamaradt növekedést, immunrendszeri zavarokat és több szerv szöveti rendellenességeket tapasztaltak (EWEN és PUSZTAI 1999, PUSZTAI *et al.* 2003).

Minden növényvédelmi technológia alkalmazása során fontos, hogy a hatóanyagok kimutatására kellő érzékenységű 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* (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 kimutatására 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. ANYAG ÉS MÓDSZER

A kereskedelmi forgalomban kapható ELISA tesztsomagok kalibrációjának vizsgálata során összehasonlítottuk a mennyiségi kimutatásra alkalmas Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag (#PN 51001, Warminster, PA, USA)¹ és az EnviroLogix Cry1Ab/Ac QuantiPlate (#AP 003; Portland, ME, USA)² esetében a gyártó által javasolt lineáris 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)³ szigmoid kalibráló görbét – melyet az Abraxis Inc. cégtől vásárolt standard oldattal vettünk fel – az Abraxis és EnviroLogix ELISA eljárások hasonló paramétereivel. Az Abraxis tesztsomag esetében a szigmoid kalibráló görbét három különböző forrásból származó (Abraxis Inc.; Szent István Egyetem – Szoboszlai Sándor; Nemzeti Kutatási Tanács – Luke Masson) Cry1Ab-standard oldatból vettük fel 0 és 50 ng/ml koncentrációtartományban. A tesztsomag által biztosított standard oldatokkal felvett standard oldatokkal felvett lineáris standard görbe alacsonyabb, de sokkal szűkebb tartományban (0–4 ng/ml) teszi lehetővé az analitikai meghatározást. A szigmoid és lineáris görbék értékeit normalizáltuk, majd reprodukálhatóságukat vizsgáltuk, illetve a kimutatási határ értékét leírtuk. Agdia Bt-Cry1Ab/1Ac ELISA tesztsomag 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 tesztsomag esetében 3 független mérés átlagainak szigmoid regresszióját hasonlítottuk az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag ugyanezen forrásból származó toxinnal felvett görbéjéhez.

A 2005-ben a piacról visszavont (SZÉKÁCS *et al.* 2010) EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate 0,5, 2,5 és 5 ng/ml koncentrációjú standard

¹ <http://www.abraxiskits.com/moreinfo/PN510001USER.pdf>

² <https://www.yumpu.com/en/document/view/18625470/quantiplatetm-kit-for-cry1ab-cry1ac-envirologix>

³ <https://orders.agdia.com/Documents/m172.pdf>

oldatainak, illetve a jelenleg is forgalomban lévő EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate pozitív és negatív kontroll oldatainak belső minőségellenőrzését *Shewhart*-féle ellenőrző kártyával (*Shewhart Control Chart*) végeztük el. A Cry1Ab/Cry1Ac QualiPlate pozitív és negatív kontrolljainak egy lemezen való ismételhetségét a méréses ellenőrző kártyák közül a terjedelmekártyával elemeztük (*Control Chart of the Range of Duplicates*).

Nemzetközi együttműködés keretében vizsgáltuk különböző ELISA rendszerek alkalmazhatóságát *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-tartalmának meghatározásában. A vizsgálat célja annak számszerűsítése volt, hogy a toxintartalom meghatározásakor alkalmazott ELISA rendszerek különbözősége mennyiben magyarázza a szakirodalomban előforduló Cry1Ab-koncentrációk nagymértékű változékonyságát. Standard növényi minták Cry1Ab-tartalmát határoztuk meg ugyanazon ELISA rendszer (Bt-Cry1Ab-1Ac ELISA tesztcsomag (#PSP06200, Agdia Inc., Elkhart, IN, USA) alkalmazásával, illetve laboronként saját ELISA eljárással is. Az analitikai mérésekből származó eredményeket az ISO 5725-2 szabvány szerint értékeltük ki (ISO 1994).

Kukoricalevél-szövetben jelentkező esetleges mátrixhatásokat két független vizsgálat során határoztuk meg. Az Abraxis Inc. cégtől vásárolt Cry1Ab-toxinnal felvett szigmoid kalibráló görbét DK 440, közel izogenikus kukorica levélmátrixban felvettük, és IC_{50} -értékét a pufferben felvett görbe azonos paraméteréhez hasonlítottuk. Meghatároztuk levélszövetre a kimutatási határt is. Ugyanezen vizsgálat során alkalmazva standard addíciós módszerrel is ellenőriztük az esetleges mátrixhatást (KEBEKKUS és MITRA 1998). A Központi Környezet- és Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (KÉKI) (jelenleg: Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ (NAIK), Élelmiszer-tudományi Kutatóintézet (ÉKI), Biológiai Osztály) az Európai Unió 7. Kutatási Keretprogramján belül elnyert pályázat keretében (FP7/2007-2013) etetéses kísérlet során vizsgálta *MON 810* (PR34N44) GM kukorica és közel izogenikus vonalának (PR34N43) hatását sertésgegyedeken. Az analitikai vizsgálat eredményeiből minden vizsgált szervre kimutatási határt határoztunk meg, és értékeltük a meghatározások analitikai jóságát.

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- és Cry4B-fehérjék keveréke volt, melyet a TEKNAR folyékony készítményből izolált *B. thuringiensis* var. *israelensis* kultúrából tisztított az Abbot Laboratórium (Chicago, IL, USA). Az antitestek tormaperoxidáz enzimmel való kötődését glutáraldehydes és perjodátos módszerrel hoztuk létre (HARLOW és LANE 1988). Az optimalizált ELISA rendszert direkt, szendvics típusú *immunoassay* elve alapján építettük fel (TIJSSEN 1985). Az analitikai standard görbét VECTOBAC WDG (granulátum) és VECTOBAC 12AS (szuszpenzó) *Bti*-készítménnyel is felvettük, majd a tiszta Cry4-toxint tartalmazó szigmoid görbéhez hasonlítottuk. A készítmények esetében meghatároztuk a kimutatási határokat.

A *MON 810* GM kukorica Cry1Ab-termelésének vizsgálata során meghatároztuk a toxin eloszlását az egyes levélszinteken és adott levélszinten belül. Tanulmányoztuk továbbá az öregedés folyamatának, a nitrogén-foszfor-kálium kevert műtrágya alkalmazásának, a termesztési körülménynek és a talajtípusnak (FLORIMO általános virágföld és agyagbemosódásos barna erdőtalaj) a Cry1Ab-termelésre gyakorolt hatását.

A *DAS-59122* környezeti hatásvizsgálata a Pioneer Hi-Bred International Inc. (Ankeny, IA USA) megbízásával valósult meg. Előkísérletek keretében meghatároztuk a hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) fejlődési ütemét három különböző hőmérsékleten, zselnicemeggy-levéltetű (*Rhopalosiphum padi*) és zöldborsó-levéltetű (*Acyrtosiphon pisum*) zsákmányállatok fogyasztása esetén, illetve az egyes lárvastádiumokban elfogyasztott levéltetvek számát. Ezt követően szabadföldi körülmények között vizsgáltuk a *DAS-59122* GM kukorica hétpettyes katicabogár L1 és L2 lárvastádiumaira, illetve a nem célszervezet teljes életciklusára gyakorolt hatását, melynek során mortalitást, fejlődési időt, imágósúlyt, termékenységet és tojásrakási paramétereket hasonlítottunk a kontroll kezelések értékeihez.

3. EREDMÉNYEK

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 tesztsomagok által biztosított standard oldatokkal felvett kalibrációs egyenes az ELISA rendszerekre jellemző szigmoid standard görbék alsó görbületi szakaszára esnek, 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 IC₅₀-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 alsó görbület szakaszára eső lineáris kalibrációval történő meghatározás bizonytalanságát. A 0,5 ng/ml koncentrációjú standard oldat esetében meghatározott számított koncentráció $0,572 \pm 0,106$ 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 optikai sűrűség (OD) szintjén, a számított koncentrációk esetében -1327,0%–595,4% volt. A *Shewhart*-féle minőségellenőrző kártyán három pont esett a figyelmeztetési határokon kívül, melyek közül egy a szabályozási határos is kívül volt. Ez azt jelenti, hogy az alacsony meghatározási tartományban – a pozitív kontroll számított 1,45 ng/ml koncentráció értéke fölötti tartománnyal ellentétben – 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 tesztsomagok alkalmazhatóságának vizsgálata során növényi (kukorica) és állati (sertés) szövetekben fellépő esetleges mátrixhatásokat határoztuk meg. Kukorica-levélszövetben Cry1Ab-meghatározás 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-koncentráció meghatározásának szempontjából, mely élelmiszer-biztonsági szempontból problémaként jelentkezik.

A PhD-munkám során a szúnyoglárváaállomány-gyérítésben alkalmazott Cry4-toxin kimutatásra alkalmas ELISA rendszert fejlesztettünk. A direkt szendvics típusú eljárás esetében az immunkomplex egyik eleme 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 szúnyoglárváaállomány-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 vizsgálatakor meghatároztuk a különböző levélszintek közötti, illetve egy adott levélen belüli toxineloszlást. A DK-440 BTY kukoricafajtában a levélszintek toxintartalma

4821 és 10054 ng/g koncentrációtartományban változott, melyek közül a legalsó látható levél toxintartalma (4821 ± 1042 ng/g) tért el szignifikáns módon a többi szinten mért eredményektől. Adott levélen belül a levéllemez középső részén mértük a legmagasabb koncentrációt (8924 ± 1507 ng/g), mely érték szignifikánsan csökkent a levélcsúcs (4579 ± 1864 ng/g) és levélnyél (1892 ± 223 ng/g) irányába. A levéllemez közepén a legmagasabb érték a levélérnél (9885 ± 877 ng/g), míg a legalacsonyabb a levél szélén (8194 ± 480 ng/g) volt mérhető. A Cry1Ab-koncentrációt 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-tartalomra 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 emelkedett toxinkoncentrációt a *MON 810* kukorica levélszövetében, azonban a növények biomasszája mind a módosított, mind a közel izogenikus vonal esetében közel másfélszeresére emelkedett, így az egy hektáron megtermelt Cry1Ab-mennyiség is magasabb 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 lárvális fejlődésének 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 $9,17\pm 0,41$ nap, *R. padi* fogyasztásakor $11,00\pm 0,63$ 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 szempontjából *R. padi* esetében hasznosultak.

A *DAS-59122* 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 nőtények esetében a legalacsonyabb átlagos testtömeget a *DAS-59122* és PR36V52 hibrid esetében mértünk ($45,28 \pm 6,18$ mg és $47,07 \pm 6,34$ mg), míg a legmagasabb értékeket a közel izogenikus kontroll (PR36D79, $52,61 \pm 3,70$ mg) és a PR37N01 hibrid ($51,90 \pm 4,38$ mg) esetében. A hím egyedeknél a legalacsonyabb testtömegeket szintén a *DAS-59122* esetében ($36,74 \pm 5,42$ 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. A szaporodási paraméterek (termékenység és tojásrakási képesség) vizsgálata során az egy tojáscsomóban lerakott tojások száma 5 és 80 között változott, a tojáscsomók átlagos mérete *DAS-59122* esetén 25 tojás volt, a közel izogenikus kukoricán 33, a további 3 hibrid kukoricán 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.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Tézis: A kereskedelmi forgalomban kapható Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA tesztsomag 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 sajátjaiból 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. Vizsgáltuk 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 tapasztaltunk 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 életciklus 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 nem tapasztaltam szignifikáns különbségeket.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A szendvics típusú ELISA módszerrel történő koncentráció-meghatározás a legjobban reprodukálható, a legmegbízhatóbb és a legpontosabb a rendszerre 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-ellenőrzést. 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 tesztsomagok negatív kontrollja sem bizonyult megfelelő referenciapontnak. Ez problémaként jelentkezhet környezet- és élelmiszerbiztonsági 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 levélszövet vizsgálatakor 1:10 hígítás mellett.

A nemzetközi körvizsgálat eredményei a standardizált ELISA protokollok alkalmazásának fontosságát hangsúlyozzák, melynek révén a különböző laboratóriumok által végzett környezetanalitikai vizsgálatok összehasonlíthatóak. Az eredmények azt is mutatják, hogy még egy standardizált eljárás esetében is adódhatnak szignifikáns eltérések a Cry1Ab-toxinkoncentráció meghatározása során, azonban az adatok variációjára lényegesen alacsonyabb, mint egymástól eltérő módszerek alkalmazása során. A jelen vizsgálatban tapasztalt, szignifikáns eltéréseket okozó, 15,5–31,6%-os relatív tapasztalati szórások alacsonyabbak, mint más hasonló szisztematikus körmérés esetében (NGUYEN *et al.* 2008). Hasonló mértékű variabilitás áll fenn a Cry1Ab-koncentrációkban a *MON 810* kukorica esetében a növény egyedek 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. A tapasztalt relatív hibák tovább csökkenthetők, amennyiben a 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 emberi hibák, illetve a dörzsmozsár használatával elért egyenetlen mintaelőkészítés is kiküszöbölhető. 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 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, különböző talajtípusokon, eltérő termesztési körülmények között 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 nem mindig lehetséges. Számos tényező, például a talaj típusa vagy a klimatikus viszonyok adott esetben nem kiküszöbölhető eltérések, azonban egy 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 termesztésének 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 szúnyoglárvatesztek segítségével követhető nyomon (FEJES 2015).

A DAS-59122 GM kukorica hatását hétpettyes katicabogár (*Coccinella septempunctata*) L1, L2 lárvastádiumaiban, illetve a teljes életciklusban vizsgáltuk tritrófikus rendszerben. A fitofág szervezet a vizsgálati rendszerünkben a zselnicemeggy-levéltetű (*Rhopalosiphum padi*) volt. Mivel a *Bt*-inszekticidok a célszervezet fiatal lárváin fejtik 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 életsiklus 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. A reprodukciós paramétereket 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 – azt feltételezi, hogy egy biotechnológiai eljárás nem hozhat létre olyan változást a genomban, ami alapvetően megváltoztatja a fajta tulajdonságait. A GM és közel izogenikus vonalokon 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 biztosságosak bizonyult”, egyéb fajták bevonását 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 2012). A *DAS-59122* GM kukorica, hétpettyes katicabogár teljes életsiklusára gyakorolt hatásának vizsgálata során a hím imágók esetében egyértelműen alacsonyabb testtömeget határoztunk meg, mely különbség még a négy negatív kontroll mellett is szignifikánsnak bizonyult. A vizsgálat eredményei a hétpettyes katicabogárra vonatkozik,

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.

6. HIVATKOZÁSOK

- 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., SEPRŐS, I., SZÁNTÓ, J. (1979): Környezetkímélő növényvédelmi eljárások rovarok és atkák ellen. I. Biológiai védekezés: entomopatogén baktériumok, entomofág állatok. Agroinform Kiadó, Budapest. 53 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.
- 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.
- 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.
- FEJES Á. (2015): Perzisztens növényvédő szerek hatástartam- és lebomlásvizsgálatai. *PhD Disszertáció*. Pannon Egyetem Georgikon Kar, Állat- és Agrárkörnyezettudományi Doktori Iskola. 1-124. 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.
- HARLOW E., LANE D. (1988): *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Springs Harbor Laboratory, 344-348. 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.
- 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>.
- KEBEKKUS, B.B., MITRA, S. (1998): *Environmental chemical analysis*, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 344 p.
- NGUYEN, H.T., HUNFELD, H., MEISSELE, 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.
- 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.
- 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. (2012): Álláspontok a *GMO* környezeti kockázatelemzésében alkalmazott statisztikai módszerekről. *II. Ökotoxikológiai Konferencia*, p. 24.
- SZÉKÁCS A., LAUBER, É., JURACSEK, J., DARVAS, B. (2010): Cry1Ab production of *MON 810* transgenic maize. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 182-190. 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.

7. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉHEZ KAPCSOLÓDÓ PUBLIKÁCIÓK

1. Folyóiratcikkek

a) Szakcikk hatástényezővel (IF) rendelkező folyóiratokban

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

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., 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.in press. *IF*: 0,40⁴

b) Szakcikk hatástényezővel (IF) nem rendelkező (lektorált) folyóiratokban

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

c) Egyéb szakmai (nem lektorált) folyóiratcikkek

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

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

2. Konferenciakiadványok

a) Magyar nyelvű (teljes)

⁴ a folyóirat elmúlt 5 éves impakt faktorának átlagával számolva

Székács A., Darvas B., Lauber É. és **Takács E.** (2008): Géntechnológiai úton módosított haszonnövények környezetvédelmi aspektusai. In: Tudomány és innováció a jövő szolgálatában. Budapesti Műszaki Főiskola, Budapest, pp. 23-27.

Takács E., Fejes Á., Fekete G., Darvas B. és Székács A. (2010): Cry4 toxin vízi hatástartam- és lebomlásvizsgálata immunoassay és *Aedes aegypti* lárvateszt segítségével. *Acta Biol. Debr. Oecol. Hung.* 21: 223-232.

b) *Magyar nyelvű (absztrakt)*

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 tenyészedőszak során szabadföldi és üvegházi körülmények között. *Abs. II. Magyar Ökotoxikológiai Konferencia* (Darvas B., szerk) 25. old.

c) *Idegen nyelvű (teljes)*

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.

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.

d) *Idegen nyelvű (absztrakt)*

- 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.

Összesített impakt faktor: 5,20