



SZENT ISTVÁN EGYETEM
BIOLÓGIATUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**TREBON NÖVÉNYVÉDŐ SZEREK TRANSZ-
ÉS MULTIGENERÁCIÓS HATÁSAI
FOLSOMIA CANDIDA WILLEM 1902
UGRÓVILLÁSRA (COLLEMBOLA)**

Szabó Borbála

Gödöllő
2019

A doktori iskola

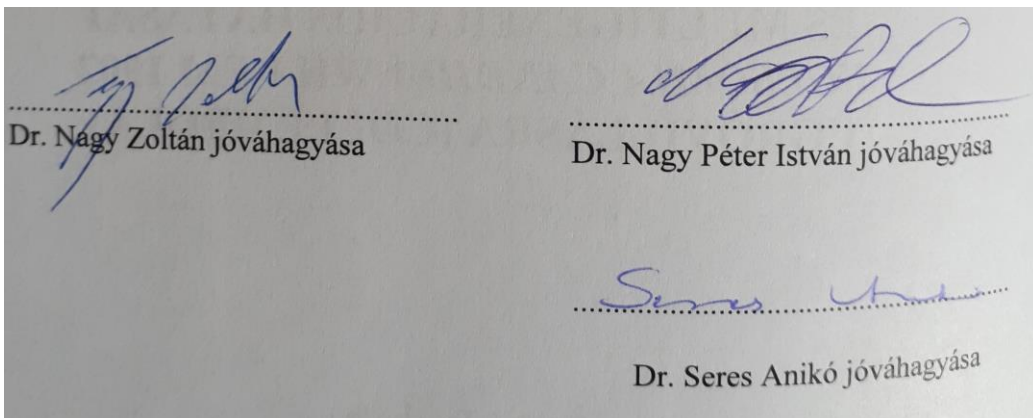
Megnevezése: SZIE Biológiateudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia tudományok

Vezetője: Dr. Nagy Zoltán
egyetemi tanár, DSc
Növénytani és Ökofiziológiai Intézet

Témavezető: Dr. Nagy Péter István
egyetemi docens, PhD
Állattudományi Alapok Intézet
Állattani és Állatökológiai Tanszék

Témavezető: Dr. Seres Anikó
egyetemi adjunktus, PhD
Állattudományi Alapok Intézet
Állattani és Állatökológiai Tanszék



1. Bevezetés:

A növényvédő szerek széleskörű elterjedése maga után vonta olyan nem kívánt mellékhatások létrejöttét is, melyet a korai ellenőrzési technikákkal még nem tudtak kimutatni. Éppen ezért szükségessé vált a nem-célszervezetekkel való kísérletek végzése, mely tevékenység azóta az engedélyezési eljárás kötelező eleme lett Európában. Minden növényvédő szernek át kell esnie kötelezően giliszta, vízibolha, hal, madár és patkány teszteken. Ezek a vizsgálatok legtöbbször akut tesztek, míg krónikus tesztek csak a gerincesekre kötelező elvégezni. A standard akut vizsgálatok azonban nem alkalmasak a hosszútávú hatások kimutatására. A szubletális tesztekben a mortalitáson kívül a finomabb reprodukciós, illetve életmenet paramétereit is megméri, amik már jobban extrapolálhatóak hosszabb távra is. Ilyenek például az ivarérés, a szívritmus, a növekedés vagy a peteméret. A több generációra kiterjedő, illetve transzkripciós vizsgálatok a kutatási munkákban egyre elterjedtebbek, melyek sorra fedik fel a generációkkal később jelentkező hatásokat, kihalásokat, rezisztenciát, stb. Szükséges lenne tehát a több-generációs kutatások bevezetése a kockázatbecslésbe is.

A piretroidokat elsőként a krizantémfélék virágporából készítették és használták rovarölő szerként. Hatásmechanismusukat tekintve az idegsejtek nátrium, kálium, kalcium és klór ionsatornáit támadhatják, erős hiperaktivitást okozva, majd az állandósult idegkiszülések végül görcsökhöz vezetnek. Rendszerint ebben pusztulnak el az állatok, de akár fel is épülhetnek ezekből a görcsökből. A Trebon növényvédő szerek, így a Trebon 10 F és Trebon 30 EC egy piretroid hatóanyagú rovarölő szer család tagjai, hatóanyaguk az etofenprox. Gyakori kártevőirtó szerek, használhatók sokféle termesztett növényi kultúrában, számos ízeltlábú faj ellen. Az etofenprox hatásai igen kevésbé ismertek nem célszervezetekre, mint amilyenek például az ugróvillások.

Az ugróvillások világszerte elterjedtek, az óceánok és a tengerek nyílt vizein kívül mindenütt előfordulnak. Jelentős tagjai a lebontó közösségeknek, továbbá fontos táplálékai a talajlakó ragadozóknak, terjesztik a mikorrhiza gombákat, illetve szabályozzák azok növekedését. Hozzájárulásuk a dekompozícióhoz és a mineralizációhoz igen jelentős. Meghatározó szerepük van a talajok táplálékhálózataiban. Emiatt bármilyen mezőgazdasági kezelés, mint például a peszticid kijuttatás, komoly következményekkel járhat rajtuk keresztül is az agroökoszisztémák működésére.

Az ugróvillások gyakran használt tesztállatok, standard és nem standard tesztekben egyaránt. Utóbbiakban vizsgálják az állatok mortalitását és reprodukciós paramétereit (peteméret, peteszám, petealak) ivarérését és petecsomóit, valamint viselkedését a különböző xenobiotikumok hatására.

Ezen tesztek a dózis-hatás görbéket, illetve azok nevezetes pontjait (EC10, EC50, LOEC, NOEC) veszik alapul a toxicitás meghatározásához. Az ökotoxikológiában egyre gyakrabban elemzett szubletális hatások tekintetében az ugróvillásoknál általában a növekedést és a reprodukciós sikert vizsgálják. A generációkon átívelő hatás jelentős tényező, hiszen ha több generáció fitnessét is rontjuk a szülőket ért szubletális hatásokkal, akkor az egyszeri szennyezésnél súlyosabb károkat okozhatunk a populációkban.

Az ugróvillások közül a leggyakrabban használt faj az ökotoxikológiai tesztekben a *Folsomia candida*, mert szemben a többi ugróvillás fajjal, mint például a *Folsomia fimetaria* vagy az *Orchesella cincta*, szűznemzéssel szaporodik és könnyen tartható laboratóriumban. Ennek köszönhetően a generációkon átívelő ökotoxikológiai hatások vizsgálatára kiválóan alkalmas.

Az epigenetikai variancia különösen fontos az aszexuális vagy kis mozgásképességű szervezetek esetén, mivel a természetes varianciát generáló mechanizmusok a partenogenezis vagy a magas beltenyésztettség miatt nem működnek. Azonban az epigenetikai mechanizmusok részlegesen átvehetik a genetikai varianciát generáló szerepet. Mivel a *F. candida* partenogenetikus szaporodású és kis mozgásképességű faj, ezért esetében fontos lehet figyelembe venni az epigenetikus mintázatokat az ökotoxikológiai vizsgálatokban.

1.1 Célkitűzések:

- dózis-hatás kísérlet segítségével kvantifikálni a Trebon 10 F és Trebon 30 EC növényvédő szer hatásait a *F. candida* mortalitására és utódszámára;
- a Trebon 30 EC növényvédő szernek a *F. candida* faj peteszámára és peteméretére gyakorolt hatásait vizsgálni a stressz és szaporodási gének expressziójával összekötve, három generáción keresztül;
- a Trebon 30 EC növényvédő szernek a *F. candida* viselkedésére gyakorolt egyes hatásait mérni egy akut testben;
- a Trebon 10 F és a Trebon 30 EC növényvédő szer *F. candida* faj életmenet tulajdonságaira és viselkedésére gyakorolt hatásainak vizsgálata több generáción keresztül. Azok transz- és multigenerációs mintázatainak kimutatása.

2. Anyag és módszer

2.1 Pete-paraméterek mérése

A kísérletek során a peték térfogatának és pete alakját minden kísérlet esetén azonos módon mértem le és számítottam ki. A gipszen lévő petéket egy nedves ecsettel finoman szétterítettem, majd sztereomikroszkóp alá tettem és mikroszkópra csatlakoztatható kamerával lefényképeztem. A méréseket ImageJ nevű szoftverrel végeztem. A pete legnagyobb és legkisebb, egymásra merőleges átmérőjét mértem meg.

A peteátmérőkből kiszámoltam a peték térfogatát prolét szferoid (orsószferoid) képlettel ($V = 4/3 \pi \times a \times b^2$, amiben „a” a hosszabb átmérő, „b” pedig a rövidebb átmérő. A statisztikai modellekben mindig a térfogat köbgyökét használtam, hogy az adatok normális eloszlást kövessenek. Ahol a peteátmérők arányát használtam, ott a hosszabb átmérőt osztottam a rövidebb átmérővel, így az arány mindig 0 és 1 közötti szám volt.

2.2 Trebon 10 F inszekticid reprodukciós és táplálékválasztási kísérlet

A dózis-hatás kísérlet eredményei alapján és a gyümölcsösöknél és a fáknál használatos ajánlott koncentrációt figyelembe véve a 0,882 ml Trebon 10 F/L koncentrációt választottam további munkára. Az előbb említett átlagos koncentrációval, a tizedével és a tízszeresével egy szülő-utódgenerációra kiterjedő reprodukciós és táplálékválasztási kísérletsorozatot végeztem.

A reprodukciós és táplálékválasztási tesztben faktoriális kísérleti elrendezést alkalmaztam. Minden kezelésben három végpontot mértem. Végeztem egy táplálékválasztási tesztet, peteszámlálást és petemérést is.

A reprodukciós tesztben mind a három koncentráció esetében 90 darab, 10-12 napos állatot raktam Trebon 10 F inszekticiddel kevert, 24,5 g standard OECD talajra. Itt 20 napig tartottam az állatokat. Egy kontroll, szernélküli csoportot is tartottam vízzel kevert mesterséges talajon. Húsz nap után a talajt óvatosan kiborítottam egy nagy Petri csészére és a rögöket óvatosan szétválasztva kerestem meg az állatokat. Véletlenszerűen kiválasztottam 30 egyedet minden koncentrációból. Kiraktam őket aktív szenes, gipszes Petri csészékbe. Egy Petri csészébe egy állat került, mindegyik Petri csésze egyedi azonosítót kapott. Az átrakással indukáltam a peterakást. Az állatokat instant élesztővel tápláltam. A 9. napon a Petri csészékben lévő petéket szétterítettem majd sztereomikroszkóp alá tettem (Olympus SZH10) és mikroszkópra csatlakoztatható Olympus C7070 widezoom fényképezőgéppel és Olympus C5060 ADL optikával lefényképeztem és lemértem a peték átmérőjét.

A kezelt szülőgenerációból 25 egyedet válogattam a táplálékválasztási teszthez, illetve a kikelő utódok közül is válogattam 25 egyedet, ugyancsak a táplálékválasztási teszthez. A táplálékválasztási tesztet mini Petri csészékben végeztem, amelyek átmérője 4 cm és magassága 1 cm volt. A Petri csészébe

egy réteg nedves szűrőpapírt helyeztem a páratartalom fenntartására, illetve egy, a táplálékok helyét kijelölő nedves papírt. Táplálékkul Zamora kukoricafajta levéldarálékát és a tenyészetekben szokásos táplálékukat, az instant élesztőt kapták az ugróvillások. A kétféle táplálékot a kísérlet elején a szűrőpapír két célkeresztjére helyeztem el, és a kísérlet kezdetén az állatot a Petri csésze közepére tettem be, hogy egyenlő eséllyel juthasson el mindkét táplálék típushoz. Egy Petri csészében egy állat volt egy hétig, majd a jelölő körökön belül lévő ürülékeket megszámláltam tápláléktípusonként.

Az első utód-generációból (F1), minden kezelésből véletlenszerűen kiválogattam 30-30 egyedet és a három koncentrációban Trebon 10 F inszekticiddel kezelt mesterséges talajon tartottam őket 20 napig, a korábban leírt módon (M0,1, M1; M10) Ezzel párhuzamosan minden kezelésből kiválogattam olyan állatokat, amelyeket Petri csészén, azaz Trebon 10 F kezelés nélkül tartottam (T0,1, T1, T10). A 20 nap eltelte után kiválasztottam, koncentrációnként 30 állatot peterakásra a kezelt csoportból, illetve a kezeletlen utódok közül is választottam koncentrációnként 30 példányt petezéshez. Ehhez a kísérlethez tartottam egy kontroll csoportot mesterséges talajon, amely talajt nem kezeltem Trebon 10 F inszekticiddel. Emellett Petri csészében is volt egy 30 egyedből álló nem kezelt, kontroll csoport, a talaj hatásának kiszűrésére.

2.3 Trebon 30 EC inszekticid több generációs transzkripció vizsgálat

A következő koncentrációkat használtam a kísérletben 107, 179, 299 és 500 mg etofenprox hatóanyag/ kg száraz LUFA talaj és egy kontroll csoport, amit ionmentesített vízzel nedvesítettem. A koncentrációkat a Trebon 30 EC inszekticiddel végzett dózis-hatás teszt alapján állítottuk be, úgy hogy az 50% effektív koncentrációnál (EC₅₀) hígabb és töményebb koncentrációt is alkalmazzunk. A talajt használat előtt 12 órával kevertem be a Trebon 30 EC inszekticid oldatokkal. Használat előtt a talajok víztartalmát korrigáltam. 30 g nedves talaj került egy üvegcsébe (5 ml oldat és 25 g száraz talaj). A kontroll csoportban tíz ismétlés volt, míg öt ismétlés volt a kezelt csoportokban.

Az első generációban (P) egy kontroll csoportot és négy koncentrációval kezelt csoportot állítottam be. Az állatok 10-12 naposak voltak minden generáció megkezdésekor. A második generációban (F1) egy kontroll (K), egy multigenerációs (MF1) és egy transzgenerációs (TF1) csoportot állítottam be. A multigenerációs csoportban az ugróvillások kezelt talajba kerülnek. A transzgenerációs csoportban az ugróvillások tiszta talajba kerülnek. A juvenil állatokat a szülői (P) generációból úgy nyertem ki, hogy elárasztottuk a talajt, majd egy szitával lemertem az állatokat a vízfelszínről. Az így kinyert állatok random kerültek vagy a multigenerációs (kezelt talaj) vagy a transzgenerációs (tiszta talaj) csoportba. A harmadik generációban (F2) fenntartottam a kontrollt és beállítottam a TF1 kezelés juvenil egyedeiből egy

transzgenerációs csoportot (TF2). Az F1 multigenerációs juvenilis állatokat további két csoportra osztottam. Egy továbbra is multigenerációs csoportra (kezelt talaj, MF2) és egy multitranszgenerációs csoportra (tisztá talaj, MTF2).

Az ökotoxikológia részben a P generáció 28 napig volt a talajban, majd az adult és a juvenil állatokat megszámláltam. Öt adult állatot egy gipszes műanyag edénybe tettem öt napra, így indukálva a peterakását. Öt nap után az adult állatokat eltávolítottam és a szétterített petecsomókról digitális fotót készítettem és megszámláltam a petéket. Véletlenszerűen kiválasztottam egyedenként tíz petét, a legrövidebb és a leghosszabb átmérőket mértem le a petetérfogat kiszámolásához. A körülbelül 10-12 napos juvenileket egy szitával távolítottam el a víz felszínéről és átraktam őket a következő generáció talajába vagy a génexpressziós rész korosító talajába. Ezek után az F1 és F2 generációban a LUFA talajban töltött időt 35 napra növeltem, annak érdekében, hogy elég 10-12 napos juvenilt találjak. Az ökotoxikológia rész F1 és F2 generációjában az összes kezelési csoportban a fent leírtak szerint jártam el.

A génexpressziós kísérlet P generációjában az állatokat 22 napos korukban ugyanabból a szinkron tenyészetből vettem ki, mint az ökotoxikológiai kísérletben. Az állatokat két napos kezelésnek tettem ki LUFA 2.2 talajban, a fent leírt koncentrációkkal. Harminc gramm nedves talaj volt minden üvegben, 50 állat a génexpressziós vizsgálathoz és 5 a reprodukciós gének szaporodással való összefüggésének ellenőrzésére. Két nap leteltével öt állatot kiraktam gipszes dobozba, hogy petét rakhassanak. Öt napot töltöttek a gipszes dobozban, aztán az adult állatokat eltávolítottam és a szétterített petecsomókról digitális fotót készítettem. A pete-paraméterek mérését a korábban leírtak szerint végeztem. A maradék állatot (50 db) folyékony nitrogénben ultragyorsan fagyasztottam és -80 °C-on tároltam őket. Az F1 generációs juvenileket az ökotoxikológiai kísérlet P generációjától nyertük a 28. nap végén. Az F1 generációs juvenilek tiszta talajba kerültek 13 napra, hogy elérjék a génexpressziós vizsgálathoz szükséges kort (21-23 nap). Ez után ugyanolyan koncentrációjú kezelést kapák, mint az ökotoxikológiai kísérlet F1 generáció (multigeneráció és transzgeneráció) tagjai. A minta itt és a következő generáció esetében egyaránt 50 állatból állt. A kezelés végeztével az állatokat ultragyors-fagyasztottam és -80°C-on tároltam. Az F2 generációs juvenileket az ökotoxikológiai kísérlet F1 generáció üvegcséiből nyertem a 35. nap végén. Ezt követően 13 napig tiszta talajban tartottam az állatokat, majd ugyanazt a kezelést kapták, mint az F2 ökotoxikológiai kísérlet állatok (transz-, multi-, multitranszgeneráció). Két nap után ultragyors-fagyasztottam és -80°C-on tároltam őket.

Egy biológiai minta 50 ultragyors-fagyasztott állatból állt, melyből a teljes RNS mennyiséget kivontam. Az RNS kivonáshoz az SV Total RNA Isolation System nevű kisset (Promega Corporation, Madison, WI, USA)

használtam a használati útmutatónak megfelelően. Annyi eltérés volt, hogy a DNáz inkubációs mixet 15 perc helyett 30 percre hagytam a membránon a még tökéletesebb tisztítás érdekében. Ezután az RNS koncentrációt NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Wilmington, DE, USA) mértem meg, majd a mintákat -80°C-on tároltam. Két háztartási gént használtam referencia géneként: tirozin-3-monooxygenáz és szukcinát-dehidrogenáz. További öt általános stresszgén expresszióját mértem meg: ABC-transzporter (ABC), izopenicilin-N-szintetáz (IPNS), két citokróm P450 monooxygenáz típust (CYP6N3v2, CYP6N4v1) és a hő sokkfehérje 70-t (HSP70). Továbbá három szaporodással kapcsolt gént is vizsgáltam: vitellogenin fehérje (vit1), vitellogenin-szerű fehérje (vit2), vitellogenin receptor (vitrec). A vitellogenin és a vitellogenin-szerű fehérje is fontos alkotóeleme a petéknek. A vitellogenin-receptor nem csak a vitellogenin petébe jutásáért felel, hanem szerepe van az ováriumokérésében is. A génexpressziók mértékének megállapításához először a qPCR mixet elkészítettem és 96-lyukú qPCR lemez lyukaiba mértem, ezen kívül 2 µl mintát is a lyukakba mértem. Biorad CFX q-PCR gépet használtam a mérésre.

2.4 Trebon 30 EC inszekticid több generációs életmenet vizsgálat

A kísérletben 9 cm átmérőjű műanyag Petri csészét használtam. A korábbi kísérletektől eltérően a gipszhez nem aktívszenet, hanem grafitot adtam (8:1 gipsz:20µm grafitpor Sigma-Aldrich® tömegarány). Mivel a grafit egy kémiaiilag inert anyag, nem tudja megkötni a Trebon 30 EC inszekticidet a kezelés után. A következő koncentrációjú oldatokat alkalmaztam a Petri csészék kezdeti szaturálására: 0,766; 1,303; 2,215; 3,765; 6,4 ml Trebon 30 EC/L víz, és egy vizes kontroll. A szülő generációban kezelésként 15-15 állatot tartottam egyedileg. Az állatokat a Petri-csészék egyedi azonosítójával különböztettem meg. Az állatok által rakott petecsomókat áthelyeztem egy új tiszta Petri-csészére, ahol a petéket lefényképeztem számolás és méret felvétel céljából. A fényképek elkészítése és a peteparméterek lemérése (csomószám, első petecsomó mérete, első peterakás időpontja, peteszám, peteméret, peteátmérők aránya) a korábban leírtak szerint történt. Ezen túl a peték lerakásához képest tíz nap múlva újabb fotót készítettem a petecsomókról, így ellenőrizni tudtam a kelési sikertelenséget (megmaradt peték/ lerakott peték száma). Ezzel matematikai értelemben, ha a kelési siker arányszáma nő, akkor nagyobb a ki nem kelt peték száma, tehát kevésbé sikeres a kelés. Amennyiben a kelési siker arányszáma csökken, akkor kevesebb pete maradt meg, tehát nőtt a kelési siker. Az állatok élelemfogyasztását úgy mértem, hogy az ad libitum adott táplálékot az élesztőt, egy a táplálékválasztási tesztben használt körre mértem ki, melyen a kísérleti ideje alatt elfogyasztott táplálékot az ürülékek száma jelezte. Mivel a három hét alatt az ürülék túlságosan begombásodott volna, emiatt az első két hét után egy friss szűrőpapírt helyeztem be és a két

szűrőpapíron talált ürülékek számának az összegét használtam a számításokhoz.

Az állatokat hetente kétszer sztereomikroszkóppal vizsgáltam és mikroszkópra csatlakoztatható fényképezőgéppel lefényképeztem. A fej csápok közötti részétől (homlok) az utolsó potroh szelvény végéig mértem meg minden állat hosszát. Két egymást követő fényképet készítettem, hogy az esetleges mozgások, nézetbeli különbségek miatti pontatlanságot csökkentsem. A két mérés átlagát tekintettem az állat hosszának. Az adatokat ImageJ programmal elemeztem. A méréseket 21 napig végeztem, hetente kétszer, tehát a kísérlet végén az állatok 32-34 naposak voltak.

A fenti paramétereken kívül minden generációban elvégeztem a 21. napon az adult egyedekkel egy viselkedés tesztet a rövid viselkedési teszt protokollja szerint. Az állatokat friss tiszta Petri-csészébe helyeztem át és két perces videót készítettem róluk, mely alapján meghatároztam az állással töltött időt, a megtett utat és a sebességet. Ezen túl a növekedés és szaporodás közötti csereviszonyt is teszteltem egy csereviszony (trade-off) hányadossal, amikor az abszolút növekedést elosztottam a teljes szaporodási befektetéssel. A csereviszony fogalma alatt a következőt értem a disszertációban: amikor azt írom, hogy többet fektetnek az állatok valamibe, ott az energia utak (energy flows) megváltozására utalok és arra, hogy az adott paraméterbe több energiát fektetnek be az állatok.

Ez után a már 10-12 napos utódokat kettéosztottam egy kezeletlen Petri-csészére egyedileg kirakott (transzgenerációs) és egy kezelt Petri-csészére kirakott (multigenerációs) csoportra, az F1 generáción belül. Az állatokat ugyanúgy tartottam, mint a szülőgenerációt, és a méréseket is azonos módon végeztem el. Az F2 és F3 generációban a multigenerációs csoport utódait megtartottam a növényvédő szerrel kezelt Petri-csészéken, illetve a transzgenerációs csoport utódai továbbra sem kaptak kezelést. Így a multigenerációs csoportban a kezelés hatásának esetleges akkumulálódását, illetve a transzgenerációs csoportban a kezelés hatásának fokozatos elmúlását vagy generációkon keresztüli átívelését figyelhettem meg.

3. Eredmények

3.1 Trebon 10 F reprodukciós és táplálékválasztási kísérlet

A szülőgenerációban (P) a peteszámra nem volt hatása a koncentrációnak. A petetérfogatra a Trebon 10 F koncentráció növekedése szignifikánsan negatív hatással volt. A peteátmérők arányára a Trebon 10 F hatása szignifikáns volt, csökkent az arány a koncentráció növekedésével. Az F1 transzgenerációs csoportban a peteszámra nem volt szignifikáns hatása a Trebon 10 F-nek. A petetérfogatra a Trebon 10 F koncentrációnak szignifikáns pozitív hatása volt. Ez trendszerű növekedés, a kontrolltól nem tértek el szignifikánsan a kezelt csoportok adatai. Az F1 multigenerációs vonalon a Trebon 10 F koncentrációjának nem volt hatása a peteszámra. Ugyanakkor a petetérfogatra szignifikánsan pozitívan hatott a Trebon 10 F koncentráció.

A táplálékválasztási tesztek elemzéséből nyert 95%-os konfidencia intervallumokból kiderül, hogy a két táplálékforrás körül talált ürülékszámok különbségeinek átlaga a koncentráció növekedése szerint tolódik el a pozitív tartományba, vagyis az élesztő preferencia irányába. Ha az egyforma koncentrációkkal kezelt csoportokat összehasonlítva nézzük az egyes generációk konfidencia intervallumait, akkor kiderül, hogy a kontroll kezelés preferenciája változékony. A szántóföldi koncentrációnál hígabb koncentrációval kezelt csoportok (P0,1, T0,1, M0,1, TT0,1) preferencia értékei a 0 körül ingadoznak, vagyis e csoportok egyedei nem válogatnak. A szántóföldi koncentráció (P1, T1, M1, TT1) intervallumai már inkább a pozitív tartományba esnek, vagyis az élesztőt preferálták. Az első generáció kezelt csoportjainak (M1) intervalluma már egyértelműen a pozitív tartományba tartozik. A tízszeres töménységű koncentrációval kezelt (P10, T10, M10, TT10) közül a P10 és T10 kezelés állatai az élesztőt preferálták. A M10 és T10 kezelések esetén nem volt kimutatható preferencia. A szülőgeneráció (P) értékeihez képest az elsőgenerációs utódok (F1) intervalluma jobbra tolódott. A második generációban egyetlen kezeletlen csoport sem válogatott a táplálékforrások között.

3.2 Trebon 30 EC több generációs transzkripció vizsgálat

Szignifikáns dózis-hatást választ találtam a túlélésre a P, F1M, F2M és F2MT kezeléseknél. A mortalitás az F2M kezelésben volt a legerőteljesebb, ahol az inszekticid már 179 mg/kg koncentrációban szignifikáns mortalitást okozott. A juvenilis szám alacsonyabb volt a P generációban, mint a kísérlet többi részében, mivel rövidebb idő állt rendelkezésre, mint a kísérlet többi részében. Szignifikáns dózis-hatást választ találtunk a juvenilis számra P, F1M, F1T és F2M kezeléseknél. A legerőteljesebb hatást a P generációban mutattuk ki, ahol már a legalacsonyabb, 107 mg/kg koncentráció is

szignifikáns, átlagosan 79%-os mértékű csökkenést okozott a juvenilis számban.

A P generációban az ABC expresszió nőtt az emelkedő koncentrációval, a LOEC 500 mg/kg volt. Mind a CYP6N3v2, mind CYP6N4v1 expresszió erősen nőtt a növekedő koncentrációval, mindkét esetben 500 mg/kg volt a LOEC. A HSP70 expressziója enyhe növekedő trendet mutatott a koncentráció növekedésével, de nem volt különbség a koncentrációk között. Az MF1 generációban mind a CYP6N3v2, mind a CYP6N4v1 expressziója erősen megemelkedett a koncentráció növekedésével, a LOEC mindkét esetben a legalacsonyabb koncentráció, azaz 107 mg/kg volt. A HSP70 expressziója nőtt az emelkedő koncentrációval, a LOEC 179 mg/kg volt. A TF1 generációban csak a HSP70 expressziója mutatott megnövekedett transzkripciót, azonban ezt a 179 mg /kg koncentrációban tapasztalt hormézisz okozta. Az MF2 generációban az ABC expressziója nőtt a koncentrációval, a LOEC érték 299 mg/kg volt. Mind a CYP6N3v2, mint a CYP6N4v1 expressziója erőteljesen nőtt a koncentráció hatására, mindkét esetben a legalacsonyabb koncentráció a 107 mg/kg volt a LOEC értéke. A HSP70 expressziója nőtt a koncentráció növekedésével, a LOEC 179 mg/kg volt. Az MTF2 generációban az ABC expresszió 107 mg/kg koncentrációnál erős horméziszt mutatott. A CYP6N4v1 expressziója csökkent a koncentráció növekedésével, a LOEC 179 mg/kg volt. A HSP70 expressziója nőtt a koncentrációval, a LOEC 179 mg/kg volt. A TF2 generációban a HSP70 expressziója nőtt a koncentrációval, a LOEC 299 mg/kg volt. A CYP6N4v1 expressziója csökkent a növekvő koncentrációval, a LOEC 500 mg/kg volt.

A multigenerációs csoport a stresszének megnövekedett expressziójával reagál. A transzgenerációs csoport pedig a HSP70 konstans aktivációjával, illetve a CYP6N4v1 expressziójának csökkentésével reagál. A multitranzgenerációs csoport hasonlóan reagált az TF2 csoporthoz, azonban a CYP6N3v2 is megnövekedett aktivitást mutatott.

3.3 Trebon 30 EC több generációs életmenet vizsgálat

A szülő generáció abszolút növekedési paramétere esetén a több-szakaszos lineáris modellel gyenge horméziszt tapasztaltam. A mortalitás szignifikánsan növekvő dózis-hatást mutatott, azonban a koncentrációk között nem volt szignifikáns különbség.

A F1 generáció multigenerációs csoportban az állatok kísérlet kezdeti nagyságában nem volt szignifikáns dózis-hatás, de a legmagasabb koncentrációból származó állatok szignifikánsan hosszabbak voltak, mint a kontroll csoport egyedei. A teljes peteszám szignifikánsan csökkent a kezelés hatására, és a két legnagyobb koncentrációval kezelt csoport kevesebb petét rakott, mint a kontroll. A szaporodási ráfordításban 50%-os horméziszt

tapasztaltam a legkisebb koncentrációban. A mortalitásban ez esetben is növekvő szignifikáns dózis-hatás volt, azonban nem volt szignifikáns különbség a kezelések között. A növekedés-szaporodás csereviszony bár szignifikáns dózis-hatás szerint nőtt, vagyis az állatok többet nőttek, mint szaporodtak, de nem volt szignifikáns növekedés a koncentráció hatására. Az F1 generáció transzgenerációs csoportban a koncentráció szignifikáns dózis-hatás összefüggést mutatott a kezdeti mérettel. A multigenerációs csoporthoz hasonlóan a kísérlet kezdetén a legmagasabb koncentrációból származó állatok szignifikánsan hosszabbak voltak, mint a kontroll csoport. Az abszolút növekedés szignifikáns dózis-hatást mutatott, a legnagyobb koncentrációval kezelt csoport kevesebbet nőtt

A F2 generáció multigenerációs csoportjában a kezdeti és a végső méretre is szignifikáns dózis-hatást gyakorolt a koncentráció növekedése. A legtöményebb koncentrációval kezelt csoport eleve kisebb mérettel kezdte a kísérletet, kisebbek is voltak a kísérlet végén. Az abszolút növekedésük nem tért el a többi csoporttól. A teljes peteszám szignifikáns dózis-hatás csökkenést mutatott. A teljes peteszám esetén az 1,3 ml/L-es koncentráció esetén 23%-os horméziszt tapasztaltam, míg a legtöményebb koncentráció állatai kevesebb petét raktak. A petecsomók esetén is szignifikáns csökkenő dózis-hatást tapasztaltam. Az 1,3 ml/L és 2,2 ml/L-es koncentrációnál 20%-os horméziszt találtam, és a legtöményebb koncentráció esetén kevesebb petecsomót raktak az állatok. Az első peterakás időpontja esetében a többszakaszos lineáris modell az első négy koncentráció esetén az állatok peterakását korábbinak becsülte, mint a kontrollt, viszont a legtöményebb koncentráció esetében az állatok később raktak petét. A szaporodási befektetés szignifikánsan csökkent a koncentrációval. A legnagyobb koncentráció szaporodási befektetése lecsökkent. A mortalitás szignifikánsan nőtt a koncentrációval, a legnagyobb koncentrációban szignifikánsan magasabb volt. A legnagyobb koncentrációval kezelt csoportot nem lehetett a következő generációba tovább vinni, mert a mortalitás és az alacsony reprodukció következtében ez a generáció kihalt. A csereviszony hányados szignifikánsan nőtt a koncentrációval párhuzamosan, tehát többet fektettek az állatok a növekedésbe, mint a szaporodásba. Azonban az 1,3 ml/L koncentrációs kezelésben szignifikánsan kevesebbet fektettek az állatok a növekedésbe és többet a szaporodásba a kontrollhoz képest. A legmagasabb koncentráció esetén jelentősen többet fektettek az állatok a növekedésbe. Az F2 generáció transzgenerációs csoportban csak a kelési siker és a táplálékfogyasztás mutatott szignifikáns dózis-válasz hatást. A kelési arány szignifikánsan csökkent, de nem volt különbség a koncentrációk között. Az 1,3, 3,8 és 6,4 ml/L-es koncentrációkkal kezelt állatok többet fogyasztottak.

Az F3 generáció multigenerációs csoportjában a petetérfogát szignifikánsan csökkent, azonban a koncentrációk hatásai között nem volt különbség. A kelési siker szignifikánsan csökkent a koncentráció

növekedésével és a két legtöményebb koncentrációban kisebb arányban keltek ki az egyedek. Az F3 generáció transzgenerációs csoportjában a kezdeti méret szignifikáns dózis-hatás szerint csökkent a koncentrációval. A végső méret szignifikáns dózis-hatás csökkenést mutatott a koncentráció növekedésével. Az állatok a legnagyobb koncentrációjú csoportban kisebbre nőttek, mint a kontroll csoport egyedei. Az abszolút növekedés a koncentrációval szignifikáns dózis-hatás csökkenést mutatott, a legtöményebb koncentrációs csoport kisebb volt. A teljes peteszám és a petecsomók száma is szignifikáns dózis-hatást mutatott. A 2,2 és a 6,4 ml/L koncentrációs kezelésben mindkét paraméter nagyobb volt a kontrollnál. Az első peterakás időpontja szignifikáns dózis-hatást mutatott és minden koncentráció-csoportban korábbra csúszott. A petetérfogathoz viszonyított nyírási arány (16%) tapasztaltam az első két koncentráció esetén. A szaporodási befektetés szignifikáns dózis-hatást mutatott és a legnagyobb koncentráció esetében nagyobb volt a kontrollénál. A csereviszony hányados szignifikánsan csökken a koncentrációval, tehát több energiát fektetnek az állatok a szaporodásba a kontrollhoz képest. A legtöményebb koncentráció esetében a hatás szignifikáns.

4. Diskusszió

4.1 Trebon 10 F reprodukciós és táplálékválasztási kísérlet

A teljes peteszám és a peteméret között fordított összefüggés van a rovaroknál, ami a reprodukció és a reprodukció közötti csereviszony következménye. Azonban a Trebon 10 F estén nem találtam dózis-hatás összefüggést a peteszámmal, sem a szülő, sem az utódgenerációban. A legvalószínűbb oka ennek az lehet, hogy a tesztelt koncentrációk a hatásos dózis alatt voltak.

A peteméret más eredményeket mutatott, ugyanis a Trebon 10 F hatására módosult a peteméret. A szülőgenerációban az inszekticid kezelés koncentráció-függően csökkentette a petetérfogatot. Ezt alátámasztják korábbi kutatások is, miszerint csökken a reprodukcióba való befektetés, amennyiben rosszak a környezeti feltételek. A Trebon 10 F embrionális fejlődésre gyakorolt serkentő hatásai is kiderültek ebben a vizsgálatban, mivel a peteátmérő aránya csökkent. Ez azt mutatja, hogy a peték kevésbé voltak kerekék, jobban megnyúlt alakjuk volt a szülő generációban. A kerekébb és szabályosabb peték kevésbé voltak életképesek, mint a szferoid alakú peték. Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a Trebon 10 F kezelés miatt a szülők kisebb energiát fektettek az utódokba. Ugyanakkor ez jele lehet egy energia-csereviszonynak is a szülők védekező mechanizmusai és a reprodukció között.

Mind a T, mind az M generációban ellentétes eredmény jött ki az inszekticidnek a peteméretre gyakorolt hatásában. A peteszám nem változott a kezelés hatására, de a peteméret nőtt a koncentráció növekedésével. Ez annak a jele, hogy az inszekticid kezelés dózis-függő módon megváltoztatta az ugróvillások epigenetikai státuszát. Az ilyen eredmények ritkák az ökotoxikológiában. Ráadásul a peteméret pozitívan korrelál a *F. candida* utódok életképességével. Az eredményeim azt valószínűsítik, hogy az inszekticiddel kezelt szülők valamilyen módon átadják a stresszről az információt az utódjaiknak, amik erre jobb minőségű petével reagálnak. A peszticid által okozott epigenetikai változás így megjelenhet az utódokban. Ebből a vizsgálatból még nem derül ki, hogy a *F. candida* milyen módon adja át az információt a generációk között. A mechanizmus felderítése további vizsgálatot igényel. Amennyiben csak a szülőgenerációt kezeltem a peszticiddel (T csoport), az eredmények nagyon hasonlóak voltak a multigenerációs kezeléshez. Ez bizonyítja, hogy a Trebon 10 F-nek van transzgenerációs hatása. A Trebon 10 F hatóanyagának magas az oktanol/víz aránya ($\log K_{ow}$: 6,9), ami lehetővé teszi, hogy bioakkumulálódjon a zsírszövetben és a zsírban (például a *F. candida* pete citoplazmájában és a fejlődő embrióban). Amennyiben ez a hipotézis érvényes, érthetővé válik a Trebon 10 F hatása a peteméretre. Azonban az etofenprox hatásmechanizmusa a *F. candida* embrionális fejlődésre egyelőre ismeretlen.

Vizsgálataim eredményei rávilágítanak a Trebon 10 F multigenerációs és transzgenerációs hatásaira a *F. candida* pete-paramétereire, és úgy tűnik hogy elsősorban a peteméret az érintett tulajdonság. Ezek a hatások dóziszfüggők.

A szülőgenerációban tapasztaltak alapján azt feltételeztem, hogy a kontroll csoportok azért fogyasztanak több kukorica levelet, mivel a monodietikus élesztőn tartás után, olyan tápanyagot próbálnak nagyobb mennyiségben felvenni, amiben a kukorica levél gazdagabb. Ám az első generációs kísérletben a kontroll csoportoknál nem találtunk preferenciát, ezért ez a feltételezés nem állja meg a helyét. A két generációban látható koncentráció szerinti elrendeződés alapján kapott eredmények azt mutatják, hogy a növényvédő szerrel kezelt állatoknak valószínűleg nagyobb szüksége van a jobb minőségű táplálékra (ebben az esetben az élesztőre), mint a kontroll csoportoknak. Ugyanis a *F. candida* fitnessze akkor a legmagasabb, amikor a preferált táplálékkal etetik. Nem publikált adataink szerint a *F. candida* számára az élesztő jobb minőségű táplálékot jelent, mint a kukorica.

A második generációnál arra voltam kíváncsi, hogy vajon ha a szülőket kezelem és az utána következő két generáció nem kap kezelést, az elég idő-e ahhoz, hogy elmúljanak a szer hatásai a vizsgált paraméterekre.

4.2 Trebon 30 EC több generációs transzkripció vizsgálat

Az Trebon 30 EC, mind transzgenerációs, mind multigenerációs hatásokat okozott az *F. candida* fajon. A túlélésen és a reprodukción csak az F1 generációig volt transzgenerációs hatás megfigyelhető. A következő generációban teljesen felépültek az állatok. A multigenerációs hatásokra bizonyítékot találtunk az egyre kisebb reprodukciós érzékenységben (magasabb reprodukciós LOEC). A kisebb érzékenység lehet egy rezisztencia kezdte, vagy a populáció rezilienciája a Trebon 30 EC ellen.

A túlélésre és a reprodukcióra gyakorolt transzgenerációs hatás még epigenetikai imprinting által, illetve a peszticid petén keresztüli átadásával is történhetett. A multigenerációs vonalon az inszekticid hatása minden mért paraméteren erősebb volt, mint a transzgenerációs vonalon. Ezt okozhatta egy additív szülői és nagyszülői hatás, így a Trebon 30 EC hatása is kumulálódni látszik a több generációs kezelés alatt. A szülő generáció csökkent peteszáma és megnövekedett petetérfogata arra utal, hogy az ugróvillások megnövelték az egyes utódokba fektetett energiát, így maximalizálva az utódszámot. Valószínűnek tűnik az a hipotézis, miszerint az egy petébe fektetett megnövelt energia segítségével a teljes reprodukcióba fektetett energia csökkenthető a túlélés és a detoxifikáció javára. Ráadásul a nagyobb pete nagyobb utódot eredményez. A nagyobb utódok életképesebbek lehetnek, így a fitness maximalizálható a stratégiaváltással. Továbbá a peteméret csökkenhet a jól ismert túlélés és reprodukció közötti csereviszony miatt is. Azonban az én

kísérletemben az F1 generációban a peteszám és a térfogat nem változott, míg az F2 generációban hormetikus hatást találtam. Ezt a mintázatot egyfajta adaptáció vagy talán epigenetikai imprinting magyarázhatja. A *F. candida* szaporodási stratégiája nagyon rugalmas, azaz a szaporodási paramétereket gyorsan és nagymértékben tudja változtatni.

A szülő generációban a legmagasabb Trebon 30 EC koncentrációban majdnem kihalt a populáció, de a túlélő egyedek az F1 és az F2 generációban jobban ellenálltak a kezelésnek, a túlélést és a juvenil számot tekintve (magasabb LOEC értékek). Ez ugyanúgy lehet epigenetikai imprinting eredménye, mint a palacknyakhatásé (bottleneck), ami a legrátermettebb állatokat válogatta ki.

Az irodalom három különböző multigenerációs hatást különböztet meg, amelyek jól magyarázzák az én eredményeimet is. Az első típus, amikor a szülői környezet befolyásolja az utód fenotípusát, de nincs meg a plaszticitás, ami az aktuális környezetre reagálna. Ebben az esetben a környezet és a fenotípus aszinkronizálódhat. A második típus, amikor a szülői hatás és a plaszticitás befolyásolja a fenotípust, de nincs interakció a két hatás között. A harmadik típus, amikor a szülői hatás és a fenotipikus plaszticitás interakcióba lép. A szülői hatás bekövetkezhet epigenetikai hatásra is, azonban annak stabilitása eltérhet a különböző gének között. Ez befolyásolhatja a szülők információ átadását az utódaik számára.

A szülő generációban a stresszgének transzkripciója megemelkedett (ABC-transzporter, citokróm-oxidáz, hősokk fehérje). Ez összhangban van a korábbi eredményekkel, és stressz hatására bekövetkező emelkedett detoxifikációra és stresszválaszra utal. Ezzel szemben az IPNS géntől egész más fajta reakciót tapasztaltam. A legkisebb koncentrációjú kezelésben erősen csökkent a transzkripció, majd a koncentráció emelkedésével dózis-válasz reakció szerint emelkedett a transzkripció. Először elérte a kontroll szintet, majd a két legmagasabb koncentráció a kontroll fölé nőtt. Ennek a jelenségnek több magyarázata is lehet. Az első, hogy a Trebon 30 EC inszekticidnek antimikrobiális hatása van, ami lehetővé teszi, hogy a detoxifikációba fektesse az állat az energiát az antibiotikum termelés helyett. Azonban néhány xenobiotikum érzékenyíti az állatokat a fertőzésekkel szemben, mint például a fenantrén, ami az antimikrobiális gének aktivációjához vezetett, illetve a diclofenac, ami az immunitással kapcsolatos gének transzkripcióját emelte meg. Egy további hipotézisem szerint az enyhébb stressz nem az IPNS-t, hanem más géneket aktivál, ami megmagyarázza a kisebb etofenprox koncentrációnál tapasztalt alacsony expressziót és a magasabb koncentrációknál való ismételt növekvő IPNS expressziót. A multigenerációs kezelésben minden stresszgén (az IPNS kivételével) erős dózis-függő mintázatot mutatott. Mind az F1, mind az F2 generáció transzgenerációs

kitettségekben a HSP70 gén transzgenerációs hatásokat mutatott dózis-függően. Ez egy stabil epigenetikai módosulás is lehet a HSP70 génen.

A HSP70 expressziós mintáját be lehet sorolni az egyes epigenetikai kategóriába, mivel az F2 generációban nem látszik különbség a kezelési csoportok között. A CYP6N4v1 gén expressziója dózis-függően nőtt a szülőgenerációban, majd az F1 transzgenerációs csoportban a Trebon 30 EC inszekticidnek látszott hatása. Azonban az F2 transzgenerációs csoportban az expresszió csökkent a nagyszülői koncentráció növekedésével. Erre az eredményre többféle magyarázat is létezik. Az első, hogy a különböző expressziós minták, így az F2 generációban tapasztalható csökkenés egy random epigenetikai modifikáció. De a random modifikáció nem magyarázza meg az F2 generációban található stabil trendet. A második lehetőség, hogy a mintázat a harmadik epigenetikai kategóriába sorolható, amikor a környezet és az epigenetikai mintázat interakcióba lép egymással, így különböző lehet a mintázat a juvenilek kitettsége (F1) és a kezelés hiánya esetén (F2).

Az MTF2 generáció nagyon hasonló mintát mutatott, mint a TF2 kezelés. A HSP70 expresszió emelkedett, a CYP6N4v1 csökkenést mutatott a szülői koncentrációval az MTF2 generációban. Általában a CYP6N4v1 transzkripciója nő a növekvő inszekticid kitettséggel. A csökkent expresszió okai hasonlóak lehetnek a TF2 generációhoz; random epigenetikai modifikáció vagy harmadik típusú epigenetikai modifikáció. Az MTF2 kezelés expressziós mintázata emelkedett stressz-szintről árukkodik, a megemelkedett ABC-transzporter szinten keresztül. Az eredmények egybevágóak azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint az ABC-transzporter expresszió megemelkedik kadmium kitettség hatására, ugyanis kiszállítja a káros anyagokat a sejtekből, így az etofenproxot is eltávolíthatja a sejtéből.

A szaporodással kapcsolt gének a jól ismert energia-allokációs elmélet szerint reagáltak a inszekticid okozta stresszre. A szülő generációban és az MF2 generációban a vitellogenin-receptor transzkripció csökkent a növekvő Trebon 30 EC koncentrációval. Mivel ez a gén nem csak a vitellogenin transzporttal, de az ivarérettség elérésével is kapcsolatban van, ezért ez arra utalhat, hogy az ugróvillások később érték el az ivarérettséget a magasabb Trebon 30 EC koncentrációk esetén. A fent említett vitellogenin receptor dózis-hatás összefüggés és a petetérfogató növekedés alátámasztja azt a hipotézist, hogy a szülők több energiát fektettek egy adott utódba. Ugyanezt az eredményt kaptuk a Trebon 10 F inszekticiddel végzett reprodukciós kísérletben is. A növekvő inszekticid koncentrációval nőtt a petetérfogató, de a peteszám nem változott, ami azt jelenti, hogy az ugróvillások több energiát fektettek egy adott utódba. A multigenerációs kezelés F1 generációjában megemelkedett a vitellogenin és a vitellogenin-szerű fehérje expressziója. Azonban ez nem járt sem a peteszám, sem a peteméret megváltozásával, ami

arra utal, hogy a vitellogenint és a vitellogenin-szerű fehérjét antioxidánsként használták fel az állatok.

Multigenerációs kitétségnél az F2 generációban a petetérfogát és a peteszám hormetikus növekedést mutatott. Ez valószínűleg nem a vitellogenin transzkripciónak köszönhető, mivel a Trebon 30 EC nem befolyásolta ezt a végpontot az F2 generációban. Inkább a stresszgének intenzív expressziója okozhatta a hormézist a szaporodásban.

Az MF2 és az MTF2 kezelési csoportokban különbséget találtam a fitness maximalizáló stratégiában. A kisebb Trebon 30 EC koncentrációnál a multigenerációs csoport többet fektetett az egyes utódokba, így a juvenileknek nagyobb az esélye a túlélésre, ha később inszekticid kitétség lép fel. A multitranszgenerációs csoport inkább a több utód termelésébe fektetett energiát. Így valamennyi utód túlél szennyezés esetén is, de a tiszta talajban gyorsan vissza tudnak állni a populációs paraméterek az eredeti méretre. A későbbi generációkban valószínűleg azért tűnik el a pozitív hatás (hormézisz), mert a generációkon keresztüli kitétség összeadódik. Az a hipotézisem, hogy az ugróvillásoknak több energiát kell a detoxifikációba fektetni a magasabb koncentrációkban. A megemelkedett stresszgén expresszió azt mutatja, hogy az ugróvillásoknak nem maradt elég energiájuk, amit az utódokba fektethetnek. A másik lehetőség, hogy az eredményeink egy korai rezisztenciát jeleznek.

A TF2 csoportban a HSP70 gén transzkripciójának dózis-függő növekedése és a CYP6N4v1 transzkripciónak dózis-függő csökkenése epigenetikai esemény lehet. Lehetséges azonban, hogy ezeket a HSP70 és CYP6N4v1 génekre vonatkozó transzkripció változásokat az F1 generációs állatok talajban való kitétsége okozza. Mivel a reprodukciós őssejtek már az embrionális fejlődés korai szakaszában megjelennek, ezáltal az F2 generációs állatok őssejt állapotú kitétsége sem kizárt. Azonban véleményem szerint ez a hatás nem lehet túl jelentős. Először is, a túlélés és a juvenilis szám sokkal kevésbé volt dózis-függő az MTF2 és a TF2 kezelésben, mint az MF2 kezelésben, ami arra utal, hogy az inszekticid kezelés hatása nem túl erős a két transzgenerációs típusú kezelésben. Másodszor, ha az érzékenyebb paramétert, a génexpressziót vesszük figyelembe, akkor is megkülönböztethetőek a különböző kezelés típusok. A transzgenerációs csoportban a CYP6N4v1 expresszió csökkent és csak a HSP70 stresszgén aktiválódott, míg a multigenerációs csoportban a legtöbb stresszgén aktiválódott. Így még ha az inszekticid gyakorolt is hatást az őssejtekre, az nem tűnik jelentős hatásnak az F2 generációban. Az epigenetikai módosulások vezethetnek inszekticid rezisztenciához, de ennek a mechanizmusa kevésbé ismert.

Összefoglalva, bizonyítékot találtam arra, hogy a Trebon 30 EC inszekticidnek van transzgenerációs és multigenerációs hatása is a *F. candida* ugróvillás fajra. A transzgenerációs kezelésben a túlélés és a reprodukció, mint

végpont az F1 generációig reagált az inszekticid hatására. Ez valószínűleg az F1 generáció juvenilis egyedeknek kitettsége miatt lehetett. Transzgenerációs hatásokat a HSP70 és CYP6N4v1 gének transzkripciója esetén találtam az F2 generációban. Ekkor a HSP70 gén expressziója nőtt, míg a CYP6N4v1 gén expressziója csökkent a koncentráció növekedésével. Ezen mintázat mögötti molekuláris mechanizmusok felderítése további vizsgálatokat igényel. A multigenerációs hatások az egyre magasabb juvenilis számban (LOEC alapján számolva) nyilvánulnak meg a generációk során.

A transzgenerációs kezelés transzkripciós mintázata és a multigenerációs kezelés magasabb juvenil LOEC értéke egy korai rezisztenciára, illetve a populáció felépülésére utalnak. Vagyis a populációk képesek a korábbi egyedszámukat visszanyerni egyszeri kezelés után.

4.3 Trebon 30 EC több generációs életmenet vizsgálat

A Trebon 30 EC inszekticid hatására multigenerációs és transzgenerációs változásokat tapasztaltam a *F. candida* faj élettörténetében. A szülő generációban a mortalitás enyhe volt, de csökkent a szaporodási befektetés és a növekedésben horméziszt tapasztaltam. A csökkent szaporodási befektetés a mortalitás enyhítésére általános reakciónak mondható a gerincteleneknél. A növekedésbe való befektetés is egy védekező reakció lehet, mivel a nagyobb utód/egyed fitnessze is nagyobb. A szülő generációban tapasztalt kezdeti enyhe hatások után a transzgenerációs csoport F1 generációja enyhe növekedéscsökkenést produkált, illetve az F2 generációban megnövekedett táplálékigényt mutatott. Eredményeim azoknak a hatásoknak a fokozatos elmúlására utalnak, melyeket az utódok lecsökkent fitnesszének továbbadódása, illetve a szer petébe való bekerülése okozhatott.

A multigenerációs csoportban a következő hatások súlyosbodtak a szülő generációhoz képest: csökkent a peték száma, így a teljes szaporodási befektetés is, nőtt a mortalitás és az egyedek inkább a növekedésbe, mint a szaporodásba fektettek energiát. Ez egybevág az irodalomban található eredményekkel is, miszerint rossz körülmények között csökken a szaporodásba való befektetés. Ez a trend jellemezte az F2 multigenerációs csoportot is, ahol a kicsi szaporulat és nagy mortalitás miatt a legtöményebb koncentrációval kezelt csoport kihalt. Ez a jelenség a hatások felhalmozódását bizonyítja. A fokozatos fitnessz csökkenés kihaláshoz vezetett. A stressz hatására bekövetkezett csökkent szaporodási befektetés ismert jelenség a *F. candida* faj esetén is. A Trebon 10 F inszekticiddal végzett vizsgálatunk során, és a Trebon 30 EC génexpressziós vizsgálatban is ezt tapasztaltam. Az F3 generáció drasztikusan más képet mutatott, mint az előzőek. A legnagyobb koncentráció mellett talált kihalás után a multigenerációs csoportban kissé csökkent a peteméret, de már nem érződtek a peszticid hatások. Az

alacsonyabb koncentrációval kezelt csoportok rezisztensebbek lettek. Ez a jelenség hasonló a génexpressziós vizsgálat eredményeihez.

Az F3 transzgenerációs csoportban egy, a szülőket ért kezelést kompenzáló folyamat indult meg. Az állatok általánosságban kisebbek voltak (kísérlet kezdeti mérete, végső mérete és az abszolút növekedésük is kisebb volt) és nőtt a szaporodási befektetésük a kontrollhoz képest, de egyedi szinten is a szaporodás felé tolódott el a csereviszony, emellett aktívabbak is voltak az állatok. Ez a szaporodás és növekedés közötti csereviszony megfelel az általános energia allokációs sémának. A *D. magna* vízibolha cink kitétsége esetén a stressz gének aktiválódtak, míg a reprodukció a következő két generációban csökkent a védekezés és reprodukció közötti csereviszony miatt. Az én kísérletemben ennek pont az ellentéte játszódott le. Amikor két generációt inszekticid mentes környezetben töltöttek az állatok, a stressz gének aktivációja a Trebon 30 EC génexpressziós vizsgálat eredményei alapján valószínűleg lecsökkent, s így újra volt energia az intenzív szaporodásra.

Az F3 generációban tapasztalt, az előző generációktól eltérő mintázat felveti az epigenetikai öröklődés lehetőségét is. A multigenerációs vonalon kialakuló rezisztencia lehet, hogy az epigenotípusok kiválogatódásának, vagy az epigenetikai mintázat megváltozásának az eredménye. Jelen kísérlet eredményei hasonlóak a Trebon 30 EC génexpressziós vizsgálatban tapasztaltakhoz, melyben a magasabb koncentrációval kezelt állatok közel kerültek a kihaláshoz, de a multigenerációs vonalon a juvenilis számban látszik, hogy rezisztensebbek az egyedek. Abban a kísérletben a transzgenerációs kezelés vonalán a hatás a generációk között kezd megszűnni, de a CYP6N4v2 gén az F2 generációban újra expresszálódni kezd, amely adat megerősíteni látszik az epigenetikai jelenség hipotézisét.

4.4 Következtetések

Általánosságban elmondható, hogy mind a Trebon 10 F, mind a Trebon 30 EC inszekticid a gyártó által javasolt alkalmazási értékekben kíméletesnek bizonyult a *Folsomia candida* ugróvillás fajra. Súlyosabb mellékhatásokat, mint a kihalás vagy a stressz gének transzgenerációs tartós aktivációja, csak jóval a gyártó által szabadföldi alkalmazásra javasolt koncentrációk felett tapasztaltam. Mindkét mellékhatást a Trebon 30 EC esetén mutattam ki, így valószínűsíthető, hogy a Trebon 10 F inszekticid alkalmazása kíméletesebb a *Folsomia candida* számára, mint a Trebon 30 EC. Erre utal az is, hogy a táplálékválasztási teszt alapján a Trebon 10 F hatása az F2 generációban már nem tapasztalható. A Trebon 30 EC inszekticiddel végzett részletes élettörténet paraméterek vizsgálatban még az F3 generációban is lehetett peteméret csökkenést tapasztalni a multigenerációs vonalon. A transzgenerációs vonalon

ekkor jelentkeztek intenzív kompenzáló folyamatok. Mindezek a jelenségek a Trebon 30 EC erőteljesebb hatására utalnak.

Mindkét peszticid a szülő generációban reprodukció-csökkenést okoz, mely transzkripciós mérések alapján a detoxifikációba és az általános stresszválaszba való energiabefektetés következménye lehet. A Trebon 10 F esetén, mind a multigenerációs, mind a transzgenerációs csoportban a szaporodásba való megnövekedett befektetést tapasztaltam, míg a Trebon 30 EC esetén a transzgenerációs csoportban nem tapasztaltam a kontrolltól eltérést. Ebben a kísérletben a multigenerációs csoport csökkentette a szaporodásba való befektetését a növekedés javára. A Trebon 10 F és Trebon 30 EC inszekticidek hatásainak összehasonlításból szintén arra lehet következtetni, hogy a Trebon 30 EC erőteljesebb hatást fejt ki a *F. candida* fajra, mint a Trebon 10 F, mert hatására több energiát fektettek az ugróvillások a túlélésbe, mint a szaporodásba. A két inszekticid eltérő hatása valószínűleg a formuláció következménye. Mindkét peszticid esetén a több generációs kísérletek epigenetikai módosulásra engednek következtetni, melyek a szaporodási paraméterekben és a transzkriptomokban is megnyilvánulnak.

Az élettörténet paraméterek részletes vizsgálatánál a negyedik generáció hozott kritikus eredményeket. Ezekből az adatokból arra következtetnek, hogy négy generáción át folytatott kísérletekből tudunk következtetni a *F. candida* esetében a hosszútávú hatásokra. Érdemes lenne ennek az állításnak a konzisztenciáját megvizsgálni. Amennyiben a négy generáció konzisztensnek bizonyul, egy ilyen tartamú teszt standardizálása és bevezetése a kockázatbecslési módszerek közé hiánypótló lenne.

5. Új tudományos eredmények

- Kimutattam, hogy a Trebon 10 F és a Trebon 30 EC nem okoz tartós károsodást a *Folsomia candida* populációkban, amennyiben a gyártó által szántóföldi alkalmazásra javasolt koncentrációkat betartják. Bár a Trebon 30 EC a szülő generációban okoz reprodukció csökkenést, azonban hosszú távon a populáció képes felépülni és kompenzálni ezt a hatást.
- Kimutattam, hogy a Trebon 10 F hatása transzgenerációs kezelés esetén az F2 generációra már eltűnik, és a továbbiakban a táplálékválasztásra sem látszik hatás.
- Bizonyítottam, hogy a Trebon 30 EC inszekticid toxikusabb a *Folsomia candida* számára, mint a Trebon 10 F. Ennek az az oka, hogy a Trebon 30 EC hatására az egyedek inkább a növekedésbe és nem a szaporodásba fektetnek energiát, valamint a stressz- és detoxifikáló gének erőteljesen aktiválódnak.
- A szaporodási és növekedési paraméterek transzgenerációs dózis-hatás függő indukciója alapján megállapítottam, hogy mind a Trebon 10 F, mind a Trebon 30 EC peszticideknek van epigenetikai hatása a *Folsomia candida* fajra.
- Bizonyítottam, hogy a Trebon 30 EC inszekticid még az F3 generációban, két, inszekticid mentes talajban nevelt generáció után is dózis-hatás függően aktiválja a hősokkfehérje és a citokrómoxidáz 6N4v2 géneket. Ez a jelenség az epigenotípusok kiválasztódásának lehet az eredménye, illetve stabil epigenetikai módosulás is lehet.

6. Tudományos publikációk

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

- Szabó B.** (2014) A Trebon 10 F generációkon átívelő hatásai a *Folsomia candida* (Collembola) faj táplálékválasztására; A biológia jövője, a jövő biológusai: Avagy szemelvények a magyarországi felsőoktatási intézményekben végzett tudományos munka eredményeiből.; Szeged: JATE Press, 2014 pp. 81-89.(ISBN:978-963-315-212-6)
- Bánszegi O., Kosztolányi A., Bakonyi G., **Szabó B.**, Dombos M. (2014) New Method for Automatic Body Length Measurement of the Collembolan, *Folsomia candida* Willem 1902 (Insecta: Collembola). PLoS ONE 9(6): e98230. doi: 10.1371/journal.pone.0098230
- Bakonyi G., **Szabó B.** (2016) Epigenetika, az ökotoxikológia új kihívása, Magyar Tudomány, 117 (8), 997-1004
- Bakonyi G., **Szabó B.**, Seres A. (2017) A hormézis, mint ökotoxikológiai jelenség, különös tekintettel a növényvédelemre, BioKontroll, 8:2, in press
- Szabó B.**, Bakonyi G. (2017) The influence of different substrates on the reproduction traits of *Folsomia candida* (Collembola) in an insecticide test, Columella, 4(2): 33-40.
- Szabó B.**, Bakonyi G. (2017) Multigenerational and transgenerational side-effects of an insecticide on eggs of *Folsomia candida* (Collembola), Polish Journal of Ecology, 65, 110–121, doi: 10.3161/15052249PJE2017.65.1.010
- Szabó B.**, Seres A., Bakonyi G. (2018) *Folsomia candida* (Collembola) locomotor activity pattern is changed by a neurotoxicant pesticide, Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 64(4), 355-368.
- Szabó B.**; Lang Zs.; Bakonyi G.; Märien J.; Roelofs D.; van Gestel C.A.M, Seres A. (2019) Transgenerational and multigenerational stress gene responses to the insecticide etofenprox in *Folsomia candida* (Collembola), Ecotoxicology and Environmental Safety, Under review

Független publikációk:

- Szabó B.**, Seres A., Bakonyi G. (2017) Long-term consumption and food replacment of near-isogenic by Bt-maize alter life-history traits of *Folsomia candida* Willem 1902 (Collembola), Applied Ecology and Environmental Research, 15(4):1275-1286.

Konferencia poszterek

Szabó B., Bakonyi G. (2013): A Trebon 10 F generációkon átívelő hatása a *Folsomia candida* (Collembola) faj populáció struktúrájára. TOX2013 konferencia, Velence, 2013. október 16-18.

Bakonyi G., Weisz M., **Szabó B.**, Seres A., Halasy K. (2014): Ha egy ugróvillás sokáig Bt kukoricát eszik-hisztológiai és populációbiológiai következmények, Tox'2014. konferencia, Visegrád, 2014.október 08-10. 72. p.

Szabó B., Bakonyi G. Transzgenerációs és multigenerációs hatások jelentősége az ökotoxikológiában. Tox'2015. konferencia, Harkány, 2015.október 14-16. 54. P

Szabó B., Seres A. és Bakonyi G. (2017) A Bt-kukoricára való áttérés befolyásolja a *Folsomia candida* (Collembola) életmenet tulajdonságait, III. Országgyűlési Nyílt Napok a GMO-król, Budapest, 2017.05.18.

Szabó B., Kocsis R., Mézes M. (2018) DON és T-2 mikotoxinok hatása a *Folsomia candida* (Collembola) faj túlélésére, utódprodukciónak és táplálékválasztására, VIII. Ökotoxikológiai Konferencia Budapest, Magyarország, 2018.11.23 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság (ISBN 978-963-89452-9-7)

Tudományos előadások

Szabó B., Seres A., Weisz M., Bakonyi G. (2014): MON810 genetikailag módosított kukoricafajta hosszú távú fogyasztásának hatása a *Folsomia candida* (Collembola) fajra. Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztály, 2014. május 7.

Szabó B.; Bakonyi G: (2014) A Trebon 10 F inszekticid multigenerációs hatásai a *Folsomia candida* (Collembola) fajra IV. Ökotoxikológiai Konferencia Budapest, Magyarország, 2014.11.21 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2014. pp. 31-32. (ISBN:978-963-89452-4-2)

Szabó B., Bakonyi G. (2015): Egy növényvédőszer multi- és transzgenerációs hatása a *Folsomia candida* (Collembola) fajra, X. Magyar Ökológus Kongresszus, 2015. augusztus 12-14.

Bakonyi G., **Szabó B.** (2015) Epigenetikai kihívások az ökotoxikológiában. 2015.11.20 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2015.6 pp: 6. (ISBN: 978-963-89452-5-9)

Szabó B., Seres A., Bakonyi G. Egy inszekticid multi- és transzgenerációs hatása a *Folsomia candida* (Collembola) modell szervezetre. Tox'2016. konferencia, Hajdúszoboszló, 2016.október 12-14.

Szabó B., Seres A., Bakonyi G., (2016) A MON 810 kukorica hosszú távú fogyasztásának hatása a *Folsomia candida* (Collembola) fajra, In: Darvas B., Bakonyi G., Győri J., Major J., Székács A. (szerk.), VI. Ökotoxikológia

- Konferencia előadás és poszter kötete. 44 p. , Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2016.11.18 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2016. pp. 33-34. (ISBN:978-963-89452-6-6)
- Szabó B.**; Seres A., Bakonyi G.; Roelofs D.; van Gestel C.A.M. (2017) A Trebon 30 EC növényvédőszer transz- és multigenerációs hatásai a *Folsomia candida* (Collembola) faj szaporodására és génexpressziójára, Tox'2017. 110 p. Konferencia helye, ideje: Bükkfürdő, Magyarország, 2017.10.11-2017.10.13.p. 58.
- Szabó B.**; Seres A., Bakonyi G.; Roelofs D.; van Gestel C.A.M. (2017) Epigenetikai vizsgálatok a *Folsomia candida* (Collembola) fajon, VII. Ökotoxikológiai konferencia. 45 p. Konferencia helye, ideje: Budapest, Magyarország, 2017.11.24 Budapest: Magyar Ökotoxikológiai Társaság, 2017. pp. 35-36., (ISBN:978-963-89452-8-0)
- Szabó B.**, Seres A., Bakonyi G. (2018): A Trebon 30 EC inszekticid *Folsomia candida* (Collembola) növekedésre és szaporodásra gyakorolt epigenetikai hatásai, XI. Magyar Ökológus Kongresszus, 2018. augusztus 28-30.
- Szabó B.**, Kocsis R., Mézes M. (2018): DON és T-2 mikotoxinnal fertőzött növényi anyag hatása a *Folsomia candida* gombafogyasztó ugróvillás (Collembola) fajra. Magyar Biológiai Társaság Állattani Szakosztály, 2018. november 7.