

Budapesti Corvinus Egyetem
Kertészettudományi Kar
Rovartani Tanszék

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

***A MON 810 Bt*-kukorica Cry1-toxintartalma és pollenjének
hatása a hazai védett lepkékre**

Lauber Éva

Témavezető: Prof. Dr. Darvas Béla, DSc
Tanszéki konzulens: Dr. Haltrich Attila, CSc

Budapest
2011

A doktori iskola

megnevezése: Interdiszciplináris (1. Természettudományok / 1.5. Biológiai tudományok / 4. Agrártudományok / 4.1. Növénytermesztési és Kertészeti tudományok) Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok

vezetője: Prof. Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, az MTA doktora (agrártudományok)
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcsstermő Növények Tanszék

Témavezető: Prof. Dr. Darvas Béla
c. egyetemi tanár, tudományos tanácsadó, az MTA doktora (biológia)
MTA Növényvédelmi Kutatóintézete, Ökotoxikológiai és
Környezetanalitikai Osztály

Tanszéki konzulens: Dr. Haltrich Attila
egyetemi docens, a mezőgazdasági tudományok kandidátusa
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Rovartani Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
A témavezető jóváhagyása

.....
A tanszéki konzulens jóváhagyása

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

**A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának
2011. október 4-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló
Bizottságot jelölte ki:**

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Bernáth Jenő, DSc

Tagjai

Heszky László, MHAS

Marton L. Csaba, DSc

Papp István, PhD

Szőcs Gábor, CSc

Vétek Gábor, PhD

Opponensek

Keszthelyi Sándor, PhD

Varga Zoltán, DSc

Titkár

Vétek Gábor, PhD

Családomnak és barátaimnak

TARTALOMJEGYZÉK

SZAKSZAVAK RÖVIDÍTÉSÉNEK JEGYZÉKE	8
1. BEVEZETÉS	9
2. CÉLKITŰZÉSEK	11
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	12
3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner	12
3.1.1. A DIPEL felhasználása a világban és Magyarországon.....	14
3.1.2. A <i>Bt</i> -növények felhasználása a világon és Európában	14
3.2. A <i>MON 810 Bt</i> -kukorica és a DIPEL főhatásai és mellékhatásai	17
3.2.1. A <i>MON 810 Bt</i> -kukorica főhatásai és alkalmazásának előnyei.....	17
3.2.2. A <i>MON 810 Bt</i> -kukorica mellékhatásai és alkalmazásának hátrányai	18
3.2.2.1. Ökológiai hatások	19
3.2.2.2. Egészségügyi hatások	25
3.2.3. A DIPEL fő- és mellékhatásai.....	26
3.3. A <i>MON 810</i> fajtacsoport Cry1-toxintartalma	28
3.4. Hazai védett lepkék	30
3.4.1. Nappali pávaszem.....	30
3.4.2. C-betűs lepke	31
3.4.3. Atalanta lepke	32
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	34
4.1. Felhasznált anyagok – Cry1-kukorica és Cry1-tartalmú növényvédő szer	34
4.2. A kukorica termesztése és mintavételezése.....	34
4.3. Cry1-toxin mérése	35
4.3.1. A Cry1Ab-protoxin enzimatis aktiválása	35
4.3.2. Növényi ~Cry1Ab-toxin mérése	36
4.4. A kukorica pollentermelése és a kiszóródott pollen eloszlása	37
4.5. Gyomfelvételezés és védett lepkék szempontjából való kritikus mintavételezés	38
4.6. A hazai védett lepkék életmódjának elemzése	38
4.7. A kukorica levélfelületének mérése	38
4.8. A kukorica és gyomnövényeinek levélfelület/levéltömeg hányadosa.....	39
4.9. Tenyészetek	39
4.9.1. Nappali pávaszem.....	39
4.9.2. Atalanta lepke	40

4.9.3. C-betűs lepke	40
4.9.4. Kukoricamoly	40
4.9.5. Gyapottok-bagolylepke	40
4.10. Kísérletek <i>MON 810</i> pollennel	40
4.11. Kísérletek DIPEL WP készítménnyel	41
4.12. A levélfogyasztás, a súlygyarapodás és a fejlődési idő stádiumonkénti vizsgálata nappali pávaszemen	43
4.13. A nappali pávaszem magányos és csoportos fejlődésének vizsgálata	43
4.14. Fényképek készítése	44
4.15. Statisztikai értékelés	44
5. EREDMÉNYEK	45
5.1. Cry1-toxin mérése kereskedelmi forgalmú <i>ELISA</i> rendszerekkel	45
5.1.1. Cry1Ab-prototoxin és aktivált Cry1Ab-toxin mérése	45
5.1.2. A két Cry1Ab-toxint mérő <i>ELISA</i> kit összevetése	46
5.1.3. ~Cry1Ab-toxin eloszlása <i>MON 810</i> kukoricában	47
5.1.3.1. ~Cry1Ab-toxin szintek alakulása az egyes növényi szervekben a fejlődés során	47
5.1.3.2. A <i>MON 810</i> kukorica ~Cry1Ab-toxintartalma a VT-R4 fenológiai fázisokban	49
5.1.3.3. A <i>MON 810</i> kukorica pollenjének ~Cry1 Ab-toxintartalma	50
5.2. A DK-440 kukorica levélfelülete	51
5.3. A kukorica pollentermő képessége	51
5.4. A kukoricapollen eloszlása	52
5.4.1. A kukoricapollen vertikális eloszlása	52
5.4.2. A kukoricapollen horizontális eloszlása	53
5.4.3. A kukoricapollen eloszlása gyomnövények levelein	55
5.5. A kukorica és különböző gyomnövények levélvastagsága	58
5.6. A hazai kukoricások szegélyén élő gyomok és borítottságuk	59
5.7. A hazai védett lepkék lárvakelése és a kukorica pollenszórása	60
5.8. A <i>MON 810</i> kukorica pollenének hatása <i>Nymphalis io</i> lárváin	61
5.8.1. A <i>MON 810</i> pollennek való rövid távú kitettség hatásai (L1-L3)	63
5.8.2. A <i>MON 810</i> pollennek való hosszú távú kitettség hatásai (L1-L5)	65
5.9. A DIPEL WP készítménnyel végzett vizsgálatok eredményei	67
5.9.1. A különböző védett és kártevő lepkéfajok DIPEL érzékenysége	67
5.9.2. A DIPEL szubletális hatásai védett lepkék lárváin	67
5.10. Az egyedül maradó első stádiumú <i>Nymphalis io</i> megnövekvő halandósága	69

5.11. A <i>Nymphalis io</i> stádiumonkénti levélfogyasztása	71
5.12. A <i>Nymphalis io</i> stádiumonkénti fejlődési ideje	72
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS MEGVITATÁS	73
6.1. A <i>MON 810</i> kukorica ~Cry1Ab-toxintermelő képessége	73
6.2. Kritikus zóna a <i>MON 810</i> kukorica esetében	74
6.3. A <i>MON 810</i> fajtacsoport által érintett védett lepkék	77
6.4. A DIPEL és a <i>MON 810</i> kukoricapollen hatásának összevetése	80
6.5. A <i>Nymphalis io</i> lárvák kiemelkedő érzékenysége okai	83
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	86
8. ÖSSZEFOGLALÁS	88
9. SUMMARY	90
MELLÉKLETEK.....	92
M1. Irodalomjegyzék.....	92
M2. A felhasznált <i>ELISA</i> rendszerek.....	103
M3. A <i>Nymphalis io</i> lárvájának stádiumonkénti morfológiai jellemzői.....	104
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	107

SZAKSZAVAK RÖVIDÍTÉSÉNEK JEGYZÉKE

<i>Bt</i>	– <i>Bacillus thuringiensis</i> eredetű
Cry1Ab	– a <i>Bacillus thuringiensis</i> bizonyos törzsei által termelt Cry-toxin, 131 kDa
~Cry1Ab	– GM-kukorica által termelt, kurtított Cry-toxin, 91 kDa
DK-440	– a DeKalb vállalat egyik kukoricahibridje, közel izogenikus hibridfajta
DK-440 BTY	– a DK-440 hibridre épülő, a <i>MON 810</i> genetikai eseményt hordozó GM-hibrid
DNS	– dezoxiribonukleinsav
EFSA	– <i>European Food Safety Authority</i> – az Európai Unió Élelmiszerbiztonsági Hivatal
ELISA	– <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> – enzimjelzéses immunanalitikai vizsgálat
GM	– géntechnológiai úton/genetikailag módosított
GMO	– <i>genetically modified organism</i> – genetikailag módosított szervezet
IU	– <i>International Unit</i> – Nemzetközi Egység (NE)
kDa	– kilodalton
<i>Ln</i>	– <i>n</i> -dik stádiumú lárva
LSD	– legkisebb szignifikáns differencia
MgSzH	– Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
<i>MON 810</i>	– a Monsanto kurtított Cry1Ab-toxint termelő kukoricájának genetikai eseményszáma
OMMI	– Országos Mezőgazdasági Minősítő Intézet
PBST	– <i>Phosphate Buffered Saline with Tween</i> – 1% Tween-20 adalékot tartalmazó foszfát puffer
PMSF	– <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i> – fenil-metánszulfonsav-fluorid
R1	– a kukorica fejlettségi stádiuma: nővirágzás (<i>reproductive stage, silking</i>)
R2	– a kukorica fejlettségi stádiuma: hólyag szem állapot (<i>reproductive stage, blister</i>)
R3	– a kukorica fejlettségi stádiuma: tejesérés (<i>reproductive stage, milk</i>)
R4	– a kukorica fejlettségi stádiuma: viaszérés (<i>reproductive stage, dough</i>)
R5	– a kukorica fejlettségi stádiuma: „fog” állapot (<i>reproductive stage, dent</i>)
R6	– a kukorica fejlettségi stádiuma: fiziológiai érés (<i>reproductive stage, physiological maturity</i>)
VE	– a kukorica fejlettségi stádiuma: kelés (<i>vegetative stage, emergence</i>)
<i>Vn</i>	– a kukorica fejlettségi stádiuma: <i>n</i> kifejlődött levél
VT	– a kukorica fejlettségi stádiuma: címerhányás (<i>vegetative stage, tasseling</i>)

1. BEVEZETÉS

Magyarország és a szomszédos országok Európai Unióhoz történő csatlakozásával az utóbbi területe egy önálló bioföldrajzi térséggel, a Pannon Biogeográfiai Régióval gazdagodott. Számos egyedülálló faj és élőhely található e régióban, mely természeti értékekben több más európai országnál gazdagabb. Magyarország területe csupán 3 %-át teszi ki az Európai Uniónak, de 55 védett élőhely típus található itt, ami 26 %-a az Unióban védett élőhelyeknek (Varga, 2007). A géntechnológiai úton módosított (GM) növények Európai Unióban történő engedélyezéséhez a környezeti hatásvizsgálatot minden biogeográfiai régióra el kell végezni (Európai Közösség, 2001).

Jelenleg egy kukoricamoly-rezisztens, GM-kukorica, a *MON 810* genetikai eseményt hordozó hibridek termesztése engedélyezett az Európai Unióban, míg másik három esemény (*DAS-01507*, *MON 89034*, *SYN-Bt11*) engedélyezése folyamatban van (GMO Compass, 2011). Az Amflora nevű, ipari célú GM-burgonyának van még vetési engedélye az EU területén, bár Magyarország peres úton akadályozta meg ennek az eseménynek a területén való vethetőségét. Az elsőgenerációs GM-növények rovarrezisztens változatai – melyek közé ezek a genetikai események tartoznak – a *Bacillus thuringiensis* Berliner (*Bt*) módosított/rövidített génjeit (*cry1*, *cry2*, *cry3*) stb. hordozzák. A *Bt* baktériumok – több más toxin között – δ -endotoxinokat (Cry-toxinok) termelnek, melyek érzékeny rovarokfajok lárváin fejtik ki ölő hatásukat; s e természetes eredetű toxinok alapján a különböző *Bt* szerotípusok (patotípusok) szelektivitása általában rovarrend-szintű. A Cry-toxintartalmú rovarölő szerek kitűnnek a többi növényvédő szer közül környezetbarát voltukkal (Darvas *et al.*, 1979). Ezen ismeretek alapján azzal a céllal állítottak elő a génállományukban módosított *Bt*-növényeket, hogy a növény maga termelje a védekezéséhez szükséges ágenszt (Darvas, 1997). A transzgenikus növények esetén a transzgén egy távoli rendszertani egységből származik. Ciszgenikus növény esetén az új tulajdonságot azonos vagy azzal kereszteződő fajból származó gén hordozza. Intragenikus fajtáknál ezen túlmenően a génexpresszió módosításáról is szó van. Ilyen típusú, a gyakorlat számára fontos GM-növényt azonban még nem állítottak elő. Az engedélyezett illetve engedélyezés alatt lévő kukoricavonalak a *Bt* módosított génjeit tartalmazzák, konstitutív promóterrel ellátva, miáltal ezen növények minden részükben Cry-toxin(oka)t termelnek (US EPA, 2001; GMO Compass, 2011).

Az elmúlt tíz évben számos tanulmány látott napvilágot a *Bt*-növények potenciális környezeti hatásairól, de ezeket általában kritikák érték. A témában széleskörű szakmai és társadalmi véleményvita kezdődött, mely oda vezetett, hogy Európa több államában kritikusan állnak a GM-növények vetéséhez. Ausztria (1999 – *MON 810*, *MON 863*, *T25*),

Magyarország (2005 – *MON 810*), Görögország (2005 – *MON 810*), Franciaország (2008 – *MON 810*), Románia (2008 – *MON 810*), Németország (2009 – *MON 810*) és Luxemburg (2009 – *MON 810*) egyes genetikai eseményt hordozó fajtákra hirdetett elővigyázatosság címén vetési tilalmat (Darvas és Székács, 2010). Rajtuk kívül Lengyelország (2006), Olaszország (2006) és Bulgária (2010) általános moratóriumot vezetett be. Az elhatározások azonban a gyakorlattal nem mindig voltak összhangban, például Lengyelország és Románia esetében.

A növényvédő szereknél általánosan elfogadott mellékhatás-vizsgálatok ezen fajták esetében sem elhanyagolhatók, mivel a *Bt*-növényekkel ugyanúgy növényvédő hatású hatóanyagot juttatunk a környezetbe: igaz, speciális formulációban (Darvas és Székács, 2010). Sőt, a Cry-toxintartalmú növényvédő szerekkal szemben ezek a növények a Cry-toxin(ok) kurtított, preaktivált formáját termelik, amely a növényi sejtbe van zárva, így lebomlása annak függvénye (Székács és Darvas, 2007). Bár a *MON 810* fajtacsoportot az amerikai kontinensen már több mint tíz éve termesztik, kevés adattal rendelkezünk a növény szerveiben termelődő toxin mennyiségéről, annak állandóságáról illetve biológiai variabilitásáról. A hibridfajta-előállítás során a módosított vonalat különböző, nagy termőképességű fajtával keresztezik, hogy az adott termőhelynek megfelelő hibrid kerülhessen forgalomba. A GM-fajták engedélyezése az EU gyakorlatában genetikai esemény szintű. Nincs ez másként az Egyesült Államokban sem, ahol a jelentős mennyiségű kibocsátás és nagy volumenű termesztés ellenére fajtákra lebontott vizsgálatok nem születtek.

A Cry-toxinok specifikitásából adódik, hogy általánosságban minden, a célkártevővel azonos rendbe tartozó rovarlárvára hatással lehetnek. Így a célkártevők mellett vizsgálni szükséges a nem célzott, rokon állatfajokra kifejtett hatásokat is. A *MON 810* által termelt, lepkefélékre specifikus ~Cry1Ab-toxin a növény minden szervében termelődik, beleértve a pollent is, ami elsodródva más növényekre rakódhat, s a kártevővel egy rendbe tartozó nem célzott kártevőre (Bánáti *et al.*, 2010; Darvas *et al.*, 2010a, 2010b) vagy védett hernyókra (Darvas *et al.*, 2004; Lauber *et al.*, 2007; 2010a; 2010b) is hatással lehet.

Eredményeinket összevetve a szakirodalmi adatokkal új megvilágításba helyezzük a növényi Cry1-toxin mérését, és következtetéseket teszünk a *MON 810* kukorica védett lepkéket érintő környezeti hatásairól, mely a hazai fajtaengedélyezés számára lehet hasznos.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink célja volt:

- Összehasonlítani a Cry1Ab-toxin mérésére forgalmazott *ELISA* kiteket a toxin aktív formájának mérésére való alkalmazhatóságukban, illetve egyazon biológiai minta mérhető toxintartalma szempontjából;
- *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukoricában meghatározni szervenként a termelődő Cry1-toxin mennyiségét, követni annak szezonális alakulását a növény különböző részeiben, és azonos termőhelyen történő több évnvi termesztés nyomán összehasonlítani a toxin kifejeződésének mértékét;
- Felmérni a pollen termelődését és eloszlását a *MON 810* kukoricahibrid és annak izogenikus vonala esetén;
- Elvégezni/folytatni a magyarországi védett lepkefajok analízisét, kiemelve a *MON 810* kukorica által potenciálisan érintett fajokat;
- Több védett lepkefajnak (*Nymphalis c-album*, *Nymphalis io*, *Vanessa atalanta*) meghatározni a Cry1-toxin érzékenységet, és ezt összevetni a két kukoricát károsító lepkefaj, a kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis*) és a gyapottok bagolylepke (*Helicoverpa armigera*) lárváinak Cry1-toxin érzékenységevel;
- Kiválasztani egy modellt fajt (*N. io*), s vizsgálni annak lárváin a természetes pollenszóródás nyomán jellemző pollenkoncentráció hatását rövidebb (L1-L3) és hosszú távú (L1-L5) kitettség nyomán.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. *Bacillus thuringiensis* Berliner

A *Bacillus thuringiensis* (Bt) környezetünkben általánosan – patogénként rovarokban illetve talajban – jelen lévő, aerob, Gram-pozitív, endospóráképző, rovarpatogén baktérium. Selyemlepke (*Bombyx mori* L.) hernyójából izolálták 1901-ben, majd 1915-ben Berliner írta le egy kártevő fajból, így került növényvédelmi alkalmazásának lehetősége a középpontba (Darvas *et al.*, 1979; Hilbeck és Schmidt, 2006). A legtöbb *B. thuringiensis* törzs sporulációja során parasporális testet formál, amely δ -endotoxin(ok)ból és néhány esetben parasporinból áll. Utóbbit nemrég fedezték fel, s a rákkutatásban nyert jelentőséget, mivel sejtlöő hatást mutat rákos sejteken (Crickmore *et al.*, 2009). A vegetatív fázisban többféle exotoxin (α -, β -, M- stb.) és Vip-toxinok (*vegetative insecticidal protein*) is termelődhetnek (Bravo *et al.*, 2007; Crickmore *et al.*, 2009). A gyakorlatban felhasznált törzsek (illetve a formulázott készítmények) nem tartalmazzak β -exotoxint (másképp: thuringiensin; hőstabil adeninnukleotid, amely az RNS-polimeráz gátlója), mivel azt súlyos mellékhatásai – mutagén és teratogén – miatt kizárták a hasznosításból (Darvas, 1999).

A δ -endotoxinoknak két nagy csoportja ismert: a Cry (*crystalline*)- és Cyt (*cytolytic*)-toxinok, melyek pórusképző hatásúak a célsejtek membránján. A Cry-toxinok három doménes, szerkezetileg hasonló vegyületek, fehérjealegységeik: egy α -hélix (1. domén), mely a membránba épülésben és a pórusképzésben játszik szerepet; egy β -lemezekből felépülő egység (2. domén), melynek a receptorhoz kötődésben van szerepe és magáért a toxikus hatásért felelős; valamint egy további β -lemezekből felépülő egység (3. domén), melynek a receptor-felismerésben és az ioncsatorna nyitásában van szerepe (Shnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2007). A Cyt-toxinok esetében 2 α -hélix vesz körül egy β -lemezt, egy egyszerű α - β domént alkotva (Bravo *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007). A Cry-toxinok túlnyomó része speciális középbeli receptorokhoz kötődve, míg a Cyt-toxinok a membránlipidekkel közvetlen kapcsolatba lépve formálnak pórusokat a sejthártyán (Bravo *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007).

A *B. thuringiensis* törzseket eredetileg morfológiai és biokémiai tulajdonságaik, később a vegetatív sejtek flagellumainak H-antigénjei alapján osztályozták kombinálva azokat a biokémiai tulajdonságaikkal, mivel vannak flagellum nélküli törzsek is (van Frankenhuyzen, 1993; Schnepf *et al.*, 1998). Ez idáig 69 különböző szerotípust és 13 alcsoportot különítettek el, s így 82 szerovariánst (patotípust) írtak le (Lecadet *et al.*, 1999). Több *B. thuringiensis* törzs többféle toxint is termel, pl. a *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD-1 törzs Cry1A (a, b, c), Cry2A- és Cry2B-toxinokat (Lisansky *et al.*, 1997). Hogy egységesítsék a rendszerbe sorolást, a legújabb szekvencia adatok alapján megállapított filogenetikai rokonság szerint

újraosztályozták a Cry-toxint termelő géneket és az általuk termelt toxinokat. A napjainkig leírt 179 Cry- és 9 Cyt-toxint a gének illetve a fehérje elsődleges szerkezeti hasonlósága (aminosav-szekvenciájuk) alapján 55 (Cry1 – Cry55) illetve 2 főtypusba (Cyt1 – Cyt2), és több altípusba sorolták (pl. Cry1Aa, Cry1Ba) (Crickmore *et al.*, 1998; 2009). Emellett több olyan toxin is ismert, melyeknek a felsoroltaktól eltérő a szerkezete. Ilyenek a bináris szerkezetű Bin (*binary*) és az Mtx (*mosquitocidal*) típusú Cry-toxinok, valamint a Vip-toxinok (Bravo és Soberon, 2008). A *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* tartalmú készítményekben előforduló Cyt-toxinok citolitikus és hemolitikus aktivitást mutatnak, és főleg kétszárnyú (Diptera) lárvákra hatnak önmagukban, illetve Cry-toxinokat szinergizálva (Bravo *et al.*, 2007; Gómez *et al.*, 2007).

A Cry-toxinok *per os* típusúak, és gyakorlati szempontból rendszintű specifitást mutatnak. Ennek alapján öt csoportba oszthatók: Cry1 – főként lepkefélék (*kurstaki*, *thuringiensis*, *aizawai*, *entomocidus* stb.), Cry2 – elsődlegesen lepkefélék és kétszárnyúak (*kurstaki*), Cry3 – leginkább bogárfélék (*tenebrionis*, *morrisoni*, *san diego* stb.), Cry4 – kétszárnyúak (*israelensis*) lárváin hatást kifejtő, Cry5 – főként fonálférgekre ható specifikus fehérjetoxinok (Darvas *et al.*, 1999; Crickmore *et al.*, 2009; van Frankenhuyzen, 2009).

A számunkra fontosabb Cry-toxinok hatása, több lépésben, a rovarok közepbelében a sejtek líziséhez vezet. A rovarok belébe kerülő protoxin ~70-130 kDa tömegű. Szerkezetét diszulfidhidak erősítik, ezért nehezen bomlik. Ezeket a középbél proteázai (tripszin, kimotripszin stb.) kb. 55-65 kDa méretű aktív toxinokra darabolják. A folyamat élettani körülmények között magas, 10-11-es pH-jú közegben megy csak végbe. A Cry-toxin (lektin természetű fehérje) a bélhám sejthártyájában található specifikus receptorával való reverzibilis kötődés hatására oligomerizálódik. Ez az oligomer azután irreverzibilisen kötődik, majd beékelődik a lipidmembránba, megzavarva a sejt ionháztartását, és így pórusokat nyit a sejthártyán. A bél perisztaltikája ennek következtében leáll, és a rovar felhagy a táplálkozással (Schnepf *et al.*, 1998; Bravo *et al.*, 2007). A keletkező mikrosebzéseken jut be a lárvák testüregébe a *B. thuringiensis* vegetatív teste, de a kialakuló szepszist ekkor már bármely, a bélben élő mikroorganizmus elő tudja idézni. Ez a tény vezetett el a csak Cry-toxint tartalmazó készítmények sikeres használatához, illetve később a *Bt*-növények kifejlesztéséhez, hiszen a letális hatáshoz a Cry-toxin jelenléte is elégséges, nincs szükség a *B. thuringiensis* baktériumra (Broderick *et al.*, 2006). Néhány rovarfaj esetén az ionháztartás felborulása is elegendő a pusztuláshoz vezető paralízishez (van Frankenhuyzen, 1993). A rovarfajok érzékenysége eltérő egy adott toxinnal szemben, és a különböző toxinoknak is eltérő a hatékonysága egy adott fajra nézve.

3.1.1. A DIPEL felhasználása a világban és Magyarországon

A *Bt*-készítmények alkalmazása 1938-ban kezdődött. Az akkor alkalmazott SPOREINE márkanevű készítmény még a *B. thuringiensis* serovar. *thuringiensis* patotípusát tartalmazta. Dulmage izolálta 1970-ben a *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD-1 törzsét, mely 2-200-szor hatékonyabbnak bizonyult mezőgazdasági kártevőkkel szemben, mint a *thuringiensis* (van Frankenhuyzen, 1993). Ez kitágította a *Bt*-készítmények alkalmazásának lehetőségeit, s a legtöbb készítmény azóta is a *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* törzsét tartalmazza. A HD-1 törzsből fejlesztette ki az Abbott laboratórium is a DIPEL készítményt. A kereskedelmi forgalmazás következő lépése a hatékonyság standardizálása volt, melyet először a spóratartalom alapján végeztek, ami azonban nincs egyértelmű kapcsolatban a toxicitással. Ezért e helyett a rovarölő aktivitást rovarteszteken alapuló biológiai egységben fejezték ki, mely megteremtette az alapot a manapság is használatos *International Units* (IU – Nemzetközi Egység, NE) használatához, amit azóta az összes *Bt*-készítmény esetén alkalmaznak (van Frankenhuyzen, 1993). A 80-as évektől a *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* alapú – szúnyogféléken (Diptera), mint vektorok ellen hatásos – készítmények ismét a *Bt*-szerekre irányították a figyelmet, mely tovább nőtt a bogárféléken (Coleoptera) hatásos törzsek megismerésével. Ugyanebben az időszakban az *ultra low volume* (ULV) kijuttatási technológia alkalmazásával a DIPEL az erdészeti kártevőkkel szembeni védekezés kulcsfontosságú elemévé vált. Utóbbi ellenére még mindig a mezőgazdasági alkalmazása a legjelentősebb, mivel erdészeti kártevők ellen csak gradáció idején védekeznek.

Magyarországon a hetvenes évek végén lezáródtak a *Bacillus thuringiensis* tartalmú készítményekkel kapcsolatos hatékonyságvizsgálatok (Darvas *et al.*, 1979), és hazai gyártásra is történtek próbálkozások. Ennek ellenére a kilencvenes évek elején a 0,05 %-ot sem érte el a DIPEL felhasználása az összes rovarölő szerhez viszonyítva. Az értékesített mennyiség 1995-re megduplázódott, majd az ezredfordulóra 0,4 %-ig emelkedett. Azóta lassú tendenciájú csökkenés jellemzi a felhasználást, melyben a más hatóanyagcsoportba tartozó rovarölő szerek mennyiségének növekedése áll (AKI, 1991-2003). Mindeközben a *Bacillus thuringiensis* készítményekből a világ biopeszticid piaca 2004-re elérte a 2 %-ot, s a prognózisok szerint rövidesen eléri a 4-5 %-ot (Bailey *et al.*, 2010).

3.1.2. A *Bt*-növények felhasználása a világon és Európában

2010-ben 148 millió hektáron termesztettek GM-növényeket (James, 2010). Európa ennek ellenére határozottan elutasító álláspontra helyezkedett a GM-növények vetésével kapcsolatban. 2009-ben GM-növényeket tekintve az Unió területén az előző évhez képest 12%-kal kisebb területen, 95 ezer hektáron termesztettek GM-kukoricát (~Cry1Ab-toxint

termelő, kukoricamoly-rezisztenciával rendelkező *MON 810* hibrideket), ami a világ GM-növénytermesztésének 0,7%-e. Ez a kereskedelmi adat – beleszámítva a francia és német termesztés beszüntetését – méltán nevezhető az elsőgenerációs, növényvédelmi célú GM-növények legjelentősebb eddigi kudarcának (Darvas *et al.*, 2009; James, 2010; Darvas és Székács, 2010).

Az elsőgenerációs GM-növények közül jelenleg 130 egyszeresen vagy többszörösen módosított GM-fajtacsoport halad az Európai Unió engedélyezésének útján (Darvas *et al.*, 2009). Az engedélyek közül csak négy vonatkozik vetésre (kibocsátásra): burgonya-fajtacsoportok közül ilyenrel rendelkezik az *EH 92-527-1* (Amflora néven ismert), kukorica fajtacsoportok közül a *MON 810* (YieldGard néven ismert) és *ACS-ZM3-2* (*T25* néven ismert), valamint szegfű fajtacsoportok közül a Moonshadow 1. Megemlíthetők a kukoricamoly-rezisztens *DAS-01507*, a kukoricabogár-rezisztens *MON 863* és *DAS-59122*, valamint a *glyphosate*-tűrő *NK603* (*MON 603*) és *GA21* (*MON 21*) fajtacsoportok, melyeket engedélyeik szerint takarmányozásra és élelmiszerként lehet felhasználni, illetve terményként importálni és iparilag feldolgozni. A kukoricamoly-rezisztens *BT11* (*SYN-BT11*) fajtacsoport engedélye takarmányként és élelmiszerként való felhasználásra korlátozódik (Darvas *et al.*, 2007b; GMO Compass, 2011). Ezekben az esetekben a környezetbiztonsági dokumentációrészek még nem kerültek az EU hatóságainál (*EFSA*) elfogadásra.

Az európai engedélyezésben a *Bt*-fajtacsoportok gyapotban (ez hazánk szempontjából nem lényeges), kukoricában (10 genetikai esemény, közülük egy visszavont) és szójában jelentek meg (1. táblázat). A fajták a Monsanto, a Pioneer/Dow/DuPont és a Syngenta kereskedelmi körébe tartoznak. Magyarországon az európai engedéllyel rendelkező *MON 810* kukorica-fajtacsoport vetésére moratórium van érvényben, így eddig hazánkban csupán szigorúan ellenőrzött, kísérleti célú kibocsátások történtek.

Az Európán kívül kiadott engedélyezésben a *Bt*-burgonya és további *Bt*-kukorica fajtacsoportok is ismertek. A Monsanto Cry3A-toxint termelő RUSSET BURBANK/NEWLEAF (eseményszám: *RBBT02-06* és *SPBT02-05*) nevű burgonyabogár-rezisztens burgonyafajtái 1995-től 2001-ig az Egyesült Államokban és Kanadában voltak forgalomban, de az élelmiszer-feldolgozók tetszését nem nyerték el. 1999 és 2000 között az Aventis (hasonló a Bayer és Pioneer érdekkörébe is tartozik) *CBH-351* eseményszámú STARLINK kukorica fajtacsoportját, ami Cry9C-toxint termelt, csak takarmányozási célra engedélyezték (Castle *et al.*, 2006). Az élelmiszerekben való előfordulása után azonban a piacról visszavonásra került, kiváltképpen hogy allergén hatásának felmerülése miatt széleskörű társadalmi vita kezdődött. E fajtacsoportok be sem kerültek az észak-amerikainál lényegesen óvatosabb európai

engedélyezési rendszerbe. A *DBT418* (DKB-89614) eseményszámú Cry1Ac-t termelő kukorica BT-XTRA (DeKalb) néven került Európán kívül forgalomba (Takács *et al.*, 2009).

1. táblázat: Európában engedélyezési folyamat alatt lévő *Bt*-növények 2011-ben

Növény	GM-fajtacsoport	Felhasználás	Gén	Márkanév
gyapot	<i>MON 15985</i>	Hernyórezisztens	<i>cry1A+cry2A+nptII</i>	BOLLGARD II
	<i>MON 531</i>	Hernyórezisztens	<i>cry1A+nptII</i>	BOLLGARD
	<i>DAS-21023 x DAS-24236</i>	Hernyórezisztens+glufosinate-tűrő	<i>cry1A+cry1F+pat</i>	WIDESTRIKE
kukorica	<i>DAS-01507</i>	Hernyórezisztens+glufosinate-tűrő	<i>cry1F+pat</i>	HERCULEX I
	<i>DAS-59122</i>	Bogárrezisztens+glufosinate-tűrő	<i>cry34A+cry35A+pat</i>	HERCULEX RW
	<i>MON 810</i>	Hernyórezisztens	<i>cry1A</i>	YIELDGARD CB
	<i>MON 863</i>	Bogárrezisztens	<i>cry3B+nptII</i>	YIELDGARD RW
	<i>MON 88017</i>	Bogárrezisztens+glyphosate-tűrő	<i>cry3B+cp4-epsps</i>	YIELDGARD RW/RR2
	<i>MON 89034</i>	Hernyórezisztens	<i>cry1A+cry2A</i>	YIELDGARD VT PRO
	<i>SYN-BT11</i>	Hernyórezisztens	<i>cry1A+pat</i>	AGRISURE CB
	<i>SYN-EV176</i>	Hernyórezisztens+glufosinate-tűrő	<i>cry1A+bla</i>	NATURGARD, KNOCKOUT
	<i>SYN-IR604</i>	Bogárrezisztens	<i>cry3A+pmi</i>	AGRISURE RW
	<i>SYN-IR162</i>	Hernyórezisztens	<i>vip3A+pmi</i>	MIR162
	<i>MON-87701</i>	Hernyórezisztens	<i>cry1A</i>	-

Megjegyzés: A szürkével kiemelt visszavonásra került.

A *Bt*-növények új generációja több *cry*-gént is tartalmaz, több azonos specifitású toxin termelése révén lassítva a rezisztens kártevők megjelenését (pl. BOLLGARD II, WIDESTRIKE, YIELDGARD VT PRO stb.). Különböző rovarrendekre specifikus Cry-toxinok egyidejű termelése a kártevők szélesebb körével szemben biztosít ellenállóságot (pl. HERCULEX XTRA, YIELDGARD VT TRIPLE PRO).

A *Bt*-fajtacsoportok kereskedelmi nevei – miközben egyszerűsítésre törekednek – sokféle téveszthetőségre adnak alkalmat. A YIELDGARD név például kezdetben nemcsak a *MON 810*, de a *SYN-BT11* fajtacsoportok jelölésére is használatban volt, miközben különböző tulajdonosaik voltak. Mára ez a név a Monsanto Cry1-termelő fajtacsoportjait jellemzi, míg a Syngenta az AGRISURE márkanévet használja. A Pioneer a fajtáit többnyire HERCULEX névvel forgalmazza. A márkanév után következik a lényegi specifikáció, amelyben a *CB* (*corn borer*) kukoricamoly-, míg az *RW* (*rootworm*) kukoricabogár-rezisztens fajtacsoportokat jelöl. Találkozhatunk azonban *glufosinate*-tűrés jelölésére az *LL* (*Liberty-link*), míg a *glyphosate*-tűrés jelölésére a *GT* (*glyphosate-resistant trait*) valamint *RR* (*Roundup Ready*) jelöléssel is. Több transzgént tartalmazó eseménynél (*stacked event*) a *VT* (*VecTran*) jelölés is terjed (Takács *et al.*, 2009).

3.2. A *MON 810 Bt*-kukorica és a DIPEL főhatásai és mellékhatásai

Főhatáson a kártevőkkel (célszervezetekkel) szemben kifejtett hatásokat értjük; míg mellékhatásként könyvelődik el minden egyéb hatás, mely a főhatáson túlmenően jelentkezik: ezeket elsősorban környezeti illetve egészségügyi szempontok szerint vizsgálják.

3.2.1. A *MON 810 Bt*-kukorica főhatásai és alkalmazásának előnyei

A *MON 810* kukorica DNS-ébe a *B. thuringiensis* toxintermelésért felelős *cryIAb* génjének módosított változatát ültették, miáltal a növény maga termeli a védekezéséhez szükséges ágenst. Az eredeti *cryIAb*-gén által termelt fehérje 131 kDa méretű, amit a toxin megfelelő szintű termelődésének elősegítése végett a gén módosításával 91 kDa-ra kurtítottak (CFIA, 1997). A módosított gént a működéséhez szükséges megfelelő genetikai elemekkel látták el (2. táblázat). A bevitt *~cryIAb* génkonstrukció tartalmazza a karfiol-mozaikvírus (*cauliflower mosaic virus*; CaMV) 35S promóterét, mely a gén magas szintű expresszióját teszi lehetővé; a kukorica *hsp70* gén intron szakaszát, mely a transzkripciót segíti és az *Agrobacterium tumefaciens* (gyökérgolyva) baktérium *Ti* plazmidjának nem kódoló NOS 3' szekvenciáját, mely poliadenilációs jelet biztosít az átíródás megállításához (ANZFA, 2001). A módosított *~cryIAb*-gén eredeti 37 %-os guanin-citozin tartalmának megnövelése 49-65 %-ra (kodon-optimalizáció) magasabb génexpressziót biztosít (Heszky, 2005).

2. táblázat: A *MON 810* kukoricavonal módosításához használt genetikai elemek (ANZFA, 2001 nyomán)

	Gén	Promóter	Intron szakasz	Terminátor szekvencia
A genetikai elem neve	<i>cryIAb</i>	E35S	<i>hsp70</i>	NOS 3'
A szekvencia eredete	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>cauliflower mosaic virus</i>	<i>Zea mays</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>

A beültetett génkonstrukció révén a kukorica minden részében módosított, lepke-specifikus *~CryIAb*-toxint termel, s így elpusztítja az arra érzékeny kártevő lárvák jelentős részét (Musser *et al.*, 2006). A permetező szerhez képest a *Bt*-növények folyamatos védelmet biztosítanak a célkártevő(k) ellen. Ez azonban azt is jelenti, hogy a növényben a Cry-toxin a kártevő megjelenésétől és aktuális népességdinamikai jellemzőitől függetlenül, a növénybe ültetett génkonstrukció és a növény genetikai programja által szabályozott mértékben folyamatosan termelődik, s ezzel állandó környezeti terhelésként van jelen. A növényi részekben a hatóanyag nincs kitéve olyan környezeti hatásoknak (UV-fény és eső), melyek csökkentik a hatékonyságát. A növényi sejt fala tehát egyfajta kapszulaként védi.

Előnyként szokták említeni, hogy a *Bt*-növények alkalmazása elejét veszi a széles hatásspektrumú rovarölő szerek használatának (Musser *et al.*, 2006), ez azonban hazánkban és

a kukoricamoly-rezisztens árukukorica fajtacsoportokra nem igazolható. E kártevő előfordulása tíz évenként egyszer, általában az ország déli részein és csak foltokban jelentősebb. További probléma, hogy a károsítás idején a kukorica túlságosan nagy és így a permetezése, a permetlé megfelelő penetrációja a megfelelő levélemeleti szintre nem valósítható meg, így a gazdák nem védekeznek (Darvas *et al.*, 2007a). Hazánkban ugyanezért nem igazolható a permetezési költség csökkenése sem.

A fajtatulajdonosok előnyként említik a hernyókártétellel együtt a *Fusarium*-fajok okozta csőfertőzések előfordulásának csökkenését is. A hazai vizsgálatok ezt pontosították, amennyiben a *Fusarium* fertőzésnek csupán egy kisebb hányada hozható összefüggésbe a *H. armigera* és *O. nubilalis* lárvákkal. A lárvák az ürülékükkel terjeszthetik a *Fusarium* mikrokonídiumait (Bánáti *et al.*, 2010, Darvas *et al.*, 2010a, 2010b, 2010c). Azonban a *Fusarium* fertőzés – melynek összetétele az adott terület *Fusarium* fajösszetételét tükrözi – látható tüneteinek mértéke nem feltétlenül arányos a mikotoxin-tartalommal. A mag fertőződése egyébként nem csak felületi sérüléseken (pl. rovarrágáson) át, hanem a bibén keresztül is bekövetkezhet, melyre bizonyos *Fusarium* fajok nagyobb hajlamot mutatnak. Így némely mikotoxinok, például a zearalenon mennyisége nem követi a hernyók kártételének alakulását (Folcher *et al.*, 2009). *Bt*-kukorica (*MON 810* és *SYN-EVI76* fajtacsoportok) esetén a vizsgált mikotoxinok csupán egy részének a változó mértékű csökkenését tudták igazolni (Papst *et al.*, 2005).

Összességében a terméshozam növekedését szokták említeni a *Bt*-növények legfontosabb hasznaként (Betz *et al.*, 2000), ám ez Cry1-kukorica esetén a kukoricamoly-kártétel függvénye, s mivel e kártétel hazánkban nem jelentős, így a terméshozam is változatlan marad. Az OMMI (ma MgSzH) ún. *DUS* vizsgálatai 0-5% esetleges termésnövekedést jeleztek az ún. izogenikus vonalhoz képest (Füsti Molnár, 2007). Kétségtelen azonban, hogy a *MON 810* sikeresen akadályozza meg a kukoricamoly szárkártételét, míg a csőkártételt jelentősen csökkenti (Darvas *et al.*, 2010c).

3.2.2. A *MON 810 Bt*-kukorica mellékhatásai és alkalmazásának hátrányai

A géntechnológiai úton módosított *Bt*-növényekre automatikusan nem vonatkozik a természetes *B. thuringiensis* törzseken szerzett tudásunk. A bevezetés/használat alatt álló *B. thuringiensis* toxint termelő növényekkel kapcsolatban több probléma is felmerül.

3.2.2.1. Ökológiai hatások

Transzgén-elszabadulás

A GM-növények használata során sarkalatos probléma a génmegszökés/génáramlás kérdése. Horizontális géntranszfer esetén a transzgén kikerül az emberi kontroll alól (pl. baktérium spontán DNS-felvétele, baktérium-konjugáció). A vertikális génáramlás során a transzgén pollen segítségével átkerül valamilyen más növényre (faj- és fajtahibridek). Az intraspecifikus hibridképződésnél a *cry*-gént is tartalmazó pollen átkerül más fajták virágára. Interspecifikus hibridképződésnél rokonnövények beporzására kerül sor és ennek főként az adott faj géncentrumában nagy az esélye (nálunk például a repce érintett). A keresztbeporzás lehetősége idegen megporzású növényeknél – legyen az akár fakultatív, mint a kukoricánál – hatványozottan jelentkezik (Darvas, 1997; Aylor *et al.*, 2003). A hibridizáció megelőzését biztosító izolációs távolság rovarmegporzás esetén jelentősen nőhet; kukoricánál a kukoricabogár mindkét nemű virágon való táplálkozása okoz kiemelkedő problémát. Ezen kívül nem csak méhfélék porozhatnak, hanem egyéb rovarcsoportok (pl. legyek, hangyák stb.) is, amelyek ilyen tevékenységéről igen keveset tudunk (Darvas és Lövei, 2007).

A fizikai génmegszökés során a GM-növény vetőmagja vagy valamilyen reprodukcióra képes szerve (gumó, hagyma, hajtás, gyökeres hajtás stb.) a termesztési technológia valamelyik fázisában keveredik a hagyományos fajtával (Heszky, 2007). Mivel a GM- és nem-GM-magvak, szaporítóanyagok, növények szemmel nem megkülönböztethetők, a tényleges keveredés, illetve mentesség kimutatása csak műszer- és költségigényes módszerekkel lehetséges. A fizikai keveredés megelőzése párhuzamos művelő eszközök és raktárak kiépítését teszi szükségessé. A törvényi szabályozás (koegzisztencia törvény) az ökológiai, a hagyományos és a GM-fajták egyidejű vetőmag- és árutermesztésének feltételeit igyekszik egy adott területen megteremteni úgy, hogy a hagyományos termények maximálisan 0,9 %, a biotermények 0,0 % transzgént tartalmazzanak (Heszky, 2007). Mindez nem vonatkozik a vetőmagtermesztésre, amelyre az EU-ban nincsen elfogadott határérték. Kellő izoláció nélkül a DK-440 BTY által beporzott hagyományos fajtának a szemeiben már abban az évben harmadmennyiségű toxin található (Székács és Darvas, 2007), ami veszélyezteti az ökológiai és hagyományos termékminőséget is. Idegenbeporzás esetén a koegzisztencia megvalósítása hosszú távon ökológiai értelemben nem megvalósítható (Darvas, 2005; Darvas *et al.*, 2009), tehát hasznosítás esetén az idegen beporzású növényekbe épített transzgenek kellőképpen nem ellenőrizhető elterjedése várható.

Cry-toxintermelés, tarlómaradványok és talajélet

A permetezéssel járó okszerű védekezéssel szemben a szakmai felügyeletet nem igénylő folyamatos védelem azzal jár együtt, hogy a növény akkor is termeli a Cry-toxint, amikor arra nincs szükség és olyan növényi részekben is, ahol fölösleges (Székács *et al.*, 2010a). A *MON 810* kukoricamoly-rezisztens kukorica például a gyökerében is jelentős mennyiségű Cry1-toxint termel (a levélben – ahol a kukoricamoly L1 stádiumában táplálkozik – mérhető mennyiség negyedét; Nguyen és Jehle, 2007), miközben a kukoricamoly (*O. nubilalis*) azt nem károsítja. A gyökérváladékkal a tenyészidőszak teljes ideje alatt kerül Cry-toxin a talajba. Ennek környezeti hatásairól alig tudunk valamit. A *MON 810* fajtacsoport a fejlődő kukoricaszemekben lényegesen kevesebb Cry1-toxint termel (kb. a tizedét), mint a levélben, így a gyapottok-bagolylepke (*H. armigera*) – kisebb részben kukoricamoly – lárvái által okozott csökártétellel szemben nem kínálhat olyan optimális megoldást, mint a kukoricamoly szárkártételére (Székács és Darvas, 2007; Darvas *et al.*, 2010c). Mindez viszont a *MON 810* kukoricák biztonságos minőségű szilázsként való felhasználásának kérdését veti fel.

A *Bt*-növények – a vegetatív részek tömegétől függően – nagy mennyiségű Cry-toxint termelnek meg hektáronként, mely a növényi sejtekbe zárva hosszú ideig megmarad (Székács és Darvas, 2007; Székács *et al.*, 2010b). Ennek hatása a tarlómaradvány lebontásában és a talajt alkotó mikrobiális közösség alakításában még nem ismert. Mérések szerint a tarlómaradvánnyal a talajba kerülő Cry-toxin 1-8 %-a mérhető vissza egy év múlva (Székács *et al.*, 2005). Ez nagy vegetatív tömeget termelő fajtáknál még mindig tetemes mennyiség lehet, ha a DIPEL-lel kivitt Cry-toxinmennyiséghez viszonyítunk. A Cry-toxinok felhalmozódására mutatkozik esély (tarlómaradványokban való perzisztencia), hiszen nagyüzemi viszonyok között a monokultúras kukoricatermesztést gyakran alkalmazzák. A felhalmozódás és a lepkelárvákon mérhető biológiai hatás talajtípus-függő mintázatot mutat (Tapp és Stotczky, 1998). Ezen kívül a területen termelődő összes Cry-toxin mennyisége, megoszlása a növényi szervekben, termelődés- illetve bomlásdinamikája, valamint egyéb abiotikus tényezők mind közrejátszanak a Cry-toxin megmaradó képességének (perzisztencia) alakulásában (Zwahlen *et al.*, 2003).

Bakonyi és munkatársai (2006) eredményei szerint a talajban élő egyes ugróvillás fajok kevésbé fogyasztják a Cry1-toxint tartalmazó kukorica maradványait a hagyományos kukoricához képest, illetve ezen a táplálékon a szaporaságuk is mérséklődik, mely részben magyarázhatja egy *MON 810* hibrid (DK-440 BTY) lassabb tarlómaradvány lebomlását.

Bíró és munkatársai (2002; 2005) szerint a *Bt*- és a közel izogenikus kukorica rhizoszférájában a kitenyészített mikrobacsoportok (heterotrófok, oligotrófok, spóráképzők és

mikroszkopikus gombák, közülük a faji összetételre is ellenőrzött *Trichoderma* sp.) száma is a módszertől és a tanulmányozott csoport tulajdonságaitól függő szezonális változásokat mutatott. Az összes mikrobatömeg fluoreszcein-diacetát hidrolízisével kimutatott nagyobb mértékű aktivitását a szerzők a *Bt*-kukorica eltérő élettani, ökofiziológiai tulajdonságaival magyarázták.

Hatás nem célzott állatokon

Nem célzott szervezetek táplálkozásuk során kerülhetnek kapcsolatba a *Bt*-növény által termelt Cry-toxinnal: fitofágok az elsodródott, tápnövényüket illetve életterüket szennyező pollen és növényi maradványok; ragadozók és parazitoidok a Cry-toxint elfogyasztó zsákmány- és gazdaállat; lebontó szervezetek a növényi maradványok; megporzó szervezetek viráglátogatásuk; szimbionta szervezetek kölcsönösségi kapcsolataik révén (Darvas és Lövei, 2006).

Kiemelkedő problémát jelent a célkártévő rokonsági körébe eső nem célzott fajok érintettsége. Losey és munkatársai (1999) irányították a figyelmet a *Bt*-kukoricásokban (SYN-EV176) élő gyomnövények leveleire tapadó toxintartalmú pollen mellékhatásaira. Üvegházi körülmények között, nagydózisú *Bt*-kukoricapollennel kezelték egy selyemkóró fajt (*Asclepias curassavica* L.; Asclepiadaceae). Ezt követően a pompás királylepke, *Danaus plexippus* L. (Danaidae) fiatal, de nem frissen kelt lárváinak csökkent táplálkozási intenzitásáról, fejlődési visszamaradásáról és növekvő mortalitásáról számoltak be. Az ezt követő kritika (Pimentel és Raven, 2000) jogosan kifogásolta, hogy a hatást kiváltó dózis nem volt pontosítva, különösen vonatkozik ez a táblaszegélytől távolabbi területekre, ahol csökkenő pollenborítottság feltételezhető. E hiányosság pótlásával először Jesse és Obrycki (2000) próbálkozott; szerintük a kukoricatáblán belül és annak háromméteres szegélyterületén növekvő selyemkórón hatásos pollendózisok előfordulhatnak. A *D. plexippus* az USA kukoricaövezetének jellemző, Mexikóban telelő faja. Szabadföldi felvételezések szerint például az iowai *D. plexippus* hernyók több mint fele kukoricatáblán belüli és azt övező selyemkórón táplálkozik (Oberhauser *et al.*, 2001). Több vizsgálatot végeztek Cry1-toxintartalmú *MON 810* kukoricapollennel *D. plexippus*-on illetve más lepkefajokon, ezek eredményeit a 3. táblázat összegzi. A szubletális hatások (kisebb lárvatömeg, lassabb fejlődés, kisebb báb- és imágótömeg) növelik az érintett egyedek, s közvetetten a populáció mortalitását. Egyfelől a lárvák mind időben, mind viselkedésükben kitettebbé válnak a ragadozóknak és parazitoidoknak, másfelől a kisebb imágótömeg gyakran rövidebb élettartammal és csökkent fekunditással társul (Dively *et al.*, 2004).

3. táblázat: Nem célzott lepkefajokon *MON 810* kukoricapollennel és -portokkal végzett vizsgálatok

Lepkefaj, lárvastádium	<i>MON 810</i> kukoricahibrid	Pollen dózis ^A [db/cm ²] (toxintartalom [ng/g])	Vizsgálat típusa	Kitettség időtartama [nap]	Hatás	Hivatkozás
<i>Papilio polyxenes</i> , L1	P34R07	26-210 (2,1 ^B)	Sz	7	33-80 % M ^c	Wraight <i>et al.</i> , 2000
<i>Papilio polyxenes</i> , L1	P34R07	1, 10, 100, 1000, 10 000 (2,1 ^B)	L	3	nincs hatás	Wraight <i>et al.</i> , 2000
<i>Danaus plexippus</i> , L1	P38G17, P34R07	150, 450, 750, 1300, 1600<	L	2	L↓ ^D	Hellmich <i>et al.</i> , 2001
<i>Danaus plexippus</i> , L1	P38G17, P34R07	18-26	Sz	5	nincs hatás	Stanley-Horn <i>et al.</i> , 2001
<i>Danaus plexippus</i> , L1	36-G32Bt	5-36, 11-116, 154-367	Sz	teljes pollenszórás	nincs hatás	Stanley-Horn <i>et al.</i> , 2001
<i>Danaus plexippus</i> , L1-5	Agropro 9355, Asgrow 730, Garst	6-72	Sz	teljes pollenszórás	nincs hatás	Jesse és Obrycki, 2003
<i>Danaus plexippus</i> , L1	-	~174	Sz	~10-12	25 % M, ^E F↓	Dively <i>et al.</i> , 2004
<i>Danaus plexippus</i> , L1	-	~158	Sz	~8-10	22 % M, ^E B↓, I↓	Dively <i>et al.</i> , 2004
<i>Danaus plexippus</i> , L1	P38G17	~171	L	10	nincs hatás	Anderson <i>et al.</i> , 2005
<i>Danaus plexippus</i> , L1	P38G17	~171 pollen/cm ² + 0,6 portok/cm ²	L	10	37 % M, ^E T↓	Anderson <i>et al.</i> , 2005
<i>Antheraea pernyi</i> , L1	-	100, 1000, 10 000	L	5	L↓ ^F	Li <i>et al.</i> , 2005
<i>Danaus plexippus</i> , L1 ^G	P38G17	1,2 portok/cm ²	L	2	L↓, T↓	Prasifka <i>et al.</i> , 2007

Megjegyzés: Ln – n-dik lárvastádium, Sz – szabadföldi, L – laboratóriumi, M – mortalitás, B↓ – csökkent bábtömeg, F↓ – lassabb fejlődés, I↓ – csökkent imágótömeg, L↓ – kisebb lárvatömeg, T↓ – csökkent táplálékfogyasztás, A – esetenkénti portok dózis külön feltüntetve, B – Agdia Cry1Ab ELISA kit (Agdia Incorporated, Elkhart, Ind.), C – nincs statisztikai összefüggés a pollenborítottsággal, D – 1000 pollen/cm² feletti összegzett eredmények, E – imágókéleség, F – 10 000 pollen/cm², G – kétnapos lárvák,

A nem célszervezetek közül a megporzásban való részvétele miatt kiemelkedő jelentőségű mézelő méh (*Apis mellifera* L.) lárváin az eddigi vizsgálatok eredményei szerint nem jelentkeztek akut toxikus hatások (Békési, 2005).

A kukorica nagy és gömb alakú pollenje viszonylag gyorsan kiülededik. Közel 80%-a kihullik az első hat méteren, bár még több száz méterre is jut belőle (Darvas *et al.*, 2004). Az élővizekbe került Cry-toxintartalmú pollen viszont igen hosszú utat is megtehet lebomlás nélkül. Egyesült államokbeli vizsgálatok szerint – ahol 2009-ben, a vizsgálat évében a termesztett kukorica 63 %-a *Bt*-kukorica volt – a termesztő területeken található élővizek 86 %-a volt szennyezett kukorica-maradványokkal. Az eredmények szerint a vízi körülmények közé került növényi sejtbe zárt ~Cry1Ab-toxin hat hónappal a betakarítás után is visszamérhető (Tank *et al.*, 2010). Rosi-Marshall és munkatársai (2007) vizsgálatai szerint a Cry1-toxintartalmú pollen és egyéb növényi törmelékek belépve a vízi ökoszisztémákba egyes tegzes fajok fejlődését hátráltatják, illetve mortalitásukat növelhetik. *Lepidostoma liba* (Trichoptera) esetén lassabb növekedést tapasztaltak *Bt*-kukorica tartalmú táplálék fogyasztásakor, bár a különböző vizsgált üledékevő ízeltlábúak abundanciájában, illetve

biomasszájában nem tapasztaltak különbséget a *Bt*- és a hagyományos fajták levélmaradványait tartalmazó vizek között (Chamber *et al.*, 2010). Böhn és munkatársai (2008) a vízminőség jelzésére gyakran használt vízibolhán (*Daphnia magna* Straus) mutatták ki a Cry1-tartalmú növényőrlemény fejlődést és szaporodást gátló hatásait. A hazai vizsgálatok akut toxikus hatást nem igazoltak, a hosszabb távú hatások vizsgálata még folyamatban van (Fejes *et al.*, 2010). Kerti barnacsigán (*Cantareus aspersus* Müller) végzett 88 hetes vizsgálatban a növekedési időszak végére a *MON 810* tartalmú táplálék és közeg hatására a kezelt állatok testtömege és héjuk növekedése visszamaradt (Kramarz *et al.*, 2009). Egyik vizsgált faj sem tartozik a Cry1-toxin által ismert érzékeny állatcsoportba.

Bt-kukoricás ízeltlábú fajösszetételének vizsgálatakor pókháló tartalmának vizsgálatával a jelenlévő rovarok szélesebb körét sikerült felvételezni, mint teljes kukoricanövények vizsgálatával. A két módszer eltérő érzékenységgű és szelektivitású a ragadozó fajokat illetően (Tóth *et al.*, 2004). Kóró törpepók (*Theridium impressum* L. Koch.; Theridiidae) hálójának vizsgálatakor nem találtak szignifikáns különbséget a hálók tartalmában *MON 810* (DK-440 BTY) és a közel izogenikus hibrid kísérleti parcellái között (Árpás *et al.*, 2004a; 2004b; 2005). A futóbogár fajok imágóinak igen nagy a mozgástere, s nem is tartoznak az elsődlegesen lepkefélék lárváira ható Cry1A-toxin hatáskörébe (Frankenhuyzen, 2009), így ezek száma kisméretű, 30x30 méteres kísérleti parcellákon szintén nem mutatott eltérést a *MON 810* illetve annak közel izogenikus fajtája esetén (Szekeres *et al.*, 2006).

Az eddigi környezeti hatásvizsgálatok eredményei nem mindenben támasztják alá Kiss és munkatársai (2004) állítását, miszerint a Cry1Ab-toxinnak nincs direkt toxikus hatása a nem célszervezetekre. A vizsgált ízeltlábú csoportok közül a leginkább érintett, a célkárttevő kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner) rokonsági körébe tartozó, a kukoricatáblák gyomnövényein élő lepkefajokra gyakorolt hatásokat nem vizsgálták.

Cry-toxinrezisztencia

A szubletális hatások hozzájárulhatnak a Cry-rezisztencia és -keresztrezisztencia kialakulásához. Laboratóriumi tenyészetben modellállaton (*Plodia interpunctella*) már a 10. nemzedék toleránsnak bizonyult a *MON 810* kukorica levélőrleményével szemben, mely a *Bt*-fajták várhatóan gyors lejárati idejére utal (Darvas és Lauber, 2007). Ez mind a hagyományos *Bt*-permetezőszerek, mind a *Bt*-növények használhatóságának elvesztéséhez vezethet, hiszen a *MON 810*-rezisztens lárvák DIPEL-lel szemben is toleranciát mutatnak (Darvas *et al.*, 2006b, Lauber *et al.*, 2009). A Cry1-rezisztencia menedzselésére izogenikus vonallal történő 20-50% arányú szegélyvetést ajánlanak a fajtatulajdonosok, ami az érzékeny kártevőnépességet fenntartja. Ez a módszer a rezisztencia kialakulásának késleltetését szolgáló módszerek közül

a szelekciós intenzitást csökkentők közé tartozik (Pap, 1990). Ez feltételezi a menedék Cry-toxinmentességét (érzékeny egyedek fennmaradását) és a Cry-rezisztencia recesszív öröklődését (a recesszíven rezisztens népességrész érzékenységét). Mára mindkét feltétel megdőlni látszik: a menedék hibridizáció útján Cry-toxinnal szennyeződhet (Chilcutt és Tabashnik, 2004); a Cry1-rezisztencia nem csak recesszíven öröklődhet (*O. nubilalis* – Huang *et al.*, 1999; *Plutella xylostella* – Sayyed *et al.*, 2000). E stratégia további érzékeny pontja a *Bt*-növény által termelt Cry1-toxin mennyisége, mely csak bizonyos szint felett okoz megfelelő mértékű mortalitást (vö. szelekciós nyomás), különösen azon heterozigóták között, amelyekben a rezisztencia nem recesszíven öröklődik (Sayyed *et al.*, 2003). A rezisztens egyedek Cry1-toxintartalmú táplálékon kezdetben hosszabb ideig fejlődnek, mint az érzékeny egyedek Cry1-toxinmentesen (Darvas *et al.*, 2005), ami a két csoport szaporodását időben teljesen elkülönítheti, a remélt hibridizáció nélkül. Ez úgyszólván a kártétel állandósulását jelenti, hiszen jelentős területrészen a kártevő tenyésztése folyik. További probléma, hogy a szegélyen csökkent Cry1-tartalmú csövek keletkeznek, s ez a szubletális hatáson keresztül a rezisztencia kialakulását segíti (Fónagy *et al.*, 2010).

A rezisztencia kialakulását különböző Cry-toxinok egyidejű alkalmazásával is igyekeznek lassítani. Ezzel a keresztrezisztencia vizsgálata kerül előtérbe, melynek alakulása függ a toxin-receptor kapcsolat specifikitásától. Káposztamoly (*P. xylostella*) lárvák esetén legalább négyféle Cry-receptort különítettek el; a Cry1Aa-, a Cry1Ba- valamint a Cry1Ca-toxinoknak külön-külön egyedi kötőhelyük (is) van, míg a negyedik receptorhoz a Cry1Aa-, Cry1Ab-, Cry1Ac-, Cry1Fa- és Cry1Ja-toxinok megosztva kötődnek (Ferré és Van Rie, 2002). Mindez azonban nem, vagy csak részben magyarázza, hogy a Cry1C-rezisztens *P. xylostella* lárvák erős keresztrezisztenciát mutattak Cry1Ab-, Cry1Ac- és Cry1F-toxinok (utóbbi kettőt lásd WIDESTRIKE) esetében. Alacsony és közepes keresztrezisztencia volt kimutatható Cry1Aa- és Cry9C-toxinok (utóbbi látst STARLINK) adagolásakor. Keresztrezisztencia nem jelentkezett Cry1Bb, Cry1Ja és Cry2A (utóbbi látst BOLLGARD II, YIELDGARD VT PRO) esetében (Liu *et al.*, 2001). A rezisztencia hátterében álló különféle mechanizmusok (Darvas és Lauber, 2007) révén két eltérő kötőhellyel rendelkező toxin (pl. Cry1Ac és Cry2Aa) esetén is felléphet keresztrezisztencia (Jurat-Fuentes *et al.*, 2003).

A napjainkban terjedő, több toxint termelő fajtacsoportok tehát – amennyiben létrehozásukat körültekintő rezisztencia-vizsgálatok előzik meg – mérsékelhetik a Cry1-rezisztencia problémáját, illetve a kártevők szélesebb körével szemben is védelmet nyújthatnak. Ekkor azonban a hektáronként termelt Cry-toxin mennyisége törvényszerűen megnövekszik, hiszen az egyes Cry-toxinok (értsd rezisztencia menedzselésére használt több

Cry-toxin, vagy kukoricamolyra és kukoricabogárra egyaránt Cry-toxinokat termelő fajtacsoportok) nem termelődhetnek egyenként sem szubletális dózisban (Takács *et al.*, 2009).

3.2.2.2. Egészségügyi hatások

Patogenitás-változás (horizontális géntranszfer)

A genetikai módosítás során antibiotikum-rezisztencia marker (pl. ampicillin) felhasználása esetén a gén továbbadása, – silózott takarmánnyal az erjesztő-baktériumokon keresztül konjugációval a marha bendőjében élő mikroflórán át – patogén *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella* fajokba jutása sem valószínűtlen, amelyek így antibiotikum-rezisztenciára tehetnek szert (Darvas, 1997; Robinson, 1997).

Élelmiszer-biztonsági területek

A jelenleg takarmánnyként és táplálékként forgalomban lévő GM-növényeket a lényegi azonosság elve alapján engedélyezték. Ennek alapja, hogy biztonsággal fogyasztható a transzgenikus növény, ha főbb kémiai összetevői az elterjedési területén található fajtaválaszték beltartalmi szórásértékei közé beilleszthetők. Ez különösen zavarba ejtő, ha a GM-vonal az izogenikus vonalához képest szignifikáns beltartalmi eltérést produkál (Pusztai és Bardócz, 2006). Az eddigi nem túl nagyszámú takarmányozási és táplálkozási vizsgálatok eredményeinek jelentős része – bármely oldalról is érkeztek azok – súlyos bírálatokat kaptak. A *Bt*-növények által termelt Cry-toxinokat például az eredeti növények nem termelik, tehát ezek nem engedélyezhetők a lényegi azonosság elve alapján. A *glyphosate*-tűrő növényekbe olyan enzimet termelő gént visznek be, amely a *glyphosate* speciális bomlástermékeit állítja elő. Ez sem eshetne a lényegi azonosság által való elbírálás alá.

A GM-növények élelmiszer-biztonságához alkalmazott módszerek felülvizsgálatának szükségességét Pusztai Árpád és munkatársainak kísérletei alapozták meg. A kutatócsoportja által vizsgált GM-burgonya hatására visszamaradt az állatok növekedése, zavarok voltak kimutathatók az immunrendszerben, és több belső szerv illetve szövet fejlődése is szokatlan tendenciát mutatott (Ewen és Pusztai, 1999; Pusztai *et al.*, 2003). A késleltetett érésű GM-paradicsom (FLAVR SAVR) nőstény patkányok gyomrában például fekélyt és gyomorvérzést okozott (Bardócz és Pusztai, 2007). A genetikai eseményenkénti részletes vizsgálat tehát nem elhanyagolható (Dona és Arvanitoyannis, 2009).

A *cry* gének beültetésével a növény olyan – a növénnel együtt emberi/állati fogyasztásra kerülő – fehérjetoxint termel, amely korábban nem képezte részét táplálékunknak. A Cry-toxinnak a rovarok specifikus receptorhelyeihez kapcsolódó része lektin-természetű (Knowles *et al.*, 1984), s ez lehetőséget teremt magasabb rendű

szervezetekben is receptorokhoz való kapcsolódásra, biológiai hatás kifejtésére. Egéren folytatott vizsgálatokban a Cry1Ac-toxin receptorhoz kötődött (Vázquez-Padrón *et al.*, 2000a), antitest (IgG, IgM illetve IgA) termelődött (Vázquez-Padrón *et al.*, 2000b), s adjuváns hatások is jelentkeztek (Vázquez *et al.*, 1999). A Cry-toxinok vizsgálata során kiderült, hogy azok embereken is allergén, immunogén hatásúak lehetnek, sőt képesek más, kevésbé allergén anyagok hatását felerősíteni (adjuvánsok). Ezt támasztja alá az a kutatás is, melynek során Cry1- és Cry2-toxinok kitett dolgozókat vizsgáltak. A kitettséget követően, annak mértékével arányosan az allergiás bőrreakciók növekedését valamint IgG és IgE antitestek termelődését jegyezték fel (Bernstein *et al.*, 1999). Kimutatták, hogy a transzgén DNS a tápcsatornában nem bomlik le teljes mértékben, és a transzgén szekvencia így átkerülhet a bélbaktériumokba. Ezt támasztja alá, hogy rekombináns *cry1Ab*-gén töredékeit mutatták ki a béltraktusban *SYN-BT11* kukoricával etetett disznók esetében (Chowdhury *et al.*, 2003). Az eddigi vizsgálatok eredményeit értékelve annak lehetőségét, hogy a transzgén-szekvencia átkerülhet bakteriális szervezetekbe az EFSA GMO Panel tagjai is elismerték (Kuiper *et al.*, 2010).

Velimirov és munkatársai (2008) *MON 810* x *NK603*-as kukoricával egereken végzett etetési vizsgálataikat tették közre. Az első generációban a negyedik vemhességig emelkedett a meddők aránya, míg a megszülető és életben maradt utódok száma a negyedik vemhességben háromnegyedére csökkent. A terhelő adatokat tartalmazó dokumentációt (nem az állításaikat) a szerzők pillanatnyilag visszavonták és az EFSA nem tárgyalja azt.

3.2.3. A DIPEL fő- és mellékhatásai

A hagyományos *Bt*-alapú termékek hatékonysága hazánkban is jól dokumentált (Darvas *et al.*, 1979, 1999). A *Bt*-készítmények hatékonyságát standard rovartröszéken végzett biotesztekkel határozzák meg és Nemzetközi Egységben (NE; *International Unit – IU*) adják meg. Az elsődleges száritmányt hatásosságának ellenőrzése után (ez akár 80 000 IU/mg is lehet) inert anyagokkal hígítják a kívánt töménységűre (4. táblázat). A DIPEL Cry1Aa-, Cry1Ab-, Cry1Ac-, Cry2A- és Cry2B-toxinokat tartalmaz, Cry1 : Cry2 = 4 : 1 arányban (Lisansky *et al.*, 1997).

A készítmények okszerű, célzott használatával a hernyókártételek jó része megelőzhető, mivel több, mint 100 kártevő faj lárváival szemben megbízható védelmet nyújtanak (Navon, 1993). A DIPEL-t a *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD-1 törzsének baktérium-fermentumából állítják elő (Lisansky *et al.*, 1997). Az alkalmazás során a technológia fontos eleme a kártevők rajzásának nyomon követésével a kezelés időzítése, egyfelől mert a kártevők a korai lárvastádiumokban általában érzékenyebbek a Cry-

toxinokkal szemben (Navon, 1993), másfelől mert a toxin UV-fény hatására gyorsan lebomlik; illetve egy hirtelen jött eső lemoshatja a készítményt (Roh *et al.*, 2007). A készítmény további kedvezőtlen tulajdonsága, hogy nem egyenletesen oszlik el a Cry-toxin a védendő felületen és nem – illetve csak korlátozottan, a berágás időszakában – véd a növény belsejében élő kártevőktől. Viszonylag korán fény derült arra, hogy az egyes lepkefajok a Lepidoptera rendre általában hatásos Cry1-toxinokra igen nagy különbséggel reagálnak, s eszerint jó néhány faj, leginkább a bagolylepke-félék családjából (Noctuidae), érzéketlennek bizonyult. A káposzta bagolylepkén (*Mamestra brassicae* L.), s több *Spodoptera* fajon kívül a gyapjaslepke (*Lymantria dispar* L., Limantriidae) is meglehetősen kevésbé érzékeny, ezért ezek kontrollálására egyéb *Bt*-törzsek használatával fejlesztettek növényvédő szereket (Navon, 1993). Piretroidokkal és *chlordimeform*-mal együtt alkalmazva szinergista, *diflubenzuron*-nal és *neem*-mel együttesen használva antagonistá hatást tapasztaltak (Navon, 1993).

4. táblázat: A DIPEL WP (16 000 IU/mg) összetevői (Lisansky *et al.*, 1993 nyomán)

Összetevők	Arány [%] ^A	Szerepe
elsődleges baktérium-szárítmány (80 000 IU/mg)	20,00	aktív összetevő
agyag (kaolin vagy egyéb) vagy talkum	75,25	inert töltőanyag
szilícium-dioxid	0,75	csomósodásgátló
Bevaloid 116 (nátrium-poliakrilát)	2,00	diszpergálószer
Surfynol 104S (46% acetiléndiol felületaktív anyag)	2,00	nedvesítő

Megjegyzés: ^A – 80 000 IU/mg hatékonyságú elsődleges baktérium szárítmány esetén

A mellékhatások monitorozása során számos egymásnak ellentmondó eredmény látott napvilágot (Hilbeck és Schmidt, 2006), melyben valószínűleg szerepe lehet a baktérium-készítményekben lévő toxin levélzettől függő kiülepedésének és az időjárási tényezők által befolyásolt gyors bomlásának is (Johnson *et al.*, 1995), mely e készítményeknek hátrányuk mellett egyben előnyös tulajdonsága is. A készítmények formulációja szintén erősen befolyásolja azok perzisztenciáját. A legkitettebbek a készítmény hatáskörébe eső nem célzott lepkefajok, melyek akár 100-szor érzékenyebbek lehetnek Cry-toxinokkal szemben, mint egyes kártevők (Johnson *et al.*, 1995). A Microlepidoptera fajok rejtőzködő életmódjuk folytán általában kevésbé kitettek, mint a Macrolepidoptera fajok (Wagner *et al.*, 1996). Bizonyos vizsgálatokban nem találtak hatást nem célzott rovarokon, míg mások számos, a ragadozókat illetve a parazitoidokat érintő letális és szubletális hatásról (pl. fejlődési idő, fekunditás, élettartam-változás) számoltak be (Hilbeck és Schmidt, 2006).

Az egyenetlen eloszlás és gyors lebomlás, illetve a nagymértékű alkalmazás miatt szántóföldi körülmények között *Bt*-készítményekre rezisztens rovartörzsek szelektálódtak. Egy szabadföldön *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* tartalmú szerre szelektálódott

káposztamoly (*Plutella xylostella*) populációban a rezisztencia további szelekció nélkül három nemzedék alatt az érzékeny populációhoz képest 1500-szorosról mintegy 300-szorosra csökkent, s ezen a szinten állandósult (Tang *et al.*, 1997). Instabil populáció esetén a szelekciós nyomás megszűnésével a rezisztencia csökken (Tabashnik *et al.*, 1994), mivel a rezisztencia kialakulásának folyamata dinamikus. Az ellenállóképesség gyors növekedése mutatkozik már néhány nemzedék után, azonban a kisselektálódó népesség kedvezőtlen génkombinációja a rezisztencia ingadozását, a túlélők számának változását eredményezi – csökkenő mértékben – nemzedékről nemzedékre (Akhurst *et al.*, 2003, Darvas *et al.*, 2005). Az érzékenység-csökkenéshez vezető folyamatok megismerése segíthet a *Bt*-rezisztencia menedzselésében.

Az egészségügyi hatások között a patogenitás változás lehetősége a legjelentősebb. DIPEL és más *Bt*-készítmények esetében hasmenést okozó enterotoxin termelődését mutatták ki; s 1995-ben egy gastroenteritis járványban a *Bacillus cereus* és a *B. thuringiensis* együttes előfordulását észlelték (Jackson *et al.*, 1995; Damgaard, 1995; Damgaard *et al.*, 1996). Allergén hatások leginkább a készítménnyel dolgozó munkásoknál fordulhatnak elő (Bernstein *et al.*, 1999). Az élelmiszer-biztonsági hatások a *Bt*-növényeknél leírtakhoz (2.2.2.2. fejezet) hasonlóak lehetnek, hozzáteve, hogy a készítmény hatóanyagának – a felületi kezelést követő – gyors lebomlása a fogyasztók kitettségét gyakorlatilag elhanyagolhatóvá teszi, s kizárja számos egyéb, például generációs hatás kialakulását.

3.3. A *MON 810* fajtacsoport Cry1-toxintartalma

Bár már több mint tíz éve, hogy termesztésre engedélyezték a *MON 810* genetikai eseményt hordozó fajtákat az Egyesült Államokban illetve Európában, az egyes fajták ~Cry1Ab-toxin termelését a mai napig nem vizsgálták kellő alapossggal. A genetikai esemény szintű engedélyezési iratokban a fajtatulajdonos a korai, 1994 és 1996 közötti, az Egyesült Államokban illetve Európában végzett, szakfolyóiratban nem közölt szabadföldi vizsgálatainak eredményeire hivatkozik (5. táblázat; AGBIOS, 2002; 2008; Sanders *et al.*, 1995; USDA APHIS, 1996). Ezek a források említik az első, második és harmadik levélemelet toxintartalmának teljes vegetációra vonatkozó átlagos értékeit, melyek a fenti sorrendben: 9780, 8430 és 4910 ng Cry1Ab/g friss tömeg. Mindezen adatok alapján azonban nem sokat tudunk az egyes fajták toxintermeléséről.

Az elmúlt évtizedben csupán néhány cikk látott napvilágot a *MON 810* hibridfajták toxintartalmáról (6. táblázat), így a változó toxintartalom háttéréről még mindig nincs pontos ismeretünk. Annyi bizonyos, hogy a *MON 810* hibridek a ~Cry1Ab-toxint szövetspecifikusan, időben változó mennyiségben termelik (Abel és Adamczyk, 2004; Nguyen, 2004; Nguyen és

Jehle, 2007). Tudjuk, hogy a talaj minősége, s kiemelkedően a nitrogén-ellátottság jelentősen befolyásolni képes a megtermelőző Cry1-toxin mennyiségét (Bruns és Abel, 2003); s nem csak termőhely, de az évjárat okozta különbségek is számottevők (Nguyen, 2004; Nguyen és Jehle, 2007) Utóbbi háttérében az időjárási körülmények, illetve a fajták genetikai instabilitása is állhat. Ismert, hogy a *MON 810* mellett másik genetikai eseményt is hordozó hibridekben a ~Cry1Ab-toxin termelődése akár kétszerese lehet az egy toxint termelő hibridekének (Monsanto Company, 2004). A közölt adatok gyakran igen tág határok között mozognak akár egyetlen vizsgálatban is, mely a transzgen eltérő mértékű kifejeződéséből, a növények nagy egyedi különbségeiből adódhat. A pollen tekintetében hasonlóan szélsőséges adatok láttak napvilágot (7. táblázat).

5. táblázat: A *MON 810* genetikai eseményű kukorica immunoreaktív Cry1Ab-toxintartalma a Monsanto tanulmányaiban

Hely	~Cry1Ab-toxintartalom			Hivatkozás
	levél	pollen	mag	
	[ng ~Cry1Ab/g friss tömeg]			
USA	7930 – 10340	90	190 – 390	Sanders <i>et al.</i> , 1995
EU	7590 – 9390	–	420 – 690	AGBIOS, 2002

6. táblázat: A *MON 810* genetikai eseményű kukorica immunoreaktív Cry1Ab-toxintartalma

Hibrid	~Cry1Ab-toxintartalom ^A					Hivatkozás
	levél	gyökér	szár	portokfal	mag	
	[ng ~Cry1Ab/g friss tömeg]					
Agrigold A6609Bt	760 – 2300					Abel és Adamczyk, 2004
Asgrow RX799Bt	770 – 2390					Abel és Adamczyk, 2004
Monsanto NOVELIS	440 – 11070	340 – 2031	350 – 2060	300 – 6650	10 – 510	Nguyen, 2004
Monsanto NOVELIS	320 – 11070	270 – 4170	0,08 – 2610	300 – 6650	10 – 510	Nguyen és Jehle, 2007
Monsanto NOVELIS	203					Ramirez-Romero <i>et al.</i> , 2008
Pioneer P31B13Bt	660 – 2200					Abel és Adamczyk, 2004
Pioneer P33V08Bt	350 – 530					Bruns és Abel, 2003
Pioneer P33V08Bt	660 – 2170					Abel és Adamczyk, 2004

Megjegyzés: ^A – A ~Cry1Ab-tartalmakat EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate Kit-tel mérték

A növényi ~Cry1Ab-toxin mérésénél további technikai kérdések merülnek fel. A *MON 810* genetikai eseményt hordozó fajták a *cry1Ab* gén rövidített változatát tartalmazzák, s a termelőző ~Cry1Ab-toxin is kisebb, 91 kDa, mint az eredeti gén által termelt 131 kDa nagyságú protoxin (CFIA, 1997). Analitikai szempontból nem helyes a protoxinnal nyert antitestekkel és protoxin standarddal működő *ELISA* rendszereket a kurtított, preaktivált növényi ~Cry1Ab-toxin mérésére közvetlenül alkalmazni. A problémát kétféle módon lehet orvosolni: vagy a növényi, kurtított ~Cry1Ab-toxint kell standardként használni, vagy aktivált

Cry1Ab-toxint. Az előbbi – egyelőre – nem elérhető a növényi toxin tisztításának nehézségei miatt. Az utóbbi viszont megtehető, hiszen számos tanulmányban használták már különféle vizsgálatokra az enzimatikusan aktivált Cry1Ab-toxint (pl. Lambert *et al.*, 1996). A hivatalos engedélyezési iratok eredményei szerint a protoxin és a növényi ~Cry1Ab-toxin enzimátikus aktiválása nyomán ugyan az a 63 kDa méretű aktív toxin képződik (US EPA, 2001; Monsanto Company, 2004). A módszer alkalmazhatóságát alátámasztja, hogy az aktív toxin ugyanazt az immunreaktivitást mutatta Cry1Ab-specifikus antitesttel szemben, mint a növényi toxin (US EPA, 2001).

7. táblázat: *MON 810* kukorica pollenjének immunoreaktív Cry1Ab-toxintartalma

Hibrid	~Cry1Ab-toxintartalom [ng/g]	Megjegyzés	Hivatkozás
-	90 ft		CFIA, 1997
-	< 90 szt		US EPA, 2001
-	< 80 ft		Monsanto Company, 2004
Monsanto NOVELIS	130-250 szt	Envirologix QuantiPlate / Agden	Lang <i>et al.</i> , 2004
Monsanto NOVELIS	1-97 szt		Nguyen, 2004; Nguyen és Jehle, 2007

Megjegyzések: szt – száraz tömeg; ft – friss tömeg

3.4. Hazai védett lepkék

Magyarországon jelenleg 213 védett lepkefajt tartanak nyilván. A 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet 2008. évi módosításával (18/2008. (VI. 19.) KvVM rendelet) 179-re emelkedett a védett fajok száma. Emellett 19 faj fokozottan védett, 16 faj pedig az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős. A nagy Apolló-lepke (*Parnassius apollo* L.) mind a magyarországi, mind az Európai Unió rendelkezései szerint védett.

3.4.1. Nappali pávaszem

A nappali pávaszem, *Nymphalis io* L. (Lepidoptera, Nymphalidae) transzpalearktikus faunaelem, nemorális faj (Varga *et al.*, 2004). Elterjedési területe egész Európát lefedi, beleértve nyugaton a Brit-szigeteket, északon Skandinávia déli részét, délen pedig az Ibériai-félsziget északi felét (Bryant *et al.*, 1997). Egy- illetve kétnemzedékes, az imágó nyári diapauzája (július-október) is előfordulhat – a helyi időjárástól függően. Az imágó magas páratartalmú faodvakban, pincékben, barlangokban telel. Az imágók március-áprilisban jelennek meg a szabadban. Napos helyeken, folyópartokon, nyirkos réteken, ugaroltatott, de zavart területeken is gyakoriak (Tolman és Lewington, 1997). A lárva tápnövénye a nagy csalán (*Urtica dioica* L.), mely egész Európában igen elterjedt. A nőstény több száz csomóba, a levelek fonákára helyezi tojásait (1. ábra). Samos szigetén, ahol a nagy csalán

nem honos, a lárva a szintén a csalánfélék családjába tartozó falgyomon (*Parietaria officinalis* L.) táplálkozik.



a./ Tojáscsomó csalánlevélen



b./ Ötödik stádiumú lárva



c./ Friss bábok



d./ Imágó

1. ábra: A *Nymphalis io* L. fejlődési alakjai

Fotó: a-c – Lauber Éva, d – Peregovits László

3.4.2. C-betűs lepke

A c-betűs lepke, *Nymphalis c-album* L. (Lepidoptera, Nymphalidae) transzpalearktikus faunaelem, nemorális faj (Varga és mtsi, 2004). Elterjedési területe Európa egészét lefedi a mediterráneumot, a Brit-szigetek és a Skandináv-félsziget nagyobb részét is beleértve (Bryant *et al.*, 1997). Évente két nemzedéke fejlődik. Az áttelelő imágók március-áprilisban jelennek meg a szabadban. Erdőségeken, bokros területeken gyakoriak (Tolman és Lewington, 1997). A nőstény a levél fonákára, általában egyesével helyezi a tojásait. A lárva tápnövénye Közép-Európában a nagy csalán illetve a komló (*Humulus lupulus* L.), hidegebb területeken *Ulmus* és *Salix* fajok (Carter és Hargreaves, 1987). A lárva előbb a levélfonákon hámozgat, majd karéjozgat, kifejlődve a növény szárán bábozódik (2. ábra).



a./ Tojások csalánlevélen



b./ Ötödik stádiumú lárva



c./ Báb



d./ Imágó

2. ábra: C-betűs lepke (*Nymphalis c-album* L.) fejlődési alakjai

Fotó: a – Darvas Béla és Lauber Éva, b – Bátori Gábor, c – Josef Dvorak, d – Tim Bekaert

3.4.3. Atalanta lepke

Az atalanta lepke, *Vanessa atalanta* L. (Lepidoptera, Nymphalidae) nyugat-palearktikus faunaelem, vándor faj (Varga és mtsi, 2004). Európa szélességi középvezérlésétől délre – beleértve a mediterráneumot is – folyamatosan jelen van, míg északabbra minden évben migráció útján terjed (Bryant és mtsi, 1997). Hazánkban két elhúzódó nemzedéke van. A téli hibernációból ébredő imágók március-áprilisban jelennek meg, míg a délről vándorlók május-júniusban. Az imágó előfordulása igen széleskörű. A lárva tápnövénye Közép-Európában a nagy csalán, a mediterráneumban egyéb *Urtica* és *Parietaria* fajok (Tolman és Lewington, 1997). A nőstény általában a levél színére, egyesével helyezi a tojásait (3. ábra), kedveli a napos, nyílt helyeket. A lárva kezdetben a levél szélét behajtva, majd több levelet összeszöve egyesével táplálkozik, később ott bábozódik. Az imágó visszavándorol délre, illetve a városokba (padlások, raktárak, pincék) húzódva enyhébb teleken Magyarországon is sikeresen áttelel. Az imágó kedvelt tápnövényei a nektárban gazdag virágok, pl. szeder fajok (*Rubus* spp.) vagy a nyáriorgona (*Buddleia davidii* Franch.) (Tolman és Lewington, 1997).



a./ Tojás csalánlevélen



b./ Negyedik stádiumú lárva



c./ Báb



d./ Imágó

3. ábra: Atalanta lepke (*Vanessa atalanta* L.) fejlődési alakjai

Fotó: a-c – Lauber Éva, d – Peregovits László

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Felhasznált anyagok – Cry1-kukorica és Cry1-tartalmú növényvédő szer

Bt-kukoricával végzett vizsgálatainkhoz *MON 810* genetikai eseményű DK-440 BTY GM-kukoricát és ennek közel izogenikus, DK-440 fajtáját használtuk, melyeket a fajtatulajdonos magyarországi képviselője (Monsanto Hungária Kft.; Czepó Mihály) két alkalommal bocsátott az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályának a rendelkezésére. Utóbbi hibrid Magyarországon az elmúlt hét évben igen nagy arányban került termesztésre; a korai éréscsoportba tartozik (FAO 330), tenészsídeje Magyarországon körülbelül 140 nap, a nővirágzás ideje átlagosan a 71. napra esik (VSZT-GOSZ, 2008, Fónagy *et al.*, 2010). A DK-440 BTY kurtított ~Cry1Ab-toxint termel, mely a beépített konstitutív promóter révén a növény minden részében kifejeződik.

Cry-toxintartalmú növényvédő szerként DIPEL WP-t (16 000 IU/mg; gyártó: Valent BioSciences Co.; kisserelő: Chemark Kft., Peremarton) nedvesíthető por alakú permetezőszert használtunk, mely standardizált *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD-1 tartalmú termék. A tesztelt terméket a kisserelést végző cég bocsátotta rendelkezésünkre.

4.2. A kukorica termesztése és mintavételezése

A *Bt*- és a közel izogenikus fajtákat az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének Ökológiai Kutatóállomásán (Julianna-major, Nagykovácsi) termesztettük négy évben (2001, 2002, 2005, 2009). A *Bt*-kukoricát 200-400 m²-es bekerített parcellákon 3-6 izogenikus sorral (köpenyvetés) szegélyezve termesztettük. A területen növényvédelmi tevékenységet nem folytattunk. Őszi szántással és tavaszi tárcsázással, kombinátorozással készítettük elő a talajt. A 2001-es és a 2009-es vetés előtt ősszel lótrágyát juttatunk ki 30 t/ha mennyiségben. 2005-ben és 2009-ben a termesztés szempontjából kritikus időszakban (július-augusztus) mérsékelten öntöztünk (10-30 mm).

A növényi ~Cry1Ab-toxin termelődését a vetést követő 4 hónapban követtük nyomon. A *Bt*- illetve a közel izogenikus növényeket kilenc alkalommal, kéthetente 4-4 ismétlésben mintáztuk. Ahogy a kukorica fejlődése lehetővé tette, a vegetatív és generatív szervekből mintát vettünk (levél, szár, gyökér, portok, pollen, mag). A növényminták a vételt követően azonnal feldolgozásra kerültek. Minden minta egyik felét a nedves majd száraz tömeg meghatározására használtuk, míg a másik fele az *ELISA* mérésig fagyasztásra került (-40 °C). A növények fejlettségi állapotát a Ritchie és munkatársai (1992) által leírt módon jeleztük (8. táblázat).

8. táblázat: A kukorica fejlettségi állapotainak jelölése (Ritchie *et al.*, 1992 nyomán)

Jelölés	Állapot	Jelölés	Állapot
VE	kelés	R1	nővirágzás
V1	egy kifejlődött levél	R2	hólyag szem állapot
V2	két kifejlődött levél	R3	tejesérés
V3	három kifejlődött levél	R4	viaszérés
Vn	n kifejlődött levél	R5	„fog” állapot
VT	címerhányás	R6	fiziológiai érés

4.3. Cry1-toxin mérése

A különböző Cry1-toxin méréseket két kereskedelmi forgalmú *ELISA* (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* – enzimjelzéses immunanalitikai vizsgálat) rendszerrel végeztük (EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate® – #AP 003, Portland, MN, USA és Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA kit – #PN 51001, Warminster, PA, USA). Mindkét *ELISA* kitet GM-növényekből származó minták Cry1Ab- és Cry1Ac-toxintartalmának kvantitatív mérésére fejlesztették és hozták forgalomba. A két kit hasonló annyiban, hogy mindkettő szendvics elven működik, bakteriális eredetű protoxint használtak immunogénként az antitestek előállításakor, valamint protoxin standard szolgál az eredmények kvantitálására. Különbség mutatkozik azonban a rendszerek felépítésében: az Abraxis kit poliklonális nyúl antiszérummal és anti-nyúl IgG-peroxidáz konjugátummal, míg az EnviroLogix kit antiszérum-peroxidáz konjugátummal működik, így az utóbbival végzett vizsgálat menete két lépéssel rövidebb (részletesen lásd a 2. mellékletben). A ~Cry1-toxinnal kapcsolatos környezetanalitikai munkát Székács András irányította; a mérésben Juracsek Judit, Lauber Éva és Takács Eszter vett részt. A mintavételezés módszertanát Darvas Béla határozta meg.

4.3.1. A Cry1Ab-protoxin enzimatisz aktiválása

Mikrobiális eredetű Cry1Ab-protoxint – melyet Luke Masson (Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada) bocsátott az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályának rendelkezésére – Lambert és munkatársai (1996) módszere szerint tripszinnel emésztettünk. Hígító pufferként 50 mM-os karbonátpuffer (pH 10,5) szolgált, mely 10 mM ditiotreitolt (*DTT*) tartalmazott. A kezelések során 5 µl, a fenti pufferben oldott protoxint (0,18-7,5 µg/ml protoxin) adtunk 45 µl tripszinoldathoz (EC 3.4.21.4; 1,8-416,6 ng/ml tripszin), így a toxin/tripszin aránya 0,4 és 55 között változott. A keveréket két órán keresztül 37 °C-on inkubáltuk. Az enzimatisz reakciót 5,6 µl 10 mM-os fenil-metánszulfonsav-fluorid (*PMSF*) hozzáadásával állítottuk meg úgy, hogy az elegyet tíz másodpercig kevertettük (540 rpm). Megfelelő arányú foszfát pufferes (*PBST*) hígítás (1:1000) után az emésztett toxinoldatot kereskedelmi forgalmú *ELISA* kitre pipettáztuk, s a kötődési aktivitást az előírt

gyártói útmutatás szerint mértük (részletesen lásd 2. melléklet). Az inaktiválással nem csupán az enzimatis emésztés idejét korlátoztuk, de kizártuk, hogy az *ELISA* mérés során az antitestek esetlegesen károsodjanak. Kontrollként hasonló mennyiségű toxint inkubáltunk inaktivált tripszinnel illetve anélkül, s ezek antitesthez való kötődését az aktivált toxinnal egy mikrotálcán mértük. A tripszin inaktiválását hőkezeléssel (90 °C, 2 perc) és *PMSF*-fel történő előinkubálással (37 °C, 30 perc) végeztük.

Az aktivált Cry1Ab-toxin és a Cry1Ab-protoxin *ELISA* méréséből származó adatok megadják az adott *ELISA* rendszer kereszt-reaktivitását ezen toxin formákra. A kereszt-reaktivitást az aktivált Cry1Ab-toxin mért koncentrációjának a mért Cry1Ab-protoxin koncentrációhoz való százalékos arányában fejeztük ki.

4.3.2. Növényi ~Cry1Ab-toxin mérése

A növényi mintáknak a korábbi vizsgálatok során optimált minta-előkészítési módszere szerint körülbelül 20 mg fagyasztott növényi mintát (az analitikai pontossággal mért tömeget mintánként feljegyeztük) porcelán dörzsmozsárban 0,5 ml, a gyártó által biztosított extrakciós/hígító pufferben homogenizáltunk, majd 10-15 percig ülepedni hagytuk és centrifugáltuk (3 perc, 12 000 rpm). A felülúszóból 50 µl mennyiséget extrakciós/hígító pufferben a méréshez megfelelően hígítottunk, azaz az *ELISA* eljárást a minta-előkészítés során kapott mintaoldatokon végeztük el. A mintaoldatokat és a gyártók által biztosított kalibrátor oldatokat (lásd 2. melléklet) 3-3 ismételtsben vittük fel a 96 cellás mikrotálcákra. A mérési eljárást a gyártók útmutatásai szerint kiviteleztük (a részletes leírások a 2. mellékletben). A kialakult kék szín intenzitását 650 nm, a sárga színt 450 nm hullámhosszon iEMS típusú (Labsystems, Helsinki, Finnország) spektrofotométeren mértük. A 0,1 és 4,0 ng/ml közötti töménységű kalibrátorok által adott pontokra lineáris regresszióval illesztett egyenes segítségével határoztuk meg a mintaoldatok Cry1Ab-toxin koncentrációját. Ezeket az adatokat a minta-előkészítés során alkalmazott hígítással illetve az analitikai pontosságú mintatömeggel korrigálva kaptuk meg a minta toxintartalmát. A mintaoldatokra vonatkoztatott kimutatási határ 0,14 ng/ml és 0,125 ng/ml az Envirologix illetve az Abraxis kitekre vonatkozóan.

Validálási célból a begyűjtött növényi anyagokból referenciamintát (#OR4) készítettünk. A minta tartalmazta a DK-440 BTY hibrid levelét, szárát és gyökerét, reprezentálva ezek növényi mátrixát. A növényi részeket együtt szárítottuk, daráltuk, homogenizáltuk, és kis adagokra szétmérve fagyasztva tároltuk. Ez a minta szolgált belső laboratóriumi standardként az analitikai vizsgálatok minőségi kontrolljához.

A pollen toxinmérését a fent leírtakhoz hasonlóan végeztük. A kimutatási határhoz közeli toxintartalmú pollent módosított eljárással készítettük elő, a növényi anyag/extrakciós puffer-arányt növelve.

4.4. A kukorica pollentermelése és a kiszóródott pollen eloszlása

A pollentermelő képesség meghatározásához az érett, de még pollent éppen nem szóró címerekre papírtasakokat helyeztünk, amit a címer alatt elkööttünk. A tasakokat a címerek elvirágzása után (5-6 nap) a címerrel együtt eltávolítottuk, árnyékos helyen, szobahőmérsékleten 3-5 napig szárítottuk, majd a kiszóródott pollent óvatosan (a portokok törését elkerülve) 150 µm-es résközű szűrőn átszittattuk. a pollen tömegét analitikai pontossággal mértük (7-10 ismétlés). Hasonló módszerrel további jelentős mennyiségű pollent gyűjtöttünk a hernyókon végzett érzékenységi vizsgálatokhoz. A pollent további felhasználásig légmentesen lezárva fagyasztva tároltuk (-40 °C).

A kukoricapollen sárga, nagyméretű (90-100 µm) gömb, melyhez hasonló formájú és nagyságú pollent kibocsátó növény nem fordult elő a kísérleti területeinken. 2001-ben a Julianna-majori táblán végeztük el a pollenszóródási vizsgálatokat, ahol a *Bt*-kukorica parcella három címerezett szegélysorral volt ellátva. A jelentős mennyiségű mintavételezés miatt a tőszámot 90 000 db/ha értékre állítottuk be.

Julianna-majorban a kukoricapollen vertikális eloszlásához a kukorica pollenszórásakor binokuláris mikroszkóp alatt megszámloltuk egy-egy levélen a pollenszámot levélemeletenként. A méréseket 10-10 darab, normál tárgylemez méretű (75x25 mm), szilikonolajjal kezelt fekete, lakkozott mérőlappal is megismételtük, melyeket a kukoricalevelek színére tűzőgéppel rögzítettünk. A szélirány megállapítására az utolsó előtti címeres sorra, valamint a címerezett 1. és 3. sor ötödik levélemeletére sugárirányban nyolc helyen helyeztünk el mérőlapokat. Az éves uralkodó széliránynak megfelelő körszeletben 1, 5, 10, 20, 50, 100 és 200 méternél távolságonként 8-8 darab 120 cm-es karóra szilikonolajos mérőlapokat helyeztünk ki. A munkát Darvas Béla tervezte és Csóti Attilával végezték el. A szilikonolajos mérőlap ötlete Petró Edétől származik.

A gyomnövényeken kiülepítő kukoricapollen mennyiségének vizsgálatához 2007-ben Zsámbék mellett felvételeztünk (Darvas Béla, Lauber Éva és Fekete Gábor) DK-440 fajtájú kukoricatáblán (60 000 tő/ha), valamint 2009-ben Kömlőd (Lauber Éva) határában (65 000 tő/ha). A leveleken 25-75 ismétlésben számoltuk a kukoricapollen sűrűségét.

A kukoricapollen horizontális eloszlását 2009-ben, Julianna-majorban 17 literes cserepekbe ültetett hamvas szeder (*Rubus caesius* L.) és kökény (*Prunus spinosa* L.) növényeken vizsgáltuk (Lauber Éva). A szedertöveket a tábla első sorába (-1 m), a tábla

szélére (0 m) illetve 1, 2, 3, 4 és 5 méterre a tábla szélétől helyeztük ki. A kökénytöveket hasonlóan, de csupán a táblán kívülre helyeztük el. Felvételezésenként minden távolságon 12-12 levélen (levelenként öt látómezőben) számoltuk a kiüledő pollen sűrűségét, két időpontban.

4.5. Gyomfelvételezés és védett lepkék szempontjából való kritikus mintavételezés

A hazai kukoricatáblák legjellemzőbb gyomfajainak vizsgálatához 2003. augusztus első hetében az ország jelentős kukoricatermesztő övezeteiben (Fejér, Komárom, Veszprém, Bács-Kiskun, Szolnok és Hajdú-Bihar megyékben) a kukorica pollenszórásának időpontjában egy tucat, véletlenszerűen választott kukoricatáblán (Darvas Béla és Csóti Attila), majd 2007-ben egy Zsámbék melletti táblán felvételeztünk (Darvas Béla és Lauber Éva). A táblaszegélyen (a szélső sortól kifelé számított három méteres sávban) és az állományban (a szélső sortól a tábla belseje felé) gyom-fajlistát vettünk fel, valamint az egyes fajok borítottsági értékeit (%) becsültük.

4.6. A hazai védett lepkék életmódjának elemzése

A védett lepkefajok életmódjának analízisét a Magyar Természettudományi Múzeum Lepkegyűjteményének és gyűjteményi adatainak (Ronkay, 1997; Bálint *et al.*, 2006), továbbá szakirodalmi adatok felhasználásával (Carter és Hargreaves, 1987; Ebert és Rennwald, 1991) valamint a Lepkegyűjtemény szakértőinek (Peregovits László, Ronkay László) személyes feljegyzéseit figyelembe véve végeztük el. A védett lepkefajok tápnövényeinek ismeretében kiválasztottuk azokat a fajokat, melyek a kukoricásokra jellemző gyomtársulásokban illetve az azokat határoló mezővédő erdősávokban előfordulhatnak. A gyűjteményi példányok (ritkább fajok esetén ~20, gyakoribbaknál ~100-200 egyed) gyűjtési idejéből (lásd rajzási idő Magyarországon) valamint a fajok életmódjának ismeretében meghatároztuk a lárvák fejlődési illetve táplálkozási idejét. Kiemeltük azokat a fajokat, melyek tápnövénye kukoricások környékén előfordulhat, és a lárva a kukorica pollenszórásakor táplálkozik. A munkában Darvas Béla tervei alapján Csóti Attila, Lauber Éva, Peregovits László és Ronkay László vettek részt.

4.7. A kukorica levélfelületének mérése

A DK-440 kukorica zöld levélfelületét a címerhányáskor mértük hat ismétlésben levélfelület-mérő készülékkel (MODEL LI-3000; Li-Cor Inc, USA). A munkát Lauber Éva végezte.

4.8. A kukorica és gyomnövényeinek levélfelület/levéltömeg hányadosa

Ez esetben a levélfelület mérése (lásd 3.7. pont) előtt megmértük a levéllemezek tömegét. A kukorica és a csalán levéltömeg és levélfelület viszonyának megállapításával kalkuláltuk a *Bt*-kukorica táblában illetve a határoló mezsgyén jelenlévő gyomnövényekre leülepedő pollenszámok alapján a Cry1-toxin dózisokat. A kísérletes munkát Csóti Attila, Lauber Éva, Darvas Béla és Kincses Judit végezték.

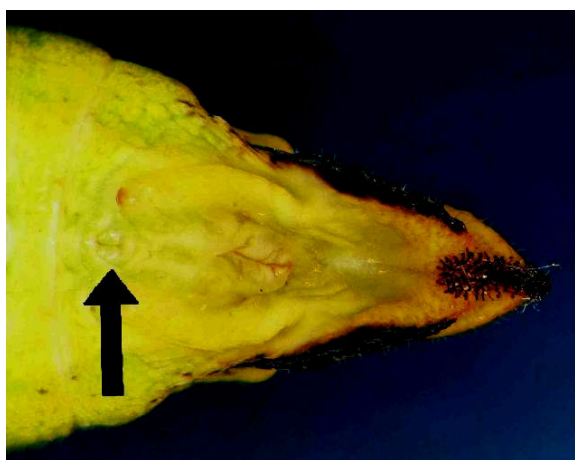
4.9. Tenyészetek

A vizsgálatokhoz felhasznált állatokat a MTA Növényvédelmi Kutatóintézet Ökológiai Kutatóállomásán laboratóriumban, illetve üvegházban tartottuk fenn az alábbiak szerint. A tenyészeteket Vajdics Gyöngyi, Kugler Nikolett és Nádasdi József gondozták. A stádiumonkénti vizsgálatokhoz szükséges állatokat Lauber Éva nevelte.

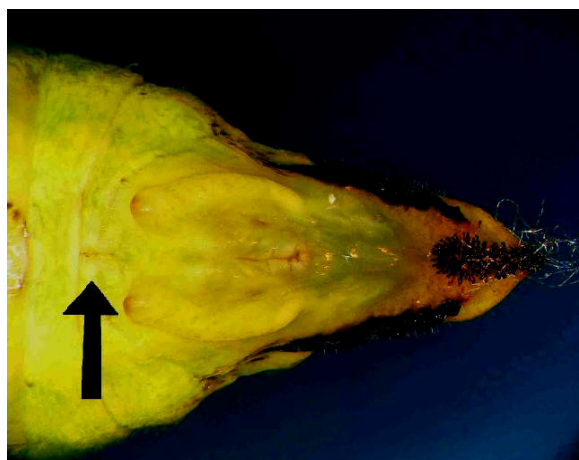
4.9.1. Nappali pávaszem

A nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) tenyészetet 2002-ben Polgár A. László (MTA NKI) és Darvas Béla Ady-ligeti (Budapest) gyűjtése nyomán alapítottuk. A tenyészethez Peregovits László, Lauber Éva és Vajdics Gyöngyi szállított időről időre vadon nevelkedett állatokat. Az állatokat üvegházi körülmények között, hosszú nappalos megvilágítás mellett tartottuk. Az imágók táplálékként 20 %-os mézes vízzel felöntött erjedő gyümölcsdarabok és az adott időszakban nyíló virágok nektárja szolgált. Az érési táplálkozást illetve a párzást követően műanyag ládába ültetett (38x12x15 cm) csalánt kínáltunk fel 1-2 napra tojásrakásra.

A bábokat ivarilag a potrohi vég hasi oldalán elhelyezkedő bélyegek alapján Lauber Éva különítette el (4. ábra).



a./ hím báb



b./ nőstény báb

4. ábra: *Nymphalis io* L. bábok ivari különbözősége

Fotó: – Lauber Éva

4.9.2. Atalanta lepke

Az atalanta lepke (*Vanessa atalanta* L.) tenyészetet 2006-ban, Peregovits László (MTM) a Fogarasi-havasokban végzett gyűjtőmunkája nyomán alapítottuk, ehhez később Lauber Éva szállított vadon nevelkedő lárvákat. Az állatokat az *N. io* tenésszettel azonos módon tartottuk.

4.9.3. C-betűs lepke

A c-betűs lepke (*Nymphalis c-album* L.) tenyészetet 2002-ben Varjas László (MTA NKI) aggteleki gyűjtése nyomán alapítottuk. Az állatokat az *N. io* tenésszettel azonos módon tartottuk.

4.9.4. Kukoricamoly

A kukoricamoly (*Ostrinia nubilalis* Hübner) imágóit 2004-ben Kétyen gyűjtötték (Kárpáti Zsolt és Szöcs Gábor; MTA NKI). A félszintetikus tápon (Nagy, 1970) tenésszetben tartott állatok szaporulatával Szöcs Gábor szíves engedélyével végeztünk vizsgálatokat.

4.9.5. Gyapottok-bagolylepke

A gyapottok-bagolylepke (*Helicoverpa armigera* Hübner) lárváit kukoricatáblákról Lauber Éva 2008-ban Zsámbék környékén gyűjtötte, ehhez 2009-ben további állatok kerültek Julianna-majori kukoricásokból történő lárvagyűjtésből (Darvas Béla és Bánáti Hajnalka). Az állatokat módosított félszintetikus tápon (Abassi *et al.*, 2007) tartottuk.

4.10. Kísérletek *MON 810* pollennel

Bt-pollennel 2002 és 2009 között végeztünk kísérleteket. A felhasznált pollen ~Cry1Ab-toxintartalmát *ELISA* módszerrel mértük, eloszlását sztereomikroszkóp segítségével számoltuk. Kétféle kezelési módszert alkalmaztunk. Nappali pávaszem lárvákon 15 kezelést végeztünk *MON 810* pollennel. A kiértékelés során 4 kísérletet – amelyet 1100 pollen/cm² feletti pollensűrűséggel végeztünk – kizártunk. Hat kísérlet eredményeit mutatjuk be részletesen. További öt kísérletet szintén alacsony toxintartalmú pollennel végeztünk, a bemutatottakhoz hasonló eredménnyel.

Porozás

A leveleket NU-FILM 17 0,05 %-os oldatával (természetes fenyőgyanta formulázott oldata) előkezeltük, mely a kísérlet beállítása során fokozta a pollen levelekhez tapadását. A kontroll csoport NU-FILM 17 kezelést kapott. A kukoricapollent 150 µm lyukátmérőjű szita

segítségével osztottuk el a leveleken. A pollen eloszlását talajra helyezett szilikonolajos tárgylemezek segítségével ellenőriztük, melyeken sztereomikroszkóp segítségével 10-10 látómezőben számoltuk a pollensűrűséget. A nappali pávaszem esetén a kezelés után helyeztük a növényre a tojáscsomókat, majd a kikelt tojások burkának számával kalkuláltunk a kezelt állatokkal illetően. A kezelt növényeket az állatokkal együtt izolátorokba helyeztük, ahol az első három stádiumban fogyasztottak kezelt csalánt, majd kezeletlen csalánnövényekre helyeztük át őket. Ez a rövid távú, a fejlődés első felében fennálló kitettséget reprezentálja. Az állatok fejlődését a teljes posztembrionális fejlődés során nyomon követtük. A lárvák tömegét a 12. és a 18. napon mértük; a kutikula szklerotizálódását követően, az ivarok szerinti szétválogatás után mértük a bábok tömegét. A kezelés módját Darvas Béla dolgozta ki. A kísérleteket Darvas Béla, Csóti Attila, Kincses Judit és Lauber Éva végezték.

Permetezés

Pollenzuszpenziót készítettünk 0,05 % NU-FILM 17 és 0,025 % NONIT (detergens) felhasználásával. A segédanyagok hatástalanságát a csupán ezeket tartalmazó oldat permetezésével végzett kontroll kezelésben ellenőriztük. Kezelésenként két-két csalánhajtást permeteztünk le 6 ml oldattal, mely 0,6 g *Bt*- illetve izogenikus pollent tartalmazott. A permetezést VICTORIA sűrített levegő (Corwell Kft., Magyarország) palackjára helyezett SIGMA SPRAY (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) szórófejjel végeztük. A pollenesezésekben egyszer (egyszeres kezelés) illetve száradás után még egyszer (kétszeres kezelés) permeteztünk; a kontroll pollen nélkül kétszeres NONIT + NU-FILM 17 kezelést kapott. A kijutatott pollenmennyiséget száradás után üvegenként 2-2 levélen, levelenként 5 látótérben sztereomikroszkóp segítségével számoltuk (50x-es nagyításon). A kezelt levelekre 100-100 frissen kelt első stádiumú lárva került. A kísérlet laboratóriumban (24 °C, 14/10 óra megvilágítás/sötét) lett elhelyezve. A fejlődő lárvák súlyát 50-50 ismétlésben mértük a 12., a 16. és a 18. napon. Mértük a bábok tömegét ivarok szerint, illetve nyomon követtük az imágók kelésének időpontját (posztembrionális fejlődési idő). A teljes táplálkozási idő alatti expozíció a kukoricatáblák szélén tapasztalható, különböző fejlettségű kukoricatövekről származó krónikus kitettséget reprezentálta. A kezelés kidolgozását és végrehajtását Darvas Béla és Lauber Éva végezte.

4.11. Kísérletek DIPEL WP készítménnyel

A nagylepkék esetén a DIPEL WP-t különböző koncentrációkban lárva illetve vágott csalánra juttattuk pumpás mikropermetezővel. Kontrollként tiszta vizes permetezés szolgált.

A kísérletekhez tojáscsomókat, frissen kelt első (3-12 óra) illetve különböző stádiumú, vedlés előtt lévő, már nem táplálkozó lárvákat használtunk (a kísérlet által vizsgálandó stádium előtti állapotban). A tojáscsomók esetén a frissen kelt lárvák számát az általuk visszahagyott tojásburok révén adtuk meg. A kisebb lárvákat (L1-L2) ecsettel, a nagyobbakat (L3-L5) puha rovarcsipesszel manipuláltuk. A kísérleteket üvegházban inszektáriumokban, illetve laboratóriumban laboratóriumi üvegedényekben (20 cm átmérőjű, 23 cm magas) végeztük. Utóbbiak tetejét vászonnal fedtük, amit gumipánttal szorítottunk le.

Kukoricamolylepke esetén a szűrőpapírra rakott tojáscsomókból kikelő lárvákat (3-12 óra) illetve vedlés előtt álló első stádiumú lárvákat használtunk. Gyapottok-bagolylepke esetén a vászontetőre rakott tojásokból kikelő lárvákat (3-12 óra) illetve vedlés előtt álló első stádiumú lárvákat használtunk. A színűkőn kezelt kukorica leveleket szárítás után óvatosan daraboltuk (~2x3 cm) és *faces* poharakba kiöntött 1,5 %-os agar gélbe szúrtuk. Erre kerültek a lárvák egyesével, majd a poharakat vászonnal fedtük és gumigyűrűvel zártuk. A módszert Lauber Éva dolgozta ki.

A kiértékelésből kizártuk azon kísérletek eredményeit, ahol a kontroll mortalitás meghaladta a 10 %-ot.

9. táblázat: DIPEL-érzékenységi (LC₅₀) vizsgálatok paraméterei

Faj	Kezelt stádium	Tápnövény	DIPEL-koncentráció [ppm]	Koncentrációnkénti lárvaszám
<i>Nymphalis io</i>	L1 – L5	csalán hajtás	0,4-25	50-100
<i>Vanessa atalanta</i>	L1	csalán hajtás vagy levél	1-50	20-50
<i>Nymphalis c-album</i>	L1	csalán levél	5-50	25
<i>Ostrinia nubilalis</i>	L1 – L2	kukorica levél 1,5% agarban	5-300	20
<i>Helicoverpa armigera</i>	L1 – L2	kukorica levél 1,5% agarban	1-100	20-30

10. táblázat: A DIPEL szubletális hatásainak vizsgálata

Faj	Kezelt stádium	Tápnövény	DIPEL-koncentráció [ppm]	Koncentrációnkénti lárvaszám
<i>Nymphalis io</i>	L1 – L3	ládás csalán	0,3-2,4	273-511
<i>Nymphalis c-album</i>	L1 – L3	ládás csalán	4,8-19,0	105-195

A szubletális hatások vizsgálatához DIPEL WP készítménnyel kezelt lédús csalánt használtunk, melyen az első három lárvastádiumban táplálkoztak a lárvák, melyeket azután kezeletlen csalánra helyeztünk. A 20-20 lárva tömegét mértük a 12. (L3) és a 18. (L4-5) napon. Szklerotizálódás után ivarok szerint elkülönítettük a bábokat és mértük azok tömegét. Nyomon követtük az imágók kelését, azaz a teljes posztembrionális fejlődési időt.

A DIPEL-lel végzett kísérletek paramétereit a 9. és a 10. táblázat foglalja össze. A kísérletes munkát Lauber Éva végezte.

4.12. A levélfogyasztás, a súlygyarapodás és a fejlődési idő stádiumonkénti vizsgálata nappali pávaszemen

Átlagosan 14 ismételtsben mértük a csalánlevelek levélemeletenkénti levéltömeg/levélfelület arányát és a táplálkozási vizsgálatokhoz csak az e tekintetben statisztikailag nem különböző (5-8.) levélemeleteket használtuk. A leveleket egyesével jelöltük és megmértük a szélességüket és a hosszúságukat, majd miután a lárvákat új levélre helyeztük, megmértük a megrágott levelek felületét (MODEL LI-3000; Li-Cor Inc, USA). Lineáris regresszióval kapott egyenlet segítségével (x – levélszélesség és levélhosszúság szorzata, y – levélfelület) kiszámoltuk az elfogyasztott levélfelületet.

Az etetési kísérlethez a csalánlevélről óvatosan leválasztott tojáscsomókat használtunk, így a lárvák a kísérlet előtt nem fogyaszthattak táplálékot. Az első stádiumú lárvákat kelés után tízes csoportokban kis üvegpotharakban vattadugóval rögzített csalánlevelekre helyeztük. Az egyedileg jelölt leveleket szükség szerint illetve vedlés előtt (amikor a lárvák már nem fogyasztottak táplálékot) cseréltük újakra. A második stádiumhoz szintén 10-10 lárvát került egy levélre, a harmadik stádiumban kettesével neveltük a lárvákat, a negyedik stádiumtól egyesével. Az egyes lárvastádiumok levélfogyasztását 6-12 ismételtsben (csoportban) vizsgáltuk. Az egyes stádiumokat az M3 mellékletben összefoglalt morfológiai bélyegek alapján különítettük el.

A súlygyarapodáshoz megmértük a kelés utáni lárvák tömegét (az első és második stádiumban az analitikai mérési pontosság miatt tízesével illetve húszasával, későbbiekben egyesével), majd minden lárvastádiumban a vedlés előtti állapotban (amikor a hernyók már nem táplálkoznak) a lárvák tömegét. Nappali pávaszem esetén ivaronként külön mértük a nőtény és hím bábok súlyát, illetve egyedileg nevelt állatok révén, az utolsó lárvastádium tömege is visszamenőleg elkülöníthető volt ivarilag.

A fejlődési idő vizsgálatához a tojásrakást követően egy-egy tojáscsomót 21, 25 illetve 29,5 °C-ra helyeztünk, majd a kikelő lárvákból kb. 100-100 állatot neveltünk az adott hőmérsékleten. Naponta kétszer ellenőrizve az állatokat nyomon követtük azok fejlődését.

A módszerek kidolgozását és a kísérletes munkát Lauber Éva végezte.

4.13. A nappali pávaszem magányos és csoportos fejlődésének vizsgálata

Ezekben a kísérletekben frissen kelt, 3-6 órás első stádiumú *Nymphalis io* lárvákkal dolgoztunk. Egy kísérletben 50 lárvát magányosan, 50-et ötös csoportokban (10x5) és 50-et tízes csoportokban (5x10) neveltünk. Egy kísérlethez egy tojáscsomóból származó állatokat használtunk, mely egy, a tojásrakás idejére izolált nőténytől származott. Mivel egy pávaszem

nőstény rendszerint csupán egy hímmel párzik (Wiklund *et al.*, 2003), ezért az egy csomóból származó állatok genetikailag egyöntetűnek tekinthetők.

Kis üveg poharakba egyesével vattadugóval csalánleveleket helyeztünk. A növények teljesen kiterült, de még nem előregedett, 5-8. levélemeletén elhelyezkedő leveleit használtuk. Az így előkészített levelek közepére tettük óvatosan ecsettel, mikroszkóp alatt a lárvákat. Az ötös és tízes csoportok esetén a lárvákat a természetes csoportosulási hajlamukat követve egymás mellé, 1 cm²-en belül helyeztük. Négy kísérletet végeztünk, egyet 21 ± 1 , egyet 25 ± 1 és kettőt 26 ± 1 °C-on.

A kísérletes munkát Lauber Éva és Darvas Béla tervezte és Lauber Éva hajtotta végre.

4.14. Fényképek készítése

A mikroszkópos fényképek Olympus SZ60 binokuláris mikroszkóp Olympus C-5050Z fotókamerájával, kézi mélységélesség-változtatással készített sorozatfelvételek CombineZ programmal való egyesítése. A saját makroszkópos képek Panasonic DMC-FZ4 kamerával készültek.

4.15. Statisztikai értékelés

Az adatokat STATISTICA szoftverrel (StatSoft Inc., USA) és R 2.10.1 programcsomaggal (R Development Core Team, 2009) Darvas Béla és Harnos Andrea értékelte. Az *ELISA* mérések során a standard grafikon t lineáris és szigmoid regresszióval számoltuk. A Cry1Ab-toxin koncentrációját lineáris regresszióval határoztuk meg. A mért koncentrációk statisztikai azonosságát kétmintás t-próbával vizsgáltuk meg. A statisztikailag homogén csoportokat Fisher-féle legkisebb szignifikáns differencia teszttel (*LSD*) különítettük el.

A biológiai tesztek értékelése során a halmazban megjelenő legalsó és legfelső értéket töröltük. Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük. Az adatokat egyutas *ANOVA* és Tukey-teszt (Hothorn *et al.*, 2008) illetve legkisebb szignifikáns differencia (*LSD*) számításával, valamint a fejlődési idők esetén Monte-Carlo szimulált p-érték segítségével elemeztük. Az LC₅₀ értékeket probit analízissel, az R program MASS (Venables és Ripley 2002) és doBy (Hojsgaard *et al.*, 2009) csomagjainak segítségével határoztuk meg. Az eredményeket STATISTICA illetve R programokkal jelenítettük meg.

5. EREDMÉNYEK

5.1. Cry1-toxin mérése kereskedelmi forgalmú *ELISA* rendszerekkel

Mennyiségi méréseinket EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE kittel kezdtük 2001-ben, majd annak a kereskedelmi forgalomból való váratlan visszavonása után – a cég a továbbiakban csak a Cry1-toxin kimutatására szolgáló QUALIPLATE-et forgalmaz – Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kittel folytattuk vizsgálatainkat. A váltás az eredményeink megalapozott összevethetőségéhez megkívánta a két rendszer összehasonlító vizsgálatát.

5.1.1. Cry1Ab-prototoxin és aktivált Cry1Ab-toxin mérése

Mindkét kereskedelmi forgalmú *ELISA* kittel (EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate és Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac) meghatároztuk a Cry1Ab-prototoxin koncentrációját tripszines aktiváció előtt illetve után. Az eredményeket a 11. táblázatban foglaltuk össze.

11. táblázat: A bakteriális eredetű Cry1Ab-prototoxin és az aktivált toxin koncentrációja, valamint az aktivált toxin/prototoxin kereszt-reaktivitás két kereskedelmi forgalmú *ELISA* kittel mérve (EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE és Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac)

Tripszin	Koncentráció		Tripszin/toxin arány	Koncentráció aktivált Cry1Ab-toxin mért	Kereszt-reaktivitás ^A aktivált Cry1Ab-toxin/prototoxin
	névleges	mért			
	[ng/ml]		[m/m]	[ng/ml]	[%]
375	750	748,3 ± 86,9 (A) ^B	0,50	292,2 ± 70,6 (B) ^B	39,1 ± 9,4
75			0,10	323,7 ± 47,2 (B) ^B	43,3 ± 6,3
125	275	277,1 ± 10,5 (C) ^C	0,45	150,5 ± 8,0 (D) ^C	54,3 ± 3,1
25			0,09	153,8 ± 8,3 (D) ^C	55,5 ± 3,0
5			0,02	164,3 ± 14,1 (D) ^C	59,3 ± 4,8

Megjegyzés: ^A – Az aktivált Cry1Ab-toxin és a Cry1Ab-prototoxin közötti kereszt-reaktivitást százalékosan adtuk meg, a mért koncentrációk alapján;

^B – A méréshez EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE-et és Cry1Ab-prototoxint (Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada) használtunk, a névleges Cry1Ab-toxin koncentráció 750 ng/ml volt. A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő adatokat jelölnek (LSD_{1%} = 212,4 ng/ml);

^C – A méréshez Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kitet és Cry1Ab-prototoxint (Abraxis, Warminster, PA, USA) használtunk, a névleges Cry1Ab-toxin koncentráció 275 ng/ml volt. A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő adatokat jelölnek (LSD_{1%} = 28,8 ng/ml).

Az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE-et használva a 750 ng/ml kiindulási koncentrációval szemben a Cry1Ab-prototoxin (Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada) enzimatiszus aktiválás után 290-325 ng/ml közötti koncentrációban volt visszamérhető. Az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kit esetén a kiindulási 275 ng/ml értékhez képest (Cry1Ab-prototoxin – Abraxis, Warminster, PA, USA) az aktivált toxin 155-165 ng/ml koncentrációjának mutatkozott. Negatív kontrollként

hőkezeléssel és *PMSF* enzimgátlóval előzetesen inaktivált tripszint adtunk a protoxinhoz, hogy kizárjuk a nem toxinspecifikus hatásokat a mérés során. A negatív kontrollok mérése során a kiinduláskor mérhető toxinkoncentráció 95,4-99,7 %-át mértük.

A toxin/tripszin arány kísérleteinkben 2 és 55 között változott, ami a moláris tömeget tekintve 0,36 és 10 közötti arányoknak felel meg. Szándékosan választottunk ilyen magas tripszin arányt, hogy az enzimátikus hasítás maradéktalanul végbemehessen, így az alkalmazott arányokon belül a protoxin hasítása a tripszin koncentrációtól nem függ.

Az *ELISA* vizsgálatok során minden esetben csökkent az enzimátikus emésztés után a toxinkoncentráció a kiindulási protoxin koncentrációhoz képest. Mindkét *ELISA* rendszerben az alkalmazott Cry1Ab-specifikus antitesteket protoxinnal való immunizálással állították elő, s ezek alacsonyabb affinitást mutatnak a hasított ~Cry1Ab-toxin kisebb számú és/vagy megváltozott antigén epitópjaival szemben, mint az eredeti immunogén, a Cry1Ab-protoxin esetén. Az így meghatározott kereszt-reaktivitás 0,412-nek adódott az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE és 0,564-nek az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kit esetén. Mindez azt mutatja, hogy ezek az *ELISA* rendszerek immunanalitikai szempontból megfelelők Cry1-protoxin mérésére (pl. mikrobiális eredetű mintákhoz), de genetikailag módosított Cry1-tartalmú növényi minták esetén, melyek preaktivált toxint tartalmaznak, korrekcióra van szükség a mérések alapján számolt kereszt-reaktivitási értékekkel.

5.1.2. A két Cry1Ab-toxint mérő *ELISA* kit összevetése

Szignifikáns eltérés mutatkozott a két *ELISA* rendszer aktív toxinnal szembeni kereszt-reaktivitásában (11. táblázat), ezért a két módszert egymáshoz validálni szükséges. Erre a célra referencia mintát (#OR4) használtunk, melynek toxintartalmát több időpontban mértük, mindkét *ELISA* kittel (12. táblázat). A növényi minta Cry1Ab-toxin koncentrációja EnviroLogix kittel 2002-ben $4,64 \pm 0,36$ µg/g-nak, Abraxis kittel 2007-ben illetve 2009-ben $1,94 \pm 0,75$ és $1,99 \pm 0,16$ µg/g-nak adódott protoxin standard használata mellett. A kereszt-reaktivitással korrigált aktív toxinra vonatkozó értékek $11,25 \pm 0,88$ illetve $3,43 \pm 1,34$ és $3,52 \pm 0,28$ µg/g – a fenti sorrendben.

Ez azt jelenti, hogy az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE alkalmazásával 2,36-szor magasabb értékek adódtak, mint ugyanazon mintát Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kittel mérve. A két kit különbsége a kereszt-reaktivitással korrigálva 3,23-szoros az aktív toxin kimutatását illetően (12. táblázat). Az Abraxis rendszere fagyasztott levélminták ismételt mérése esetén is hasonlóan alacsony értékeket produkált. E szerint a két *ELISA* rendszer hasonló nagyságrendi tartományban szolgáltat adatokat, ám mérési eredményeik direkt összehasonlíthatósága kérdéses.

12. táblázat: Szárított DK-440 BTY (*MON 810*) kukorica referencia minta mérése a két alkalmazott *ELISA* kittel

Alkalmazott <i>ELISA</i> rendszer	#OR4 referencia minta ~Cry1Ab-toxin koncentrációja	
	mért <i>ELISA</i> eredmény	aktivált toxinhoz korrigált eredmény
	[µg toxin/g száraz tömeg]	
Envirologix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE, 2002	4,64 ± 0,36 (A)	11,25 ± 0,88 (C)
Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA kit, 2007	1,94 ± 0,75 (B)	3,43 ± 1,34 (D)
Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA kit, 2009	1,99 ± 0,16 (B)	3,52 ± 0,28 (D)

Megjegyzés: A, B – A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő adatokat jelölnek (LSD_{1%} = 0,50 ng/g).

C, D – A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő adatokat jelölnek (LSD_{1%} = 0,99 ng/g).

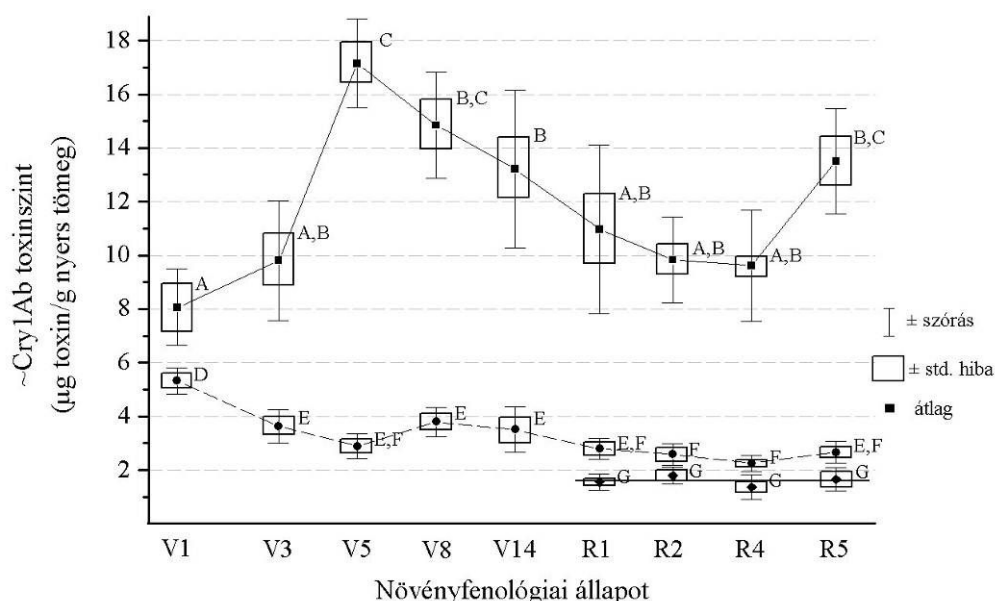
5.1.3. ~Cry1Ab-toxin eloszlása *MON 810* kukoricában

A ~Cry1Ab-toxin termelődését két féle megközelítésből vizsgáltuk: egyfelől egy vegetációs perióduson belül követtük nyomon a ~Cry1Ab-toxinszint alakulását a különböző növényi szervekben, másfelől azonos fejlettségi állapotban lévő kukorica szerveinek ~Cry1Ab-toxintartalmát vetettük össze több év termesztés során.

5.1.3.1. ~Cry1Ab-toxin szintek alakulása az egyes növényi szervekben a fejlődés során

A ~Cry1Ab-toxin monitorozása során, melyet az első évben végeztünk, jelentős különbségek jelentkeztek mind időben, mind a minták között. Egyedi minták többszörös mérése során 0,2-7,6 %, míg az egy időben mintázott párhuzamos ismétlések között 9,7-57,8 % eltérés mutatkozott a levél, a gyökér, a szár vagy a szem minták ~Cry1Ab-toxintartalmában. Ez az egyedi növények fajtán belüli nagyfokú – ~Cry1Ab-toxintartalomban megnyilvánuló – biológiai variabilitásra utal.

~Cry1Ab-toxint nem találtunk a közel izogenikus kukorica mintákban (DK-440 – negatív kontroll). Ez a kimutatási határokat (0,14 ng/ml Envirologix és 0,125 ng/ml Abraxis kit esetén), valamint a kereszt-reaktivitási értékeket figyelembe véve elvileg azt jelenti, hogy az izogenikus kukoricahibrid nem tartalmaz 85 illetve 55 ng/g toxinnál többet (friss tömegre vonatkoztatva).



5. ábra: A ~Cry1Ab-toxintartalom változása a levélben, a gyökérben és a szárban a DK-440 BTY (*MON 810*) kukoricában EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE kittel mérve.

Megjegyzés: Az értékeket a protoxin és aktív toxin között mért kereszt-reaktivitási különbséggel korrigáltuk. A növényi mintákat legalább 4 ismétlésben vizsgáltuk. A Cry1Ab-toxintartalmat a növények következő fejlődési stádiumaiban vizsgáltuk: egy (V1), három (V3), öt (V5), nyolc (V8) és tizennégy (V14) kifejlett levél, nővirágzás (R1), hólyagérés (R2), viaszérés (R4) és „lófogú” állapot (R5). Az eltérő nagybetűk szignifikáns eltéréseket jeleznek ($LSD_{1\%} = 3,68$ és $0,92 \mu\text{g } \sim\text{Cry1Ab/g}$ friss tömeg a levél (A-C) illetve a gyökér (D-F) esetén. A ~Cry1Ab-toxintartalom nem változott szignifikánsan a gyökérben (G; $F_{\text{kalk.}} = 1,37$).

A *MON 810* kukoricában mért adatokat a fentebb tárgyalt okok miatt az adott *ELISA* rendszerre vonatkozó kereszt-reaktivitással korrigálva adjuk meg. A ~Cry1Ab-toxintartalmat illetően egy sajátos trend rajzolódott ki a DK-440 BTY fajtájú növények fejlődése során (5. ábra). A ~Cry1Ab-toxin termelődése a levelekben a kelést követő időszakban a legkifejezettebb; a magban mérhető $0,83 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$ -ról $8,06 \pm 1,43$ -ra növekszik. A levelek toxintartalma az első hónapban tovább nő, s ötleveles stádiumban (V5) éri el a maximumot, $17,15 \pm 1,66 \mu\text{g/g}$ értéken. Ezután fokozatosan a kelés utáni mennyiségre csökken ($9,61 \pm 2,07 \mu\text{g/g}$) az érés folyamán (R4 fázis), majd kis mértékben ismét növekszik ($13,51 \pm 1,96 \mu\text{g/g}$), a növényeknek az éréssel párhuzamosan bekövetkező részleges vízvesztése következtében (R5 fázis). Hasonló, bár kisebb mértékű változások következnek be a gyökér ~Cry1Ab-toxintartalmában, mely a kelést követő $5,32 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$ -ról kis hullámmzással 2 és 4 $\mu\text{g/g}$ közötti értékeken mozog, majd az R4 fázisban mérhető minimuma után $2,25 \pm 0,30 \mu\text{g/g}$ értékre nő a vízvesztés következtében. A szár toxintartalma nem változott szignifikánsan az R1-R5 fázisban, mely utóbbiban $1,36 \pm 0,45 \mu\text{g/g}$ koncentráció jellemezte. Így a toxintartalom alapján a különböző szervek az alábbi sorrendet mutatták: levél > portokfal > gyökér > szár > mag > pollen.

5.1.3.2. A *MON 810* kukorica ~Cry1Ab-toxintartalma a VT-R4 fenológiai fázisokban

Ahogy az a ~Cry1Ab-toxineloszlási adatok időbeli lefutásából kitűnik, a toxinszintek nem változnak szignifikánsan a levélben, a gyökérben és a szárban a növény reproduktív szakaszának első felében (5. ábra), a nővirágzás (R1 – a bibék megjelenése) és a viaszérés (R4 – intenzív keményítő felhalmozódás a magban) között. Ezért ezen fázisban lévő növények egymással több év tekintetében is összehasonlíthatók (13. táblázat). A ~Cry1Ab-toxintartalom egyöntetűen a levelekben volt a legmagasabb, és a legalacsonyabb a magban és a pollenben.

13. táblázat: A *MON 810* kukorica ~Cry1Ab-toxintartalma a VT-R4 fenológiai fázisokban

Növényi szerv ^A	~Cry1Ab-toxintartalom ^B [µg toxin/g friss tömeg]		
	2001 ^C	2005 ^D	2008 ^E
levél	9,83 ± 1,61 (A)	7,99 ± 1,34 (AB)	6,12 ± 2,15 (B)
gyökér	2,58 ± 0,41 (C)	1,53 ± 0,43 (D)	3,82 ± 0,44 (E)
szár	1,79 ± 0,31	1,07 ± 0,10	1,61 ± 0,60
portokfal vagy címer ^F	4,98 ± 0,31	n.m. ^G	1,31 ± 0,37
pollen ^F	0,47 ± 0,03	< LOD ^H	n.m.

Megjegyzés: ^A – ~Cry1Ab-toxintartalmat a címerhányás és a viaszérés közötti fejlődési fázisokban mértük (VT-R4). A növényi mintákat legalább négy ismételtesben enzimjelzéses immunanalitikai vizsgálattal mértük;

^B – A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő adatokat jelölnek. LSD_{5%} = 2,81 µg/g a levélre (A, B) és LSD_{1%} = 1,05 µg/g a gyökér esetén (C-E). A szár ~Cry1Ab-toxintartalmában nem jelentkezett szignifikáns eltérés az évek között (F_{szám.} = 2,99);

^C – A levelet, a gyökeret és a szárát R4, a pollent és a portokot R1 fejlődési fázisban mintáztuk. A ~Cry1Ab-toxintartalmat EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE kittel mértük. A mért adatokat az aktív toxin/protoxin rendszerre vonatkozó kereszt-reaktivitásával (0,412) korrigáltuk;

^D – A levelet, a gyökeret és a szárát R3, a pollent R1 fejlődési fázisban mintáztuk. A ~Cry1Ab-toxintartalmat Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA kittel mértük. A mért adatokat az aktív toxin/protoxin rendszerre vonatkozó kereszt-reaktivitásával (0,564) korrigáltuk;

^E – A növényi szerveket címerhányáskor (VT) mintáztuk. A ~Cry1Ab-toxintartalmat Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA kittel mértük. A mért adatokat az aktív toxin/protoxin rendszerre vonatkozó kereszt-reaktivitásával (0,564) korrigáltuk;

^F – 2001-ben portokfalat a pollenszórás követően gyűjtöttünk. 2008-ban a címert pollenszórás előtt mintáztuk (VT stádium);

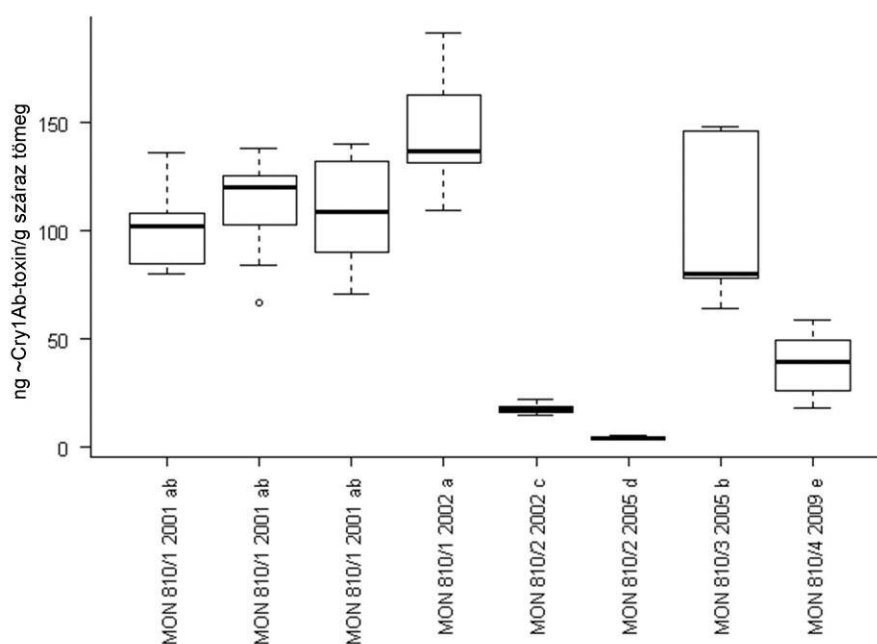
^G – nem mért (n.m.)

^H – kimutatási határ (*limit of detection*; LOD)

A levélben illetve a gyökérben mért toxin mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt 2008-ban – illetve a gyökérben 2005-ben is – a többi évekhez képest. A szár toxintartalmában nem mutatkozott szignifikáns eltérés az évek tekintetében sem (F_{számított} = 2,99). A legnagyobb különbség a portok/címer adatok között mutatkozott, mivel a mintázott növények fejlettsége eltért. 2001-ben pollenszórás követően gyűjtöttünk portokfal mintát, 2008-ban a címerhányás kezdetén, még éretlen címerből vettünk mintát. A 2005-ben gyűjtött pollen toxintartalma a gyártó által megadott mérési metódussal kimutatási határ alattinak bizonyult. Minden évben a levelekben – mely szervben a legintenzívebb a fotoszintézis – volt a legmagasabb a toxinszint.

5.1.3.3. A *MON 810* kukorica pollenjének ~Cry1Ab-toxintartalma

Szignifikáns különbségek mutatkoztak az egyes hibridek pollenének ~Cry1Ab-toxintartalmában (6. ábra). A *MON 810/1* és a *MON 810/2* DK-440 BTY hibridek: a *MON 810/1* magja normál hibrid méretű, míg a *MON 810/2* magja szignifikánsan kisebb volt (7. ábra; az adatok nincsenek feltüntetve); mindkét magtételt a Monsanto Hungária Kft. biztosította. Különbség mutatkozott egy hibrid pollenjének ~Cry1Ab-toxintartalmában is egyazon termőhelyen a különböző években. 2002 júniusa és júliusa kifejezetten száraznak bizonyult, amikor is csak a fő címerág szórt pollent. Ennek a kis mennyiségű pollennek a toxintartalma szignifikánsan magasabbnak bizonyult a korábbi és a későbbi évekenél.



6. ábra: *MON 810* hibridek pollenjének~Cry1Ab-toxintartalma különböző években

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel



7. ábra: A tulajdonos által biztosított DK-440 BTY vetőmagok(bal oldalt a *MON 810/1*, jobb oldalt a *MON 810/2*)

Fotó: Darvas Béla

5.2. A DK-440 kukorica levélfelülete

A 2007-ben, trágyázott körülmények között, 60 000 tő/ha sűrűségben termesztett DK-440 hibrid levélfelülete (14. táblázat) alapján 3,82 ha levélfelület esik egy hektár földterületre. Azaz az adott korai érésű hibrid esetében majdnem 4-szeres a levélborítottság a területen.

14. táblázat: DK-440 kukorica levélfelülete (Zsámbék, 2007)

Levélelemlet	Levélfelület [cm ²]
7.	341 ± 98 (BC)
8.	477 ± 29 (CD)
9.	626 ± 79 (D)
10.	742 ± 71 (E)
11.	776 ± 58 (E)
12.	756 ± 28 (E)
13.	695 ± 32 (DE)
14.	630 ± 35 (D)
15.	549 ± 46 (CD)
16.	416 ± 71 (C)
17.	263 ± 55 (B)
18.	94 ± 47 (A)
Összesen	6365

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló különböző betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (6 ismétlés)

5.3. A kukorica pollentermő képessége

A fajtaválaszték szerint a kukorica pollenszórása hazánkban júliusban és augusztusban várható. Termesztési kísérleteinkben vizsgáltuk a módosított hibrid tulajdonságait, míg saját illetve egy zsámbéki állományban az izogenikus hibrid jellemzőit követtük nyomon.

A fajták és hibridek között rendkívül nagymértékű eltérés mutatkozik a pollentermőképességben. Az általunk vizsgált hibrid nem tartozik a jelentős pollentermelők közé. A mért száraz pollenmennyiség 76-137 kg/ha volt, ami egyenlő ~152-274 kg/ha friss pollennel (a pollen víztartalma ~52 %; Aylor, 2002). 2002-ben – ez egy szárazabb év volt, amikor kiegészítő öntözést alkalmaztunk – csupán a fő címerág szórt pollent, s körülbelül 40 kg/ha pollen termett.

A portok űrtartalma (~3000 pollen/portok) és a portokszám (2400-4000 portok/tő; 15. táblázat) alapján, 4000 pollen/mg száraz tömeggel kalkulálva (Goss, 1968; Jesse és Obrycki, 2000), potenciálisan 160-180 kg/ha száraz pollen képes megteremni. Erősebb címerű fajtáknál ennél több is előfordulhat. A KISKUN 4517 fehér magvú fajta esetén közel 200 kg/ha száraz pollen termett 2004-2005-ben Julianna-majorban (16. táblázat).

15. táblázat: A DK-440 BTY és közel izogenikus vonalának, a DK-440 hibridnek a portokszáma

Hibrid	Portok $\pm$ szórás [db/címer]
DK-440 BTY, 2001 Julianna-major	2415 $\pm$ 648 (A)
DK-440, 2007 Zsámbék	4077 $\pm$ 509 (B)

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (7 ismétlés)

16. táblázat: Megtermett száraz pollenmennyiség

Hibrid	Száraz pollen $\pm$ szórás [g/tő]
DK-440 BTY, 2001	1,52 $\pm$ 0,33 (A)
DK-440, 2004	1,26 $\pm$ 0,16 (A)
KISKUN 4517, 2004	2,98 $\pm$ 1,60 (B)
KISKUN 4517, 2005	3,27 $\pm$ 0,94 (B)

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (10 ismétlés)

A mért pollenmennyiség 3,5-5,5 x 10¹¹ db pollen/ha-t jelent, ami töredéke a potenciálisan megtermőnek (6,4-7,2 x 10¹¹). A genetikai háttér mellett az időjárási tényezők – kiemelkedően a virágzás előtti csapadék mennyisége – jelentősen befolyásolják a pollenhozamot.

5.4. A kukoricapollen eloszlása

Ha a potenciálisan megtermő pollenmennyiség egyenletesen oszlana el a területen, úgy az 1900-2000 pollen/cm²-es sűrűséggel jelenne meg a kukorica levélzetén. A valóságban a potenciális pollenmennyiségnek csak egy része realizálódik, s ennek eloszlása is igen szélsőségesen változik.

5.4.1. A kukoricapollen vertikális eloszlása

A silóra és csalamádéra jellemző tössűrűség a kukoricapollen vertikális penetrációját részben akadályozta (17. táblázat: Julianna-major, 2001), az árukukoricára jellemző tössűrűség mellett egyenletesebb polleneloszlás volt mérhető (17. táblázat: Zsámbék, 2007).

A szilikonolajos lapokon nem volt lehetőség pollenátrendeződésre, így a legfelső leveleken igen nagy pollensűrűség alakult ki, mely amúgy nem jellemzi a kukorica gyengén szőrözött leveleit, különösen a felső, ferde állásúakat.

Árukukoricánál a felülről számolt 5. levélen a levélalapi harmadban mérhetőnél nagyobb pollensűrűségi értékek mérhetők a levélhegyen, azonban itt mutatkozik a legnagyobb adatszórás is. Ennek oka a szél okozta levélmozgáskor bekövetkező jelentős átrendeződés, ezért a sorszéli töveken a vertikális eloszlást a legkisebb szórást mutató alapi

harmadban végeztük. A lazább levélátfedés miatt a pollen itt már a pollenszórás első felében megjelent az alsó leveleken is (17. táblázat: Zsámbék, 2007). Az alacsonyabb értékek ugyanis nem csupán a tövek táblaszéli elhelyezkedéséből adódnak, 2007-es felvételezésünket a pollenszórás elején végeztük.

17. táblázat: Kukoricapollen vertikális eloszlása kukoricalevélen és ragadós lapon emeletenként, alulról számolva

Levélemelet	Pollensűrűség [pollen/cm ²]		
	Julianna-major (2001)		Zsámbék (2007)
	levélen	ragadós lapon	levélen
5.	30 ± 21 (A)	536 ± 217 (AB)	-
6.	32 ± 28 (A)	283 ± 110 (A)	-
7.	38 ± 22 (A)	529 ± 264 (AB)	73 ± 45 (A)
8.	43 ± 31 (A)	667 ± 294 (AB)	149 ± 57 (B)
9.	337 ± 249 (B)	890 ± 677 (BC)	161 ± 87 (AB)
10.	201 ± 56 (AB)	1259 ± 800 (C)	103 ± 71 (AB)
11.	1042 ± 468 (C)	1423 ± 1028 (C)	210 ± 110 (B)
12.	81 ± 54 (AB)	596 ± 531 (AB)	206 ± 80 (B)
13.	319 ± 444 (B)	1731 ± 339 (CD)	138 ± 41 (AB)
14.	65 ± 31 (AB)	1281 ± 368 (C)	198 ± 105 (B)
15.	-	-	185 ± 78 (B)
16.	-	-	154 ± 75 (AB)
17.	-	-	133 ± 32 (AB)
18.	-	-	175 ± 121 (B)

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (10 ismétlés)

5.4.2. A kukoricapollen horizontális eloszlása

A kukoricapollen átlagos sűrűsége az alsó nővirág emeletén 100-600-ról 10-100 pollen/cm²-es értékre csökken a szélső, címerezetlen *Bt*-kukoricasortól számított 3. címerezett szegély után (18. táblázat). Az első 5 méteren a kiüledő pollenmennyiség erőteljes csökkenését figyeltük meg. A kukoricapollen viszonylag nagy – 90-100 µm átmérőjű – gömbje általában csak korlátozott mértékű röpülésre képes. A maximális pollensűrűséget a radiálisan elhelyezett mérések eredményeiből kalkuláltuk, amely szerint uralkodó szélirányban az átlagnál hatszor nagyobb borítottság fordult elő (19. táblázat). A 200 méterre elhelyezett fogólapokon még 1 pollen/cm²-es értékeket mértünk. Kalkulációnk szerint a táblaszegélyi gyomnövények levélzetén, 40 kg/ha pollent termő *Bt*-kukoricánál a legszélső sortól átlagosan 5 méter után csökken a pollensűrűség 100 pollen/cm² alá. Három címerezett szegélyssorral ez megelőzhető (8. ábra), azonban az uralkodó szélirányban 6-10 méter körüli kritikus szegélyhatással kalkulálhatunk. A megadott kritikus zóna 160-180 kg/ha pollen esetén újra kalkulálandó.

Adataink a pollenszórás végére az alsó zöld levélen átlagosan 100-400 pollen/cm² sűrűséget valószínűsítene, amennyiben a fűszórás hetében (mint 2007-ben a vizsgált táblán) nincs eső. A minimális 0-hoz viszonyítva a maximum érték az egyetlen portok által termelt pollenszám értéke. Néha előfordul, hogy a még fel nem hasadt portok leszakad, és a leveleken nyílik fel. Ilyenkor – kis valószínűséggel – az ezer fölötti pollensűrűség is előfordul. A portok természetesen gyomnövények levelére is kerülhet, ahol a levélszőrök azt megfoghatják. A portokok nagyobb része szakad le pollenszórás után, s ezeket az első eső a kukoricalevél szárhoz illeszkedő „vízvezető árkához” sodorja, ahol felhalmozódik a pollennel együtt. A kukoricamoly fiatal hernyói előszeretettel táplálkoznak itt.

18. táblázat: DK-440 BTY kukoricapollen horizontális eloszlása szilikonolajos lapokon egy méter magasságban, három címezett szegélysor esetén (Julianna-major)

Elhelyezkedés	Távolság a tábla szélétől [m]	Pollensűrűség ± szórás [pollen/cm ²]	Arány a pollenforrástól [%]	Arány a tábla szélétől [%]
Utolsó címeres sor	-	346 ± 198 (D)	100	-
1. címezett sor	-	344 ± 267 (D)	99	-
3. címezett sor	-	199 ± 310 (C)	58	100
Kukoricatáblán kívül	1	56 ± 44 (C)	16	28
Kukoricatáblán kívül	5	20 ± 26 (B)	6	10
Kukoricatáblán kívül	10	14 ± 15 (B)	4	7
Kukoricatáblán kívül	20	9 ± 11 (B)	3	5
Kukoricatáblán kívül	30	2 ± 4 (A)	1	1
Kukoricatáblán kívül	50	1 ± 3 (A)	0	1
Kukoricatáblán kívül	70	0 ± 0 (A)	0	0
Kukoricatáblán kívül	100	6 ± 8 (B)	2	3
Kukoricatáblán kívül	200	3 ± 5 (A)	1	2

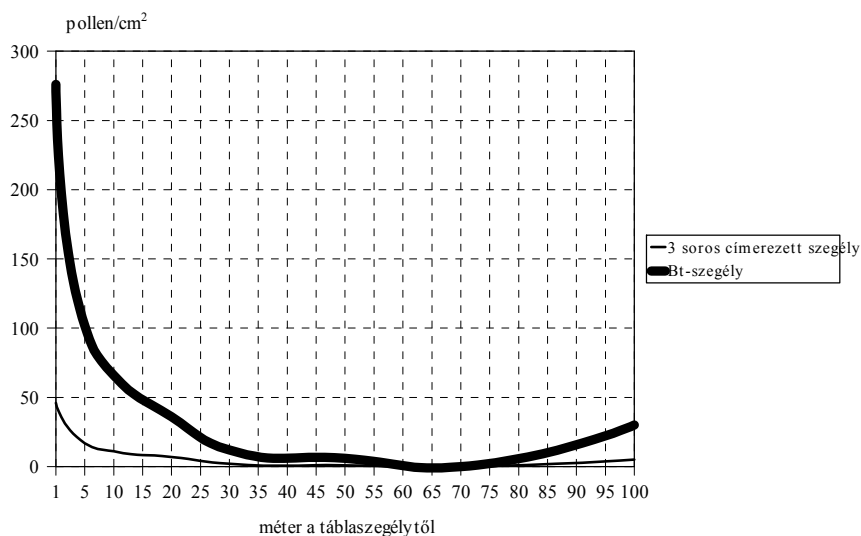
Megjegyzés: Augusztus első hetében MON 810/1 (2001) kukoricán végzett mérések. A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (50 ismétlés)

19. táblázat: DK-440 BTY kukoricapollen koncentrikus eloszlása szilikonolajos lapokon 1 méter magasságban, az uralkodó széliránytól függően (Julianna-major)

Elhelyezkedés	Pollensűrűség ± szórás [pollen/cm ²]			
	0°	+45°	+90°	+135°
Utolsó címeres sor	195 ± 21 (BC)	351 ± 138 (CD)	349 ± 78 (CD)	447 ± 117 (D)
1. címezett sor	114 ± 35 (AB)	132 ± 27 (AB)	239 ± 28 (BC)	398 ± 63 (CD)
3. címezett sor	18 ± 10 (AB)	26 ± 7 (AB)	16 ± 8 (AB)	91 ± 18 (AB)
Összesen (átlag)	327	509	604	936
Kategória	1	2	2	3

Elhelyezkedés	180°	-135°	-90°	-45°
Utolsó címeres sor	372 ± 150 (CD)	717 ± 198 (E)	271 ± 49 (BC)	296 ± 60 (C)
1. címezett sor	397 ± 134 (CD)	614 ± 125 (E)	78 ± 32 (AB)	141 ± 18 (AB)
3. címezett sor	146 ± 39 (B)	261 ± 68 (BC)	6 ± 7 (A)	103 ± 34 (AB)
Összesen (átlag)	915	1592	355	540
Kategória	3	5	1	2

Megjegyzés: Augusztus első hetében MON 810/1 (2001) kukoricán végzett mérések. A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) $P_{1\%}$ -os valószínűséggel (50 ismétlés)



8. ábra: DK-440 BTY kukoricapollen horizontális eloszlása három címezett szegéllyel mértén, 1 méteres magasságban mérve – 3 soros szegéllyel mért, illetve a nélkül kalkulált értékek (Julianna-major)

5.4.3. A kukoricapollen eloszlása gyomnövények levelein

Az árukukorica első három sorában a kémiai gyomirtás sorvégi egyenetlensége és a késői záródás (szélhatás) miatt többféle, a táblaszáron élő kétszikű gyom fordul elő. Levelük felszíni struktúrája nagymértékben eltérő, pollenfogó képességük vizsgálataink szerint ezerszeres különbségeket is mutathatnak (20. táblázat). A kukorica leveléhez viszonyítva a sorközi, árnyékban nevelődő nagy felszínű és kiterülő levelű nagy csalán több kukoricapollent foghat meg. Az itt mérhető pollensűrűség a pollenszórás végén átlagosan 300-500 pollen/cm²-re becsülhető. Jó pollenfogó-képességű a csattanó maszlag (*Datura stramonium* L.), amely hazai kukoricáinkban igen gyakori, viszont a levelén kiülepítő pollent nem tartja meg. Kiemelkedő pollenfogó az orvosi ziliz (*Althaea officinalis* L.), amelyen átlagosan 1000 pollen/cm²-es (ez már láthatóan sárgás színt kölcsönöz a levélnek) értéket mértünk. Ez azt jelenti, hogy kukoricaleveleken a rászóródó pollennek csupán töredéke marad meg.

A mikroszkópos felvételeinken jól látszik, hogy az egyes gyomfajok levelei eltérő struktúrájú felülettel és szőrözöttséggel rendelkeznek. Ez és a levélfelület nagysága, valamint állása alapvetően meghatározza a kiülepítő pollen mennyiségét (vö. 20. táblázat és 9. ábra). Legjobb pollenfogónak az orvosi ziliz bizonyult, melynek igen sűrű szőrözöttsége és nagy felülete kiemelkedő mennyiségű pollent fogott és tartott meg még egy hónap után is. Kisebb értékekkel, de hasonlóan tartósan bizonyult a nagy csalán leveleire kiülepítő pollen.

20. táblázat: DK-440 kukoricapollen eloszlása gyomnövények levelein, a tábla széli tövek alatt (Zsámbék)

Faj	Pollensűrűség ± szórás, július 13. [pollen/cm ²]	Pollensűrűség ± szórás, augusztus 15. [pollen/cm ²]
<i>Althaea officinalis</i>	1114 ± 626 (D)	508 ± 304 (c)
<i>Cannabis sativa</i>	83 ± 46 (AB)	3 ± 7 (ab)
<i>Chenopodium hybridum</i>	31 ± 37 (A)	32 ± 64 (ab)
<i>Cirsium arvense</i>	39 ± 59 (A)	0 ± 0 (a)
<i>Datura stramonium</i>	339 ± 266 (C)	0 ± 0 (a)
<i>Urtica dioica</i>	328 ± 200 (C)	42 ± 66 (ab)
<i>Zea mays</i> alsó zöld levél	190 ± 114 (B)	2 ± 5 (ab)

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (59 ismételtes)

A kukoricapollen túlnyomó többsége a szélső sortól számított első öt méteren kiszóródik. A nagy csalán levelein ez követhető volt, amennyiben a 3 méterre lévő csalánon ötöd annyi pollen volt átlagosan mérhető, mint a szélső sorokban (21. táblázat). Napos körülmények között a felmagzó száraknak kicsi és kanalasodó levelei vannak, s ez már a 0,5 méterre található csalánnövényeket is jellemzi.

21. táblázat: A DK-440 (MON 810) kukoricapollen eloszlása *Urtica dioica* L. felső levelein, a tő elhelyezkedésétől függően

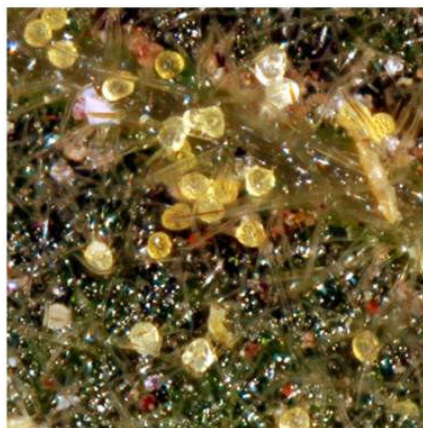
Elhelyezkedés	Pollensűrűség ± szórás [pollen/cm ²]
Az 1-2. sor között	328 ± 200 (C)
1 méterre a táblaszéltől	144 ± 187 (B)
3 méterre a táblaszéltől	64 ± 94 (A)

Megjegyzés: Zsámbék, 2007. július 13. A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (57 ismételtes)

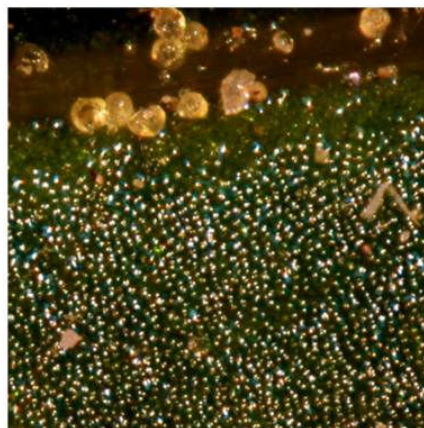
22. táblázat: Kukoricapollen eloszlása gyomnövények levelén (Kömlőd, 2009)

Faj	Pollensűrűség ± szórás [pollen/cm ²]
<i>Carduus acanthoides</i>	14 ± 19 (B)
<i>Euonymus europeus</i>	30 ± 34 (B)
<i>Juglans regia</i>	2 ± 4 (A)
<i>Viola</i> sp.	5 ± 7 (A)
<i>Rubus</i> spp. – 1. sorban	154 ± 96 (D)
<i>Rubus</i> spp. – 0 méterre	88 ± 70 (C)
<i>Rubus</i> spp. – 1 méterre	94 ± 55 (CD)
<i>Rubus</i> spp. – 3 méterre	27 ± 30 (B)

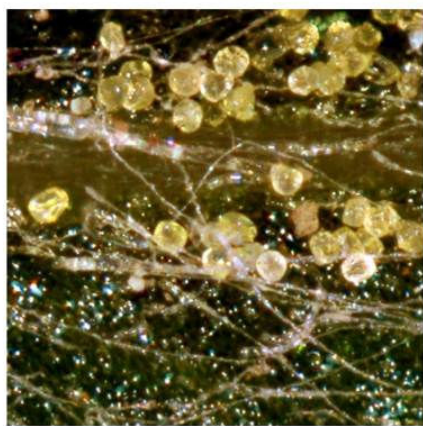
Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (25 ismételtes)



a./ *Althaea officinalis* L.



b./ *Chenopodium hybridum* L.



c./ *Cirsium arvense* L.



d./ *Datura stramonium* L.



e./ *Urtica dioica* L.



f./ *Zea mays* L.

9. ábra: Néhány gyomnövény és a kukorica levélfelületének szerkezete (~1 mm²)

Megjegyzés: a sárga gömbök kukoricapollen-szemek

Fotó: Darvas Béla és Lauber Éva

További kukoricatáblák felvételezésekor figyeltünk fel a hamvas szeder gyakori előfordulására. A táblán befelé számított egy méteren szeder levelén (*Rubus* spp.) szignifikánsan nőtt a kiüledett pollen mennyisége (22. táblázat). A táblától távolodva szederlevelén a csalánhoz hasonló polleneloszlást tapasztaltunk. A szeder kúszó indáival képes mélyen a táblába hatolni. A pollenszórás első felében a táblában mérhető 333

pollen/cm² a táblaszélén szélirányban átlagosan 189 pollen/cm²-re, három méteren 7 pollen/cm²-re csökkent, majd öt méterig távolodva ismét emelkedett (23. táblázat). Felvételezésünket követően erős széllekedésekkel járó eső mosta a leveleket, mely után négy nappal megismételtük a mintavételt. A pollen eloszlása hasonló képet mutatott, mint korábban (23. táblázat), a táblán belül a korábbinál magasabb értékekkel (átlagosan 431 pollen/cm²).

23. táblázat: Kukoricapollen eloszlása *Rubus caesius* L. levelén (Julianna-major, 2009)

Elhelyezkedés [m]	Pollensűrűség ± szórás augusztus 13. [pollen/cm ²]	Pollensűrűség ± szórás augusztus 18. [pollen/cm ²]
első sor	333 ± 219 (d)	431 ± 334 (D)
0	189 ± 129 (d)	213 ± 150 (CD)
1	152 ± 102 (d)	110 ± 52 (C)
2	74 ± 82 (c)	119 ± 74 (C)
3	7 ± 8 (a)	14 ± 16 (A)
4	24 ± 30 (b)	17 ± 21 (A)
5	102 ± 149 (c)	37 ± 37 (B)

Megjegyzés: Augusztus 13-14-én 5 mm csapadék esett. A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (151 ismétlés)

5.5. A kukorica és különböző gyomnövények levélvastagsága

A Julianna-majorban vizsgált gyomfajok levéltömeg és -felület arányai alapján három csoportot különítettünk el (24. táblázat). Az *Asclepias syriaca* L. (Asclepiadaceae), a *Cirsium arvense* (L.) Scop. (Asteraceae) és a *Taraxacum officinale* Weber ex. Wiggers (Asteraceae) esetében ugyanazon levélfelülethez nagyobb levéltömeg társul, mint a kukoricánál. A második csoporthoz tartozik a kukorica mellett a *Chondrilla juncea* L. (Asteraceae), a *Consolida regalis* S. F. Gray (Ranunculaceae), a *Picris hieracioides* L. (Asteraceae), a *Rubus* fajok (Rosaceae) és a *Setaria viridis* (L.) Beauv. (Poaceae). Mindkét csoporttól eltérően az *U. dioica* és a *Daucus carota* L. (Apiaceae) levélfelületéhez tartozik a legcsekélyebb levéltömeg (24. táblázat).

Ez azt jelenti, hogy adott levélfelületen számolható azonos *Bt*-kukoricapollen-sűrűség esetében a nagy csalánon élő hernyók 2,85-ször, a szeder fajokon élők 1,95-ször annyi Crytoxint fogyasztanak, mint a selyemkóró esetében például a *Danaus* lárvák.

A zsámbéki felvételezés során a korábban már vizsgált kukorica és nagy csalán mellett további gyomnövények levéltömeg/levélfelület arányát mértük (25. táblázat). A legvékonyabb levelekkel a *Chenopodium hybridum* L. (Amaranthaceae) és a *Cannabis sativa* L. (Cannabidaceae) rendelkezett. A csalánnal egy csoportba tartozónak bizonyult a kiemelkedő pollenfogó képességgel rendelkező *Althaea officinalis* L. (Malvaceae). A kukorica mellett a *Datura stramonium* L. (Solanaceae) levelei adódtak a legvastagabbnak.

24. táblázat: A Julianna-majori kukoricás gyomnövényeinek levéltömeg és levélfelület aránya augusztusban, a kukorica pollenszórásakor (2001)

Faj	Levéltömeg/levélfelület arány [mg/cm ²]
<i>Asclepias syriaca</i> L.	37 ± 3 (D)
<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop.	31 ± 2 (CD)
<i>Chondrilla juncea</i> L.	20 ± 2 (AB)
<i>Consolida regalis</i> S. F. Gray	22 ± 5 (B)
<i>Daucus carota</i> L.	15 ± 6 (A)
<i>Picris hieracioides</i> L.	17 ± 5 (AB)
<i>Rubus</i> sp.	19 ± 2 (AB)
<i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv.	18 ± 3 (AB)
<i>Taraxacum officinale</i> Weber ex. Wiggers	30 ± 6 (C)
<i>Urtica dioica</i> L.	13 ± 1 (A)
<i>Zea mays</i> L.	23 ± 1 (B)

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel

25. táblázat: A zsámbéki kukoricás gyomnövényeinek levéltömeg és levélfelület aránya júliusban, a kukorica pollenszórásakor (2007)

Faj	Levéltömeg/levélfelület arány [mg/cm ²]
<i>Althaea officinalis</i> L.	17 ± 2 (B)
<i>Chenopodium hybridum</i> L.	13 ± 5 (A)
<i>Cannabis sativa</i> L.	12 ± 1 (A)
<i>Datura stramonium</i> L.	24 ± 5 (C)
<i>Zea mays</i> L.	23 ± 2 (C)
<i>Urtica dioica</i> L.	16 ± 3 (B)

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel (62 ismétlés)

5.6. A hazai kukoricások szegélyén élő gyomok és borítottságuk

A hazai kukoricások igen fajgazdag szegélytársulásaiban országos felmérésünk során három jellemző gyomfajt találtunk, amelyen védett lepkék hernyói élnek (26-28. táblázat).

A nagy csalán a vizsgált tíz tábla közül négyben fordult elő, s főleg a gyomszegélyen találtuk. A nagy csalán élettere a vályogtalajok nedves vízlevezető árkainak partjától a táblaszegélyig tart, illetve nedves kaszálórétkekre foltosan kiterjed. Vizsgálataink alapján, a táblaszegélyen a harmadik legnagyobb borítottságot mutatja, s ennek oka, hogy a táblaszéli árokrendszer jellemzőnek nevezhető a korábbi táblarendezési viszonyok között. A szederfélék szintén magas arányban fordultak elő, s kúszó hajtásaikkal a szélső két-három sorban is megjelennek (27. táblázat). A csattanó maszlag táblán belüli előfordulása szintén igen gyakori (27-28. táblázat). Eltérés mutatkozott a gyomfajok összetételében a talaj víztartalma szerint (vö. 27. és 28. táblázat).

26. táblázat: Gyakori gyomfajok átlagos borítottsága (%) a kukorica pollenszórásakor Magyarországon (országos felmérés)

Gyomfaj	Távolság a kukoricatábla szélétől [m]			
	50	7	1	0
<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.		3	7	4
<i>Amaranthus retroflexus</i> L.		1	5	1
<i>Cannabis sativa</i> L.	1		4	8
<i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers.	2	2	3	16
<i>Datura stramonium</i> L.	3	12	10	3
<i>Elymus repens</i> (L.) Gould.				19
<i>Panicum miliaceum</i> L.	5	12	7	5
<i>Setaria viridis</i> (L.) P. Beauv.	4		2	1
<i>Urtica dioica</i> L.				9

Megjegyzés: *dőlt és vastag betűtípus* – védett lepkefajok tápnövényei

27. táblázat: Gyakori gyomfajok átlagos borítottsága (%) a kukorica pollenszórásakor (Zsámbék, száraz oldal)

Gyomfaj	Felvételezés helye				
	Út felé (3m)	Táblaszél	1-2. sor között	5-6. sor között	10-11. sor között
<i>Arrhenatherum elatius</i> (L.) P. B. ex J. et C. Presl	64 ± 19 (10)				
<i>Chenopodium hybridum</i> L.		5 ± 6 (4)	1 ± 2 (3)	3 ± 3 (6)	1 ± 1 (3)
<i>Datura stramonium</i> L.					2 ± 1 (4)
<i>Rubus</i> spp.	20 ± 23 (7)	18 ± 31 (5)	7 ± 14 (3)		
<i>Urtica dioica</i> L.	4 ± 3 (3)				

Megjegyzés: átlagos borítás ± standard szórás (faj előfordulása 10 ismétlésből); legalább kétszer előforduló gyomfaj: *Althaea officinalis* L., *Artemisia vulgaris* L., *Cirsium vulgare* (Savi.) Ten., *Conium maculatum* L., *Galium aparine* L.; *dőlt és vastag betűtípus* – védett lepkefajok tápnövényei;

28. táblázat: Gyakori gyomfajok átlagos borítottsága (%) a kukorica pollenszórásakor (Zsámbék, nedves oldal)

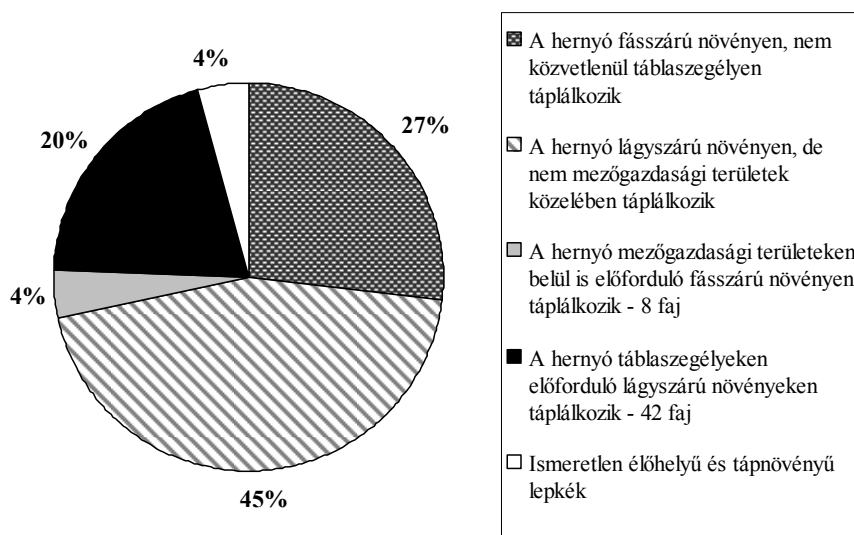
Gyomfaj	Felvételezés helye					
	Vízállásos terület felé (3m)	Táblaszél	1-2. sor között	5-6. sor között	10-11. sor között	20-21. sor között
<i>Althaea officinalis</i> L.		7 ± 16 (4)	2 ± 2 (4)			
<i>Calamagrostis epigeios</i> (L.) Roth.	82 ± 23 (9)	10 ± 44 (3)	7 ± 20 (5)	11 ± 11 (6)	10 ± 7 (7)	13 ± 31 (5)
<i>Chenopodium polyspermum</i> L.		43 ± 34 (6)				
<i>Datura stramonium</i> L.						10 ± 13 (5)
<i>Persicaria lapathifolia</i> (L.) S.F. Gray					1 ± 2 (5)	

Megjegyzés: átlagos borítás ± standard szórás (faj előfordulása 10 ismétlésből); legalább kétszer előforduló gyomfaj: *Urtica dioica* L.; *dőlt és vastag betűtípus* – védett lepkefajok tápnövényei;

5.7. A hazai védett lepkék lárvakelése és a kukorica pollenszórása

Magyarországon 213 védett lepkefaj van. Ezek közül 50 faj populációi fordulhatnak elő kukoricatáblák szegélyén (10. ábra), melyek közül az olasz sakktáblalepke, a *Melanargia arge* (Sulzer) és a korzikai fecskefarkulepke, a *Papilio hospiton* (Géné) bár ruderalis területeken is előfordul Európában, Magyarországon nem honos. Hernyóként telet 18 faj, s

csak egy részük táplálkozik nyáron: rendszerint az első – a legkevesebb táplálékot fogyasztó, ám általában a legérzékenyebb – vagy az utolsó – a legnagyobb levélfelületet elfogyasztó – stádium. A lárvális fejlődés időtartamát alapul véve 33 faj táplálkozik számottevően a kukorica pollenszórásakor (11. ábra). A fajok tápnövényeinek (29. táblázat) mikro- és makrostruktúrája alapján következtetéseket tehetünk az egyes fajok ~Cry1-pollennek való kitettségéről.



10. ábra: A Magyarországon védett 213 lepkefaj fejlődési helye

5.8. A *MON 810* kukorica pollenének hatása *Nymphalis io* lárváin

Ennek a lepkefajnak a tojásrakó imágói többek között a fagyal virágzása idején gyűjthetők, s ez a kukorica pollenszórási időszaka is. Tojásaikat általában több száz csomókban a levelek fonákján helyezik el. A fiatal lárvák együtt maradnak, és egy-egy csalánhajtás lekopasztása után vándorolnak új hajtásra. A lárvák gyorsan elfogyasztják a teljes levelet, ahol kikeltek, bár a csalán ereiben összegyűlő nagyobb mennyiségű, sárgálló kukoricapollent visszautasítják.

Kísérleteinkben vizsgáltuk a *MON 810* pollen rövid és hosszú távú hatásait. Az első három stádiumban illetve a teljes táplálkozási periódus során pollennel szennyezett csalánon táplálkozó lárvák fejlődését a teljes kifejlődésig követtük nyomon.

<i>Acherontia atropos</i> (L.)												
<i>Arctia festiva</i> (Hufnagel)												
<i>Argynnis niobe</i> (L.)												
<i>Argynnis (Pandoriana) pandora</i> (Denis & Schiffermüller)												
<i>Argyronome laodice</i> (Pallas)												
<i>Boloria euphrosyne</i> (L.)												
<i>Boloria selene</i> (Denis & Schiffermüller)												
<i>Brenthis ino</i> (Rottemburg)												
<i>Carcharodus lavatherae</i> (Esper)												
<i>Chazara briseis</i> (L.)												
<i>Chondrosoma fiduciarium</i> (Anker)												
<i>Colias chrysotheme</i> (Esper)												
<i>Cucullia dracunculi</i> (Hübner)												
<i>Diachrysis zosimi</i> (Hübner)												
<i>Diarsia dahlia</i> (Hübner)												
<i>Dyscia conspersaria</i> (Denis & Schiffermüller)												
<i>Eriogaster catax</i> (L.)												
<i>Eriogaster lanestris</i> (L.)												
<i>Eudia pavonia</i> (L.)												
<i>Euplagia quadripunctaria</i> (Poda)												
<i>Euxoa distinguenda</i> (Lederer)												
<i>Euxoa hastifera</i> (Donzel)												
<i>Heteropterus morpheus</i> (Pallas)												
<i>Hyponephele lupina</i> (Costa)												
<i>Iphiclides podalirius</i> (L.)												
<i>Lemonia dumi</i> (L.)												
<i>Lemonia taraxaci</i> (Denis & Schiffermüller)												
<i>Lycaena alciphron</i> (Rottemburg)												
<i>Lycaena thersamon</i> (Esper)												
<i>Neptis sappho</i> (Pallas)												
<i>Nymphalis (Polygonia) c-album</i> (L.)												
<i>Nymphalis (Inachis) io</i> (L.)												
<i>Nymphalis polychloros</i> (L.)												
<i>Nymphalis (Aglais) urticae</i> (L.)												
<i>Ocnogyna parasita</i> (Hübner)												
<i>Oria musculosa</i> (Hübner)												
<i>Papilio machaon</i> (L.)												
<i>Peribatodes umbraria</i> (Hübner)												
<i>Periphanes delphinii</i> (L.)												
<i>Saragossa porosa kenderesiensis</i> (Kovács)												
<i>Saturnia pyri</i> (Denis & Schiffermüller)												
<i>Schinia cardui</i> (Hübner)												
<i>Schinia cognata</i> (Freyer)												
<i>Spialia sertorius</i> (Hoffmannsegg)												
<i>Vanessa atalanta</i> (L.)												
<i>Zerynthia polyxena</i> (Denis & Schiffermüller)												
<i>Zygaena fausta</i> (L.)												
<i>Zygaena laeta</i> (Hübner)												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Hónap

11. ábra: Táblaszegélyeken előforduló gyom- és kultúrnövényeken kifejlődő,
Magyarországon honos védett lepkék lárvális időtartama

Megjegyzés: **vastag és dőlt betűtípussal** szedettek a tápnövény levelének felépítéséből következően fokozottan kitett fajok; szürke háttérűek azok a fajok, ahol a lárvafejlődés átfedésben van a kukorica pollenszórásával; a fekete keret azt az időtartamot jelöli, amelyen belül a kukorica pollenszórása előfordulhat; ■ a lárva táplálkozik; ■ a lárva visszahúzóva pauzál

29. táblázat: A kukorica pollenszórásakor lárvaként táplálkozó védett lepkefajok tápnövényei

Lepkefaj	Tápnövény hazánkban
<i>Acherontia atropos</i> (L.)	<i>Datura stramonium</i> L., <i>Lycium</i> spp., <i>Solanum</i> spp. (Solanaceae)
<i>Arctia festiva</i> (Hufnagel)	kétszikű lágyszárúak
<i>Argynnis niobe</i> (L.)	<i>Rubus</i> spp., <i>Viola</i> spp.
<i>Argynnis (Pandoriana) pandora</i> (Denis & Schiffermüller)	<i>Rubus</i> spp., <i>Viola</i> spp.
<i>Boloria euphrosyne</i> (L.)	<i>Viola</i> spp.
<i>Boloria selene</i> (Denis & Schiffermüller)	<i>Viola</i> spp.
<i>Brenthis ino</i> (Rottemburg)	<i>Filipendula</i> spp., <i>Potentilla</i> spp., <i>Rubus</i> spp., <i>Sanguisorba</i> spp.,
<i>Chazara briseis</i> (L.)	<i>Festuca</i> spp.
<i>Colias chrysotheme</i> (Esper)	<i>Astragalus</i> spp., <i>Vicia</i> spp. (Fabaceae)
<i>Cucullia dracunculi</i> (Hübner)	<i>Aster linosyris</i> (L.) Bernh.
<i>Diachrysia zosimi</i> (Hübner)	<i>Sanguisorba officinalis</i> L.
<i>Dyscia conspersaria</i> (Denis & Schiffermüller)	kétszikű ruderalis fajok
<i>Eriogaster catax</i> (L.)	<i>Crataegus</i> spp., <i>Prunus</i> spp., <i>Populus</i> spp., <i>Quercus</i> spp., <i>Salix</i> spp.
<i>Eriogaster lanestris</i> (L.)	<i>Crataegus</i> spp., <i>Prunus</i> spp., <i>Betula</i> spp., <i>Salix</i> spp., <i>Tilia</i> spp.
<i>Euplagia quadripunctaria</i> (Poda)	<i>Rubus</i> spp., <i>Urtica</i> spp., egyéb lágy- és fásszárú fajok
<i>Heteropterus morpheus</i> (Pallas)	fűfélék (Poaceae)
<i>Iphiclides podalirius</i> (L.)	<i>Amygdalus</i> spp., <i>Prunus</i> spp.
<i>Lycaena alciphron</i> (Rottemburg)	<i>Acetosella vulgaris</i> L., <i>Rumex</i> spp.
<i>Lycaena thersamon</i> (Esper)	<i>Polygonum aviculare</i> L., <i>Rumex</i> spp.
<i>Neptis sappho</i> (Pallas)	<i>Lathyrus</i> spp., <i>Robinia pseudoacacia</i> L.
<i>Nymphalis (Polygonia) c-album</i> (L.)	<i>Urtica</i> spp., <i>Humulus</i> spp., <i>Ribes</i> spp.
<i>Nymphalis (Inachis) io</i> (L.)	<i>Urtica dioica</i> L.
<i>Nymphalis (Aglais) urticae</i> (L.)	<i>Urtica dioica</i> L.
<i>Papilio machaon</i> (L.)	ernyős virágzatúak (Apiaceae)
<i>Peribatodes umbraria</i> (Hübner)	<i>Fraxinus</i> spp., <i>Ligustrum</i> spp.
<i>Periphanes delphinii</i> (L.)	<i>Consolida</i> spp., <i>Delphinium</i> spp.
<i>Saragossa porosa kenderesiensis</i> (Kovács)	<i>Artemisia</i> spp.
<i>Saturnia pyri</i> (Denis & Schiffermüller)	gyümölcsfák (<i>Prunus</i> spp., <i>Pyrus</i> spp.), <i>Juglans regia</i> L.
<i>Schinia cardui</i> (Hübner)	<i>Picris hieracioides</i> L.
<i>Schinia cognata</i> (Freyer)	<i>Chondrilla juncea</i> L.
<i>Spialia sertorius</i> (Hoffmannsegg)	<i>Malva</i> spp., <i>Potentilla</i> spp., <i>Rubus</i> spp., <i>Sanguisorba</i> spp.
<i>Vanessa atalanta</i> (L.)	<i>Urtica dioica</i> L.
<i>Zygaena laeta</i> (Hübner)	<i>Eryngium campestre</i> L., <i>Heracleum sphondylium</i> L.

5.8.1. A *MON 810* pollennek való rövid távú kitettség hatásai (L1-L3)

Kukoricatáblák szegélyén pollenszórásakor csalánon 300-600 kukoricapollen/cm² közötti értékek fordulnak elő. Az ilyen mennyiségű pollen – ~100 ng ~Cry1Ab/g száraz pollen toxintartalommal – szignifikánsan késleltette a lárvák fejlődését, és csökkentette azok tömegét (30. táblázat). A tojások kelésétől a bábozódásig terjedő fejlődési idő a *MON 810* pollennel szennyezett csalánt fogyasztó lárvák esetén meghosszabbodott (12. ábra).

Alacsony ~Cry1Ab-toxintartalmú pollen kis sűrűségben nem fejtett ki hatást a nappali pávaszem lárvákra (31. táblázat). Ezt tapasztaltuk azon kezeléseknél, ahol a ~Cry1Ab-toxin koncentrációja alacsonyabb volt, mint 7 pg ~Cry1Ab-toxin/cm². Nagyobb pollensűrűség mellett az ilyen pollen is megnövelte az állatok pusztulékonyosságát (31. táblázat). A kezelt lárvák között gyakrabban fordult elő vírusos megbetegedés az utolsó lárvastádiumban. A legnagyobb dózisu kezelést túlélő lárvák tömege viszont magasabbnak bizonyult a többi kezelésben részesülőnél. A nagyobb pollensűrűséggel együtt járó magasabb ~Cry1Ab-toxinkoncentráció ez esetben is megnövelte a lárvák fejlődési idejét (13. ábra).

30. táblázat: Az L1-L3 stádiumban *MON 810* pollennel (109 ng ~Cry1Ab toxin/g száraz pollen) szennyezett csalánon táplálkozó *Nymphalis io* L. lárva- és bábtömegei

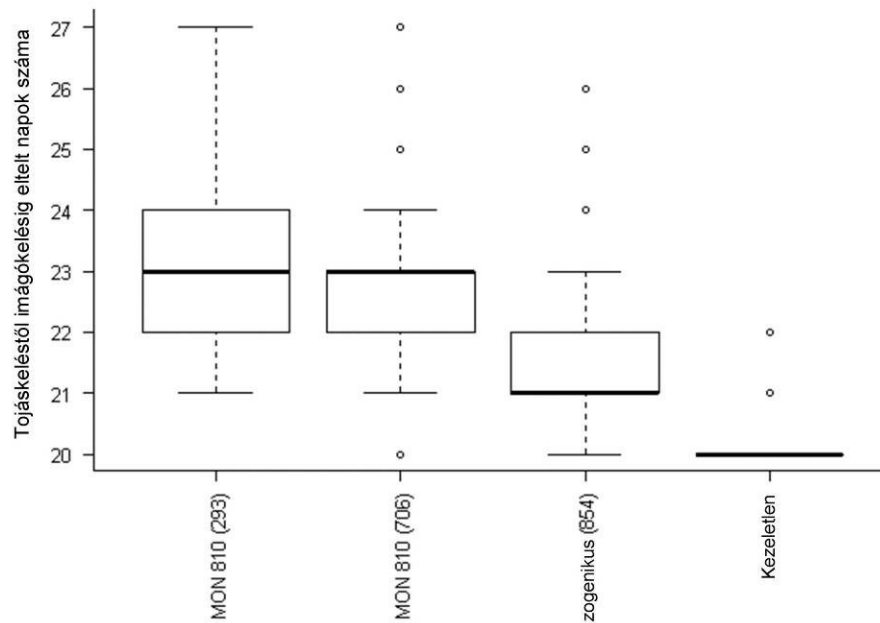
Kezelés	Lárva-szám	Pollensűrűség [pollen/cm ²]	Henderson-Tilton mortalitás az L5 stádiumban	Lárvatömeg a 12. napon [mg]	Lárvatömeg a 18. napon [mg]	Bábtömeg a 22. napon [mg]
<i>MON 810</i>	486	293 ± 187 (x)	20	19 ± 7 (a)	231 ± 111 (A)	441 ± 90
<i>MON 810</i>	267	706 ± 362 (y)	41	20 ± 5 (a)	292 ± 104 (A)	461 ± 43
Izogenikus	162	854 ± 252 (y)	1	55 ± 13 (b)	494 ± 85 (B)	491 ± 61
Kezeletlen	135	-	-	57 ± 14 (b)	436 ± 57 (B)	474 ± 42

Megjegyzés: Az izolátorok a szabadban, árnyékban voltak elhelyezve; a hőmérséklet 18-30 °C között változott. A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel

31. táblázat: Az L1-L3 stádiumban *MON 810* pollennel (29 ng ~Cry1Ab-toxin/g száraz pollen) szennyezett csalánon táplálkozó *Nymphalis io* L. lárva- és bábtömegei

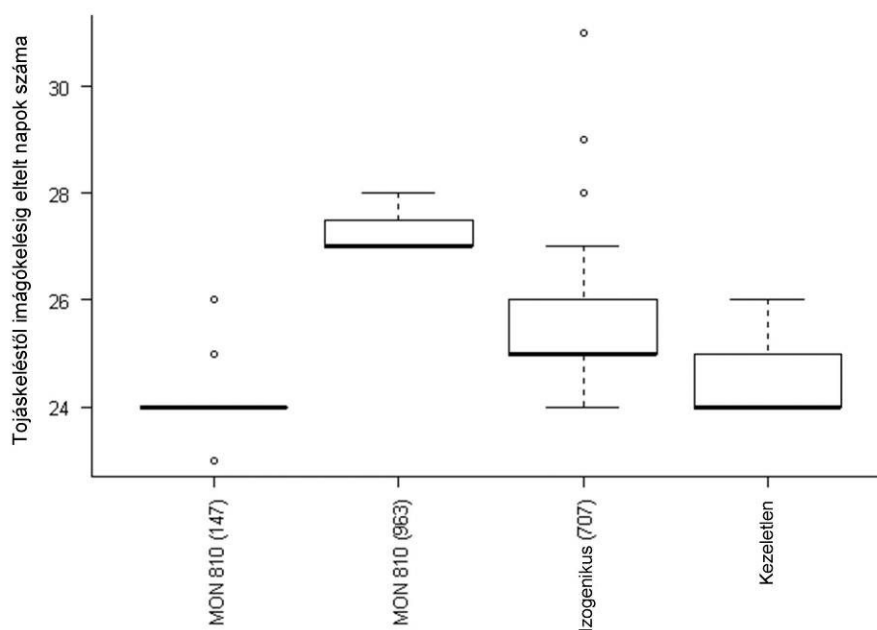
Kezelés	Lárva-szám	Pollensűrűség [pollen/cm ²]	Henderson-Tilton mortalitás az L5 stádiumban	Lárvatömeg a 11. napon [mg]	Lárvatömeg a 18. napon [mg]	Bábtömeg a 22. napon [mg]
<i>MON 810</i>	172	147 ± 120 (x)	1	325 ± 60 (c)	420 ± 27 (l)	517 ± 17 (LM)
<i>MON 810</i>	125	963 ± 226 (y)	30	129 ± 12 (a)	491 ± 18 (m)	554 ± 25 (M)
Izogenikus	153	707 ± 393 (y)	0	183 ± 39 (b)	433 ± 27 (l)	500 ± 17 (L)
Kezeletlen	151	-	-	299 ± 86 (c)	445 ± 22 (l)	520 ± 42 (LM)

Megjegyzés: Az izolátorok üvegházban voltak elhelyezve; a hőmérséklet 25-35 °C között változott. A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel



12. ábra: *MON 810* pollennel (109 ng ~Cry1Ab-toxin/g száraz pollen) szennyezett csalánon táplálkozó (L1-L3) nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) tojáskeléstől bábozódásig tartó fejlődési ideje.

Megjegyzés: A zárójelben álló számok a kezelés átlagos pollensűrűségét mutatják [pollen/cm²] (Monte Carlo szimulált p-értékkel végzett khi-négyzet teszt) P < 0,01 %-os valószínűséggel



13. ábra: L1-L3 stádiumban *MON 810* pollennel (29 ng ~Cry1Ab-toxin/g száraz pollen) szennyezett csalánon táplálkozó *Nymphalis io* L. tojáskeléstől imágókélelésig tartó fejlődési ideje.

Megjegyzés: A zárójelben álló számok a kezelés átlagos pollensűrűségét mutatják [pollen/ cm²] (Monte Carlo szimulált p-értékkel végzett khi-négyzet teszt) P < 0,01 %-os valószínűséggel

5.8.2. A *MON 810* pollennek való hosszú távú kitettség hatásai (L1-L5)

Vizsgálatunkban a táblaszélre átlagosan, valamint szélirányban jellemző pollenkoncentrációt juttattunk ki csalánhajtásokra. A permetezéssel egyenletesebb polleneloszlást tudtunk elérni, mint porozással, bár mindkettő egyenletessége meghaladta a természetben tapasztaltakat. A *MON 810* pollennel szennyezett csalánt fogyasztó nappali pávaszem lárvák tömege a teljes fejlődés során alacsonyabb volt, mint a kontroll kezelésekben fejlődőké, az utolsó stádiumra pedig szignifikánsan csökkent (32. táblázat). Bábozódás előtt erős vírusfertőzés mutatkozott a lárvákon. Ennek következtében a *MON 810* pollennel kezelt csoportokban olyan mértékű mortalitást jelentkezett, hogy csupán az alacsonyabb dózisú (átlagosan 551 pollen/cm²) kezelésből származó hímek közül bábozódott statisztikailag kiértékelhető mennyiségű állat (33. táblázat). Ezek bábtömege kisebb volt, s imágóvá fejlődésük is elhúzódott a közel izogenikus és a kezeletlen kontrollhoz képest (14. ábra). Ezek a kezelések 11-20 pg/cm² ~Cry1Ab-toxint tartalmaztak. Amikor a vizsgálatot kisebb toxintartalmú pollennel (4-7 pg/cm²) megismételtük, csak enyhe hatásokat tapasztaltunk.

32. táblázat: Az L₁-L₅ stádiumban *MON 810* pollennel (101 ng ~Cry1Ab-toxin/g száraz pollen) szennyezett csalánon táplálkozó *Nymphalis io* L. lárvatömegei

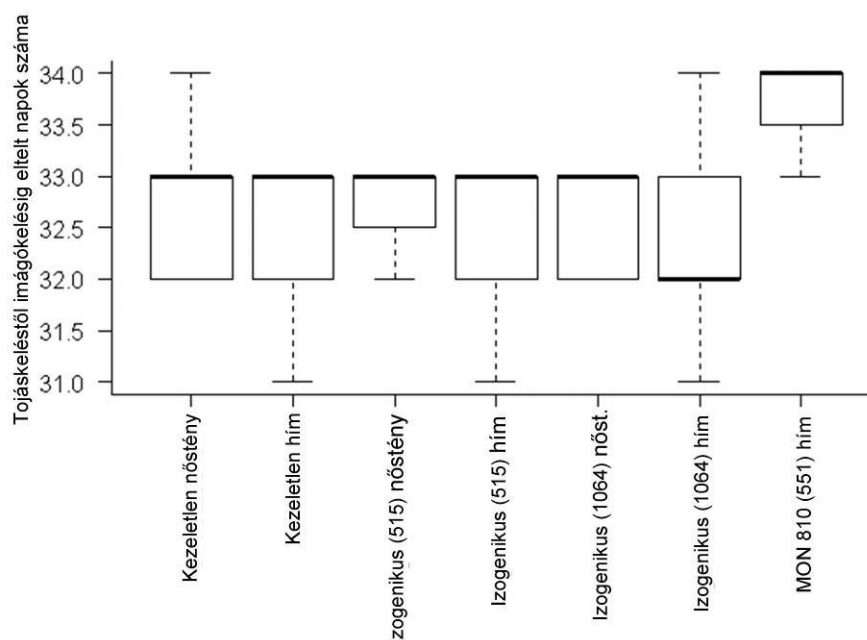
Kezelés	Lárva-szám	Pollensűrűség [pollen/cm ²]	Henderson-Tilton mortalitás az L5 stádiumban	Lárvatömeg a 12. napon [mg]	Lárvatömeg a 16. napon [mg]	Lárvatömeg a 18. napon [mg]
<i>MON 810</i>	100	551 ± 181 (x)	12	22 ± 6 (a)	108 ± 31 (AB)	166 ± 67 (p)
<i>MON 810</i>	100	1008 ± 272 (y)	20	21 ± 8 (a)	100 ± 41 (A)	124 ± 45 (p)
Izogenikus	100	515 ± 152 (x)	4	30 ± 4 (b)	141 ± 14 (C)	312 ± 62 (r)
Izogenikus	100	1064 ± 335 (y)	4	29 ± 4 (b)	130 ± 26 (CB)	325 ± 89 (s)
Kezeletlen	100	-	-	29 ± 5 (b)	136 ± 29 (C)	271 ± 101 (r)

Megjegyzés: Az izolátorok üvegházban voltak elhelyezve; a hőmérséklet 20-25 °C között változott. A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel

33. táblázat: Az L₁-L₅ stádiumban *MON 810* pollennel (101 ng ~Cry1Ab-toxin/g száraz pollen) szennyezett csalánon táplálkozó *Nymphalis io* L. bábtömegei

Kezelés	Lárvaszám	Pollensűrűség [pollen/cm ²]	Hím bábok tömege a 23. napon ± szórás [mg]	Nőstény bábok tömege a 23. napon ± szórás [mg]
<i>MON 810</i>	100	551 ± 181 (x)	382 ± 30 (l)	-
<i>MON 810</i>	100	1008 ± 272 (y)	-	-
Izogenikus	100	515 ± 152 (x)	434 ± 37 (mn)	488 ± 38
Izogenikus	100	1064 ± 335 (y)	424 ± 39 (m)	512 ± 38
Kezeletlen	100	-	453 ± 28 (n)	518 ± 40

Megjegyzés: Az izolátorok üvegházban voltak elhelyezve; a hőmérséklet 20-25 °C között változott. A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel



14. ábra: *MON 810* pollennel (101 ng ~Cry1Ab-toxin/g száraz pollen) szennyezett csalánon táplálkozó (L₁-L₅) nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) tojásrakástól imágókéklésig tartó fejlődési ideje

Megjegyzés: A kezelés után álló számok az átlagos pollensűrűséget mutatják [pollen/ cm²] (Monte Carlo szimulált p-értékkel végzett khi-négyszert teszt) P < 0,01 %-os valószínűséggel

5.9. A DIPEL WP készítménnyel végzett vizsgálatok eredményei

A *B. thuringiensis* toxinokat tartalmazó DIPEL növényvédő szer túlnyomórészt (80 %) Cry1-toxint tartalmaz. Ezeket a vizsgálatokat a kétféle eredetű – bakteriális és GM-növényben termelődő – ~Cry1Ab-toxin hatásának összevetésére illetve a különböző – védett és kártevő – lepkefajok különböző stádiumú lárvái Cry-toxin érzékenységének összevetése céljából végeztük.

5.9.1. A különböző védett és kártevő lepkefajok DIPEL érzékenysége

Az első lárvastádiumban a nappali pávaszem lárvák a nagyobb koncentrációk (1000, 500, 250, 125, 78, 39, 20 ppm) esetén a 3-4. napra, 5 ppm-es kezelés esetén maradéktalanul a 11. napra pusztultak el. A fejlődésük vontatott volt, a lárvák keveset ettek. A nappali pávaszem lárvastádiumai közül a 2. és 3. stádium bizonyult a legérzékenyebbnek (34. táblázat). Összességében nem mutatkozott jelentős különbség az *N. io* különböző lárvastádiumainak DIPEL érzékenységében.

5.9.2. A DIPEL szubletális hatásai védett lepkék lárváin

Az első három stádiumban DIPEL-lel kezelt táplálékot fogyasztó nappali pávaszem érzékenysége halmozott kitettség során az egy lárvastádiumra korlátozódó kitettséghez képest alacsonyabbnak bizonyult (35. táblázat).

Kisebb dózis esetén a DIPEL (2,4; 1,2; 0,6 és 0,3 ppm) időszakos fogyasztása dóziszfüggően és szignifikánsan késleltette a fiatal nappali pávaszem lárvák fejlődését (15. ábra). A bábtömeg mérésekor a különbségek főként a hím és nőstény bábok tömegének szignifikáns eltéréseiből származnak, azonban a legmagasabb két dózis mindkét ivar bábtömegét csökkentette, ami a Cry1-toxinok bélperisztaltika leállítása és a táplálkozás beszüntetése miatt alakul ki (36. táblázat). A tojástól imágóig tartó fejlődési idő a három legnagyobb dózisú kezelés esetében megnőtt (15. ábra). A lárvális mortalitás mindegyik DIPEL-koncentrációban megnőtt és többé-kevésbé követte a dózis emelkedését (36. táblázat).

C-betűs lepke esetén sokkal magasabb koncentráción jelentkeztek hatások (37. táblázat). Bár a magasabb dózisú kezelésben részesülő lárvák tömege csökkent, a bábtömegekben különbség már nem mutatkozott. A nappali pávaszemnél nagyságrenddel magasabb koncentrációjú kezelésben közel 10 %-kal meghosszabbodott a posztembrionális fejlődési idő (16. ábra).

34. táblázat: Védett és kártevő lepkefajok különböző stádiumainak DIPEL érzékenysége (LC₅₀ értékek)

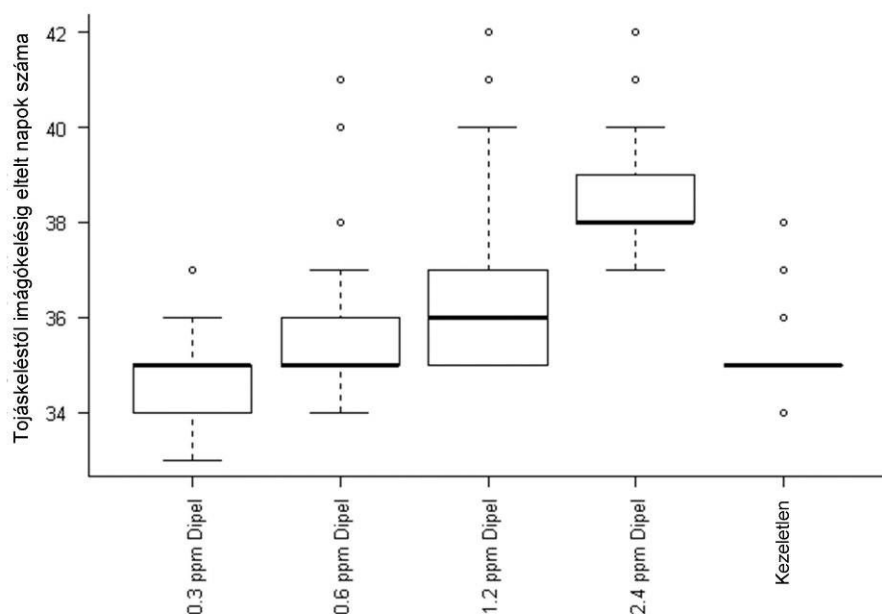
Faj	Kezelt növényrész	Stádium	Kezelt lárva [db]	LC ₅₀ [ppm]	LCL	UCL	SE	Beta (SE)	LC ₉₀ [ppm]
<i>Nymphalis io</i>	hajtás	L1	2343	4,39	3,79	4,98	0,30	0,28 (0,030)	8,98
<i>Nymphalis io</i>	hajtás	L2	1400	1,93	1,41	2,46	0,27	0,28 (0,030)	6,53
<i>Nymphalis io</i>	hajtás	L3	2100	2,99	2,48	3,49	0,26	0,45 (0,060)	5,81
<i>Nymphalis io</i>	hajtás	L4	900	5,74	5,25	6,22	0,25	0,34 (0,040)	9,47
<i>Nymphalis io</i>	hajtás	L5	950	6,17	5,66	6,70	0,27	0,50 (0,070)	8,74
<i>Nymphalis c-album</i>	levél	L1	300	7,24	4,16	10,31	1,57	0,07 (0,010)	26,96
<i>Vanessa atalanta</i>	hajtás	L1	730	15,14	12,37	17,90	1,41	0,07 (0,010)	32,85
<i>Vanessa atalanta</i>	levél	L1	410	15,43	12,98	17,88	1,25	0,05 (0,004)	39,40
<i>Helicoverpa armigera</i>	levél	L1	240	14,87	6,88	22,85	4,07	0,03 (0,007)	51,85
<i>Helicoverpa armigera</i>	levél	L2	100	51,08	31,55	70,61	9,96	0,01 (0,003)	144,90
<i>Ostrinia nubilalis</i>	levél	L1	200	18,02	15,72	20,31	1,17	0,08 (0,010)	33,24
<i>Ostrinia nubilalis</i>	levél	L2	200	14,23				ns	135,00

Megjegyzés: LCL – alsó konfidencia határ (*lower confidence limit*), UCL – felső konfidencia határ (*upper confidence limit*), SE – standard hiba (*standard error*), Beta (SE) – a becsült regressziós koefficiens (standard hiba), ns – nem szignifikáns

35. táblázat: Védett lepkefajok L1-L3 stádiumainak DIPEL érzékenysége (LC₅₀) halmozott kitétség esetén

Faj	Kezelt növényrész	Stádium	Kezelt lárva [db]	LC ₅₀ [ppm]	LCL	UCL	SE	Beta (SE)	LC ₉₀ [ppm]
<i>Nymphalis io</i>	ládás csalán	L1-L3	1859	2,16	1,61	2,71	0,28	0,48 (0,129)	4,80
<i>Nymphalis c-album</i>	ládás csalán	L1-L3	1105	12,13				ns	38,90

Megjegyzés: LCL – alsó konfidencia határ (*lower confidence limit*), UCL – felső konfidencia határ (*upper confidence limit*), SE – standard hiba (*standard error*), Beta (SE) – a becsült regressziós koefficiens (standard hiba), ns – nem szignifikáns



15. ábra: Szubletális koncentrációjú DIPEL-lel kezelt csalánon L1-L3 stádiumban táplálkozó *Nymphalis io* L. poszttembrionális fejlődési ideje.

Megjegyzés: (Monte Carlo szimulált p-értékkel végzett khi-négyzet teszt) $P < 0,01$ %-os valószínűséggel

36. táblázat: DIPEL-lel kezelt csalánon L1-L3 stádiumban táplálkozó *Nymphalis io* L. lárva- és bábtömegei

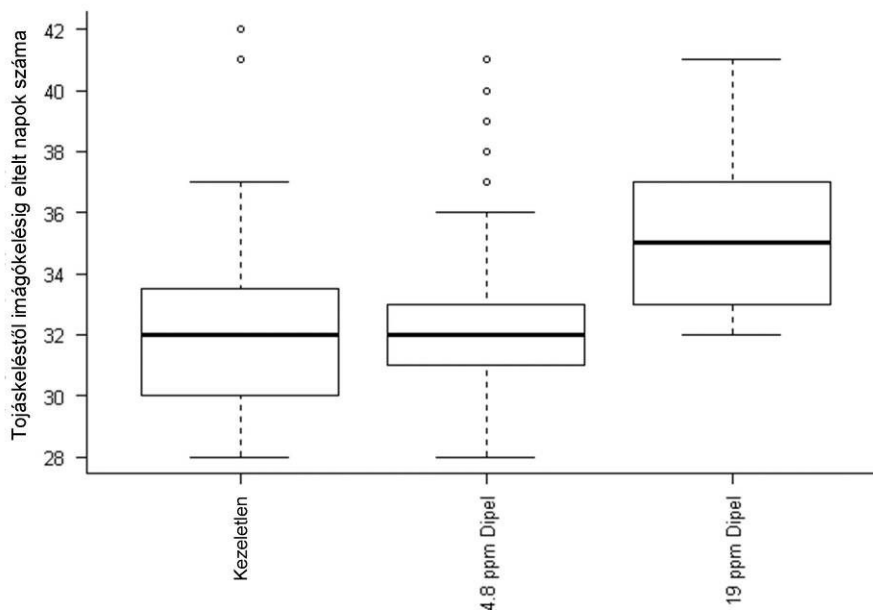
DIPEL kezelés [ppm]	Lárva-szám	Henderson-Tilton mortalitás L5 stádiumban	Lárvatömeg a 12. napon ± szórás [mg]	Lárvatömeg a 18. napon ± szórás [mg]	Hím bábok tömege ± szórás [mg]	Nőstény bábok tömege ± szórás [mg]
0,3	273	2	24 ± 11 (b)	143 ± 22 (C)	466 ± 30 (ml)	546 ± 30 (MKJ)
0,6	411	4	17 ± 9 (b)	154 ± 31 (CE)	469 ± 37 (ml)	593 ± 36 (M)
1,2	432	15	17 ± 7 (b)	100 ± 53 (B)	429 ± 18 (l)	498 ± 26 (LJ)
2,4	511	18	8 ± 4 (a)	70 ± 33 (B)	430 ± 37 (lm)	519 ± 35 (LK)
Kezeletlen	326	-	35 ± 5 (c)	187 ± 16 (DE)	478 ± 31 (m)	580 ± 34 (M)

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő nagybetűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P₁%-os valószínűséggel

37. táblázat: DIPEL-lel kezelt csalánon L₁-L₃ stádiumban táplálkozó *Nymphalis c-album* L. lárva- és bábtömegei

DIPEL kezelés [ppm]	Lárva-szám	Henderson-Tilton mortalitás L5 stádiumban	Lárvatömeg a 10. napon ± szórás [mg]	Lárvatömeg a 17. napon ± szórás [mg]	Hím bábok tömege ± szórás [mg]	Nőstény bábok tömege ± szórás [mg]
4,8	190	16	20 ± 12 (b)	297 ± 120 (B)	360 ± 36	366 ± 28
19,0	195	71	8 ± 6 (a)	135 ± 45 (A)	376 ± 26	364 ± 28
Kezeletlen	110	-	21 ± 12 (b)	275 ± 94 (B)	378 ± 27	361 ± 17

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P₁%-os valószínűséggel



16. ábra.: Szubletális koncentrációjú DIPEL-lel kezelt csalánon L1-L3 stádiumban táplálkozó *Nymphalis c-album* L. poszttembrionális fejlődési ideje.

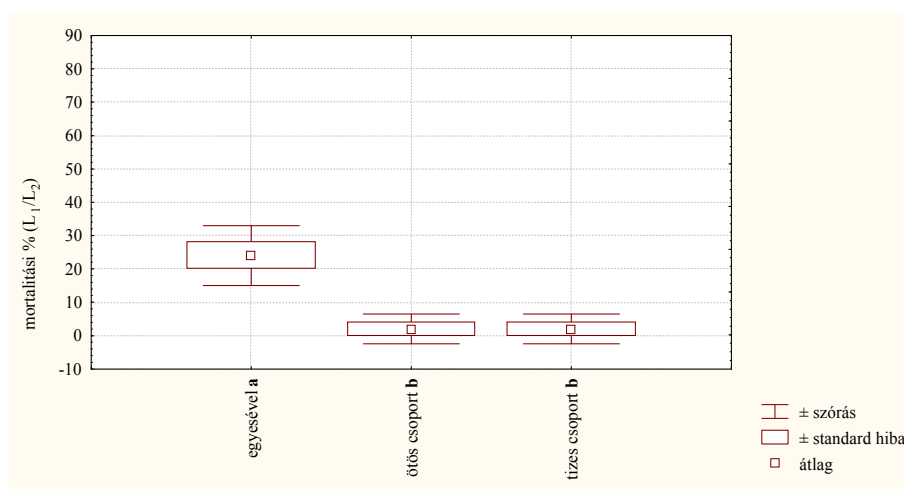
Megjegyzés: (Monte Carlo szimulált p-értékkel végzett khi-négyzet teszt) P < 0,01 %-os valószínűséggel

5.10. Az egyedül maradó első stádiumú *Nymphalis io* megnövekvő halandósága

A nappali pávaszem nőstény átlagosan 100-300 tojást tartalmazó csomókba, rendszerint a csalán leveleinek fonákjára rakja tojásait. A kikelő lárvák együtt táplálkoznak, s

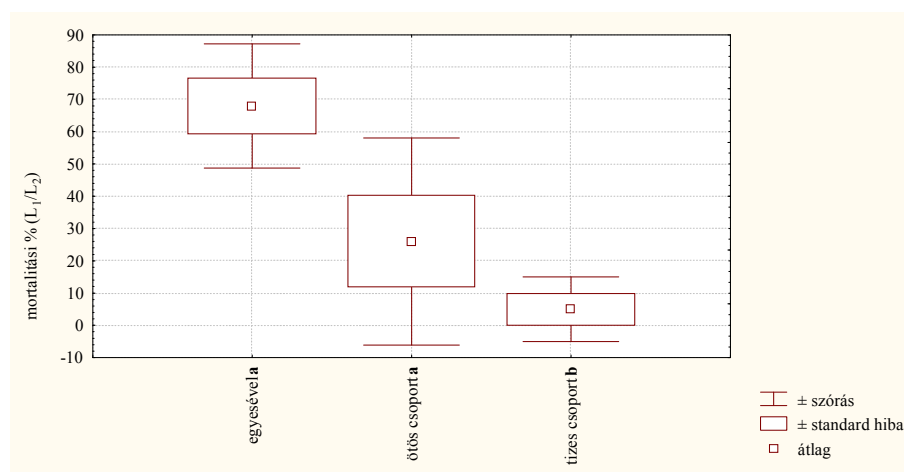
miután elfogyasztottak egy levelet, együtt vándorolnak tovább a következőre. Ezt a csoportos életmódot folytatják – elegendő táplálék esetén – a negyedik lárvastádiumig. A jelenség vizsgálatára négy kísérletet végeztünk, egyet 21 illetve 25, kettőt 26 °C-on. Az egyedül nevelt lárvák halandósága minden esetben szignifikánsan nőtt az ötös és a tízes csoportokban neveltekéhez képest (17-20. ábrák).

Az egyedül maradó lárvák szöttek és esetleg táplálkoztak egy keveset, de legtöbbjük hosszú ideig mozdulatlanul várakozott. Esetükben a táplálkozás megkezdése sem jelentett biztos túlélést, mivel igen nagy arányban hamar felhagytak azzal, s egy-két napon belül elpusztultak.



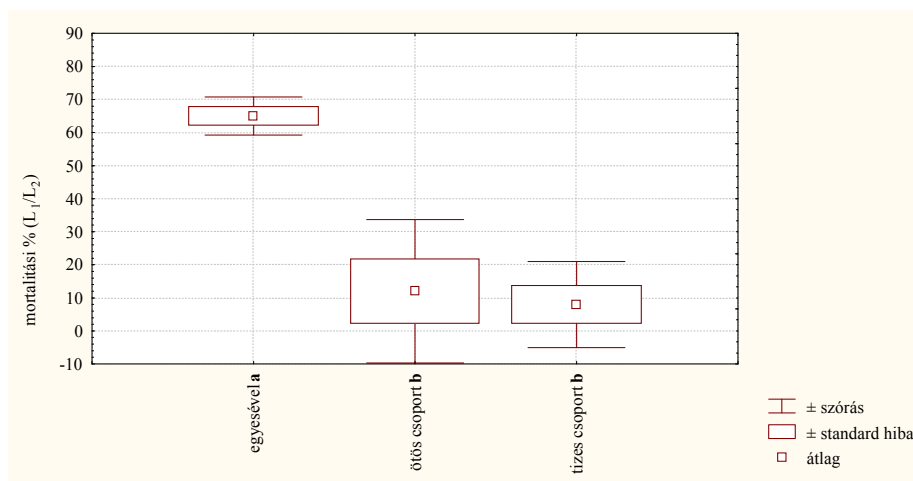
17. ábra: Különböző nagyságú csoportokban nevelt *Nymphalis io* lárvák mortalitása 21 °C-on

Megjegyzés: $LSD_{1\%} = 12\%$ (50 ismétlés; A kezelések után álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek.)



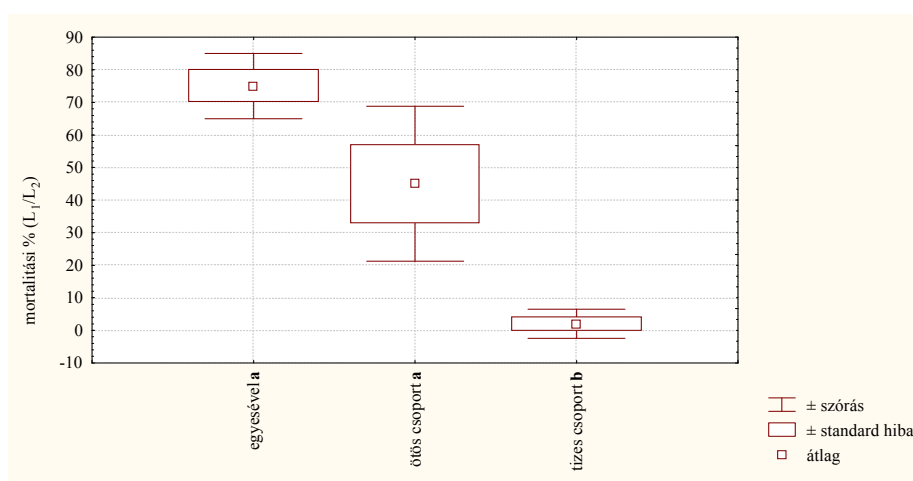
18. ábra: Különböző nagyságú csoportokban nevelt *Nymphalis io* lárvák mortalitása 25 °C-on

Megjegyzés: $LSD_{1\%} = 44\%$ (50 ismétlés; A kezelések után álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek.)



19. ábra: Különböző nagyságú csoportokban nevelt *Nymphalis io* lárvák mortalitása 26 °C-on

Megjegyzés: $LSD_{1\%} = 30\%$ (50 ismétlés; A kezelések után álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek.)



20. ábra: Különböző nagyságú csoportokban nevelt *Nymphalis io* lárvák mortalitása 26 °C-on

Megjegyzés: $LSD_{1\%} = 28\%$ (50 ismétlés; A kezelések után álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek.)

Az ötös csoportban fejlődő állatok mortalitása változónak mutatkozott. Két esetben a tízes (kontroll) csoporttól szignifikánsan nem különbözött (17. és 19. ábrák), két esetben a magányos és a tízes csoportot jellemző értékek közé esőnek mutatkozott (statisztikailag a magányosok pusztulásával esett egy csoportba; 18. és 20. ábrák).

5.11. A *Nymphalis io* stádiumonkénti levélfogyasztása

Táplálékfogyasztási vizsgálatainkhoz a csalánhajtások felülről számolt 5-8. levélemelelein található leveleket használtuk. Ezek már teljesen kiterültek, levéltömeg/levélfelület arányuk közel állandó, szignifikánsan nem különbözik, így ez az elfogyasztott levélmennyiséget nem befolyásolta.

A táplálékfogyasztás a fejlődés során exponenciálisan nő, a nappali pávaszem esetén legnagyobb mértékben a második stádiumban, amikor is megközelítőleg 18-szor annyi táplálékot fogyasztanak, mint az elsőben. A további stádiumokban csupán 4-7-szeresére nő a

fogyasztás, mint a megelőző stádiumban (38. táblázat). A súlygyarapodás a báb stádiumig a nappali pávaszemnél közel 6000-szeres.

38. táblázat: A *Nymphalis io* L. stádiumonkénti *Urtica dioica* L. levélfogyasztása

Stádium	Levélfogyasztás [cm ²]	Levélfogyasztás [%]
L1	0,07 ± 0,03 (A)	0,03
L2	1,21 ± 0,19 (B)	0,56
L3	5,38 ± 0,94 (C)	2,47
L4	27,92 ± 6,63 (D)	12,84
L5	-	84,10
L5 hím	172,34 ± 26,25 (E)	-
L5 nőstény	193,35 ± 39,34 (E)	-

Megjegyzés: A mért adatok után zárójelben álló eltérő betűk szignifikánsan eltérő csoportokat jelölnek (log-transzformált adatokon végzett egyutas ANOVA, Tukey-teszt) P_{1%}-os valószínűséggel

5.12. A *Nymphalis io* stádiumonkénti fejlődési ideje

Állandó hőmérsékleteken mértük a nappali pávaszem lárvák fejlődési idejét. Az adatokat összegezve átlagosan 959 nap°C hőösszeg szükséges a teljes embrionális és posztembrionális fejlődéshez, míg a táplálkozási periódus átlagosan 477 nap°C-ot igényel (39. táblázat). Ez azt jelenti, hogy nyáron a táplálkozási periódus – az aktuális hőmérséklettől függően – 19-15 nap alatt lezajlik.

39. táblázat: A *Nymphalis io* L. stádiumonkénti átlagos fejlődési ideje különböző hőmérsékleteken

Hőmérséklet [°C]	A stádium fejlődéséhez szükséges idő [nap]							Hőösszeg [nap°C]
	tojás	L1	L2	L3	L4	L5	báb	
21,0	11,0	5,0	4,5	5,0	4,5	5,5	10,5	955,5
25,0	10,0	4,5	3,5	3,0	3,0	5,0	9,5	962,5
29,5	9,0	3,0	3,0	3,0	2,0	4,0	8,5	958,8

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS MEGVITATÁS

6.1. A *MON 810* kukorica ~Cry1Ab-toxintermelő képessége

A ~Cry1Ab-toxintartalmat két kereskedelmi forgalmú *ELISA* kittel mértük *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukoricahibridben és ennek izogenikus vonalában. Mindkét *ELISA* rendszer Cry1Ab-protoxinnal szembeni antitesteket tartalmaz, melyek alacsonyabb affinitást mutattak az aktivált toxinnal szemben. A két *ELISA* rendszer összevethetősége miatt mértük a protoxinnal és az aktív toxinnal szembeni kereszt-reaktivitásuk, melyet 0,412-nek találtunk az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE és 0,564-nek az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kit esetén. A két szendvics elvű *ELISA* kit közvetlen összevetésére egy referencia-minta (#OR4) mérése szolgált. A két kit különbsége a kereszt-reaktivitással korrigálva 3,23-szoros az aktív toxin kimutatását illetően. A ~Cry1Ab-toxintartalmakat a kimért kereszt-reaktivitási értékkel korrigálva, aktív toxinra adtuk meg (Székács *et al.*, 2010a; 2010b).

A vegetációs periódus során a levelekben a ~Cry1Ab-toxinszint gyors emelkedése tapasztalható, mely az ötödik hét végére eléri a $17,15 \pm 1,66 \mu\text{g/g}$ -ot. Ezután csökken valamelyest a 16. hétig ($9,61 \pm 2,07 \mu\text{g/g}$), majd ismét emelkedik, az érési folyamatokkal párhuzamosan bekövetkező részleges vízvesztés következtében ($13,51 \pm 1,96 \mu\text{g/g}$). Hasonló, bár kisebb mértékű ingadozást figyeltünk meg a gyökérben, ahol $5,32 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$ -ot mértünk a kevésbé differenciálódott V1 (egyleveles) stádiumban, és $2,25 \pm 0,30 \mu\text{g/g}$ -ot a növény fejlődése során. Mindezekkel ellentétben közel állandónak bizonyult a ~Cry1Ab-toxintartalom a szárban, a portokfalban és a magban, sorrendben $1,36 \pm 0,45$; $4,98 \pm 0,31$ és $0,83 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$ -nak. A pollenben mértük a legkevesebb toxint. Így a növényben termelődő toxinmennyiség nagysága szervenként az alábbiak szerint alakult: levél > portokfal > gyökér > szár > mag > pollen (Székács *et al.*, 2005). Több év összevetésében szignifikánsan változott a közel azonos stádiumú növények levelének ($6,12 \pm 2,15$ és $9,83 \pm 1,61 \mu\text{g/g}$ között; $\text{SzD}_{5\%} = 2,81 \mu\text{g/g}$) és gyökerének toxintartalma ($1,53 \pm 0,43$ és $3,82 \pm 0,44 \mu\text{g/g}$ között; $\text{SzD}_{1\%} = 1,05 \mu\text{g/g}$), azonban nem mutatkozott szignifikáns különbség a szár toxintartalmát tekintve.

Az általunk mért eredmények hasonló nagyságrendűek az engedélyezési iratokban (AGBIOS, 2002; 2008; USDA APHIS, 1996) szereplőkkel és egyes szakirodalmi adatokkal (Nguyen, 2004; Nguyen és Jehle, 2007), viszont igen széles tartományban változnak. Egyes tanulmányok számottevően alacsonyabb toxintartalomról számolnak be a levelet – $350\text{--}530 \text{ ng/g}$ (Bruns és Abel, 2003) – és a magot – $190\text{--}390 \text{ ng/g}$ (AGBIOS, 2002), 160 ng/g (Chilcutt és Tabashnik, 2004), $10\text{--}510 \text{ ng/g}$ (Nguyen és Jehle, 2007) – illetően. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a levél toxintartalma arányos a klorofill-tartalommal (Abel és Adamczyk,

2004): fejlődő levelek esetén a legmagasabb a zöld levélcsúcsban (600 ± 50 és 590 ± 70 ng ~Cry1Ab-toxin/g friss tömeg), míg a legalacsonyabb a sárgás-fehér levélalapban (180 ± 10 és 220 ± 70 ng ~Cry1Ab-toxin/g friss tömeg). Mindemellett átlagosan húszszoros különbség mutatkozik ugyanazon *MON 810* hibrid (NOVELIS) toxintartalmában a termőhelytől és az évjárástól függően (Nguyen, 2004; Nguyen és Jehle, 2007).

A különböző genetikai események és hibridek pollenjének ~Cry1Ab-toxintartalmát is igen nagy variabilitás jellemzi. Jesse és Obrycki (2000) munkájában az 1600 ng/g immunoreaktív ~Cry1Ab-toxint tartalmazó pollen (*SYN-EVI76*, MAX 454 hibrid) Wraight és munkatársai (2000) – 9 hónap fagyasztva tárolás utáni – méréseiben már csak 90,5 ng/g-nak bizonyult, holott mindkét kutatócsoport az Agdia Inc. (Elkhart, Ind.) által gyártott Cry1Ab ELISA kitet alkalmazta. 2002-ben ugyanennek a kukoricafajtának a pollenjében közvetlenül a gyűjtés után 667 ng/g toxint mértek (Ohlfest és et al., 2002). Ezen mérések eredményei 1-3 nagyságrenddel térnek el az EPA által a genetikai esemény pollenére megadott 7000-12 360 ng/g-tól (US EPA, 2001). A toxin pollenben megmutatkozó variabilitására a mérési bizonytalanságok is jelentős hatással lehetnek. Cry1Ab-tartalmú *SYN-EVI76* pollen esetén a toxintartalom közel felére csökkent 10 napig, 27 °C fokon, árnyékos helyen való tárolás után, s csak 4 %-kal volt kevesebb az azonos hőmérsékleten folyamatos UVB sugárzásnak kitett pollen toxintartalma (Ohlfest et al., 2002). Azonban a 12., 24., 72. és 240. órában végzett mérések inkonzisztensnek bizonyultak, a 24. és 72. órában magasabb ~Cry1Ab-toxintartalmat mértek, mint 12 óra sugárzás után.

Hasonló anomáliák mutatkoznak *MON 810* pollen mérése során is (7. táblázat). Wraight és munkatársai (2000) méréseiben 2,1 ng/g toxintartalmúnak bizonyult a 34R07 hibrid pollenje. Lang és munkatársainak (2004) vizsgálataiban 130-250 ng/g-nak adódott a NOVELIS hibrid pollenjének toxintartalma, míg Nguyen és Jehle (2007) ugyanezen fajtában 1 és 97 ng/g közötti értékeket mért. Az engedélyezési iratokban 90 (CFIA, 1997), illetve <80 ng/g áll, azonban ez utóbbi esetében 80-180 ng/g terjedelemmel (Monsanto Company, 2004).

Felmerül a kérdés – tekintve a mérések eredményei közötti igen nagy eltéréseket –, mennyire tekinthető egységesnek egy genetikai eseményt hordozó vonal (esetünkben a *MON 810*), hiszen az engedélyezés csak erre vonatkozik, illetve az ezekből nemesített – igen eltérő tulajdonságú – fajták. További vizsgálatok szükségesek a fajták genetikai stabilitásának és egyöntetűségének vizsgálatára.

6.2. Kritikus zóna a *MON 810* kukorica esetében

A megtermő pollenmennyiség genetikailag meghatározott. A kihulló pollen eloszlása az aktuális széliránytól és szélerősségtől függő. Vizsgálataink során eltérő mennyiségű pollent

gyűjtöttünk DK-440 és DK-440 BTY, valamint fehér magvú KISKUN 4517 hibrid esetében. A DK-440 BTY és közel izogenikus vonala több év vizsgálatában 40-137 kg/ha pollent termett, míg a KISKUN 4517 közelítőleg 2-3-szor annyit. A megtermő pollenmennyiség és a kukorica levélfelülete alapján, egyenletes polleneloszlás esetén 1900-2000 pollen/cm²-es értékek lennének jellemzők. Ezzel szemben a gyakorlatban egy kukoricanövényen belül a levélemeletek között vertikálisan 30-szoros, a növények között egy levélemelet magasságában hatszoros eltérést találtunk. Ezen túlmenően egy levélen belül is akár hatszoros lehet az eltérés a lerakódó pollenmennyiségben. A kukoricaállományban a természetes polleneloszlás tehát ezerszeres átlageltolódással jellemezhető (Lauber *et al.*, 2006; Lauber *et al.*, 2007).

A kiüledő pollen eloszlását tekintve a korábbi tanulmányokban a saját méréseinkhez hasonló nagyságrendű adatok jelentek meg, bár a konkrét értékekben – mint azt eredményeink is mutatják – fajtánként és évjáratonként, valamint a pollenfogó felszín jellemzőinek hatására jelentős eltérések mutatkoznak. Általánosságban megállapítható, hogy a kukoricatábla belsejében a legnagyobb a pollenborítottság. A zárt levélállomány miatt a felső leveleken mértük a legtöbb pollent, kukoricatáblán belüli töveken 0-1500 pollen/cm²-es sűrűséget, míg ragadós lapokon – ahol átrendeződésre nincs lehetőség – a pollenszám megközelítette a 2500 pollen/cm²-t. Körkörös – nyolc irányban végzett – felvételezésnél a tábla szélső címeres sorában átlagosan 200-720, míg az első címerezett szegélysorban átlagosan 80-610 pollen/cm² jelent meg a széliránytól függően. A kiüledő pollen mennyisége a tábla szélétől exponenciálisan csökken, a sodródást a kukoricapollen viszonylag nagy mérete (90-100 µm átmérő) is korlátozza. A megtermő pollen legnagyobb része az első öt méteren kiüledik, s a tábla közvetlen szélén mérhető átlagosan 300 pollen/cm²-es értékről 50 pollen/cm²-re csökken. Tíz méterre ~20, tizenöt méterre még átlagosan 15 pollen/cm²-es értékek fordultak elő, mely csak 30 méter után csökkent 2 pollen/cm² alá. Azonban szélirányban a fenti értékek hatszorosa is megjelenik. Tapasztalataink valamivel kedvezőtlenebbek, mint Jarosz és munkatársainak (2003), akik szerint a kilépő pollenmennyiség 95 %-a kiüledik a tábla szélétől számított 10 méteren belül, s 99 %-a 30 méteren belül.

A szél iránya és erőssége mellett fontos paraméter a felszín, amire a pollen kiül. A vizsgált gyomnövények felszínének struktúrája igen eltérő képet mutat. Kiemelkedő pollenfogó képességűnek bizonyult az erősen szőrözött levelű orvosi ziliz (*A. officinalis*), melyen a tábla szegélyén átlagosan 1114 pollen/cm² fordult elő, miközben kukoricalevélen, a gyomok felső levélzetének magasságában, csupán 190 pollen/cm² volt mérhető, mely mutatja utóbbi viszonylag csekély pollenfogó képességét. Szintén nagy pollensűrűség jellemezte a csattanó maszlag (*D. stramonium*) levélzetét, átlagosan 339 pollen/cm²-es értékkel, azonban ez megfelelő mértékben visszatartó erejű mirigyszőrök hiányában nem maradt meg tartósan.

Nagy csalánon (*U. dioica*) a tábla szélétől való távolság függvényében a szegélyen mérhető 130-530 pollen/cm² átlagosan 70 pollen/cm² alá csökkent az első három méteren. Ebben közrejátszhatott az is, hogy a táblaszéli árnyékos résztől távolodva a csalán levelei – a naposabb és szárazabb körülmények hatására – kisebbek és kanalasan fejlődnek. Ez jobb vízellátottságú és árnyékos helyeken nem tapasztalható. A csalán közel vízszintes állású, nagy felületű, erősen szőrözött levele jó pollenmegtartó, a szórás első felében a táblaszálon mért átlagosan 328 pollen/cm²-es értékből egy hónapon túl is megmaradt 42 pollen/cm².

Egy zápor a kiüledett pollen 54-86 %-át is lemoshatja, s ebből a szempontból a növények felső levelei az érintettebbek (Pleasants *et al.*, 2001), ahol a levélfogyasztó hernyók előszeretettel táplálkoznak. Ugyanakkor hamvas szeder (*R. caesius*) levelén a pollenszórás időszakában fellépő vihar előtt, és azt követően néhány nappal hasonló értékeket felvételeztünk mind a táblán belül (333 illetve 431), mind annak szegélyén (189 illetve 213 pollen/cm²).

Selyemkóró levelén átlagosan 10-426 pollen/cm²-es értékeket felvételeztek táblán belül, de hosszabb csapadékmentes időszakban 1400 pollen/cm² is előfordult (Pleasants *et al.*, 2001). A szélirányba eső oldalon a szél felőli oldalhoz képest sokkal magasabb értékek fordulnak elő. Egy iowai tábla szélirányba eső oldalán a tábla szélétől távolodva 732, 313, 60, 30 és 1 pollen/cm²-es értékeket találtak 0, 1, 2, 4 és 8 m-re a kukoricatáblától, míg a szél felőli oldalon csupán 13, 3, 3, 2, 0 értékek fordultak elő (Pleasants *et al.*, 2001). Wraight és munkatársai (2000) vizsgálatai szerint *MON 810* (P34R07 hibrid) kukoricás mellett a viszonylag kis felületű és osztott levelű pasztinák (*Pastinaca sativa* L. – a *Papilio polyxenes* tápnövénye) levelére a kukoricatábla szélétől fél méterre, szélirányban, a pollenszórás kezdetétől átlagosan 210 pollen/cm², a táblától távolodva (1, 2, 4 és 7 m-en) 200, 115, 60 és 26 pollen/cm² ülepedett ki. Ugyanezek a távolságokon három nappal később 100, 70, 50, 30 és 11 pollen/cm² sűrűséget számoltak. A leveleken mért értékekkel szemben ragadós felületen nincs lehetőség pollenátrendeződésre. Lang és munkatársai (2004) vazelines tárgylemezen 0-429 pollen/cm² közötti értékeket felvételeztek pollenszóró kukoricatábla belsejében (-5 m), míg a tábla szélén 0-255 közötti értékeket. Li és munkatársai (2005) szélirányban a táblán belül 1000, a táblaszálon ~700, 3 m-re ~400, 6 m-re ~300, 10 m-re ~180, 15 m-re ~100 és 20 m-re a tábla szélétől átlagosan 28 db/cm² pollenmennyiséget számoltak vazelines tárgylemezen, *MON 810* eseményt hordozó kukorica esetén.

Saját adatainkkal összevetve is kitűnik, hogy táblán belül a pollensűrűség elérheti az 1000 db/cm²-t, míg a tábla szélén szélirányban 100-1000, a szél felőli oldalon 0-350 pollen/cm²-es értékek fordulnak elő. Kalkulációnk szerint a táblaszegélyi gyomnövények levélzetén, 40 kg/ha pollent termő *Bt*-kukoricánál (igen alacsony érték) a legszélső sortól

átlagosan 5 méter után csökken a pollensűrűség az amerikai vizsgálatokban fiatal lepkehernyók számára (*SYN-EVI76* esemény pollenje – selyemkóró – *Danaus plexippus* lárva) kritikus 100 pollen/cm² alá. Így megállapítható, hogy bár az egyes fajtákat és éveket tekintve igen nagy az eltérés, az uralkodó szélirányt is figyelembe véve körülbelül 10 méteres kritikus szegélyszávval kell számolni a védett lepkéket érintő ~Cry1Ab-toxint tartalmazó kukoricapollen kiülepedését illetően.

6.3. A *MON 810* fajtacsoport által érintett védett lepkék

Lepkefajok szabadföldi monitorozása során számtalan tényező befolyásolja egy adott lepkefaj előfordulásának gyakoriságát. Az imágók előfordulása egyfelől nem egyenértékű a lárva előfordulásával, hiszen számos faj kifejlett egyedei csak táplálkozási célból (virágnektár) látogatják a mezőgazdasági határterületeket, melyek diverzitásának mértéke alapvetően meghatározza a lepkefajok diverzitását. Nem elhanyagolható a felvételezések időzítése, mivel adott lepkefaj megjelenése térben és időben – egy vegetációs perióduson belül, illetve évek összevetésében – nagy heterogenitást mutat. Több éves, nagyszámú felvételezés adhat csak pontos képet a ritka, illetve rejtőző életmódú fajokról és/vagy az előre láthatóan kismértékű – 5-10 %-os – hatásokról (Lang, 2004).

A védett lepkefajok nagyobb része ritka előfordulású, ezért a fentebb említett anomáliák miatt, az idő- és pénzigényes rovar-felvételezések helyett a védett lepkék élőhelyét, tápnövényét és a lárva táplálkozási periódusát vetettük össze a kukoricatáblákat övező határterületek flórájával, illetve a kukorica pollenszórásával (Darvas *et al.*, 2004). Az ismert gyűjteményi (Magyar Természettudományi Múzeum Állattára, Lepkegyűjtemény) és szakirodalmi adatok alapján (Bálint *et al.*, 2006; Carter és Hargreaves, 1987; Ebert és Rennwald, 1991; Ronkay, 1997) 213 védett lepkefajunkból 48 fordulhat elő a kukoricásaink határát jellemző gyom- és kultúrnövény társulásokban. Ezek közül 33 faj lárvai táplálkoznak a kukorica pollenszórása idején (11. ábra).

A kis felületű és/vagy sima levélzet nem kedvez a kukoricapollen megtapadásához, ezért nem tartjuk valószínűnek, hogy a viola fajokon (*Viola* spp.), az olajféléken (Oleaceae), pl. közönséges fagyalon (*Ligustrum vulgare* L.), az ernyős fajokon (Apiaceae), pl. vadmurkon (*Daucus carota* L.), sóska- és keserűfű féléken (*Acetosella* és *Polygonum* spp.), szarkalábon (*Consolida regalis* S. F. Gray), üröm fajokon (*Artemisia* spp.), mezei iringón (*Eryngium campestre* L.), valamint pillangós fajokon (*Fabaceae*) – a sorrendnek megfelelően – táplálkozó árvácska-gyöngyházlepke (*Boloria euphrosyne* L.) és fakó gyöngyházlepke (*Boloria selene* [Denis & Schiffermüller]), fagyal-faaraszoló (*Peribatodes umbraria* Hübner), fecskefarkú lepke (*Papilio machaon* L.), ibolyás tűzlepke (*Lycaena alciphron* Rottemburg) és

kis tűzlepke (*Lycaena thersamon* Esper), szarkalábbagoly (*Periphanes delphinii* L.), sziki ürömbagoly (*Saragossa porosa kenderesiensis* Kovács), vörös csüngőlepke (*Zygaena laeta* Hübner), dolomit-kéneslepke (*Colias chrysotheme* Esper) és kis fehérsávoslepke (*Neptis sappho* Pallas) veszélyes mennyiségű *Bt*-kukoricapollent fogyaszthat. A fűfélék (Poaceae) kis felületű, s leginkább ferde állású levélzete szintén alacsony kitettséget eredményez, így a tarka szemeslepke (*Chazara briseis* L.) és a tükrös busalepke (*Heteropterus morpheus* Pallas) valószínűleg nem érintett.

Hasonlóan nem fogyaszthat jelentős mennyiségű kukoricapollent a hernyóként nem levélen, hanem a tápnövény (*Picris hieracioides* L., *Chondrilla juncea* L., *Aster linosyris* (L.) Bernh.) virágzatában élő keserűgyökér-nappalibagoly (*Schinia cardui* Hübner), a nyúlparéj-nappalibagoly (*Schinia cognata* Freyer) és a tárkonyüröm-csuklyásbagoly (*Cucullia dracunculi* Hübner).

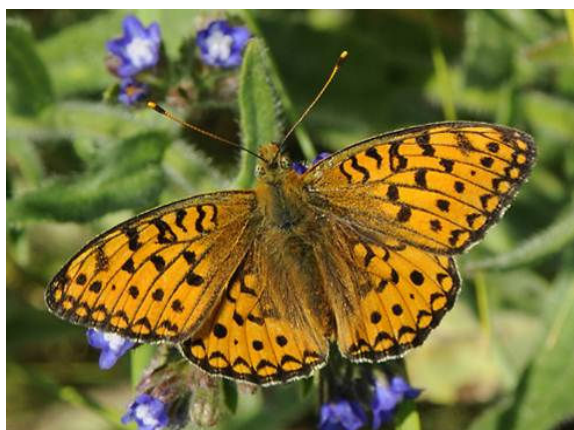
A tavasszal kelő díszes medvelepke (*Arctia festiva* Hufnagel) lárvájának tápnövényei a kétszikű lágyszárúak széles körét felölelik. Azonban csak a közepes fejlettségű lárva (~L3) fogyasztat a nyári pauzát követően augusztus első felében *Bt*-kukorica pollenével szennyezett táplálékot, ami valószínűsíthetően kismértékű kitettséget jelent.

Pollenkiüledési vizsgálataink alapján a *Prunus* fajokat fogyasztó sárga gyapjasszövő (*Eriogaster catax* L.), tavaszi gyapjasszövő (*Eriogaster lanestris* L.) és kardoslepke (*Iphiclides podalirius* L.) nem érintett, amennyiben kökényt (*Prunus spinosa* L.) fogyasztanak (átlagosan hétről egy pollenre csökken cm²-ként a sűrűség 1 és 5 méter között), de az érintettség biztos kizárásához a nagyobb levélfelszínű *Prunus* fajokat is meg kell vizsgálni.

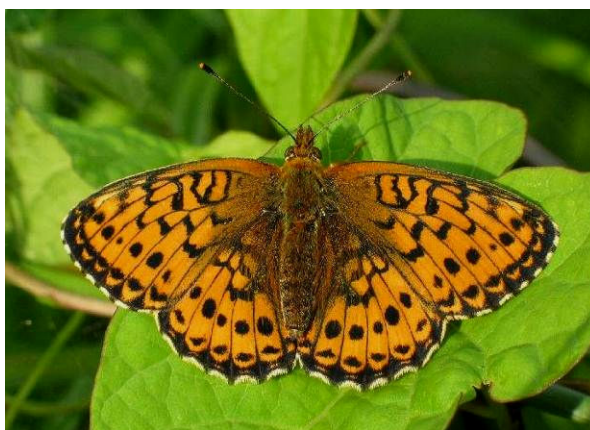
Az érintettség eldöntéséhez további – életmódbeli és táplálkozási – vizsgálatokra lenne szükség a polifág táplálkozású sziklaüröm-araszoló (*Dyscia conspersaria* [Denis & Schiffermüller]), a csabaíre vérfűn (*Sanguisorba officinalis* L.) táplálkozó nemes aranybagoly (*Diachrysia zosimi* Hübner), valamint a gyümölcsfákon táplálkozó nagy pávaszem (*Saturnia pyri* [Denis & Schiffermüller]) esetén.

Ugyanakkor a nagy és közel vízszintes állású levelekkel rendelkező csattanó maszlag (*D. stramonium*) a táblába mélyen behatoló (27-28. táblázat), jó pollenfogó növénynek bizonyult (20. táblázat). Azonban a pollent nem tartja meg hosszú ideig (egy hónappal a pollenszórás kezdete után nem maradt a leveleken pollen) így a rajta táplálkozó halálfejes lepke (*Acherontia atropos* L.) hernyóinak rövidebb távú – 10-14 napos – kitettsége valószínűsíthető. Az atalanta lepke (*Vanessa atalanta* L.; 3. ábra), a c-betűs lepke (*Nymphalis c-album* L.; 2. ábra), a kis rókalepke (*Nymphalis urticae* L.) és a nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.; 1. ábra) hernyói a kukorica pollenszórásakor a nagy csalán (*U. dioica*); az ibolya-gyöngyházlepke (*Argynnis niobe* L.; 21. ábra, a./), a lápi gyöngyházlepke (*Brenthis ino*

Rottenburg; 21. ábra, b./), a nyugati törpebusalepke (*Spialia sertorius* Hoffmannsegg; 21. ábra, c./) és a zöldes gyöngyházlepke (*Argynnis pandora* [Denis & Schiffermüller]; 21. ábra, d./) hernyói a szeder (*Rubus* spp.) nagy felületű és szőrös leveleivel táplálkoznak, melyek igen alkalmasak a kukoricapollen megfogására és megtartására (20. és 23. táblázat), így ezen fajok táblaszélien növekvő lárvái krónikusan kitettek lehetnek a MON 810 kukorica Cry1-tartalmú pollenjének. A szedren táplálkozó csíkos medvelepke (*Euplagia quadripunctaria* Poda) hernyói augusztusban kelnek, s elhúzódva fejlődnek (lárvaként telelnek), így valószínűleg a többi szederlevélen táplálkozó fajnál kevésbé érintettek.



a./ *Argynnis niobe* L.



b./ *Brenthis ino* Rottenburg



c./ *Spialia sertorius* Hoffmannsegg



ro Martínez

d./ *Argynnis pandora* [Dennis & Schiffermüller]
21. ábra: Védett lepkék, melyek lárvái a kukorica virágzásakor szeder fajokon (*Rubus* spp.) táplálkoznak

Fotó: a – Magnus Unger, b – Christine Devillers, c – Jürgen Rodeland, d – Pedro Martinez

Gyomfelvételezéseink során vizsgáltuk a különböző gyomfajok, mint potenciális tápnövények előfordulását, borítottságát. Felke és Langenbruch (2003) szerint a nagy csalán nem fordul elő Németországban kukoricatáblák belsejében az intenzív gyomirtás következtében. Felvételezéseink szerint Magyarországon a táblán belüli víznyomásos foltok és a gyomirtó szerek kezelésekre változó táblaszéli hatása következtében a nagy csalán mind a

táblán belül, mind annak szélén – a szélső sorok között megjelenve – gyakori előfordulása; táblaszéli viszonyok között a harmadik legnagyobb borítottságot mutatta (Darvas *et al.*, 2004). Szintén gyakorinak bizonyult a csattanó maszlag és a szeder-félék előfordulása. A kukoricában előforduló gyomok milyensége a gyomirtó szerek alkalmazásával is összefügg, amennyiben az egyes hatóanyagoknak önálló hatásspektruma van. Egy technológiai váltás – amint éppen a triazin-típusú (pl. *atrazine*) gyomirtók hazai kivonása is jelzi – jelentősen változtathatja a táblaszegélyek gyakori társulásait, így a rendszeres felülvizsgálat indokolt lehet. A fentebb említett gyakori gyomnövények nagy területű levelei jó pollenfogónak bizonyultak, valamint a szeder és a csalán esetében a szőrözött levélfelszín nem csak megfogja, de akár hosszú időn át meg is tartja a rárakódott pollent. Mindez növeli a rajtuk ez idő alatt táplálkozó hernyók kitettségének időtartamát. A pollen szóródása akár 10-16 napig elhúzódhat (Fónagy *et al.*, 2010), melyen felül – csapadékmentes időjárás esetén, amely többször is kísérté az elmúlt években a kukorica pollenszórását – így további 1-2 héttel megnő az expozíciós idő (Lauber *et al.*, 2010a, 2010b).

Mindezeket összevetve védett lepkéink közül és a jelenlegi kukorica gyomirtási technológiák alkalmazása mellett a *MON 810* kukorica pollenszóráskor a nagy csalánon, valamint a szeder-féléken táplálkozó lepkék lárvái lehetnek kiemelkedően, továbbá a csattanó maszlagon fejlődők kisebb mértékben érintettek.

A korábban 30 %-os határon meghúzott küszöbérték, miszerint a 30 % alatti populációs befolyással (pl. mortalitás) bíró hatások rizikómentesek (Dutton *et al.*, 2003), ökológiai szempontból nem tartható. A *MON 810* kukorica pollenje potenciálisan veszélyezteti a tábla gyomszegélyén és esetenként a táblában élő védett és ritka lepkelárvák biztonságos élőhelyeit, amennyiben azokra a ~Cry1Ab-toxintartalmú pollen kiülepedik, és hosszabb ideig megmarad. A táblákból kikerülő pollen megváltoztatja egyes élőhelyek adottságait, amit védett állatokkal kapcsolatban a hazai természetvédelmi törvény nem engedélyez (Magyar Országgyűlés, 1996; Darvas *et al.*, 2006a; Lauber *et al.*, 2007).

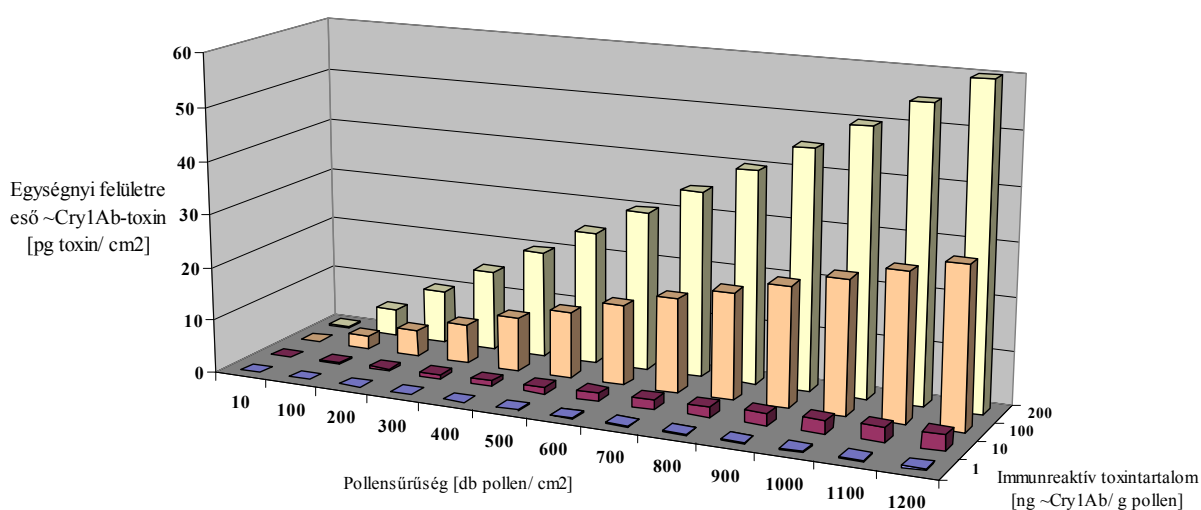
6.4. A DIPEL és a *MON 810* kukoricapollen hatásának összevetése

A pollen elosztásának nehézségei miatt fordult figyelmünk a Cry-toxinokat tartalmazó DIPEL hatása felé. Az összehasonlítás alapjául szolgál, hogy a *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* HD-1 törzse esetén a fő hatást a Cry1-toxinok (80%) okozzák, illetve ez utóbbiak közül a Cry1Ab a legjelentősebb (Arvidson *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2000; Babu *et al.*, 2002).

A DIPEL készítményt 1000 ppm koncentrációban használják kukoricamoly ellen (LC₁₀₀). A nappali pávaszem lárvák stádiumonkénti DIPEL-érzékenysége (LC₅₀) 2 és 7 ppm között változott; az atalanta lepke első lárvastádiuma 3,5-szer kevésbé érzékeny, mint a

pávaszemé, de még a c-betűs lepke is majdnem fele annyira érzékeny. Ezzel szemben a kártevő lepkefajok közül a gyapottok-bagolylepke és a kukoricamoly hernyói mind az első, mind a második stádiumban kevésbé érzékenyek ~Cry1Ab-toxinra. Különösen nagymértékű érzékenység-csökkenés figyelhető meg a *H. armigera* második lárvastádiumában, ami a ~Cry1Ab-rezisztencia alakulására lehet kedvezőtlen hatással (Darvas *et al.*, 2010a, 2010b). Eredményeink szerint a korai stádiumokban a 2 ppm-es kezelésnek való kitettség hasonló mértékű (20-40 %) mortalitást okoz nappali pávaszemen, mint a *MON 810* pollennel történő 300-600 pollen/cm² sűrűségű szennyezettség. A DIPEL kezelések során a *MON 810* pollen fogyasztásához hasonló szubletális hatások jelentkeztek: a lárvatömeg csökkent, a posztembrionális fejlődés lassult, a kezelt állatok érzékenyebbnak bizonyultak a későbbi stádiumokban jelentkező vírusos megbetegedéssel szemben.

A *Bt*-pollen hatása nem csak annak eloszlásától, hanem a pollennel kikerülő ~Cry1Ab-toxin mennyiségétől is függ, mely azonban igen nagy variabilitást mutat. A kukoricapollen átmérője közel 100 µm, ami a kihullást követő vízvesztés során – ez 1-4 óra alatt bekövetkezik (Aylor, 2002) – kissé csökken. Mivel 1 g száraz pollen közel 4 millió szemből áll (Goss, 1968; Jesse és Obrycki, 2000), így a toxinkoncentrációtól (1-200 ng ~Cry1Ab/g pollen) és a pollensűrűségtől (10-1000 db pollen/cm²) függően 24 000-szeres különbségek jelentkezhetnek az adott egységnyi levélfelülettel fogyasztásra kerülő ~Cry1Ab-toxintartalomban (22. ábra). Ezért a mások által pollennel kapott eredményektől eltérően, mi a jól elosztható, toxintartalmában állandó DIPEL készítményre határoztuk meg az *N. io* lárvák stádiumonkénti Cry-toxin érzékenységét.



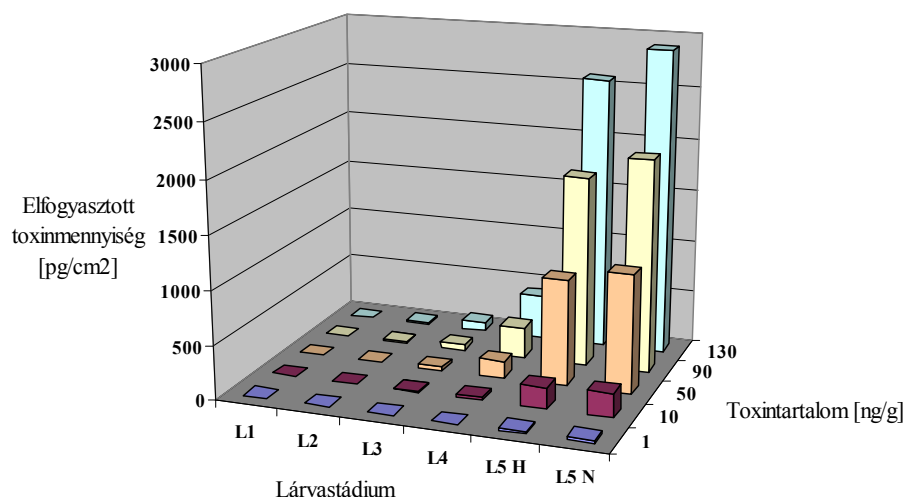
22. ábra: Egységnyi felületre eső ~Cry1Ab-toxintartalom *MON 810* kukoricapollen esetében

Felke és Langenbruch (2003; 2005) az idősebb (L3-L4) *N. io* lárvák csökkenő érzékenységről számolnak be ~Cry1Ab-pollennel szemben (*SYN-EV176*) a fiatalabb lárvastádiumhoz (L2) képest. Ez egyezik a saját eredményeinkkel, amennyiben a késői stádiumok LC₅₀ értéke közel ~6 ppm-nek adódott, a második stádium ~2 ppm-es érzékenységgel szemben. A nagyobb lárvák stádiumonként vizsgált csökkenő érzékenységet mutatták ki Cry1-toxintartalmú pollennel szemben *D. plexippus*, valamint *Pieris rapae* és *P. brassicae* esetén is (Felke és Langenbruch, 2002; Hellmich *et al.*, 2001). A nagyobb lárvák csökkent érzékenységet az idősebb lárvastádiumok nagyobb tömegével magyarázták (Felke és Langenbruch, 2003), de eredményeiket igen rövid, egy-két napos akut kitettség nyomán kapták.

Fiatal lárvákon, igen alacsony, 2 ng/g toxintartalmú *MON 810* pollennel végzett laboratóriumi vizsgálatokban még extrém magas (10 000 db/cm²) pollensűrűség mellett sem tapasztaltak hatást *Papilio polyxenes* esetén (Wraight *et al.*, 2000). Hellmich és munkatársai (2001) laboratóriumi vizsgálataikban csak 1000 pollen/cm² felett tapasztalták a kis *Danaus plexippus* lárvák tömegének csökkenését. Tölgy selyemlepke (*Antherea pernyi* Guérin-Méneville; Lepidoptera, Saturniidae) lárváin csak 10 000 db/cm²-es pollensűrűségnél tapasztaltak tömegcsökkenést (Li *et al.*, 2005). Mindezzel megegyezők a saját eredményeink, amennyiben csak 7 pg/cm² ~Cry1Ab-toxinkoncentráció felett okozott a *MON 810* pollen a természetes táblaszéli pollensűrűségben szubletális és letális hatásokat, míg az alatt csak magas, ~1000 pollen/cm²-es sűrűségben jelentkezett a nappali pávaszem lárvák tömegcsökkenése. Ez azt jelenti, hogy a jelentkező hatás mértékét a pollen ~Cry1Ab-toxintartalma alapvetően meghatározza. 1000 pollen/cm² felett a lárvák felismerési/elkerülési mechanizmusa révén – a lárvák a nagyobb mennyiségű, sárgálló kukoricapollent elkerülték – nem lineáris a kapcsolat a tömegcsökkenés és a pusztulás mértéke valamint a pollenkonzentráció között. A vizsgálatainkban szereplő rövidebb, 12 napos kezeléshez hasonló mértékű, 8-12 napos, átlagosan 158-174 db/cm² *MON 810* pollennek való kitettség nyomán eredményeinkkel megegyező mortalitási értékek (22-25 %) jelentkeztek *D. plexippus*-on szabadföldi körülmények között (Dively *et al.*, 2004). A fokozott pusztulékonyosság mellett lassabb lárvafejlődést, csökkent lárva- és bábtömeget tapasztaltak. Anderson és munkatársai (2005) csak pollennek (171 pollen/cm²) és portoknak (0,6 db/cm²) való 10 napos együttes kitettség esetén tapasztalták a pompás királylepke lárvák fokozott, 37 %-os mortalitását, valamint a lárvák csökkent táplálékfogyasztását.

Több kísérletben, ahol a toxintartalomról nincsenek adatok, nem találtak hatást a teljes pollenszórás alatti szabadföldi kitettség esetén *D. plexippus*-on (Stanley-Horn *et al.*, 2001; Jesse és Obrycki, 2003). Ez nem csak a más kísérletekben tapasztalt rövidebb kitettség esetén

jelentkező hatásokhoz képest meglepő, hanem azért is, mert a súlynövekedéssel együtt járó táplálékfogyasztás-növekedéssel a lárvák több pollent, s azzal együtt nagyságrendekkel több ~Cry1Ab-toxint is fogyasztanak, különösen a 4. és 5. stádiumban (23. ábra; a lárvákat ekkor már egyedileg neveltük, így a bábok ivarából következett a lárvák megkülönböztetése). Ez krónikus fogyasztás esetén halmozott kitettséget jelent, aminek következtében a nagyobb lárvák pusztulékonyasága fokozódik. Kísérleteinkben a teljes táplálkozási periódus során 500 és 1000 db/cm² *MON 810* pollennek kitett lárvák mortalitása az imágóvá fejlődésig meghaladta a 80 illetve a 90 %-ot. Ehhez a magas mortalitáshoz kiemelkedő mértékű vírusfertőzöttség társult, mely a kontroll illetve az izogenikus pollent fogyasztó csoportokat nem jellemezte. A kérdés további virológiai vizsgálata mindenképpen fontos lenne.



23. ábra: A *Nymphalis io* lárvák stádiumonkénti ~Cry1Ab-toxinfogyasztása a táblaszegélyre jellemző 300 db/cm² pollensűrűség esetén

Megjegyzés: H – hím, N – nőstény

6.5. A *Nymphalis io* lárvák kiemelkedő érzékenységének okai

A nappali pávaszem lárvák fokozott kitettségének hátterében több tényező együttes hatása áll. A fajnak Magyarországon két egymásba nyúló nemzedéke fejlődik, az első (az áttelelés nehézségei miatt kevésbé népes) június-júliusban, a második augusztus-szeptemberben rajzik (Bálint *et al.*, 2006). Mind a két nemzedék lárvanépességének táplálkozási periódusa átfedésben van a kukorica pollenszórásával.

A faj tápnövénye, a nagy csalán gyakori előfordulása kukoricatáblákban és azok közelében; táblaszéli körülmények között a harmadik legnagyobb borítottságú gyomnövény (Darvas *et al.*, 2004). Levele nagy felületű, közel vízszintes állású és szőrözött, így nagy mennyiségű pollen megfogására és megtartására képes. A csalánlevelek

levéltömeg/levélfelület hányadosa 2,85-ször kisebb, mint a selyemkóróé, ami azt jelenti, hogy ugyanakkora pollensűrűség mellett a pávaszem hernyók közel háromszor annyi pollent fogyasztanak, mint a *D. plexippus* (Darvas *et al.*, 2004).

A tojások pozícionálása hatással lehet a korai lárvastádiumok kitettségére. A nappali pávaszem imágók több százas csomóba rakják a tojásaikat, melyek egyszerre kelnek, s a lárvák csoportosan táplálkoznak egy-egy csalánhajtást lekopaszítva. Így a kis lárvák a teljes levelet elfogyasztják a felszínére rakódott szennyezéssel együtt. A dózisfüggést azonban rontja az állatok felismerési/elkerülési mechanizmusa. A csoportban táplálkozó pávaszem lárvák elkerülik a nagy mennyiségű pollennel szennyezett részeket. Az atalanta lepke hernyói egyesével a levélszél színét beszöve, míg a c-betűs lepke lárvái egyesével az első stádiumban a fonákon hámozgatnak. Utóbbi ez által csak később kerül kapcsolatba a levél színére kiülepedő pollennel. A *D. plexippus* a selyemkóró leveleinek fonákára helyezi egyesével a tojásait (Tschenn *et al.*, 2001), így ezek kitettsége ebből a szempontból a c-betűs lepkéhez hasonlítható.

Az *N. io* lárvái az általunk vizsgált védett lepkefajok (*N. c-album*, *V. atalanta*) közül ~Cry1Ab-toxinnal szemben a legérzékenyebbnek bizonyultak (Lauber *et al.*, 2006; 2010a; 2010b). Perry és munkatársai (2010) tévesen citálja a közzétett eredményeinket, amely az atalanta lepke hasonló érzékenységről számol be. Darvas és munkatársai (2004) cikke említést sem tesz a *V. atalanta* érzékenységről. A mostani vizsgálatainkból következően az atalanta lepke kevésbé érzékeny Cry1-toxinra.

Az egyedül maradó magányos fiatal lárvák pusztulékonyasága jelentősen fokozódik, 25-75 %-ra nő (Lauber és Darvas, 2009) – így a ~Cry1Ab-pollennel bekövetkező lárvaritkítás lavinaszerűen hat a pollen által esetleg nem letálisan érintett, magányossá vált egyedek mortalitására is.

Magyarországon a júliusi középhőmérséklet 19-22 °C. Az *N. io* táplálkozási periódusához szükséges átlagosan 477 nap°C hőösszeget véve alapul, ez 24-35 napos posztembrionális fejlődési időt jelent. Nevelési kísérleteinkben a nappali pávaszem lárvák táplálkozási periódusa 25 °C-on 19, 29,5 °C-on 15 napnak bizonyult (Lauber *et al.*, 2010a). A kukorica pollenszórása akár 17 napig is elhúzódhat (Jarosz *et al.*, 2003), s csapadékmentes időjárás esetén a kiülepedett pollen további 1-2 hétig megmarad a szőrözött csalánleveleken. Ez azt jelenti, hogy a nappali pávaszem lárvák teljes táplálkozási periódusuk során kitettek lehetnek lepkespecifikus Cry1-toxintartalmú *Bt*-kukoricapollennek. A kukoricatáblák gyomos szegélyén a növények növekedése igen egyenetlen, így könnyen előfordulhat, hogy a szegélyen pollent szóró egyedek pollenszórása 4 hétig is elhúzódik, s így az egész lárvafejlődés időtartamára kitolódik.

A nappali pávaszem Magyarországon védett lepkefaj. Véleményünk szerint alkalmas modell faj lehet a *MON 810* típusú Cry1-kukoricák Pannon Biogeográfiai Régióban élő védett lepkéket érintő környezeti hatásvizsgálatára.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Bizonyítottuk, hogy a két vizsgált kereskedelmi forgalmú, a Cry1Ab-prototoxin mennyiségi mérésére szolgáló *ELISA* rendszer (az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE és az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kit) az aktív toxint eltérő immun-reaktivitással méri (a kereszt-reaktivitással korrigálva 3,2-szeres eltérés). Tehát a különböző *ELISA* rendszerekkel végzett mérések eredményei nagyságrendileg hasonlóak, de közvetlenül nem összevethetők.
2. Megállapítottuk, hogy a *MON 810* genetikai eseményt hordozó kukorica ~Cry1Ab-toxintartalma szervenként és fenológiai stádiumonként eltérést mutat. A legmagasabb a levél toxintartalma (ötleveles stádiumban ~17 µg/g).
3. Igazoltuk a kukoricatáblák szegélyét övező ruderaliák gyomnövényeinek eltérő pollenfogó képességét, amelyek közül a nagy csalán (*Urtica dioica*; 328 ± 200 pollen/cm²), a hamvas szeder (*Rubus caesius*, 431 ± 334 pollen/cm²) és a csattanó maszlag (*Datura stramonium*, 339 ± 266 pollen/cm²) bizonyult gyakori előfordulású, jó pollenfogónak.
4. A kukorica pollenszórási időszakának, a védett lepkék tápnövény és élőhely preferenciájának összevetésével meghatároztuk a Pannon Biogeográfiai Régióban *MON 810* kukorica révén jelentős ~Cry1Ab-toxin kitettségű védett lepkefajok körét: nagy csalánon táplálkoznak az atalanta lepke (*Vanessa atalanta*), a c-betűs lepke (*Nymphalis c-album*), a kis rókalepke (*Nymphalis urticae*) és a nappali pávaszem (*Nymphalis io*); szedren táplálkoznak az ibolya-gyöngyházlepke (*Argynnis niobe*), a lápi gyöngyházlepke (*Brenthis ino*), a nyugati törpebusalepke (*Spialia sertorius*) és a zöldes gyöngyházlepke (*Argynnis pandora*) hernyói; továbbá csattanó maszlagon fejlődik a halálfejes lepke (*Acherontia atropos*) hernyója.
5. A vizsgált védett lepkék hernyóinak Cry1-toxin (DIPeL) érzékenységi sorrendje (LC₅₀-értékek): *Nymphalis io* L2 (1,93 ppm), *N. io* L3 (2,99 ppm), *N. io* L1 (4,39 ppm), *N. io* L4 (5,74 ppm), *N. io* L5 (6,17 ppm), *Nymphalis c-album* L1 (7,24 ppm) és *Vanessa atalanta* L1 (15,14 ppm).

6. Laboratóriumi körülmények között feltérképeztük a kukoricatáblák szegélyén jellemző sűrűségű ~100 ng/g ~Cry1Ab-toxintartalmú *MON 810* pollen L1-L3 (20-40 % mortalitás, kisebb lárva- és bábtömeg, lassabb fejlődési idő) és L1-L5 stádiumok közötti etetésének (>80% mortalitás, kisebb lárva- és bábtömeg, lassabb fejlődési idő) hatásait nappali pávaszemen. A 30 ng/g-nál kisebb ~Cry1Ab-toxintartalomnál a *MON 810* pollen hatására csak magas (~1000 pollen/cm²) koncentrációban jelentkeztek hatások.
7. Vizsgálataink alapján modell fajnak ajánljuk a nappali pávaszemet (*Nymphalis io*) a kukoricamoly-rezisztens *MON 810* és az ehhez hasonló *Bt*-kukoricahibridek környezeti hatásvizsgálatára a Pannon Biogeográfiai Régióban.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

~Cry1Ab-toxin mérése MON 810 kukoricában

A *MON 810* kukoricahibridek minden részükben kurtított ~Cry1Ab-toxint termelnek. A növényi toxin (91 kDa) analitikai szempontból nem azonos az eredeti baktérium által termelt protoxinnal (131 kDa), az előbbi immun-reaktivitása az enzimatikusan aktivált toxinéval (63 kDa) azonos. A kereskedelmi forgalomban lévő, a ~Cry1Ab-toxin mennyiségi mérésére szolgáló *ELISA* rendszerek protoxinon alapulnak, így az ezekkel végzett mérések eredményeit az aktív toxin immun-reaktivitásával korrigálni szükséges. A kereszt-reaktivitási 41 %-nak adódott az EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE és 56 %-nak az Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac *ELISA* kit esetén. A két kit különbsége a kereszt-reaktivitással korrigálva 3,2-szeres az aktív toxin kimutatását illetően, tehát a különböző *ELISA* rendszerekkel végzett mérések eredményei nagyságrendileg hasonlóak, de nem közvetlenül összevethetők.

Az egyedi mintákat tekintve a ~Cry1Ab-toxintartalom ~10-60 %-os eltérése mutatkozott az egyes növények között (biológiai variabilitás). A vegetációs időszak alatt ötleveles stádiumig nőtt a levél ($17,15 \pm 1,66 \mu\text{g/g}$) toxintartalma, majd a termésérés kezdetéig folyamatosan csökkent. Az érés végén újabb kis mértékű emelkedés volt megfigyelhető a részleges vízvesztés következtében. A gyökér toxintartalma az egyleveles stádiumhoz tartozó kezdeti magas értékről ($5,32 \pm 0,49 \mu\text{g/g}$) gyors csökkenéssel közel állandó, enyhén csökkenő szintre állt be a további stádiumok során. A szár toxintartalma nem változott szignifikánsan, „lófogú” állapotban $1,36 \pm 0,45 \mu\text{g/g}$ érték jellemezte. A DK-440 BTY kukoricában a ~Cry1Ab-toxin koncentrációja a növény szervei között az alábbiak szerint alakul: levél > portokfal > gyökér > szár > mag > pollen. Egy termőhelyen vizsgálva több év összevetésében a levél és a gyökér ~Cry1Ab-toxintartalmában szignifikáns különbségek adódtak. Egyes években jelentősen, sorrendben 60 illetve 38 %-kal kevesebb ~Cry1Ab-toxin termelődött e szervekben.

MON 810 pollen hatásának vizsgálata

A kukorica virágzása Magyarországon, tekintve a felhasználható fajtaválasztékot, júliusban és augusztusban történik. A hazai táblarendezési viszonyok között a kukoricások szegélyén található növénytársulások igen összetettek. Növény-felvételezéseinkkel vetettük össze a Magyarországon védett 213 lepkefaj élőhelyét és tápnövényét, majd az eredményt tovább szűkítettük a kukorica pollenszórási időszakával. Vizsgáltuk a gyakori előfordulású, nagy borítottságot elérő lehetséges tápnövények felépítését és levélstruktúráját. Nagy felületű, vízszintes állású és szőrözött levelekkel rendelkezik a nagy csalán (*Urtica dioica*) és a szederfélék (*Rubus* spp.), melyekre így nem csak nagy mennyiségű pollen képes kiüledni, de az

hosszabb időn át meg is marad. Egy adott kukoricatábla szórása 10-17 nap, azonban a szőrözött levélfelület a pollent további 1-2 hétig megtartja. Így krónikus kitettséggel kell számolni a kukorica pollenszórásakor a nagy csalánon fejlődő atalanta lepke (*V. atalanta*), c-betűs lepke (*N. c-album*), kis rókalepke (*N. urticae*) és nappali pávaszem (*N. io*), valamint a hamvas szedren táplálkozó ibolya-gyöngyházlepke (*A. niobe*), lápi gyöngyházlepke (*B. ino*), nyugati törpebusalepke (*S. sertorius*) és zöldes gyöngyházlepke (*A. pandora*) hernyóit illetően.

A pollenszóródást vizsgálva megállapítható, hogy a pollensűrűség táblán belül elérheti az ~ 1000 pollen/cm²-t. A kukoricatábla szélén a széliránytól és -erősségtől, a fajta/hibrid pollentermelésétől, valamint a pollenfogó levélfelszíntől függően igen széles intervallumban mozog a kiüledett pollen sűrűsége. A tábla szélén kukoricalevélen a gyomok magasságában mérhető átlagosan 300 pollen/cm² szélirányban a hatszorosára növekedhet. A táblától távolodva az elsodródó pollen mennyisége exponenciálisan csökken. A védett lepkék lárváira hatásos Cry1-tartalmú pollen koncentrációját illetően átlagosan 10 méter kritikus szegéllyel kell kalkulálni.

A nappali pávaszem (*N. io*) kiemelkedően érzékenynek bizonyult $\sim$ Cry1Ab tartalmú pollennel és a DIPEL-ben található Cry-toxinokkal szemben. Az *N. io* lárvastádiumonkénti DIPEL (80 % Cry1-toxin) érzékenysége LC₅₀ = 2-7 ppm-nek bizonyult. Tápnövénye gyakori előfordulása és jó pollenfogó. A fajnak Magyarországon két egymásba érő nemzedéke van, mindkettő utódai a kukorica pollenszórásakor növekednek. A nőtény több száz csomóba rakja a tojásait, melyekből a lárvák egyszerre kelnek és csoportosan táplálkoznak, így egy-egy teljes levelet, majd hajtást elfogyasztanak, a ráakódott szennyezéssel együtt. A *MON 810* kukorica hatását vizsgálva, a táblaszegélyi viszonyok között átlagosnak mondható 300-600 pollen/cm²-nek való 12 napos kitettség (L₁-L₃) a lárvák 20-40 %-os mortalitását okozta. A lárvák viszonylag rövid, közelítőleg két-három hétig tartó táplálkozási periódusából, a tápnövény habitusából és a pollenszóródási időből következően a hernyók akár a teljes táplálkozási periódusuk során kitettek lehetnek *MON 810* pollennek. Teljes posztembrionális kitettséget (~ 500 pollen/cm², ~ 100 ng Cry1Ab/g száraz pollen) követően 80 % fölé emelkedett a nappali pávaszem imágókelésig megfigyelt mortalitása, mely jelentős vírusfertőzöttséggel társult.

A hazai természetvédelmi törvények szerint a védett állatok élőhelyeinek megváltoztatása nem megengedhető. Ezt a *MON 810* genetikai eseményt hordozó fajták nem tudják biztosítani. Izogenikus szegélysorok vetésével csökkenthető a tábla szélén jelentkező hatás, azonban ez nem jelent megoldást a táblában előforduló víznyomásos foltok növényzetére kiüledő $\sim$ Cry1Ab-pollenre.

9. SUMMARY

Measurement of Cry1 toxin in *MON 810* corn

Corn hybrids containing the *MON 810* genetic event produce truncated ~Cry1Ab toxin in all plant organs. The plant derived toxin (91 kDa) is not equal, in analytical sense, to the *Bacillus thuringiensis* derived protoxin (131 kDa). The immunoreactivity of the former is the same as of the enzymatically activated toxin (63 kDa). Commercial ELISA systems applicable for quantitative measurements of the ~Cry1Ab toxin, however, are devised against Cry1Ab/Cry1Ac protoxins to the measurement of plant ~Cry1Ab toxin levels by using analytical standards of the protoxin protein. Therefore, the results of these measurements should be corrected with the cross-reactivity (CR) of the active toxin. The average CR was found to be 41% and 56% in the EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QuantiPlate and Abraxis Bt-Cry1Ab/Ac ELISA kit, respectively. Between the two kits, there is a 3.2 times difference in the calculated activated Cry toxin content. These indicate that the results of different ELISA systems are similar in order of magnitude, but they cannot be directly compared to each other.

There occurred a ~10-60% difference in toxin content among parallel samples of individual plants taken at the same time (biological variability). During the vegetation period the ~Cry1Ab toxin concentration rised in the leaves until the five-leaf stage (17.15 ± 1.66 µg/g), followed by a gradual decline from the start of maturity. At the end of maturity there was a slight increase again due to partial desiccation. Toxin concentration in the roots rapidly decreased from the high initial level at the single-leaf stage (5.32 ± 0.49 µg/g) reaching a nearly constant, slightly decreasing level during subsequent stages. The ~Cry1Ab toxin concentration in the stem did not vary significantly, it was 1.36 ± 0.45 µg/g at the dent stage. Toxin levels showed the following pattern: leaf > anther wall > root > stem > grain > pollen. At the same production site significant differences were found in the toxin content of leaf and stem among years. In certain years, a substantially less toxin was produced in the leaves and the stem, by 60 and 38%, respectively.

Monitoring the impact of *MON 810* pollen

The flowering of corn in Hungary, considering the actual hybrid assortment, occurs in July and August. Plant associations in the cornfield edges are rather diverse in Hungarian table settlement conditions. Within our plant survey, the habitat and food plant assortment of the 213 protected butterfly species in Hungary was compared. The result was narrowed with the pollen shedding period of corn to determine affected butterfly species. We investigated the build-up characteristics and the leaf structure of the possible food plants, which are common and represent ample coverage. The leaves of stinging nettle (*Urtica dioica*) and dewberry

(*Rubusspp.*) have large, horizontal hairy surfaces, on which substantial amounts of corn pollen can be deposited and remain for a long time. The pollen shedding of a given cornfield lasts 10-17 days, but because of the hairy surface of the weed leaves, pollen may remain present for a subsequent 1-2 week period. This causes chronic exposure of the caterpillars of the red admiral (*V. atalanta*), the comma butterfly (*N. c-album*), the small tortoiseshell (*N. urticae*) and the peacock butterfly (*N. io*) feeding on nettle, as well as the Niobe fritillary (*A. niobe*), the lesser marbled fritillary (*B. ino*), the red-underwing skipper (*S. sertorius*) and the cardinal fritillary (*A. pandora*) feeding on dewberry.

Analysing the pollen shedding it can be established that the pollen density can reach the ~ 1000 pollen/cm² in the cornfields. At the edge of the cornfield, settled pollen density varies greatly, depending on the wind direction and pressure, the pollen yield of the hybrid, and the leaf surface on which the pollen is deposited. The average 300 pollen/cm² density measured on corn leaf in the height of the weeds at the edge can increase by six times in downwind direction. Moving away from edge, the amount of the pollen decreases exponentially. For the $\sim$ Cry1Ab contained pollen density affecting protected butterfly species an average critical edge of 10 meter has to be considered.

The peacock butterfly (*Nymphalis io*) proved to be prominently sensitive against $\sim$ Cry1Ab toxin contained pollen and Cry toxins originated from DIPEL. The sensitivity of *N. io* per stadium against DIPEL (80% Cry1 toxin) was $LC_{50} = 2-7$ ppm. The food plant of this species is common and is effective in capturing pollen. In Hungary, the two generations of *N. io* overlap with each other, both progenies develop during pollen shedding interval of corn. The female lays its eggs in butches of hundreds. Larvae hatch together and feed gregariously, so they consume entire leaves and shoots along with the pollution deposited on them. Investigating the effect of *MON 810* corn, the 12-day exposure (L_1-L_3) to 300-600 pollen/cm² density, common at the cornfield perimeters, causes 20-40% mortality of the larvae. Due to the short (approx. two-three weeks) feeding period of the larvae, the build-up of the food plant and the pollen shedding period of corn, the larvae can be exposed to *MON 810* corn pollen during their entire feeding period. Total postembryonic exposition (~ 500 pollen/cm², ~ 100 ng Cry1Ab/g dry pollen) of the peacock butterfly larvae caused more than 80% mortality by the imago stage, combined with serious viral infection symptoms.

Concerning the Hungarian law of nature conservation, it is not allowed to change the habitats of protected species. This requirement cannot be guaranteed by the use of corn varieties of the *MON 810* genetic event. The edge effect can be reduced by isogenic border lines, but this does not solve the problem of the $\sim$ Cry1Ab toxin containing pollen deposited on weeds near wet patches inside the cornfield.

MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- Abbasi, B., Ahmed, K., Khalique, F., Ayub, N., Liu, H., Kazmi, S. and Aftab, M. (2007): Rearing the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*, on a tapioca-based artificial diet. *J. Insect Sci.*, 7: 35.
- Abel, C. A. and Adamczyk, J. J. Jr. (2004): Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton bolls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and Southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. *J. Econ. Entomol.*, 97: 1737-1744.
- Akhurst R. J., James, W., Bird, L. J. and Beard C. (2003): Resistance to the Cry1Ac δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in the Cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 96: 1290-1299.
- AGBIOS (2002): Safety assessment of YieldGard insect-protected event MON810. Product Safety Description – <http://agbios.com/docroot/decdocs/02-269-010.pdf> (lekérdezés időpontja: 2010. január 14.)
- AGBIOS (2008): MON 810 food safety assessment case study. Case Study – <http://agbios.com/cstudies.php?book=FSA&ev=MON810&chapter=Expressed&lang> (lekérdezés időpontja: 2010. január 14.)
- Anderson, P. L., Hellmich, R. L., Prasifka, J. R. and Lewis, L. C. (2005): Effects on fitness and behavior of Monarch butterfly larvae exposed to a combination of Cry1Ab-expressing corn anthers and pollen. *Environ. Entomol.*, 34: 944-952.
- AKI (1991-2003): A mezőgazdasági termelőeszköz kereskedelmi vállalatok/szervezetek növényvédőszer értékesítése és zárókészlete szercsoportonként cikkelemes részletezésben. (Testületi szerző: Agrárgazdasági Kutató és Informatikai Intézet) Agrárgazdasági Kutató és Informatikai Intézet, Budapest.
- ANZFA (2001): Food derived from an insect-protected corn line Mon 810. A safety assessment. Technical Report Series No. 5, November 2001, Australia New Zealand Food Authority. http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/TR5.pdf (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Arvidson, H., Dunn, P. E., Strnad, S. and Aronson, A. I. (1989): Specificity of *Bacillus thuringiensis* for lepidopteran larvae: factors involved *in vivo* and in the structure of a purified protoxin. *Mol. Microbiol.*, 3: 1533-1543.
- Aylor, D. E. (2002): Settling speed of corn (*Zea mays*) pollen. *J. Aerosol Sci.*, 33: 1601-1607.
- Aylor, D. E., Schultes, N. P. and Shields, E. J. (2003): An aerobiological framework for assessing cross-pollination in maize. *Agric. For. Meteorol.*, 119: 111-129.
- Árpás, K., Tóth, F. and Kiss, J. (2004a): Analysis of web content of *Theridion impressum* L. Koch (Araneae: Theridiidae) in BT (DK 440 BTY, MON 810, Cry1Ab) and isogenic (DK 440) maize. *Bulletin IOBC/WPRS*, 27: 23-29.
- Árpás, K., Tóth, F. és Kiss, J. (2004b): A *Theridion impressum* L. Koch (Araneae: Theridiidae) pókfaj hálótartalmának elemzése Bt- (DK-440 BTY, MON 810, Cry1Ab) és izogén (DK 440) kukoricában. *Növényvédelem*, 40: 61-65.
- Árpás, K., Tóth, F. and Kiss, J. (2005): Foliage-dwelling arthropods in Bt-transgenic and isogenic maize: a comparison through spider web analysis. *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, 40: 347-353.
- Babu, B. G., Udayasuriyan, V., Asia Mariam, M., Sivakumar, N. C., Bharathi, M. and Balasubramanian, G. (2002): Comparative toxicity of Cry1Ac and Cry2Aa δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera* (H.). *Crop Protect.* 21 (9): 817-822.

- Bailey, K. L., Boyetchko, S. M. and Längle, T. (2010): Social and economic drivers shaping the future of biological control: A Canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. *Biol. Control.*, 52: 221-229.
- Bakonyi, G., Szira, F., Kiss, I., Villányi, I., Seres, A. and Székács, A. (2006): Preference tests with collembolans on isogenic and *Bt*-maize. *Eur. J. Soil Biol.*, 42: 132-135.
- Bánáti H., Lauber É., Szécsi Á., Székács A. és Darvas B. (2010): A gyapottok-bagolylepke és a kukoricamoly szerepe a csőfuzariózis terjesztésében. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok.* 56. old.
- Bardócz Zs. és Pusztai Á. (2007): A Cry-toxint termelő kukoricák táplálkozástani és gasztroenterológiai vizsgálatáról. 43-45. old. In: Darvas B. (szerk.) *Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények.* Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest.
- Bálint Zs., Gubányi A. és Pitter G. (2006): *Magyarország védett pillangóalakú lepkéinek katalógusa – a Magyar Természettudományi Múzeum gyűjteménye alapján.* Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest. 1-136 old.
- Bernstein, I. L., Bernstein, J. A., Miller, M., Tierzieva, S., Bernstein, D. I., Lummus, Z., Selgrade, M. K., Doerfler, D. L. and Seligy, V. L. (1999): Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environ. Health Perspect.*, 107: 575-582.
- Betz, F. S., Hammond, B. G. and Fuchs, R. L. (2000): Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32: 156-173.
- Békési L.: A genetikailag módosított (GM) növények és a mézelő méh (*Apis mellifera*) (2005): *Magyar Állatorvosok Lapja*, 127: 307-313.
- Biró, B., Villányi, I., Naár, Z., Bakonyi, G., Magyar, E. and Tombácz, E. (2002): Soil- and rhizobiological tools for the risk assessment of *Bt* corn. Internat. Symp. on Impact of GMOs: „Soil microbiology and nutrient dynamics”, Vienna, BOKU, *Abs. ISIG*, p. 17.
- Biró B., Villányi I., Füzy A. és Naár Z. (2005): Baktériumok és gombák kolonizációja génmódosított (*Bt*-) és izogénes és kontroll kukorica rhizoszférájában. *Agrokémia, Talajtan*, 54: 189-203.
- Bøhn, T., Primicerio, R., Hessen, D. O. and Traavik, T. (2008): Reduced fitness of *Daphnia magna* fed a *Bt*-transgenic maize variety. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 55: 584-592.
- Bravo, A. and Soberón, M. (2008): How to cope with insect resistance to *Bt* toxins? *Trends Biotechnol.*, 26: 573-579.
- Bravo, A., Gill, S. S. and Soberón, M. (2007): Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, 49: 423-435.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F. and Handelsman, J. (2006): Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 103: 15196-15199.
- Bruns, H. A. and Abel, C. A. (2003): Nitrogen fertility effects on *Bt* delta-endotoxin and nitrogen concentrations of maize during-early growth. *Agron. J.*, 95: 207-211.
- Bryant, S. R., Thomas, C. D. and Bale, J. S. (1997): Nettle-feeding nymphalid butterflies: temperature, development and distribution. *Ecol. Entomol.*, 22: 390-398.
- Carter, D. J. und Hargreaves, B. (1987): Raupen und Schmetterlinge Europas und ihre Futterpflanzen. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, Deutschland. S. 1-292.
- Castle, L. A., Wu, G. and McElroy, D. (2006): Agricultural input traits: past, present and future. *Curr. Opin. Biotech.*, 17: 105-112.
- CFIA (1997) – Decision Document 97-19: Determination of the Safety of Monsanto Canada Inc.'s Yieldgard™ Insect Resistant Corn (*Zea mays* L.) Line MON810. Canadian Food Inspection Agency, Plant Products Directorate, Plant Biosafety Office. <http://www.inspection.gc.ca/english/plaveg/bio/dd/dd9719e.shtml#A3> (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)

- Chambers, C. P., Whiles, M. R., Rosi-Marshall, E. J., Tank, J. L., Royer, T. V., Griffiths, N. A., Evans-White, M. A. and Stojak, A. R. (2010): Responses of stream macroinvertebrates to Bt maize leaf detritus. *Ecol. Appl.*, 20: 1949-1960.
- Chilcutt, C. F. and Tabashnik, B. E. (2004): Contamination of refuges by *Bacillus thuringiensis* toxin genes from transgenic maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 7526-7529.
- Chowdhury, E. H., Kuribara, H., Hino, A., Sultana, P., Mikami, O., Shimada, N., Guruge, K. S., Saito, M. and Nakajima, Y. (2003): Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J. Anim. Sci.*, 81: 2546-2551.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. and Dean, D. H. (1998): Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 807-813.
- Crickmore, N., Zeigler, D. R., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Bravo, A. and Dean, D. H. (2009): *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/ (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Damgaard, P. H. (1995): Diarrhoeal enterotoxin production by strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from commercial *Bacillus thuringiensis*-based insecticides. *FEMS Immunol. Med. Mic.*, 12: 245-250.
- Damgaard, P. H., Larsen, H. D., Hansen, B. M., Bresciani, J. and Jorgensen, K. (1996): Enterotoxin-producing strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from food. *Lett. Appl. Microbiol.*, 23: 146-150.
- Darvas B. (1997): *A genetikailag módosított élőszervezetek kibocsátásának környezeti kockázatai*. Fenntartható Fejlődési Bizottság, Budapest. 1-64.
- Darvas B. (1999): Baktériumok. 83-91. old. (*Bacillus thuringiensis* Berliner). In Polgár A. L. (szerk.) *A biológiai növényvédelem és helyzete Magyarországon*. OMFB, Budapest.
- Darvas B. (2005): Hozzászólás Balázs Ervin és társainak állásfoglalásához. *Magyar Tudomány*, 166: 1292-1294.
- Darvas B. és Lauber É. (2007): A Cry1-toxinrezisztenciáról. 64-66. old. In Darvas B. (szerk.): *Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények*. Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest.
- Darvas B. és Lövei G. (2006): A genetikailag módosított szervezetek környezeti hatásai. 320-326. old. In Darvas B. és Székács A. (szerk.): *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. L'Harmattan Kiadó, Budapest.
- Darvas B. és Székács A. (2010): A géntechnológiai úton módosított növények megítélése az Európai Unió keleti határán. *Biokontrol*, 1: (megjelenés alatt).
- Darvas B., Seprős I. és Szántó J. (1979): *Környezetkímélő növényvédelmi eljárások rovarok és atkák ellen. I. Biológiai védekezés: entomopatogén baktériumok, entomofág állatok*. Agroinform, Budapest, Tématanulmány. 1-53.
- Darvas B., Csóti A., Gharib, A., Peregovits L., Ronkay L., Lauber É. és Polgár A. L. (2004): Adatok a *Bt*-kukoricapollen és védett lepkefajok lárváinak magyarországi rizikóanalíziséhez. *Növényvédelem*, 40: 441-449.
- Darvas B., Lauber É., Kincses J., Vajdics Gy., Juracsek J. és Székács A. (2005): *Bt*-kukorica eredetű Cry1Ab toxinra rezisztens *Plodia interpunctella*. *Abs. 51. Növényvédelmi Tudományos Napok* 9. old.
- Darvas B., Székács A., Bakonyi G., Kiss I., Biró B., Villányi I., Ronkay L., Peregovits L., Lauber É. és Polgár A. L. (2006a): Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal GMO Paneljének a magyarországi környezetanalitikai és ökotoxikológiai vizsgálatokkal kapcsolatos állásfoglalásáról. *Növényvédelem*, 42: 313-325.
- Darvas B., Lauber É., Vajdics Gy., Pap L., Juracsek J. és Székács A. (2006b): *Bt*-kukorica eredetű Cry1Ab toxinra rezisztens *Plodia interpunctella* keresztérzékenysége Dipel-re,

- és reakciója citokróom P-450 gátlókra. *Abs. 52. Növényvédelmi Tudományos Napok*. 37. old.
- Darvas B., Lauber É., Bakonyi G., Békési L., Székács A. és Papp L. (2007a): A MON 810-es GM-kukoricák környezettudományi megítélése. *Magyar Tudomány*, 168: 1047-1056.
- Darvas B., Lauber É. és Székács A. (2007b): Az Európai Unióban engedélyezés alatt álló, géntechnológiai úton módosított növények környezettudományi megítélése. 15-27. old. *In* Kövics Gy. és Dávid I. (szerk.) *Proc. 12. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum*, Debrecen.
- Darvas B., Lauber É., Takács E. és Székács A. (2009): A GM-növények mérlege a növény- és környezetvédelemben. I-II. *Környezetvédelem*, 17: (1): 24-25; 17 (2): 26-27.
- Darvas B., Bánáti H., Szécsi Á., Lauber É. és Székács A. (2010a): A gyapottok-bagolylepke, a kukoricamoly és a fuzariózis együttes előfordulása szabadföldi hagyományos és Cry1-toxintermelő kukoricacsövekben. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok*. 57. old.
- Darvas, B., Bánáti, H., Szécsi, Á., Lauber, É. and Székács, A. (2010b): Relationships of *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* and *Fusarium verticillioides* on MON 810 maize. *Abs. 9th European Congress of Entomology*, Budapest. Page 200-201.
- Darvas, B., Bánáti, H., Takács, E., Lauber, É., Szécsi, Á. and Székács, A. (2010c): Relationships of *Helicoverpa armigera*, *Ostrinia nubilalis* and *Fusarium verticillioides* on MON 810 maize. *Insects*, 2: 1-11.
- Dively, G. P., Rose, R., Sears, M. K., Hellmich, R. L., Stanley-Horn, D. E., Calvin, D. D., Russo, J. M. and Anderson, P. L. (2004): Effects on Monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after continuous exposure to Cry1Ab-expressing corn during anthesis. *Environ. Entomol.*, 33: 1116-1125.
- Dona, A. and Arvanitoyannis, I. S. (2009): Health risks of genetically modified foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 49: 164-175.
- Dutton, A., Romeis, J. and Bigler, F. (2003): Assessing the risks of insect resistant transgenic plants on entomophagous arthropods: Bt-maize expressing Cry1Ab as a case study. *BioControl*, 48: 611-636.
- Ebert, G. und Rennwald, E. (Hrsg.) (1991): Die Schmetterlinge Baden-Württembergs. Band 1: Tagfalter I. S. 1-552; Band 2: Tagfalter II. S. 1-535; Band 3: Nachtfalter I. S. 1-518; Band 4: Nachtfalter II. S. 1-535; Band 7: Nachtfalter V. S. 1-582. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, Deutschland.
- Európai Közösség (2001): 2001/18/EC Directive of the European Parliament and of the Council on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. http://www.biosafety.be/PDF/2001_18.pdf (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Ewen, J. W. B. and Pusztai, Á. (1999): Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *The Lancet*, 354: 1353-1354.
- Fejes Á., Fekete G., Székács A. és Darvas B. (2010): Cry-toxintartalmú kukoricapollen (MON 810 és DAS-59122) és néhány vízi szervezet (*Aedes aegypti*, *Daphnia magna*). *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok*. 61. old.
- Felke, M. and Langenbruch, G. A. (2002): Laboratory studies on the effects of pollen from Bt-maize on larvae of some butterfly species. *J. Appl. Entomol.*, 126: 320-325.
- Felke, M. und Langenbruch, G. A. (2003): Wirkung von Bt-Mais-Pollen auf Raupen des Tagpfauenauges im Laborversuch. *Gesunde Pflanzen*, 55: 1-7.
- Felke, M und Langenbruch, G. A. (2005): Auswirkungen des Pollens von transgenem Bt-Mais auf ausgewählte Schmetterlingslarven. Bfn-Skripten 157. Bundesamt für Naturschutz. S. 1-143. <http://www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/skript157.pdf> (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Ferré, J. and Van Rie, J. (2002): Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.*, 47: 501-533.

- Folcher, L., Jarry, M., Weissenberger, A., G  rault, F., Eychenne, N., Delos, M. and Regnault-Roger, C. (2009): Comparative activity of agrochemical treatments on mycotoxin levels with regard to corn borers and *Fusarium* mycoflora in maize (*Zea mays* L.) fields. *Crop Prot.*, 28: 302-308.
- Fónagy A., Krishnan, M., Bánáti H., Lauber   ., Takács E., Székács A., Ny  ri A., Herman G., Kugler N.   s Darvas B. (2010): Kukoricafajt  k virágzása, k  l  n  s tekintettel az intraspecifikus hibridiz  ci  ra (*MON 810* x egy  b fajták) [N  1.] *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok* 53. old.
- van Frankenhuyzen, K. (1993): The challenge of *Bacillus thuringiensis*. pp. 1-36. In Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S. (eds) *Bacillus thuringiensis, an environmental biopesticide: Theory and practice*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- van Frankenhuyzen, K. (2009): Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins. *J. Invertebr. Pathol.*, 101: 1-16.
- F  sti Molnár G. (2007): Az   llami elismer  s el  tt l  v   géntechnológiai   ton módosított fajt  kkal végzett hazai fajtavizsg  latok eredményei. 17-19 old. In Darvas B. (szerk.) *Mez  gazdas  gi géntechnológia – els  gener  ci  s GM-növények*. Orsz  ggy  l  s Mez  gazdas  gi Bizottsága, Budapest.
- GMO Compass (2011): GMO Database. <http://www.gmo-compass.org/eng/gmo/db/> (lekérdezés id  pontja: 2011. szeptember 15.)
- Gómez, I., Pardo-López, L., Munoz-Garay, C., Fernandez, L. E., Pérez, C., Sánchez, J., Soberón, M. and Bravo, A. (2007): Role of receptor interaction in the mode of action of insecticidal Cry and Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*. *Peptides*, 28: 169-173.
- Goss, J. A. (1968): Development, physiology and bio-chemistry of corn and wheat pollen. *Bot. Rev.*, 34: 333-359.
- Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., Spencer, T., Bidne, K. G. and Lewis, L. C. (2001): Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 98: 11925-11930.
- Heszky L. (2005): VI. Els  gener  ci  s transzgenikus növények. 163-170. old. In Heszky L., F  s  s L.   s Hornok L. (szerk.): *Mez  gazdas  gi biotechnol  gia*. Agroiinform, Budapest, 2005.
- Heszky L. (2007): G  n  raml  s, génmegszökés várható k  vetkezm  nyei. 20-23. old. In Darvas B. (szerk.) *Mez  gazdas  gi géntechnológia – els  gener  ci  s GM-növények*. Orsz  ggy  l  s Mez  gazdas  gi Bizottsága, Budapest.
- Hilbeck, A. and Schmidt, J. E. U. (2006): Another view on Bt proteins – How specific are they and what else might they do? *Biopestic. Int.*, 2: 1-50.
- Hojsgaard, S., Wright, K. & Leidi, A. A. (2009): doBy: Groupwise computations of summary statistics, general linear contrasts and other utilities. *R package version 4.0.5*. <http://CRAN.R-project.org/package=doBy> (lekérdezés id  pontja: 2011. szeptember 18.)
- Hothorn, T., Bretz, F. and Westfall, P. (2008): Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical J.*, 50: 346-363.
- Huang, F., Buschman, L. L., Higgins, R. A. and McGaughey, W. H. (1999): Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin in the European corn borer. *Science*, 284: 965-967.
- Jackson, S. G., Goodbrand, R. B., Ahmed, R. and Kasatiya, S. (1995): *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett. Appl. Microbiol.*, 21: 103-105.
- James, C. (2010): *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2010*. International Service for Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY. Brief No. 42.

- Jarosz, N., Loubet, B., Durand, B., McCartney, A., Foueillassar, X. and Huber, L. (2003): Field measurements of airborne concentration and deposition rate of maize pollen. *Agricult. Forest Meteorol.*, 119: 37-51.
- Jesse, L. C. H. and Obrycki, J. J. (2000): Field deposition of *Bt* transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia*, 125: 241-248.
- Jesse, L. C. H. and Obrycki, J. J. (2003): Occurrence of *Danaus plexippus* L. (Lepidoptera: Danaidae) on milkweeds (*Asclepias syriaca*) in transgenic Bt corn agroecosystems. *Agr. Ecosyst. Environ.*, 97: 225-233.
- Johnson, K. S., Scriber, J. M., Nitao, J. K. and Smitley, D. R. (1995): Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* to three nontarget Lepidoptera in field studies. *Environ. Entomol.*, 24: 288-297.
- Jurat-Fuentes, J. L., Gould, F. L. and Adang, M. J. (2003): Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 5898-5906.
- Kiss J., Szentkirályi F., Tóth F., Szénási Á., Kádár F., Árpás K., Szekeres D. és Edwards, C. R.: A transzgénikus *Bt*-kukorica (*MON 810*, Cry1Ab) hatása nem-célszervezet rovarokra szántóföldön (2004). 24-27. old. In *Géntechnológia harmóniában a zöld világgal*. (Dudits D. szerk.) Barabás Zoltán Biotechnológiai Egyesület Kiadványa, Szeged.
- Knowles, B. H., Thomas, W. E. and Ellar, D. J. (1984): Lectin-like binding of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* lepidopteran-specific toxin is an initial step in insecticidal action. *FEBS Lett.*, 168: 197-202.
- KöM 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről. <http://www.termeszetvedelem.hu/vedett-fajok-listaja-a-13-2001-v-9-kom-rendeletben> (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Kuiper, H. A., Davies, H. V. (2010): The SAFE FOODS risk analysis framework suitable for GMOs? A case study. *Food Control*, 21: 1662-1676.
- Kramarz, P., de Vaufléury, A., Gimbert, F., Cortet, J., Tabone, E., Andersen, M. N. and Krogh, P. H. (2009): Effects of *Bt*-maize material on the life cycle of the land snail *Cantareus aspersus*. *Appl. Soil Ecol.*, 42: 236-242.
- KvVM 18/2008 (VI. 19.) KvVM rendelet a védett és a fokozottan védett növény- és állatfajokról, a fokozottan védett barlangok köréről, valamint az Európai Közösségben természetvédelmi szempontból jelentős növény- és állatfajok közzétételéről szóló 13/2001. (V. 9.) KöM rendelet módosításáról. http://www.termeszetvedelem.hu/user/downloads/jogszabalyok/18_2008_VI19_%20KvVM%20rendelet_szoveg.pdf (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Lambert B, Buysse L, Decock C, Jansens S, Piens C, Saey B, Seurinck J, Van Audenhove K, Van Rie J, Van Vliet A, Peferoen M. (1996) A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 80-86.
- Lang, A. (2004): Monitoring the impact of *Bt* maize on butterflies in the field: estimation of required sample sizes. *Environ. Biosafety Res.*, 3: 55-66.
- Lang, A., Ludy, C. and Vojtech, E. (2004): Dispersion and deposition of *Bt* maize pollen in field margins. *J. Plant Dis. Protect.*, 11: 417-428.
- Lauber, É. and Darvas, B. (2009): Increased mortality of isolated first instar larvae of *Inachis io* (Lepidoptera). *Acta Phytopath. Entomol. Hung.*, 44: 111-117.
- Lauber É., Kincses J., Polgár A. L., Juracsek J., Székács A. és Darvas B. (2006): Az *Inachis io* és *Polygonia c-album* első stádiumú lárváinak érzékenysége Dipel-re és Cry1Ab-toxint tartalmazó GM-pollenre. *Abs. 52. Növényvédelmi Tudományos Napok* 36. old.

- Lauber É., Polgár A. L. és Darvas B. (2007): A MON 810-es kukorica pollene és a védett lepkék. 39-42. old. In Darvas B. (szerk.): *Mezőgazdasági géntechnológia – Elsőgenerációs GM-növények*. Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest.
- Lauber É., Bánáti H., Takács E. és Darvas B. (2009): Természetes eredetű proteínázgátlók hatása Cry1-fogékony és Cry1-rezisztens aszalványmolyon. *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok* 20. old.
- Lauber É., Székács A. és Darvas B. (2010a): Cry1-toxint termelő kukorica (MON 810) pollenjének hatása nappali pávaszemre (*Inachis io*). *Abs. 56. Növényvédelmi Tudományos Napok* 60. old.
- Lauber, É., Peregovits, L., Ronkay, L., Csóti, A., Székács, A. and Darvas, B. (2010b): Protected lepidopteran larvae and Cry1Ab toxin exposure by Bt-maize pollen in the Pannonian Region. *Abs. 9th European Congress of Entomology*, Budapest. Page 205-206.
- Lecadet, M. M., Frachon, E., Dumanoir, V. C., Ripouteau, H., Hamon, S., Laurent, P. and Thiéry, I. (1999): Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.*, 86: 660-672.
- Li, W., Wu, K., Wang, X., Wang, G. and Guo, Y. (2005): Impact of pollen grains from Bt transgenic corn on the growth and development of Chinese tussah silkworm, *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae). *Environ. Entomol.*, 34: 922-928.
- Lisansky, S. G., Coombs, J., Dale, T. and Frederick, R. (1997): Biopesticides – Markets, technology, registration and IPR companies. CPL Scientific Information Services Ltd., Newbury, United Kingdom. p. 1-578.
- Lisansky, S. G., Quinlan, R. J. and Tassoni, G (1993): The *Bacillus thuringiensis* handbook. CPL Scientific Information Services Ltd., Newbury, United Kingdom. p. 1-124.
- Liu, B.-L., Tzeng, J.-M. and Wei, C.-T. (2000): Recovery of solubilized δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* fermentation broth. *Pest Manag. Sci.*, 56: 448-454.
- Liu, Y.-B., Tabashnik, B., Meyer, S. K. and Crickmore, N. (2001): Cross-resistance and stability of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C in diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 3216-3219.
- Losey, J. E., Rayor, L. S. and Carter, M. E. (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399: 214.
- Magyar Országgyűlés (1996): 1996. évi LIII. törvény a természet védelméről. http://www.euvki.hu/content/docs/1996_liii_tv.pdf (lekérdezés időpontja: szeptember 18.)
- Monsanto Company (2004): Application for authorization of MON 863 x MON 810 maize in the European Union, according to Regulation (EC) No 1829/2003 on genetically modified food and feed. Part II, Summary. http://www.gmo-compass.org/pdf/regulation/maize/MON863xMON810_maize_application_food_feed.pdf (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Musser, F. R., Nyrop, J. P. and Shelton A. M. (2006): Integrating biological and chemical controls in decision making: European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) control in sweet corn as an example. *J. Econ. Entomol.*, 99: 1538-1549.
- Nagy, B. (1970): Rearing of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn) on a simplified artificial diet. *Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 2: 73-79.
- Navon, A. (1993): Control of lepidopteran pests with *Bacillus thuringiensis*. pp. 125-146. In Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. and Higgs, S. (eds) *Bacillus thuringiensis, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice*. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Nguyen, T. H. (2004): Biosafety research and monitoring methods of Bt-corn: Expression, detection and effect of recombinant Cry1Ab in heterologous expression systems. PhD Thesis, Georg August University, Göttingen, Germany.

- Nguyen, T. H., Jehle, J. A. (2007): Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON 810. *J. Plant Dis. Protect.*, 114: 82-87.
- Oberhauser, K. S., Prysby, M. D., Mattila, H. R., Stanley-Horn, D. E., Sears, M. K., Dively, G., Olson, E., Pleasants, J. M., Lam, W-K. F. and Hellmich, R. L. (2001): Temporal and spatial overlap between monarch larvae and corn pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 11913-11918.
- Ohlfest, J. R., Jesse, L. C. H., Jurenka, R. and Obrycki, J. J. (2002): Stability of insecticidal Cry1Ab protein in transgenic Bt corn pollen exposed to UV irradiation. *J. Kansas Entomol. Soc.*, 75: 48-51.
- Pap L. (1990): A zoocid rezisztencia alapjai. 177-191. oldal. In. Darvas B. (szerk.) *A növényvédelmi rovarélettan és toxikológia alapjai*. Debreceni Agrártudományi Egyetem Nyomdája, Debrecen.
- Papst, C., Utz, H. F., Melchinger, A. E., Eder, J., Magg, T., Klein, D. and Bohn, M. (2005): Mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in isogenic, Bt vs. non-Bt maize hybrids under European corn borer pressure. *Agron. J.*, 97: 219-224.
- Perry, J. N., Devos, Y., Arpaia, S., Bartsch, D., Gathmann, A., Hails, R. S., Kiss, J., Lheureux, K., Manachini, B., Mestdagh, S., Neemann, G., Ortego, F., Schiemann, J. and Sweet, J. B. (2010): A mathematical model of exposure of non-target Lepidoptera to Bt-maize pollen expressing Cry1Ab within Europe. *Proc. R. Soc. B*, 277: 1417-1425.
- Pimentel, D. S. and Raven, P. H. (2000): Bt corn pollen impacts on nontarget Lepidoptera: assessment of effects in nature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 8198-8199.
- Pleasants, J. M., Hellmich, R. L., Dively, G. P., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Mattila, H. R., Foster, J. E., Clark, P. and Jones, G. D. (2001): Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 11919-11924.
- Prasifka, P. L., Hellmich, R. L., Prasifka, J. R. and Lewis, L. C. (2007): Effects of Cry1Ab-expressing corn anthers on the movement of Monarch butterfly larvae. *Environ. Entomol.*, 36: 228-233.
- Pusztai Á. és Bardócz Zs. (2006): Genetikailag módosított élelmiszerek táplálkozási hatásai. 327-333. old. In Darvas B. és Székács A. (szerk.) *Mezőgazdasági ökotoxikológia*. L'Harmattan Kiadó, Budapest.
- Pusztai, Á., Bardócz, Zs. and Ewen, S. W. B. (2003): Genetically modified foods: Potential human health effects. Page 342-372. In D'Mello, J. P. F. (ed.) *Food Safety: Contaminants and Toxins*. CAB International. Wallingford, Oxon, UK. http://www.owenfoundation.com/Health_Science/Pusztai/GM/GMHumanHealth.html (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Ramirez-Romero, R., Desneux, N., Chaufaux, J. and Kaiser, L. (2008): Bt-maize effects on biological parameters of the non-target aphid *Sitobion avenae* (Homoptera: Aphididae) and Cry1Ab toxin detection. *Pest. Biochem. Physiol.*, 91: 110-115.
- R Development Core Team (2009): *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <http://www.r-project.org> (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- Ritchie, W. W., Hanway, J. J. and Benson, G. O. (1992) How a corn plant develops. Iowa State University of Science and Technology Cooperative Extension Service, Special Report 48. <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/library/maize/www.ag.iastate.edu/departments/agronomy/corntitle.html> (lekérdezés időpontja: 2010. november 22.)
- Robinson, C. (1997): Genetically modified foods and consumer choice. *Trends Food Sci. Technol.*, 8: 84-88.
- Roh, J. Y., Choi, J. Y., Li M.S., Jin, B. R. and Je, Y. H. (2007): *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotech.*, 17: 547-559.

- Ronkay, L. (1997): Nemzeti Biodiverzitás-monitorozó Rendszer VII. Lepkék. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest. 1-70 old.
- Rosi-Marshall, E. J., Tank, J. L., Royer, T. V., Whiles, M. R., Evans-White, Chambers, M. C., Griffiths, N. A., Pokelsek, J. and Stephen, M. L. (2007): Toxins in transgenic crop byproducts may affect headwater stream ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 104: 16204-16208.
- Sanders PR, Elswick EN, Groth ME, Ledesma BE (1995) *Evaluation of insect protected maize lines in 1994 U.S. field test locations*. Study No. 94-01-39-01, MSL-14179, an unpublished study conducted by Monsanto Company. EPA MRID No. 43665502. – <http://www.agbios.com/cstudies.php?book=FSA&ev=MON810&chapter=Expressed&lang> (lekérdezés időpontja: 2010. január 14.)
- Sayyed, A. H., Haward, R., Herrero, S., Ferré, J. and Wright, D. J. (2000): Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the Diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1509-1516.
- Sayyed, A. H., Schuler, T. H. and Wright, D. J. (2003): Inheritance of resistance to *Bt*-canola in a field-derived population of *Plutella xylostella*. *Pest Manag. Sci.*, 59: 1197-1202.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D. R. and Dean, H. D. (1998): *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 775-806.
- Stanley-Horn, D. E., Dively, G. P., Hellmich, R. L., Mattila, H. R., Sears, M. K., Rose, R., Jesse, L. C. H., Losey, J. E., Obrycki, J. J. and Lewis, L. (2001): Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in field studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98: 11931-11936.
- Szekeres, D., Kádár, F. and Kiss, J. (2006): Activity density, diversity and seasonal dynamics of ground beetles (Coleoptera: Carabidae) in Bt- (MON 810) and in isogenic maize stands. *Entomologica Fennica*, 17: 269-275.
- Székács A. és Darvas B. (2007): A MON 810-es kukorica Cry1-toxintermelése és annak tarlómaradványokon való bomlása. 27-30. old. I Darvas B. (szerk.) *Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények*. Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest.
- Székács A., Juracsek J., Polgár L. A. and Darvas B. (2005): Levels of expressed Cry1Ab toxin in genetically modified corn DK-440-BTY (YieldGard) and stubble. *FEBS Journal*, 272: Suppl. 1: 508.
- Székács, A., Lauber, É., Juracsek, J. and Darvas, B. (2010a): Cry1Ab toxin production of MON 810 transgenic maize. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29: 182-190.
- Székács, A., Lauber, É., Takács, E. and Darvas, B. (2010b): Detection of Cry1Ab toxin in the leaves of MON 810 transgenic maize. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396: 2203-2211.
- Tabashnik, B. E., Finson, N., Groeters, F. R., Moar, W. J., Johnson, M. W., Luo, K. and Adang, M. J. (1994): Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 4120-4124.
- Takács E., Lauber É., Bánáti H., Székács A. és Darvas B. (2009): *Bt*-növények a növényvédelemben. *Növényvédelem*, 45: 549-558.
- Tang J. D., Gilboa, S., Roush, R. T. and Shelton, A. M. (1997): Inheritance, stability, and lack-of-fitness costs of field-selected resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) from Florida. *J. Econ. Entomol.*, 90: 732-741.
- Tank, J. L., Rosi-Marshall, E. J., Royer, T. V., Whiles, M. R., Griffiths, N. A., Frauendorf, T. C. and Treering D. J. (2010): Occurrence of maize detritus and a transgenic insecticidal protein (Cry1Ab) within the stream network of an agricultural landscape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press)*.

- Tapp, H. and Stotzky, G. (1998): Persistence of the insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in soil. *Soil. Biol. Biochem.*, 30: 471-476.
- Tolman, T. and Lewington, R. (1997): *Butterflies of Britain and Europe*. Field Guide Series. Harper Collins Publishers, London, United Kingdom. p. 1-320.
- Tóth, F., Árpás, K., Szekeres, D., Kádár, F., Szentkirályi, F., Szénási, Á. and Kiss, J. (2004): Spider web survey or whole plant visual sampling? Impact assessment of Bt corn on non-target predatory insects with two concurrent methods. *Environ. Biosafety Res.*, 3: 225-231.
- Tschenn, J., Losey, J. E., Jesse, H., Obrycki, J. J. and Hufbauer, R. (2001): Effects of corn plants and corn pollen on Monarch butterfly (Lepidoptera: Danaidae) oviposition behaviour. *Environ. Entomol.*, 30: 495-500.
- US EPA (2001): *Bacillus thuringiensis* Plant-Incorporated Protectants. Biopesticides Registration Action Document, October 15, 2001. Environmental Protection Agency, USA. http://www.epa.gov/opppbd1/biopesticides/pips/bt_brad.htm (lekérdezés időpontja: 2011. szeptember 18.)
- USDA APHIS (1996): Monsanto Co. Addition of two genetically engineered insect resistant corn lines to determination of. Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture. *Federal Register* 61 (52): 10720 (1-83). <http://www.agbios.com/docroot/decdocs/05-242-021.pdf> (lekérdezés időpontja: 2010. január 10.)
- Varga Z. S. (2007): A Pannon Régió életföldrajzi és természetvédelmi vonatkozásai. pp. 52-54. In Darvas, B. (szerk.): *Mezőgazdasági géntechnológia – elsőgenerációs GM-növények*. Magyar Országgyűlés Mezőgazdasági Bizottsága, Budapest
- Varga Z., Ronkay L., Bálint Zs., László M. Gy. és Peregovits L. (2004): *A magyar állatvilág fajjegyzéke. 3. kötet, Nagylepkék*. Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest. 1-111 old.
- Vázquez, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., de la Riva, G. A. and López-Revilla, R. (1999): *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.*, 49: 578-584.
- Vázquez-Padrón, R. I., Gonzáles-Cabrera, J., García-Tovar, C., Neri-Bazan, L., López-Revilla, R., Hernández, M., Moreno-Fierros, L. and de la Riva, G. A. (2000a): Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp. *kurstaki* HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 271: 54-58.
- Vázquez-Padrón, R. I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazán, L., Martínez-Gil, A. F., de la Riva, G. A. and López-Revilla, R. (2000b): Characterization of the mucosal and systemic immune response induced by Cry1Ac protein from *Bacillus thuringiensis* HD 73 in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33: 147-155.
- Velimirov, A., Binter, C. and Zentek, J. (2008): Biological effects of transgenic maize NK603xMON810 fed in long term reproduction studies in mice. Forschungsberichte der Sektion IV, Band 3. Bundesministerium für Gesundheit Familie und Jugend, Vienna, Austria. p. 1-105.
- Venables, W. N. and Ripley, B. D. (2002): *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York.
- VSZT-GOSZ (2008): Kukorica Posztregisztrációs Fajtakísérletek. A Vetőmag Szövetség Szakmaközi Szervezet és Terméktanács, valamint a Gabonatermesztők Országos Szövetségének kiadványa. *Vetőmag*, 14 (1): 1-32.
- Wagner, D. L., Peacock, J. W., Carter, J. L. and Talley, S. E. (1996): Field assessment of *Bacillus thuringiensis* on nontarget Lepidoptera. *Environ. Entomol.*, 25: 1444-1454.
- Wiklund, C., Gotthard, K. and Nylin, S. (2003): Mating system and the evolution of sex-specific mortality rates in two nymphalid butterflies. *Proc. R. Soc. London*, 270: 1823-1828.

- Wraight, C. L., Zangerl, A. R., Carroll, M. J. and Berenbaum, M. R. (2000): Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7700-7703.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Gugerli, P. and Nentwig, W. (2003): Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Mol. Ecol.*, 12: 765-775.

M2. A felhasznált *ELISA* rendszerek

Az ELISA mérések menete

	EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE® Kit
0.	Cry1Ab-antitesttel bevont 96 cellás mikrotálca
1.	100 µl mintaoldat (ill. negatív kontroll vagy kalibrátor) pipettázása cellánként
2.	20-30 másodperc rázatás
3.	letakarva 15 perc inkubáció rázatva (200 rpm) szobahőmérsékleten
4.	100 µl Cry1Ab-enzimkonjugát (antiszérumperoxidáz) hozzáadása
5.	20-30 másodperc rázatás
6.	letakarva 1 óra inkubáció rázatva (200 rpm) szobahőmérsékleten
7.	átmosás 3x mosó pufferrel (PBS, pH 7,4 – Tween-20)
8.	100 µl szubsztrát (színreagens) hozzáadása
9.	20-30 másodperc rázatás
10.	letakarva 30 perc inkubáció rázatva (200 rpm) szobahőmérsékleten
→	színintenzitás leolvasása 650 nm-en
11.	100 µl stop oldat hozzáadása
→	színintenzitás leolvasása 450 nm-en

	Abraxis Bt Cry1Ab/Cry1Ac ELISA Kit
0.	monoklonális Cry1Ab-/Cry1Ac-antitesttel bevont 96 cellás mikrotálca
1.	100 µl mintaoldat (ill. negatív kontroll vagy kalibrátor) pipettázása cellánként
2.	20-30 másodperc rázatás
3.	letakarva 30 perc inkubáció szobahőmérsékleten
4.	átmosás 3x mosó pufferrel
5.	100 µl Cry1Ab-/Cry1Ac-antitest oldat hozzáadása (poliklonális nyúl)
6.	20-30 másodperc rázatás
7.	letakarva 30 perc inkubáció szobahőmérsékleten
8.	átmosás 3x mosó pufferrel
9.	100 µl enzimkonjugát hozzáadása (anti-nyúl IgG-peroxidáz konjugátum)
10.	20-30 másodperc rázatás
11.	letakarva 30 perc inkubáció szobahőmérsékleten
12.	átmosás 3x mosó pufferrel
13.	100 µl szubsztrát (színreagens) hozzáadása
14.	letakarva 20 perc inkubáció szobahőmérsékleten
15.	20-30 másodperc rázatás
→	színintenzitás leolvasása 650 nm-en
16.	50 µl stop oldat hozzáadása
→	színintenzitás leolvasása 450 nm-en

Kalibráló oldatok

EnviroLogix Cry1Ab/Cry1Ac QUANTIPLATE® Kit kalibrátorok
negatív kontroll
0,5 ng/ml
2,5 ng/ml
5,0 ng/ml

Abraxis Bt Cry1Ab/Cry1Ac ELISA Kit kalibrátorok
0,00 ng/ml
0,25 ng/ml
0,50 ng/ml
1,00 ng/ml
2,00 ng/ml
4,00 ng/ml

M3. A *Nymphalis io* lárvájának stádiumonkénti morfológiai jellemzői

Stádium	Lárva hossza [mm]	Fejtök szélessége [mm]	Lárva tömege [mg]	Kutikula színe	Szőrök a testen
L1	1,5-3,0	~ 0,3	~0,06-0,60	kelés után sárgászöld; vedlés előtt tori részen barnás, potrohi végen sárgás	egyszerű, fekete
L2	3,0-5,0	~ 0,6	~0,50-3,50	középbarna test, enyhe pettyezettséggel, drapp márványozottsággal	egyszerű, fekete
L3	5,0-10,0	~ 1,0	~3,00-35,00	vedlés után szürke, halvány fehér pettyezettséggel; vedlés előtt szürkés sötétbarna	fekete, kúp alakú tengelyen vékony oldalszálakkal
L4	10,0-20,0	~ 1,7	~25,00-250,00	bársonyos fekete, fehér pettyezettséggel	fekete, kúp alakú tengelyen hosszabb, szintén kúp alapú és rövidebb, vékony oldalszőrökkel; a főtengely csúcsa rozsdabarna
L5	20,0-30,0	~ 2,6	~200,00-550,00	bársonyos fekete, erős fehér pettyezettséggel	fekete, kúp alakú tengelyen hosszabb, szintén kúp alapú és rövidebb, vékony oldalszőrökkel; a főtengely csúcsa rozsdabarna



24. ábra: Nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) első stádiumú lárvái

Fotó: Lauber Éva



25. ábra: Nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) második stádiumú lárvái

Fotó: Lauber Éva



26. ábra: Nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) harmadik stádiumú lárvái

Fotó: Lauber Éva



27. ábra: Nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) negyedik stádiumú lárvái

Fotó: Lauber Éva



28. ábra: Nappali pávaszem (*Nymphalis io* L.) ötödik stádiumú lárvája

Fotó: Lauber Éva

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mindenekelőtt köszönettel tartozom témavezetőmnek, Darvas Bélának, aki a *MON 810* kukoricával végzett kísérletes munkákat az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet Ökotoxikológiai és Környezetanalitikai Osztályán irányította.

Köszönet illeti Polgár A. Lászlót és Fónagy Adrient, akik a szabadföldi táblák agrotechnikai munkáit szervezték; Nádasdi Józsefet, aki az ezzel kapcsolatos fizikai munkát végezte. Köszönöm Székács Andrásnak, hogy az *ELISA* mérésekkel kapcsolatos munkába bekapcsolódhattam. Köszönöm Juracsek Juditnak és Takács Eszternek a méréseket. Hálás vagyok Peregovits Lászlónak és Ronkay Lászlónak (Magyar Természettudományi Múzeum Állattára, Lepkegyűjtemény), továbbá Csóti Attilának (Budapesti Corvinus Egyetem) a védett lepkék érintettségének korábbi vizsgálataért, ami az e területen végzett revíziós munkám megalapozta. A pollenszóródási munkák megalapozásáért Darvas Bélának és Csóti Attilának tartozom köszönettel. A védett lepkehernyókon végzett munkák korai részéért Darvas Bélának és Kincses Juditnak vagyok hálás. A statisztikai kiértékeléseket Harnos Andrea (Szent István Egyetem, Állatorvostudományi Kar, Biomatematikai és Számítástechnikai Tanszék) és Darvas Béla végezte, amiért úgyszintén köszönettel tartozom. Vajdics Gyöngyi, Kugler Nikolett és Nádasdi József a tenyészetek fenntartásáért érdemelnek tőlem köszönetet.

A PhD dolgozatomban foglalt munkát kezdetekben az Oktatási Minisztérium (OMFB pályázati rendszer) támogatta, míg a további anyagi támogatásért a Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztériumot (megkülönböztetetten Rodics Katalint) illeti köszönet.