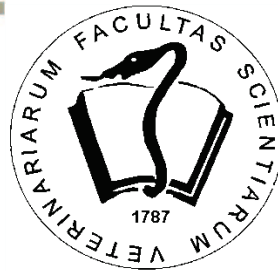
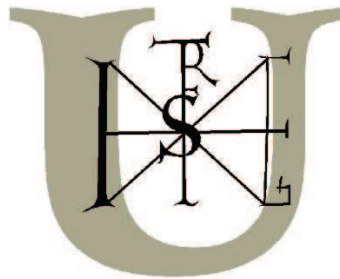


Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar
Biológiai Intézet



Cím

**Növekedésvizsgálatok a *Folsomia candida* (Collembola) fajon és a
növekedésvizsgálatok módszertanának fejlesztése**

Készítette: Szabó Borbála
Biológus MSc

Témavezetők:

Bakonyi Gábor, egyetemi tanár
SZIE MKK, Állattani és Állatökológiai Tanszék

Dombos Miklós, tudományos főmunkatárs
MTA ATK TAKI, Környezetinformatikai Osztály

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	1
2. Anyag és módszer.....	5
2.1 A <i>Folsomia candida</i> , mint modell szervezet.....	5
2.2 A Trebon 10 F növényvédő szer.....	6
2.3 Vizsgálat Trebon növényvédő szerrel.....	7
2.3.1 Statisztikai módszerek.....	9
2.4 Vizsgálat MON810-es kukorica vonallal.....	11
2.4.1 Statisztikai módszerek.....	11
2.5 CollScope módszertani fejlesztése.....	12
3. Eredmények.....	15
3.1 Növekedésvizsgálat Trebon növényvédő szerrel.....	15
3.2 A MON810-es kukorica vonallal végzett vizsgálatok eredményei.....	22
3.3 A CollScope módszertani fejlesztésének eredményei.....	28
3.3.1 A CollScope protokoll.....	31
4. Diskusszió.....	35
4.1 A Trebon növényvédő szerrel végzett kísérlet diskussziója.....	35
4.2 A MON810-es kukorica fajtával végzett kísérlet eredményeinek diskussziója.....	37
4.3 A CollScope módszertani fejlesztésének diskussziója.....	39
5. Köszönetnyilvánítás.....	39
6. Összefoglaló.....	40
7. Summary.....	41
8. Irodalomjegyzék.....	43
9. Nyilatkozatok.....	49

1.Bevezetés

A népesség növekedésével az emberiség mindig fejlettebb és fejlettebb mezőgazdasági módszereket talált fel, hogy növelje a termelékenységet. Így megjelentek a növényvédő szerek, melyekkel a kártevők által okozott terméscsökkenést kívánták megelőzni. A szerek kifejlesztésének kezdeti szakaszában azonban még nem látták előre a nem-célszervezetekre gyakorolt hatásokat. Ilyen ismert példa, hogy a DDT elvékonyítja a madarak tojáshéját, illetve felhalmozódik a táplálékláncban (WALKER et. al, 2006). A benthocarb, chlorpyrifos, methyl parathion, permethrin, fenvalerate és AC 222,705 vízi élőlényekre gyakorolt erős hatását is kimutatták, melyből az utolsó három szintetikus piretroid (SCHIMMEL et al , 1983). Ismert az alanycarb, az organophosphate, a isoxathion és primiphose-methyl által okozott igen magas mortalitás a parazitoid szervezeteknél (MAFI - OHBAYASHI, 2006). Az előzőekben csak néhány, különböző csoportokon talált mellékhatást mutattam be példaképpen. Részletes adatok DARVAS-SZÉKÁCS (2010) könyvében található.

A növényvédő szerek engedélyezési eljárása nem terjedhet ki minden fajra, ennek kivitelezése lehetetlen, de nagyszámú élőlényen sem tesztelhetik azokat, hiszen akkor előállításuk és használatuk megfizethetetlenül drága lenne. Az engedélyezési eljárás során maradt hiányokat későbbi eredményekkel pótolják a kutatók, illetve a gyakorlati tapasztalatok alapján döntenek a szerek további használatáról.

Az ugróvillások (Collembola) fajai világszerte elterjedtek. Az óceánok és a tengerek nyílt vizein kívül mindenütt előfordulnak. Fontos tagjai a lebontó közösségeknek (HOPKIN, 1997, DÁNYI-TRASER, 2008), illetve fontos szerepet játszanak egyes talajok szerkezetének kialakításában (HOPKIN, 1997). Fontos táplálékai továbbá a talajlakó ragadozóknak, terjesztik a mikorrhiza gombákat, illetve szabályozzák azok szaporulatát (DÁNYI-TRASER 2008). Az ugróvillások jellemzése HOPKIN (1997) könyvében részletesen olvasható. Ez a csoport nem szerepel a növényvédő szerek engedélyezési procedúrájában (DARVAS-SZÉKÁCS 2010). Mint nem célszervezeteket, és a talaj életében jelentős állatcsoportot érdemes górcső alá venni ezeket ökotoxikológia szempontból is.

A Trebon 10 F növényvédő szer egy általánosan használt inszekticid, melyet széles körben alkalmaznak a gyakori kártevők, például tetvek, molyok ellen. Használatos gyümölcsösökben, út menti fákban, búzán és kukoricán. Az utóbbi két növényfaj jelentős részét teszi ki a magyar mezőgazdasági termelésnek. A szer használata 2019-ig engedélyezett az Európai Unióban

(MITSUI CHEMICALS). Mindezekért érdemes megvizsgálni a szer hatását ugróvillásokon is.

A MON810 a Monsanto cég által előállított genetikailag módosított kukorica vonal (*Zea mays*) mely a *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* baktérium Cry1Ab toxinját termeli. A kukoricamoly (*Ostrina nubilalis*) és a mediterrán kukoricamoly (*Sesamia nonagroides*) kukorica kártevőkkel fertőzött területeken ajánlják termesztését. A Cry1Ab toxin a Lepidoptera rend tagjainak a középbelében kation-szelektív ioncsatornákat formáz, mely felborítja a sejt ionegyensúlyát és ozmotikus lízishez vezet (ARONSON – SHAI, 2001).

A MON810 Bt-toxin termelő kukorica-fajta, melyet Magyarországgal határos országokban, Csehországban, Szlovákiában, Romániában már termesztenek, így az átkerülő pollen miatt termesztésük potenciális hatást jelenthet egyes területeken a hazai kukoricaföldeken. Az Európai Unió 2013-as határozata értelmében továbbra is termesztendő az Unió területén (EFSA, 2013).

Sok esetben nem találtak a Bt-toxint termelő kukorica által kiváltott káros hatást a talajállatokra. Például DE VAUFLEURY et al. (2007) nem találtak különbséget a mikroarthropoda közösségek közt egy Bt termelő (MEB307) és közel-izogénes kukorica vonala között, és a *Helix aspersa* (Gastropoda) fajon sem mutattak ki káros hatást. Az *Eisenia fetida* (Lumbricidae) esetén sem találtak eltérést a Bt-termelő (GTK19, Cry1Ac) és a közel-izogénes vonal hatásai között (LIU et al, 2009). GRIFFITH et al. (2006) sem talált a MON 810 esetén eltérést a mikroarthropoda közösségben üvegházi kísérletekben, ahol természetes talaj volt. A *Protaphura armata* ugróvillás esetén nem találtak különbséget a Bt-toxint termelő és több közel-izogénes kukorica vonal között (HECKMANN et. al, 2006).

A pollen terjedése miatti gészölkést repcénél már kimutatták (DAMGAARD-KJELLSSON, 2005). Bár a Bt-termelő növények nagy előnyének tartják, hogy nem igényelnek növényvédő szer kiszórást, ezáltal megkímélik a nem-célszervezeteket (LU et al, 2012), azonban DUTTON et al (2002) kimutatták, hogy a *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae) ragadozó fajra, a Bt-termelő kukoricát fogyasztó *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) fogyasztása káros lehet. A *Chrysoperla carnea* bizonyos lárvastádiumainak túlélése és tömege lecsökkent, ha a Bt-fogyasztó *Spodoptera littoralis* lárván nevelték, ahhoz képest, ha Bt-t nem tartalmazó kukoricát fogyasztó lárvát adtak neki. Ugyanezt az összefüggést ugyanezekben a fajokon és az *Ostrinia nubilalis* prédánál is sikerült igazolni (HILBECK et al, 1998).

Több vizsgálat is kimutatta, hogy a Cry1Ab protein, melyet a MON810 is termel hosszú ideig perzisztens a talajban (BAUMGARTE-TEBBE, 2005), akár 4 évig is kimutatható

(ICOZ et al, 2008). Ezen túl vizsgálatok mutatták, hogy a talajba kerülő Cry1Ab toxin megváltoztatja a mikroorganizmus-közösség összetételét (ICOZ et al, 2008). Bár SAXENA-STOTZKY (2001a) vizsgálata kimutatta, hogy a gyökér kiválasztja a toxint, de a vizsgálatuk nem mutatott ki hatást a mikroorganizmus-közösségre, a *Lumbricus terrestris* fajra és a fonálférgekre (Nematoda). Ugyanakkor STOTZKY (2004) kimutatta, hogy egy Bt-toxint termelő burgonya (Cry3A), és egy Bt-toxint termelő rizs (Cry1Ab) gyökere is kiválasztja a toxint. Ez a vizsgálat sem talált szignifikáns hatást a mikroorganizmus-közösségre, a *Lumbricus terrestris* fajra és a fonálférgekre (Nematoda). Egy MON810 vonalat megvizsgálva azonban kimutatták, hogy a Bt-toxint termelő kukorica gyökérszónájában kisebb az összes mikroarthropoda denzitás, mint a közel-izogénes vonal gyökérszónájában (CORTET et. al, 2007). CLARK-COATS (2006) nem mutattak ki káros hatást az *Eisenia fetida* faj esetén, viszont a *Folsomia candida* fajnak kisebb lett a reprodukciója a Bt-vonal, mint a közel-izogénes fogyasztása esetén. A kevés, és részben egymásnak ellentmondó eredmények miatt a MON810 hatásait érdemes az engedélyezésen kívüli, további vizsgálatokkal is megerősíteni.

A peszticideknek gyakran vannak nem kívánt hatásai a nem célszervezetekre. A hatások lehetnek akutak és krónikusak is. Az akut toxicitás általában egyszeri meghatározott idejű kitettség következménye, mely általában a szervezet pusztulásával, vagy szubletális hatásokkal jár. Különösen veszélyeztetettek a vízi szervezetek és a beporzó rovarok, de ártalmas lehet az ökoszisztémákra azáltal is, hogy egyes ragadozó fajok között okoz pusztulást (DARVAS-SZÉKÁCS 2010).

A krónikus toxicitás alatt hosszú idejű kitettség melletti hatásokat értjük. Gyakran szubletális formában jelennek meg. Krónikus hatás sokféle lehet. Okozhat a peszticid mutációt, akár a DNS károsításán keresztül vagy lehetnek teratogén hatásai, esetleg a hormonháztartást boríthatja fel, de tönkretelheti vagy megzavarhatja az immunrendszert, idegméregként viselkedhet, és szaporodásbiológiai zavarokat is okozhat. Az utóbbit előidézhetheti akár a gametogenezis, akár az embriogenezis gátlásával/zavarásával (DARVAS-SZÉKÁCS 2010).

Az irodalomban több példát találunk szubletális hatások vizsgálatára. Az ugróvillásoknál a szubletális hatások vizsgálatokor általában a növekedést és a reprodukciós sikert vizsgálják (FOUNTAIN-HOPKIN, 2001, SCOTT-FORDSMAND et al, 1999; BUR et al, 2010; NURSITA et al., 2005; STAEMPFLI et al, 2007; CROUAU-MOIA, 2006; FOLKER-HANSEN et al., 1996), de előfordulhat, hogy más végpontot választanak, például a különböző lipid és fehérjék arányát (STAEMPFLI et al, 2007).

A növekedés-vizsgálatok fontosságára hívja fel a figyelmet SCOTT-FORDSMAND et al., (1999) munkája, melyben a nikkelnak való kitétség csökkentette a *Folsomia fimetaria* (Collembola) faj juvenilis egyedeinek méretét körülbelül 10%-kal. A *Proisotoma minuta* (Collembola) fajról megállapították (NURSITA et al., 2005), hogy nehézfém szennyezés (Cd, Zn, Pb, Cu) esetén az egyedek mérete szignifikánsan csökkent. *Folsomia fimetaria* (Collembola) fajon kimutatták (FOLKER-HANSEN et al., 1996), hogy a dimethoate inszekticid csökkentette az állatok hosszát, viszont a *Folsomia candida* (Collembola) fajon a reprodukció csökkenését és a növekedés enyhe stimulálását tapasztalták dinoseb inszekticid kezelés hatására (STAEMPFLI et al, 2007).

A növekedés-vizsgálatok kivitelezése lassú és igen sok munkát igényel. Ezt sokszor egyszerű mikroszkópra csatlakoztatható mikrométerrel végzik el (TRANVIK et al, 1997; STAEMPFLI et al, 2007). Ennél a módszernél gyorsabb és általánosabban elterjedt FOLKER-HANSEN (1996) módszere, melyben az állatokat digitális fényképező géppel lefényképezik, és képelemző szoftverrel lemérik az állatok hosszát (SMIT-VAN GESTEL, 1997; SCOTT-FORDSMAND et al, 1999; FOUNTAIN-HOPKIN, 2001; NURSITA et al., 2005; CROUAU-MOIA, 2006; BUR et al, 2010). Ennél a módszernél minden képpel egyesével kell foglalkozni, mely elég időigényes feladat.

A generációkon átívelő hatás jelentős tényező, hiszen ha több generáció fitnessét is rontjuk letális vagy szubletális hatásokkal, akkor az egyszeri szennyezésnél súlyosabb károkat okozhatunk a nem célfajok populációiban. Megfigyelték állatoknál és növényeknél is, hogy a szülőktől érkező hatások befolyásolhatják az utódok fejlődését (MOUSSEAU-FOX, 1998).

A generációkon átívelő hatásokra az ugróvillások körében bizonyíték HAFER et al. (2011) cikke, melyben a táplálék-elérhetőség hatásait vizsgálták három generáción keresztül *Folsomia candida* fajon. Kimutatták, hogy anyai és nagyanyai hatások is befolyásolják az életmenet stratégiát. Hasonló eredményt kapott CAMPICHE et al. (2007) is. Növekedésgátló inszekticidekkel (methoprene, fenoxycarb, teflobenzuron, precocene II) kezelték *Folsomia candida* faj egyedeit és kimutatták, hogy szignifikáns növekedés van a mortalitásban, illetve csökkenés az utódok számában, amennyiben teflubenzuronnal vagy methoprene-nel kezelték őket. Rezisztencia alakult ki az *Orchesella cincta* ugróvillás faj esetében a kadmiummal szemben (STERENBORG-ROELOFS, 2003).

A piretroidok, ahová a Trebon is tartozik, a rovarok idegsejtjein az ioncsatornákat blokkolják. Ezért a vizsgálatom hipotézise az volt, hogy a *Folsomia candida* túlélése, reprodukciós sikere, növekedése és táplálékválasztási sikere jelentősen csökken piretroidok

jelenlétében, mivel az ugróvillások közeli rokonai a rovaroknak (TIMMERNMANS et al. 2008).

Céljaim a következők voltak:

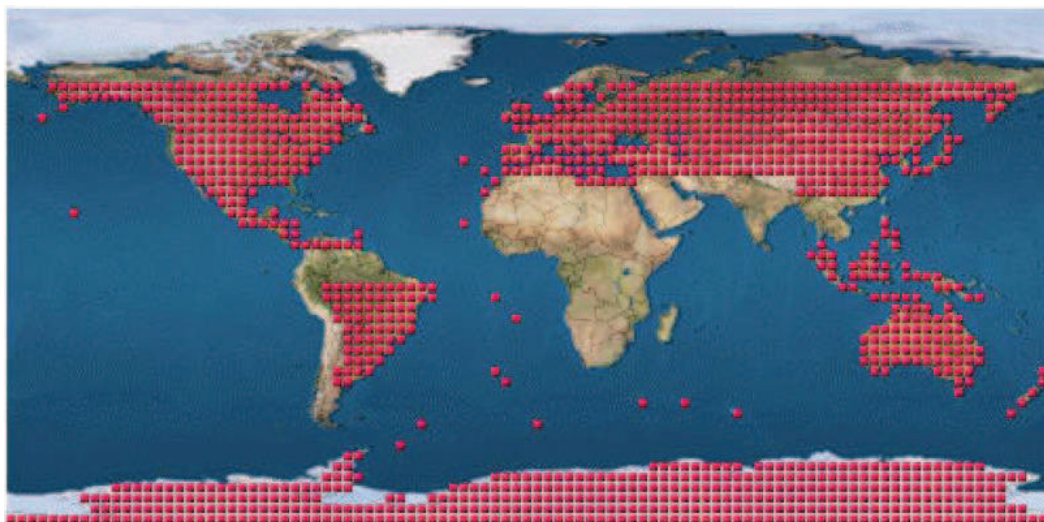
- Meg kívántam vizsgálni, hogy a Trebon 10 F (MITSUI CHEMICALS) nevű növényvédő szer okoz-e dózis-függő, illetve generációkon átívelő hatásokat a *Folsomia candida* Willem 1902 (Hexapoda, Collembola, Isotomidae) ugróvillás faj laboratóriumi populációin.
- Vizsgálni kívántam továbbá, hogy a MON810 genetikailag módosított kukorica fajta (Monsanto) hosszú távú fogyasztása okoz-e populációbiológiai változásokat a *F. candida* ugróvillás faj laboratóriumi populációin.
- Célom volt egy, a *F. candida* ugróvillás faj növekedés-vizsgálatát egyszerűbbé és gyorsabbá tevő módszer kifejlesztése.

2. Anyag és módszer

2.1 A *Folsomia candida* mint modell szervezet

Modell állatnak a *Folsomia candida* Willem 1902 (Collembola) fajt választottam, mivel széles körben elterjedt a Föld szervesanyagban gazdag talajaiban (**1. ábra**, KROGH, 2008). Fontos szerepet tölt be sok életközösségben, a talajok anyagforgalmában. A laboratóriumi tenyészet könnyen fenntartható, amiatt hogy szűznemzéssel szaporodik (ennek oka a *Wollbachia* baktérium fertőzés) (FOUNTAIN-HOPKIN, 2005). A szennyező anyagokat felveheti a kültakarón (epidermisz), a hasi tömlőn (ventrális tubulus) és a táplálékon keresztül (FOUNTAIN-HOPKIN, 2001).

A törzstenyészet a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszék laboratóriumából származott. A tenyészetet 9 cm átmérőjű és 1,5 cm magasságú Petri csészében tartottam. A csésze alján aktív szénrel kevert gipsz (20 g aktív szén, 200 g gipsszel keverve és 200 ml vízzel hígítva) kb. 1 cm magasságig volt elhelyezve (GOTO 1960). A tenyészetet instant szárított élesztővel tápláltuk hetente egyszer. A tenyészeteket $20 \pm 0,2$ °C-on, termosztátban tartottuk.



1.ábra: a *F. candida* elterjedése a Földön (KROGH, 2008)

2.2 A Trebon 10 F növényvédő szer

A Trebon 10 F növényvédő szer, használata 2019-ig engedélyezett Európában. Széles körben használt növényvédő szer. Használják gyümölcsösök, kalászosok, kukorica és út menti fák növényvédelmére. Inszekticid, melynek hatóanyaga az etofenprox. Ez a vegyület egy piretroid, ami állandó testhőmérsékletű állatokban gyorsan bomlik, UV érzékeny (DARVAS-SZÉKÁCS, 2006, LEHEL-LACZAY, 2011). Hatását az axonikus idegvégződések Cl⁻ ioncsatornáin fejt ki, tartós ingerületet létrehozva (FAO 2007). Tárolhatósága kiváló, mivel 0 °C±2°C hőmérsékleten 7 napig tárolva semmilyen ülepedés vagy olajos kiválás nem tapasztalható, és 54°C±2°C hőmérsékleten 14 napig tárolva 5%-nál kevesebb hatóanyag veszteséget tapasztaltak (FAO 2007). A következő kártevők ellen ajánlott: *Nilaparvata lugens*, *Laodelphax striatellus*, *Nephotettix nigropictus*, *Cnaphalocrosis medinalis*, *Lissorhoptrus oryzophilus*, *Leptocorisa* sp., *Pieris rapae*, *Myzus persicae*, *Bermista tabici*, *Thrips tabici*, *Phyllocnistis citrella*, *Psylla pyrisuga*, *Cydia pomonella*, *Grapholita molesta*, *Empoasca* sp., *Aphis gossypii*, *Eurvoaster* sp., *Scirtotrips dorsalis*, *Empoasca onukii*, *Lymantria dispar*. A talaj mély rétegeibe nem mosódik le. A vízi élőlényekre erősen mérgező. Bomlási félideje 1-3 hét, aerob talajban. Az élelmezés-egészségügyi várakozási idők (PHI= Pre-harvest intervall) az **1. táblázat**ban láthatók (MITSUI CHEMICALS).

1. táblázat: A Trebon 10F egészségügyi várakozási ideje, napokban

Növény	PHI (nap)	Növény	PHI (nap)
Rizs	21	Paprika	1
Gabonafélék	14	Paradicsom	1
Kukorica	7	Uborka	1
Krumpli	7	Dinnye	3
Szója	14	Káposzta	3
Borsó	1	Retek	21
Cékla	14	Saláta	14
Citrusfélék	14	Dohány	-
Tea	21	Dísznövények	-
Padlizsán	1		

A Trebon felhasználási javaslata a szer dobozán feltüntetett adatok alapján a **2. táblázatban** található. Ezek alapján választottam ki a később használt alapkonzentrációt, mely a gyümölcsökön és a fákon használt koncentrációval esett egybe.

2. táblázat: A Trebon 10F szántóföldi kiszórási koncentrációi a szer dobozán megadott információk szerint

Növény	Vízmenyiség	Trebon mennyiség
Alma	700-1000 l	0,5-1 l/ha
Szőlő	1000 l	0,5-1 l/ha
Kalászosok	300-400 l	1 l/ha
Út menti fák	700-1000 l	0,5-1 l/ha
Díszfák, erdő	600-1000 l	0,5-1 l/ha
Kukorica	400-600 l	0,5 l/ha

2.3 Vizsgálat Trebon növényvédő szerrel

A gyümölcsösöknél használt átlagos koncentrációval, 1 l/ha (**2. táblázat**), a tizedével és a tízszeresével egy szülő-utód generációra kiterjedő növekedésvizsgálatot végeztem, melyben a reprodukciós paramétereket is vizsgáltam.

A növekedésvizsgálat során 12-14 napos állatokat aktívszenes gipsszel kiöntött Petri csészékbe helyeztem, melyet Trebon oldattal itattam át.

Egy Petri csészébe egy állat került. Mindegyik Petri csésze kapott egy egyedi azonosítót. Koncentrációnként 15-15 állatot használtam.

Az állatokat hetente kétszer sztereomikroszkóppal vizsgáltam (Olympus SZH10) és mikroszkópra csatlakoztatható Olympus C7070 widezoom fényképezőgéppel és Olympus C5060 ADL optikával lefényképeztem. Két testméretet vettem fel. A fej csápok közötti részétől (homlok) az utolsó potrohszelvény végéig mértem meg minden állat hosszát (1), illetve a test szélességét az első potrohszelvény szélességével (2) jellemeztem. A mérési pontok az **2. ábrán** láthatóak. Két egymást követő fényképet készítettem, hogy az esetleges mozgások, nézetbeli különbségek miatti pontatlanságot csökkentsem. A két mérés átlagát tekintettem az állat hosszának, illetve szélességének. Az adatokat ImageJ (ABRÀMOFF et al., 2004) programmal elemeztem. A méréseket 20 napig végeztem, hetente kétszer, tehát a kísérlet végén az állatok 32-34 naposak voltak.



2. ábra: A növekedés-vizsgálat mérési pontjai. A piros vonalak jelölik az állaton mért hosszúság és szélesség helyét, míg a fekete vonalak a pete mért átmérőit jelzik.

Közben folyamatosan figyeltem, hogy vannak-e petecsomók, melyeket egy nedves ecsettel finoman szétterítettem és a korábbi mikroszkóppal és fényképezőgéppel lefényképeztem. A képen lévő peték számát folyamatosan feljegyeztem, illetve a 29. napon fényképezett petéknek a méretét is megmértem. A képeken minden petének adtam egy számot, majd Excel programmal VÉL függvénnyel mindegyik mellé generáltam egy random számot. A tíz legkisebb számot kapó petét mértem minden Petri csészéből. A méréseket ImageJ nevű ingyenes szoftverrel (ABRÀMOFF et al., 2004) végeztem. A pete legnagyobb és legkisebb, egymásra merőleges átmérőjét mértem meg. A mérési pontok az **2. ábrán** láthatóak. Ezen kívül az utódok számát is folyamatosan feljegyeztem. A mérések utolsó napja a 36. nap volt.

A kezelt csoportok kikelő utódait kettéosztottam egy kezelt és egy nem kezelt csoportra. A kezelt csoport tagjai 10-12 naposan (mivel ekkor lehet őket biztonságosan, sérülések nélkül áthelyezni) Trebon oldattal átítatott Petri csészére kerültek, a nem kezelt csoport pedig vízzel átítatott Petri csészébe került. Az utódokon is elvégeztem a hossz- és szélességméréseket hetente kétszer, húsz napig.

Mivel a kontrollcsoport kb. egy héttel korábban rakott petét a kezelt csoportoknál, ezért az utódjainak növekedésvizsgálatát is egy héttel korábban kezdtem, hogy tarthassam a 10-12 napos kezdő kort.

2.3.1 Statisztikai módszerek

Az eredményeket R statisztikai programmal (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012) elemeztem. Első lépésben a koncentrációk értékeit tízes alapú logaritmus skálára helyeztem, hogy kevesebb összehasonlítás kerüljön a modellekbe. Ezzel a módszerrel nem kaptam meg minden koncentrációra külön-külön a p-értéket és becsléseket, hanem a koncentráció növekedésének hatására kaptam egy p-értéket és egy becslést arra, hogy ez milyen irányba és mennyivel változtatja meg a növekedést. Ezzel a módszerrel arra vonatkozóan kaptam egy statisztikai becslést, hogy a tizedére csökkentett, vagy tízszeresére növelt koncentráció szignifikánsan megváltoztatja-e a növekedést.

Az adatokat nem lineáris kevert modellel elemeztem, nlme csomaggal (PINHERO et al, 2013). Ebben az adatokat a groupedData paranccsal az egyedi azonosítók szerint fűztem egybe, így az egymás után következő növekedési adatok egymás mögé kerültek. Ezután egy lineáris modellt illesztettem az adattáblára. Elemeztem az állat hosszúság és szélesség növekedésgörbéjének koncentráció függését és a hosszúság-szélesség arányának változását a koncentráció függvényében, illetve a peteszám és az utódszám hatását az előbbi paraméterekre. Az ábrákat Excel programmal készítettem, mivel az R-ben nem találtam olyan módot, amivel az általánosan elfogadott ábratípust el lehet készíteni.

A növekedésgörbék különbségei, illetve az hogy egy csoport gyorsabban nő, mint a másik, azt jelenti, hogy a nem lineáris kevert modellben az állatok átlagosan nagyobbak voltak a megadott napokon, mint a másik csoport. Ez nem jelenti azt, hogy az adott csoportban az állatok a kísérlet végén is nagyobbak voltak, a növekedésnek azt a részét, hogy ki nőtt többet az egy napra levetített növekedés és az abszolút növekedés írja le.

Elvégeztem a napokra levetített növekedésvizsgálatát is a következő módon:

$$m = (h_2 - h_1)/t$$

ahol r_n : az egy napra jutó növekedés mértéke, h_2 : az utolsó alkalommal mért hossz, h_1 : az első alkalommal mért hossz, t : két mérés között eltelt napok száma.

Ezeknek az értékeknek a koncentrációfüggését általános lineáris modellel elemeztem. Az elemzést elvégeztem minden kezelés esetében.

Ezen kívül ellenőriztem egy általános lineáris modellel, hogy van-e különbség a különböző koncentrációk egyedeinek hosszúsága között a kísérlet első napján és az utolsón.

Elemeztem a peteszám és az utódszám koncentrációfüggését általános lineáris modellel, valamint a peteméret és a petealak koncentrációfüggését kevert modellel.

A pete átmérőket úgy transzformáltam, hogy a két átmérőt összeszoroztam, majd gyököt vontam belőle. Ennek az az értelme, hogy az új adat olyan, mintha a peték tökéletesen kerek lennének. Ebben a módszerben mindkét adat szerepel, szemben azzal a módszerrel, mintha csak a nagyobb átmérőt használnánk. Ha kerekre transzformáljuk a petét, akkor ennek ez az értéke a transzformált átmérő (TA).

A transzformált átmérő (TA) tesztelésénél a modellben a koncentráció hatását teszteltem. Mivel egy Petri csészéből 10 petét mértem le, ezért feltételeztem, hogy az adatok nem függetlenek. A függetlenség problémájának kiküszöbölésére kevert modellt használtam fix és random hatásokkal. Az egyedek azonosítóját használtam random hatásnak, mert ez mutatja meg, hogy azonos Petri csészéből származnak a peték. A random hatás modell megmondja, hogy a különböző forrásokból mennyi variancia származik. A modell kiszámolja a standard deviációt, a random hatást adó csoporton belül és a teljes mintában. Amennyiben a két deviáció nem tér el jelentősen, akkor az adatok függetlenek tekinthetők.

A peteátmérők aránya esetében a modellben szintén a koncentráció hatását teszteltem. Ezen esetben is az egyedek azonosítóját használtam random hatásnak.

Ellenőriztem, hogy a peteátmérők aránya függ-e a kísérletben használt koncentrációktól, vagy csak a peteátmérőtől. Tudjuk, hogy ha fejlettebb az embrió, kevésbé gömb alakú a pete (HOPKIN 1997), így ettől a hatástól mindenképpen függ a peteátmérők aránya. Ezt szintén random hatás modellel elemeztem, a koncentráció függvényében. Ezzel megkaphatjuk, hogy van-e valamilyen torzító hatása a szernek az átmérők arányára.

Az első peterakás időpontját ANOVA-val hasonlítottam össze.

Az utód generáció adatait külön elemeztem aszerint, hogy kaptak-e kezelést vagy sem, egyébként minden a szülő generációnál leírt módon történt.

2.4 Vizsgálat MON810-es kukorica vonallal

Az általános gyakorlat helyett nem egyszeres, hanem kétszeres szinkronizációt alkalmaztunk a kísérlet során. Ennek kezeletlen állatok estén az az előnye, hogy nem csak az egyedek egykorúak, hanem a szüleik is. Kezelt állatok esetén még inkább kihozza a különbségeket, mint például a peterakás idejében való eltolódást. A kísérletet 10-12 napos *F. candida* állatokkal végeztem.

A kísérletben négy csoport volt. Olyan állatok, amelyek már öt éve (2009 óta) MON810 kukoricát fogyasztanak (levéldarálék ad libitum, egy szem élesztővel) (BtBt), olyan állatok, melyek a MON810 kukoricát fogyasztottak öt évig, de a kísérletben az izogénes változatot (levéldarálék ad libitum, egy szem élesztővel) kapták (BtIzo). Olyan csoport melyek eddig izogénes kukoricát fogyasztottak, de a kísérletben MON810 kukoricát kaptak (IzoBt), illetve egy kontroll csoport, amely eddig közel-izogénes kukoricát fogyasztott, és a kísérlet alatt is azt kapott (IzoIzo). Minden csoportban a kísérlet elején 50 állatot állítottunk be, melyeket egyedileg tartottunk műanyag edényben (5 cm magas, 5,3 cm alapátmérő és 6,6 cm felső átmérő). Az edényekben a gipszet 2 cm magasságig öntöttük. A gipsz tetejét ledörzsöltük, hogy az esetlegesen kialakult buborékok által nyújtott bűvőhelyeket megszüntessük. Az állatokat egyedileg tartottuk.

Az állatokat hetente kétszer, összesen 9 alkalommal mértem 29 napig. Az állatokon ugyanazokat a paramétereket mértem meg, mint a Trebon növényvédő szeres vizsgálatnál. Az állatoktól a petecsomókat, minden petézésnél átraktuk egy gipszes Petri csészére és finoman szétterítve a petéket lefényképeztük őket az előzőekben ismertetett módszerrel. Az első petecsomóból, minden egyes állat esetében, random kiválasztottam egy petét a korábban leírt módszerrel és megmértem a két átmérőjét, majd a modellben a transzformált átmérőt használtam (TA). A peteszámokat és a peterakások időpontját folyamatosan feljegyeztem. A kísérlet végén az állatok mortalitása is feljegyzésre került. Kiszámoltam az abszolút növekedést is, mely a 29. napi mérés és az első alkalommal mért adat különbsége.

2.4.1 Statisztikai módszerek

A növekedési adatokat a Trebon növényvédő szeres vizsgálatnál leírt, kevert nem lineáris modellel elemeztem. A táplálék hatását a peteszámra, a peteméretre, a petecsomók számára, az első peterakás időpontjára és az abszolút növekedésre lineáris modellel elemeztem. A helyes modellilleszkedés érdekében, az első petecsomó méretének a logaritmusát a teljes peteszám logaritmusának függvényében vizsgáltam. A kezelések hatását IzoIzo-IzoBt és

BtBt-BtIzo párok esetén is modelleztem, hogy a táplálékvtás hatását is megvizsgálhassam ne csak a kontrolltól (IzoIzo) való eltérést.

2.5 CollScope módszertani fejlesztése

Szükség volt egy gyors és pontos módszer kifejlesztéséhez a növekedésvizsgálatokhoz, melyet a szakdolgozatomban a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Talajtani és Agrokémiai Intézetének Környezetinformatikai Osztályán végeztem.

A CollScope egy olyan eszköz, mely a digitális fotókról képes megmérni a *F. candida* ugróvillás állatok hosszát az elmozdulásuk alapján. Az eszközt Dombos Miklós (MTA ATK TAKI) kutatócsoportja fejlesztette ki (BANSZEGI et al, 2014).

A CollScope tulajdonképpen egy eszköz csomag: egy digitális képkészítő eszköz (**3. ábra**), egy fényképező program, egy Fiji (SCHINDELIN et al. 2012) makró a mérések elvégzéséhez és egy R script az adatok gyors összegyűjtéséhez. Az én feladatom az eszköz pontosságának és kísérletekben való használhatóságának ellenőrzése, és ezen felhasználhatóságnak javítása, javaslatok tétele volt.



3. ábra. Az eredeti CollScope fénykép készítő eszköz a hozzátartozó becsúsztatható plexi tárolóval (Foto. Dombos Miklós)

A képkészítő eszköz egy erre a célra kialakított digitális mikroszkóp: fix objektívvel felszerelt digitális kamera (3.3 MP color CCD kamera: TCC-3.3ICE-N, ICX412AQ Sony CCD, egy Tamron Mega-pixel Machine Vision CCTV lencse: 23FM25SP fokális távolság 25 mm, Aperture 1.4), alsó megvilágítással, melybe egy plexi tartót (48 mm x 37 mm) lehet becsúsztatni. Így amikor az állatokat a tartóba helyezzük és lefényképezzük, akkor az állat sötétnek látszik, míg a háttér világosnak hat. Ez adja meg a kellő kontrasztot a mérésekhez. Azonban a plexi első verziója nem volt alkalmas az állatok mérésére, mivel nem tudtak sem járni, sem állni rajta, s így csak vergődtek az oldalukra fordulva. Ez nem csak azért előnytelen, mivel ebben a pozícióban nem lehet pontos méréseket végezni, hanem mivel az erőlködéstől pár percen belül elpusztulnak az állatok, ezért nem lehet élő állatról ismételt felvételeket készíteni. Kipróbáltuk a szűrőpapír lefektetését a tároló aljába, de jobban bevált az általam javasolt csiszolás. A plexi tároló alját csiszoló papírral csiszoltuk, érdekessé tettük, így már tudtak az állatok járni rajta. Még mindig problémát jelentett az, hogy az ugróvillások magas páratartalmat igényelnek és ezt az egyszerű plexi tároló nem tudja biztosítani a számukra. Rövid méréseknél ezt még elviselik az állatok, de hosszabb mérésnél, már gondot jelenthet az alacsony páratartalom. Ennek megoldása lehet egy felülről megvilágított gipszes edény, mely megszokott és elfogadott az ugróvillásokkal végzett kísérletekben és a gipszbe kevert aktív szén kellő kontrasztot is ad az elemzéshez. A dolgozatomban bemutatott méréseket az eredeti 2. ábrán látható berendezéssel és a felcsiszolt plexi tárolóval végeztük el, azóta azonban kifejlesztésre került az eszköz egy újabb változata, melyben normál Petri csészét és nedvesített szűrőpapírt használhatunk, megoldva a fent említett technikai problémákat.

A mérés technikailag a következőképpen történik: az állatokat a képeken a mozgásuk alapján azonosítja a program. Az az objektum, mely 30 másodperc alatt elmozdul élő állatnak, minden más háttérnek tekintett. Először egy pixel extrakciót végez a program, mely során 10 elkészített képből az elsőt tekinti alapnak, minden más, ami ezekhez képest elmozdul piros színű lesz, míg a háttér egységes szürke marad (emlékeztetőül: az állat előző és következő helyzete sötétszürkével van jelölve, lásd **4. ábra**). Így összesen 8 különböző kép lesz egy állatról. A képelemzés algoritmusát úgy alakították ki, hogy csak a 0,01-10 mm² közötti foltok kerüljenek bele a további elemzésbe, mivel ezen a tartományon kívül eső részecskék nagy valószínűséggel nem élő *F. candida* egyedek.



4. ábra: A különböző képek, melyen az aktuális elmozdulás pirossal, az előző és a következő helyzet sötétszürkével van jelölve. Példaként három különböző állatról készült felvételt mutatok be.

Ezután a Fiji makro részecskeanalízist végez. Mivel az egyedek testhosszát kívántuk becsülni, ezért a mi mérésünkhöz a kiválasztott foltra illesztett ellipszis hosszabb átlóját (Major) használtuk fel. Az állatok hosszát az ismételt mérésből kapott Major-értékek átlagából becsültük, mivel az ugróvillások váza puha, könnyen kinyújtóznak, illetve összehúzódnak, így testméretük nem stabil. A különböző képeket és a képekből kinyert adatokat (text fájl) a program lementi a kiválasztott mappánkba. Amennyiben az állatok megfelelően mozogtak 8 sor lesz a fájlunkban. Ha az állat nem mozgott két fényképfelvétel között, akkor ennél kevesebb adat lesz, ha pedig egy helyben forog az állat, akkor több sor lesz, mivel így a különbség ketté oszlik és a program két foltot is érzékel egyszerre. A különböző kép azért oszlik ketté forgás esetén, mivel az állat középső része nem mozdul el, az a terület az egymást követő képeken is lefedett (nem mozdul el), csak az állat elülső és hátulsó részének mozgása érzékelhető.

A mérés pontosságának ellenőrzéséhez 35 db állatot mértem meg a CollScope-hoz csatlakoztatott kamerával készített képeken a CollScope Fiji makróval, illetve a hagyományos kézi módszerrel. A hagyományos módszer lényege, hogy a digitális képeken egyesével lemérjük az állatok hosszát egy képelemző szoftver segítségével, ebben a vizsgálatban a Fiji-vel. A mérés pontosságának ellenőrzése és az emberi hiba becslésének céljából munkatársam, Bánszegi Oxana is végigmérte ugyanazokat az állatokat. Az állatokat random választottuk, minden mérettartományból. Lineáris modellel ellenőriztem, hogy mennyiben különbözik a kézi mérés és a gépi mérés.

Ahhoz, hogy biztosak lehessünk abban, hogy az eszköz egy kísérletes helyzetben is jól működik elvégeztem egy növekedés-vizsgálatot szinkronizált *F. candida* egyedekkel. A módszer tesztelését nehézfémes vizsgálattal végeztem, mely régóta jelentős az ökotoxikológiában (SMIT-VAN GESTEL, 1997; SCOTT-FORDSMAND, 1999; NURSITA

et al, 2005, BUR et al, 2010). Például FOUNTAIN és HOPKIN (2001) olyan módszert fejlesztett ki, mely esetén a kadmium hatása már 7 nap alatt kimutatható a *F. candida* fajon. A méréseket az állatok 10-12 napos korában kezdtem, hogy ne károsítsam az egyedeket, amikor az edényükből a CollScope tárolójába áthelyezem őket. A kísérletben CROUAU és MOIA (2006) kísérletének nominális kadmium koncentrációit vettem alapul (0; 76,5; 153; 306 mg kadmium/kg száraz talaj). Kísérletünkben kadmium-szulfátot alkalmaztam (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$). Minden csoportból tizenöt ismétlést végeztem, így összesen hatvan Petri csészével dolgoztam. Az állatok hosszát a 0., 7., 14. és 21. napon mértem meg a CollScope készülékkel és a hagyományos kézi módszerrel. Az adatokat először egy általánosított lineáris modellel elemeztem az általános összefüggések felfedezésére, majd naponként külön-külön illesztettem rájuk egy lineáris modellt, melyből kiszámoltam az EC10 és EC50 értékeket méréstípusonként. Az EC10 és EC50 értékeket páros t-próbával hasonlítottam össze.

Végül 150 állatot mértünk meg Bánszegi Oxanával CollScope-pal és kézzel is a mérés pontosítására, melynek matematikai alapjait Kosztolányi András készítette el.

A CollScope-pal történő és a kézi mérés összehasonlítására random kiválasztották 50 állat adatait. Ezeket az adatokat úgy ábrázolták a koordináta rendszerben, hogy x tengelyén szerepeltek a CollScope mérési adatai, az y tengelyén a kézi mérés adatai. Ezek mellé illesztettek egy 45°-os egyenest. Aztán kiszámolták az adatok egyenestől való eltérését és beépítettek a programba egy korrekciós egyenletet. Ellenőrzésképpen véletlenszerűen kiválasztották másik 50 állat adatát, melyre újra elvégezték az illesztést, mely immáron nem tért el a 45°-os egyenestől. Ez bizonyította, hogy a korrekcióval számolt adatok esetében a CollScope-pal történő és a kézi mérés adatai megegyeznek egymással.

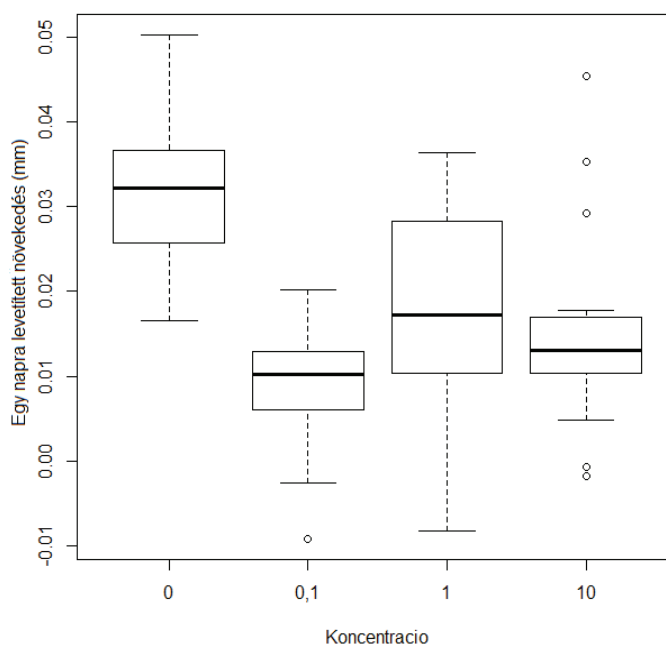
3. Eredmények

3.1 Növekedésvizsgálat Trebon növényvédő szerrel

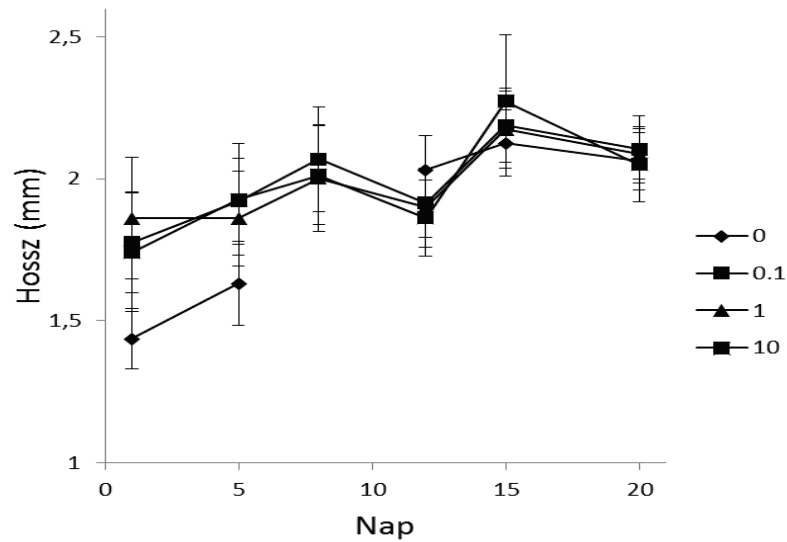
A szülő generációban a különböző koncentrációkkal kezelt csoportok növekedési görbéi között nem volt szignifikáns különbség a koncentrációk függvényében, sem az állatok hosszának, sem pedig a szélességének növekedése esetén. A hosszúság-szélesség arány sem függött a koncentrációtól. A peteszám ($p < 0,001$, standard hiba $< 0,001$) és az utódszám ($p = 0,033$ standard hiba $= 0,007$) igen erős pozitív összefüggést mutatott a hossznövekedéssel, míg a szélesség-növekedéssel csak a peteszám ($p < 0,001$, standard hiba $< 0,001$) mutatott pozitív összefüggést. A hossz-szélesség arányra egyik paraméter sem volt szignifikáns hatással.

Az állatok napokra levetített testhossz-növekedésére a koncentráció marginálisan szignifikáns ($p=0,053$, standard hiba= $0,002$) hatással van. A koncentráció növekedése enyhén csökkenti az egy napra levetített növekedést (lásd **5. ábra**).

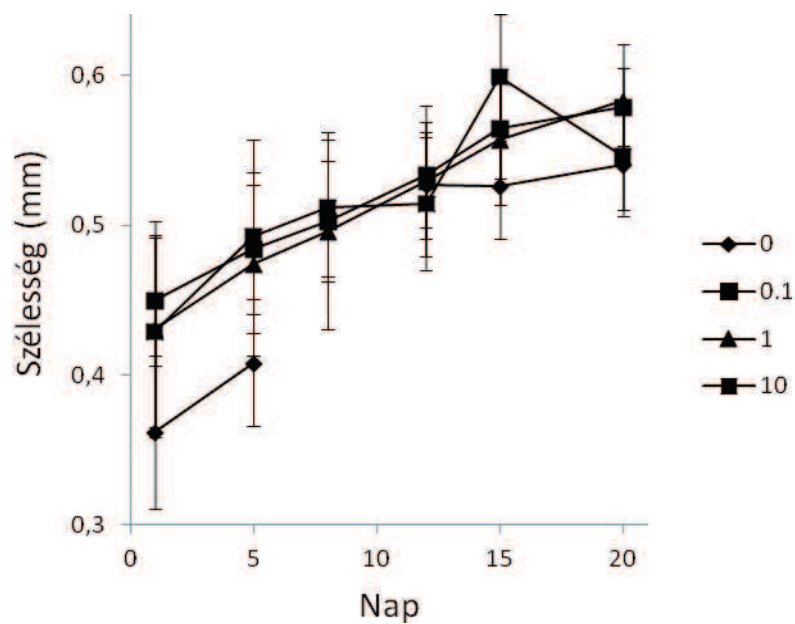
Az utód generáció nem kezelt csoportjaiban a testhossz-növekedésre vonatkozó növekedési görbék szignifikánsan tértek el ($p=0,003$, standard hiba= $0,010$) egymástól a különböző koncentrációk szerint. A koncentráció növekedés megnövelte az átlagos napi növekedés értékét (lásd **6. ábra**). Az utódszámmal ($p=0,003$, standard hiba= $0,001$) és a peteszámmal ($p<0,001$, standard hiba= $<0,001$) is pozitív szignifikáns összefüggést mutatott a növekedés. A szélesség-növekedés növekedésgörbéi között szignifikáns különbség volt ($p=0,003$, standard hiba= $0,010$). A koncentráció emelkedése növelte az átlagos napi növekményt (lásd **7. ábra**), ahogy a peteszám ($p<0,001$, standard hiba= $<0,001$) és az utódszám ($p=0,003$, standard hiba= $0,001$) is. A hosszúság-szélesség arányt a koncentráció növekedése csökkentette ($p=0,036$, standard hiba= $0,042$), ahogy a peteszám is ($p<0,001$, standard hiba= $<0,001$) (lásd **8. ábra**).



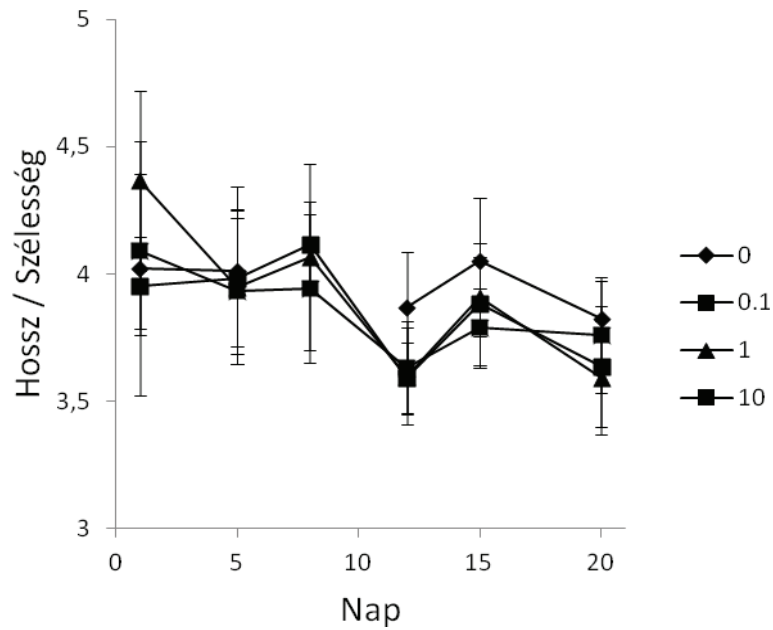
5. ábra: Trebonos kísérlet: szülő generáció egy napra levetített növekedése. 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció



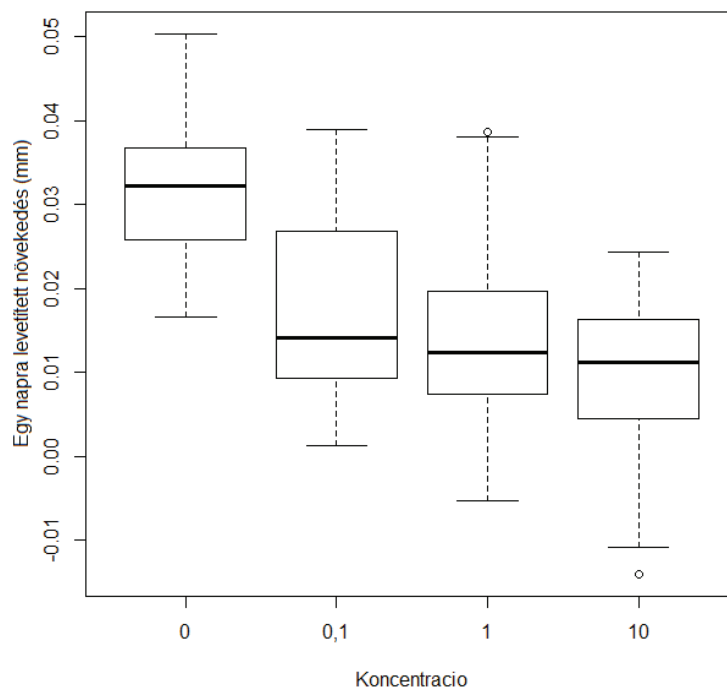
6. ábra: Trebonos kísérlet: a nem kezelt utód generáció hossznövekedési görbéi. 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció



7. ábra: Trebonos kísérlet: a nem kezelt utód generáció szélesség-növekedés görbéi. 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció



8. ábra: Trebonos kísérlet: a nem kezelt utód generáció hossz-szélesség arány görbéi. 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció

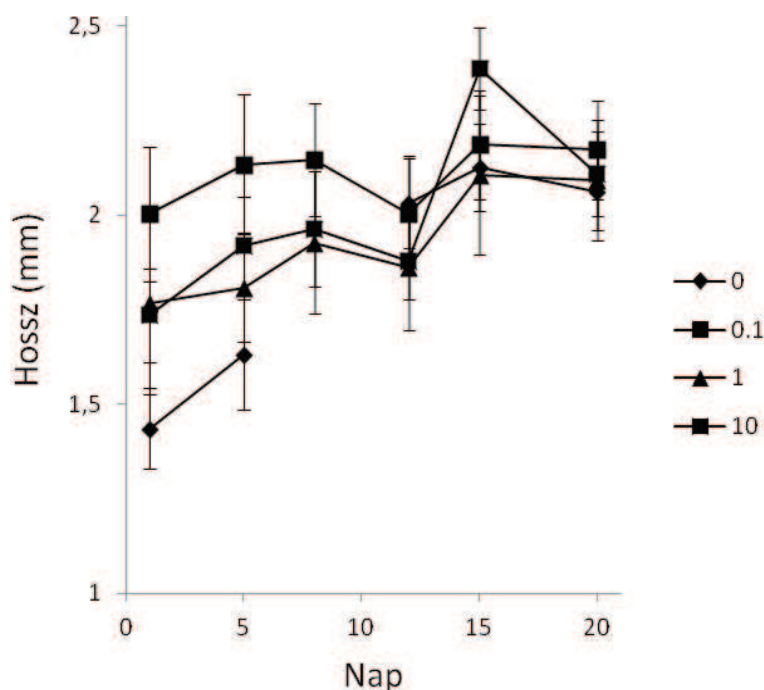


9. ábra: Trebonos kísérlet: a nem kezelt utód generáció egy napra levettített növekménye, 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció

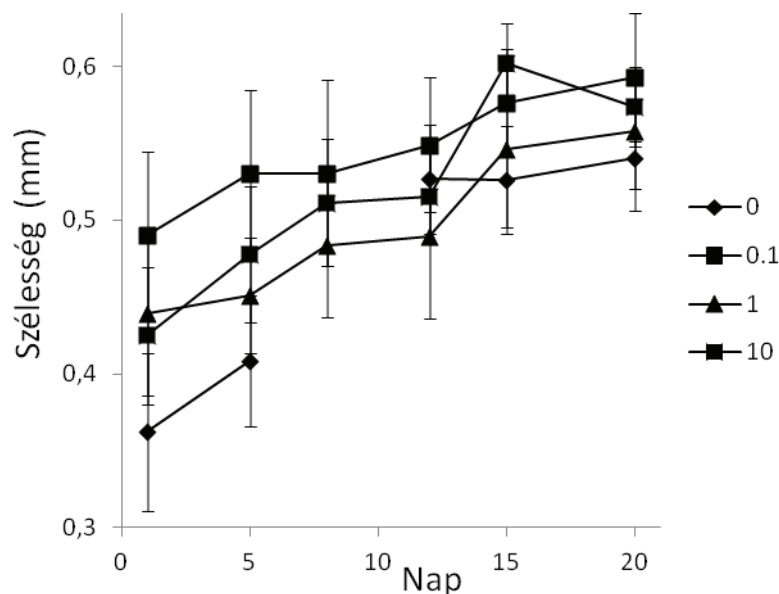
Az egy napra levetített növekedésre a koncentráció szignifikáns ($p < 0,001$, standard hiba = 0,004) hatással van. A koncentráció növekedése csökkenti az egy napra levetített növekedést (lásd **9. ábra**).

Az utód generáció kezelt csoportjaiban a hosszúsági növekedési görbék között szignifikáns különbség volt a koncentráció függvényében ($p = 0,025$, standard hiba = 0,033). Mind a peteszám ($p < 0,001$, standard hiba < 0,001), mind az utódszám ($p < 0,001$, standard hiba = 0,001) növelte a növekedést (lásd **10. ábra**). A szélesség növekedési görbék és koncentráció között szintén pozitív volt az összefüggés ($p = 0,011$, standard hiba = 0,010), mind a peteszámmal ($p < 0,001$, standard hiba = < 0,001), mind az utódszámmal ($p < 0,0001$, standard hiba < 0,001) (lásd **11. ábra**). A hosszúság-szélesség arány nem függött a koncentrációtól, de a peteszámmal negatívan függött össze ($p < 0,001$, standard hiba < 0,001). Az egy napra levetített növekedésre a koncentráció nem volt szignifikáns hatással.

A peteszám egyetlen generációban sem függött a koncentrációtól. A koncentrációnak nem volt hatása a peteméretre a szülő generációban és a kezelést nem kapott utódoknál. A kezelt utódokra a koncentráció növekedésének méretcsökkentő hatása volt ($p = 0,021$, standard hiba = 0,004). A peteátmérők arányára (vagyis a petealakra) a koncentrációnak nem volt hatása egyetlen generációban sem.



10. ábra: Trebonos kísérlet: a kezelt utód generáció hossznövekedési görbéi, 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció



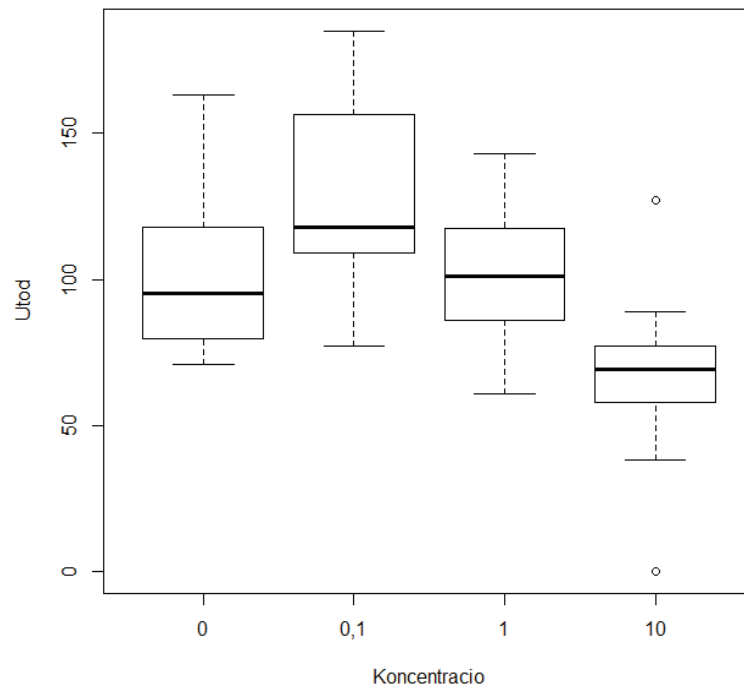
11. ábra: Trebonos kísérlet: a kezelt utód generáció szélesség-növekedési görbéi, 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció

A szülő generációknak sem a kezdeti sem a végső mérete nem különbözött szignifikánsan egyetlen csoportban sem.

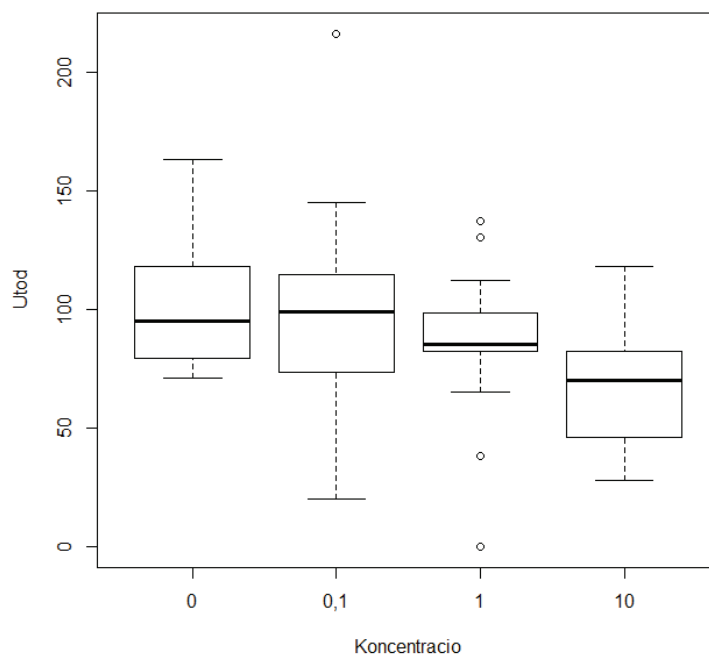
A kezelést kapott utódok, minden csoportja szignifikánsan kisebb volt a kontroll csoportnál, azonban a kísérlet végén csak a leghígabb koncentrációval kezelt csoport ($p=0,032$, standard hiba=0,045) volt nagyobb a kontrollnál, a többi nem különbözött. A kezelést nem kapott utódok a kísérlet első napján szignifikánsan nagyobbak voltak a kontroll csoportnál. A kísérlet utolsó napján nem volt különbség a méretben.

A szülő generációban az utódszáma marginálisan szignifikáns hatása volt a koncentrációnak ($p=0,060$, standard hiba=3,880). A koncentráció emelkedésével az utódszám csökkent. Az utód generáció kezelést kapott ($p=0,004$, standard hiba=10,74) és kezelést nem kapott ($p<0,001$, standard hiba=9,22) csoportjában szignifikáns hatása volt a koncentrációnak az utódszáma. Mindkét esetben a koncentráció emelkedésével csökkent az utódszám. (lásd **12-13. ábra**)

A szülő generációban nem volt szignifikáns hatása a kezelésnek az első peterakás időpontjára, azonban a kezelt ($p=0,014$, F-érték=6,496) és nem kezelt utódokban ($p=0,004$, F-érték=9,221) igen. Mindkét utód generációban később raktak petét a töményebb kezelés hatása alatt lévő állatok



12. ábra: Trebonos kísérlet: a nem kezelt utód generáció utódszáma, 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció

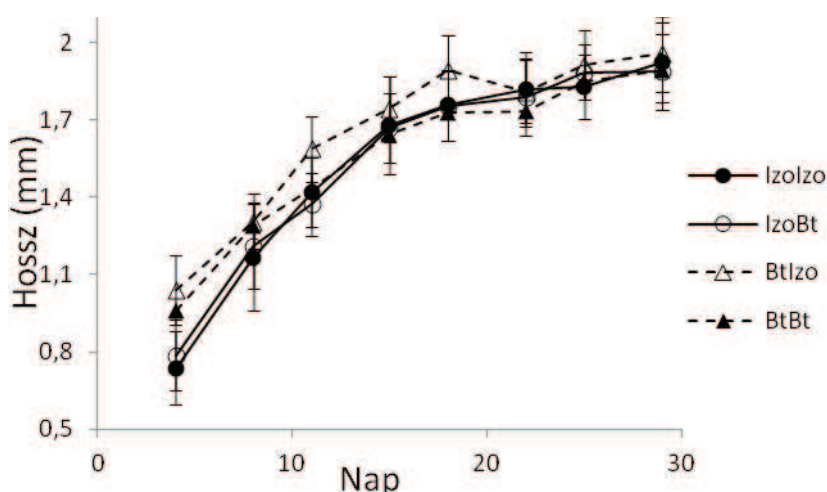


13. ábra: Trebonos kísérlet: a kezelt utód generáció utódszáma, 0: kontroll csoport, 0,1 a tizedére hígított koncentráció, 1 a szántóföldi koncentráció, 10 a tízszeres töménységű koncentráció

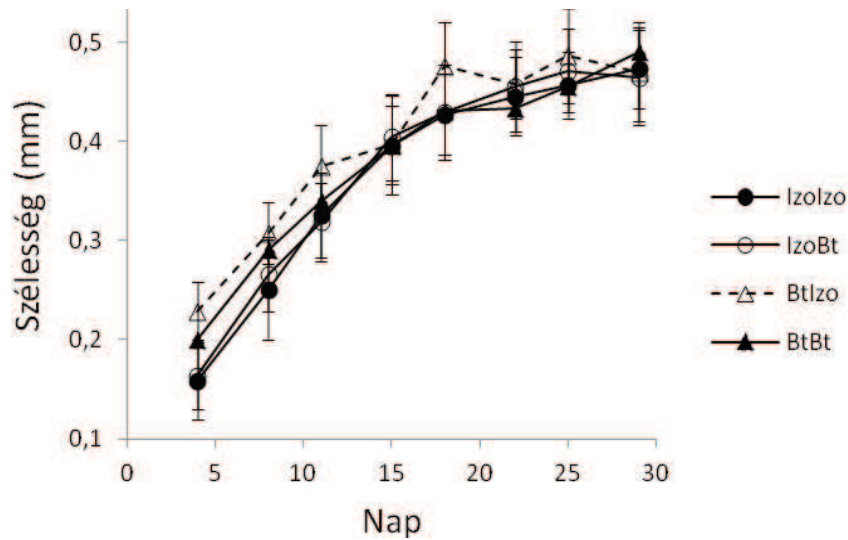
3.2 A MON810-es kukorica vonallal végzett vizsgálatok eredményei

A kevert modellben a hossznövekedés esetén, a BtIzo növekedése tért el az IzoIzo-tól ($p < 0,001$, standard hiba=0,029), mely kicsit gyorsabb volt annál (lásd **14. ábra**). Az IzoIzo és a IzoBt nem különbözött szignifikánsan, de a BtBt-től a BtIzo gyorsabban nőtt ($p = 0,001$, standard hiba= 0,034). A szélességnövekedés esetén szintén a BtIzo különbözött az IzoIzo-tól ($p < 0,001$, standard hiba=0,008), mely növekedése gyorsabb volt (lásd **15. ábra**). Az IzoIzo-IzoBt nem különbözött szignifikánsan, de a BtBt-től gyorsabban nőtt s BtIzo ($p = 0,003$, standard hiba=0,010). Bár a BtIzo hossz-szélesség arány változása szignifikánsan különbözött az IzoIzo-tól ($p = 0,026$, standard hiba=0,041, lásd **16. ábra**), de ez nem volt jelentős. Az abszolút növekedése a BtBt ($p < 0,001$, standard hiba= 0,056) és BtIzo-nak ($p < 0,001$, standard hiba= 0,052) tért el az IzoIzo-tól, mindkét csoport kisebbre nőtt, mint a kontroll (lásd **17. ábra**). Páronkénti összehasonlításban sem az IzoIzo-IzoBt, sem a BtBt-BtIzo abszolút növekedése nem különbözött egymástól szignifikánsan.

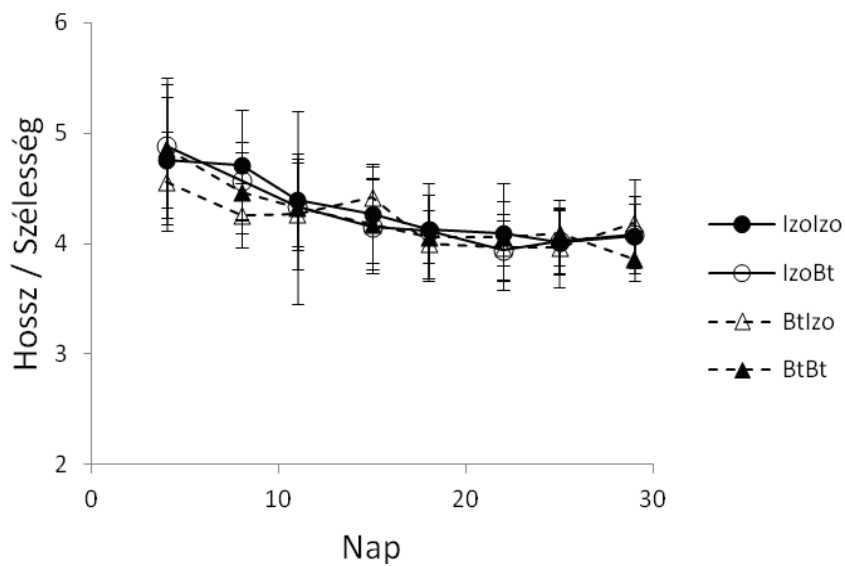
A BtBt átlagos TA értéke marginálisan szignifikánsan nagyobb volt ($p = 0,067$, standard hiba= 0,003) a kontrollhoz viszonyítva. A párok összehasonlításánál sem az IzoIzo-IzoBt, sem a BtBt-BtIzo nem különbözött egymástól szignifikánsan. Bár a teljes peteszám szignifikáns hatással van a TA-ra ($p = 0,007$, standard hiba < 0,001), de ez a hatás nem jelentős mértékű, hiába szignifikáns, mert a mérések bizonytalansága az adott tartományban már igen nagy. Minél több petecsomót raktak az állatok, annál kisebbek lesznek az első peterakás petéi ($p = 0,035$, standard hiba= 0,001, lásd **18. ábra**). Az első petecsomó méretének és az első peterakás időpontjának nem volt szignifikáns hatása a TA-ra.



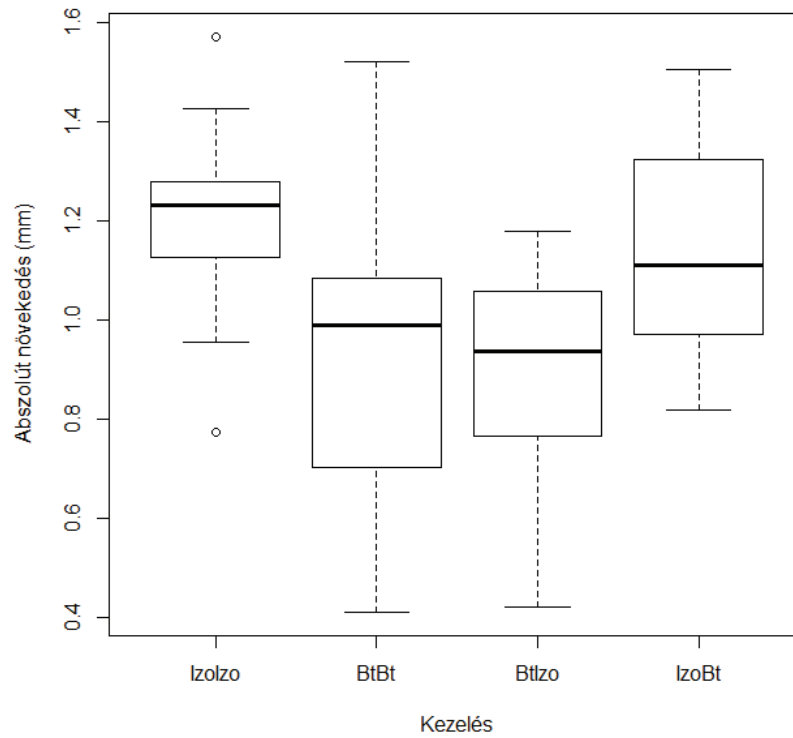
14. ábra: MON810 kísérlet: hosszúsági növekedés görbék. IzoIzo-Izogéneset fogyasztók, IzoBt- Izogénes fogyasztásáról áttért Bt-re, BtIzo- Bt fogyasztásról áttért Izogénesre, BtBt-Bt-t fogyasztók



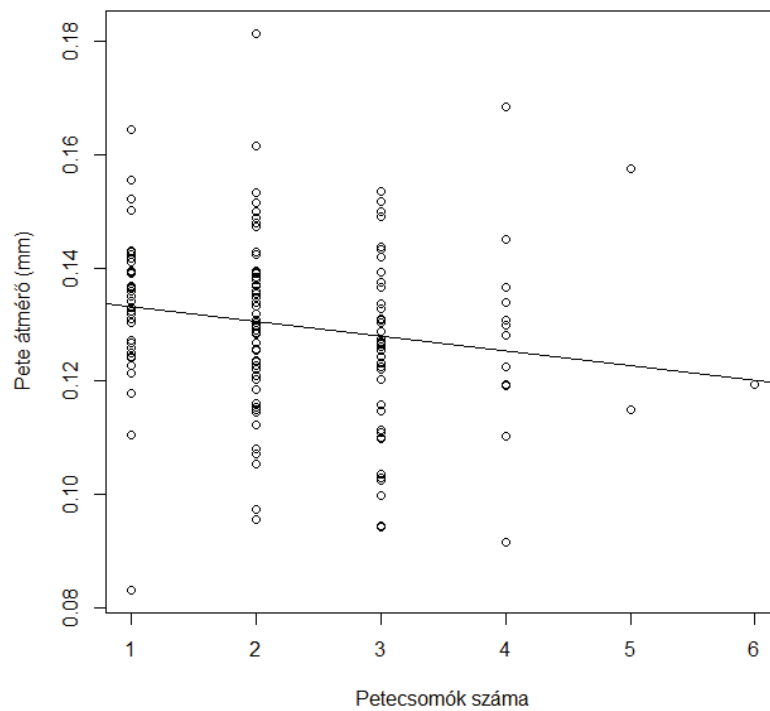
15. ábra: MON810 kísérlet: szélesség növekedési görbék, IzoIzo-Izogéneset fogyasztók, IzoBt- Izogénes fogyasztásáról áttért Bt-re, BtIzo- Bt fogyasztásról áttért Izogénesre, BtBt-Bt-t fogyasztók



16. ábra: MON810 kísérlet: hosszúság-szélesség arány változása a kísérlet folyamán, IzoIzo-Izogéneset fogyasztók, IzoBt- Izogénes fogyasztásáról áttért Bt-re, BtIzo- Bt fogyasztásról áttért Izogénesre, BtBt-Bt-t fogyasztók



17. ábra: MON810 kísérlet: az állatok abszolút növekedése (utolsó nap hosszmérete- első nap hosszmérete), IzoIzo-Izogéneset fogyasztók, IzoBt- Izogénes fogyasztásáról áttért Bt-re, BtIzo- Bt fogyasztásról áttért Izogénesre, BtBt-Bt-t fogyasztók



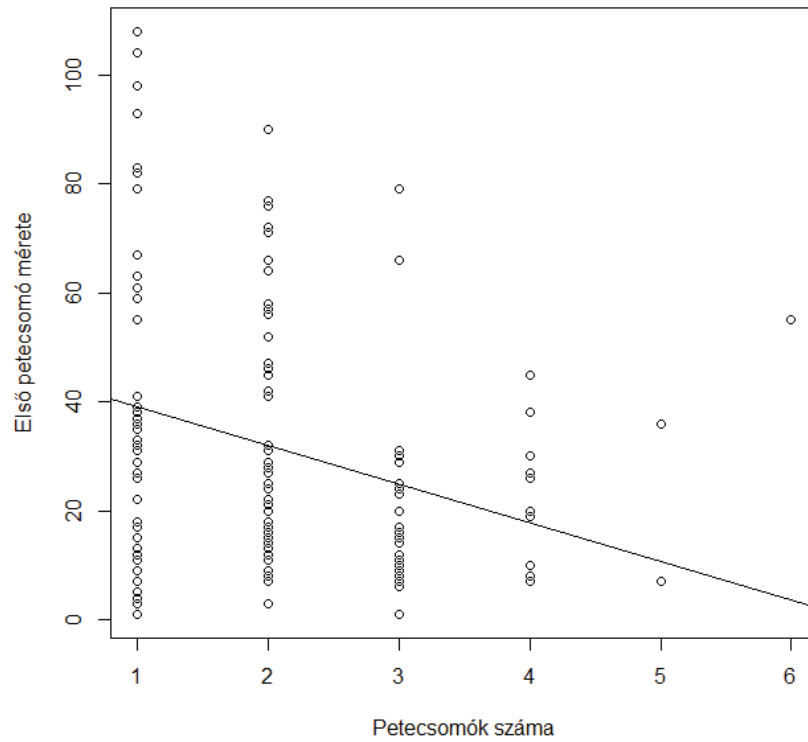
18. ábra: MON810 kísérlet: az első peterakás petéinek az átmérője a petecsomók számának a függvényében. Minél több a petecsomó, annál kisebbek a peték ($p=0,035$)

Az első petecsomó méretére a táplálék típusának nem volt hatása (a párok összehasonlításánál sem), azonban a petecsomók száma ($p < 0,001$, standard hiba= 1,819) és az első peterakás időpontja ($p < 0,001$, standard hiba=0,310) szignifikáns hatással volt rá (lásd **19-20. ábra**). Minél több petecsomót raknak az állatok, annál kisebb a petecsomó mérete és minél később rakják le az első petecsomót az annál nagyobb lesz. Az első petecsomó méretének logaritmus szignifikánsan nőtt ($p < 0,001$, standard hiba= 0,071) a teljes peteszám logaritmusának növekedésével.

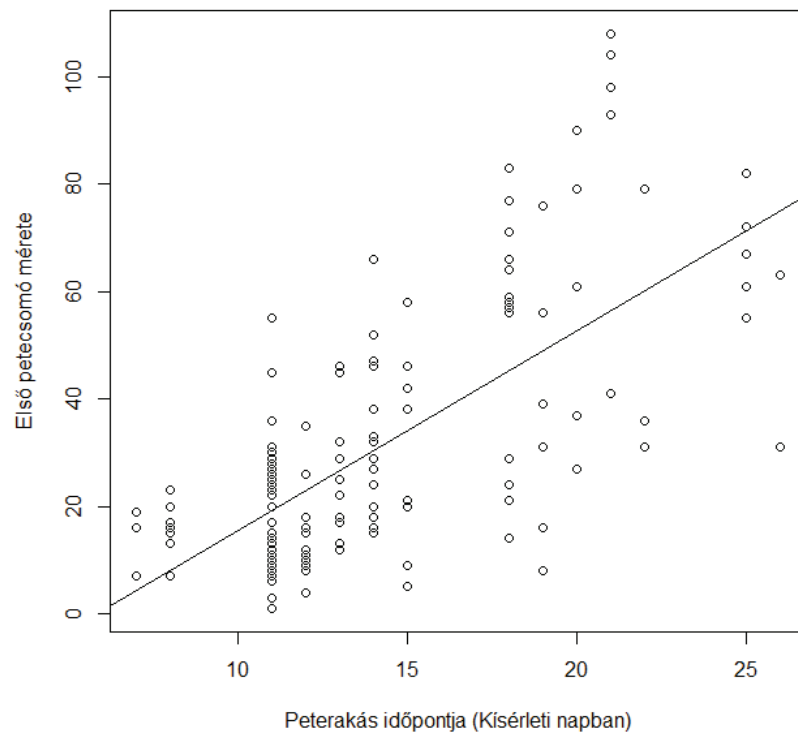
Bár a teljes peteszámra nem volt szignifikáns hatása a tápláléktípusnak, de egy trend figyelhető meg, mely szerint egyre kisebb a peteszám bizonyos tápláléktípusoknál, melyhez a p-érték csökkenése is trend-szerűen társul. Így a kontrollhoz képest a BtBt átlagosan 1,2 petével rak kevesebbet ($p = 0,934$, standard hiba= 14,56), a BtIzo átlagosan 10,4 petével rak kevesebbet ($p = 0,471$, standard hiba= 14,37), míg az IzoBt átlagosan 16,3 petével kevesebbet rak ($p = 0,291$, standard hiba= 15,37) összesen. A párok összehasonlításánál nem volt szignifikáns hatás. A petecsomók száma szignifikánsan növelte a teljes peteszámot ($p < 0,001$, standard hiba= 3,185, lásd **21. ábra**).

A petecsomók számára és az első peterakás időpontjára nem volt szignifikáns hatása a tápláléktípusnak egyik statisztikai módszerrel sem.

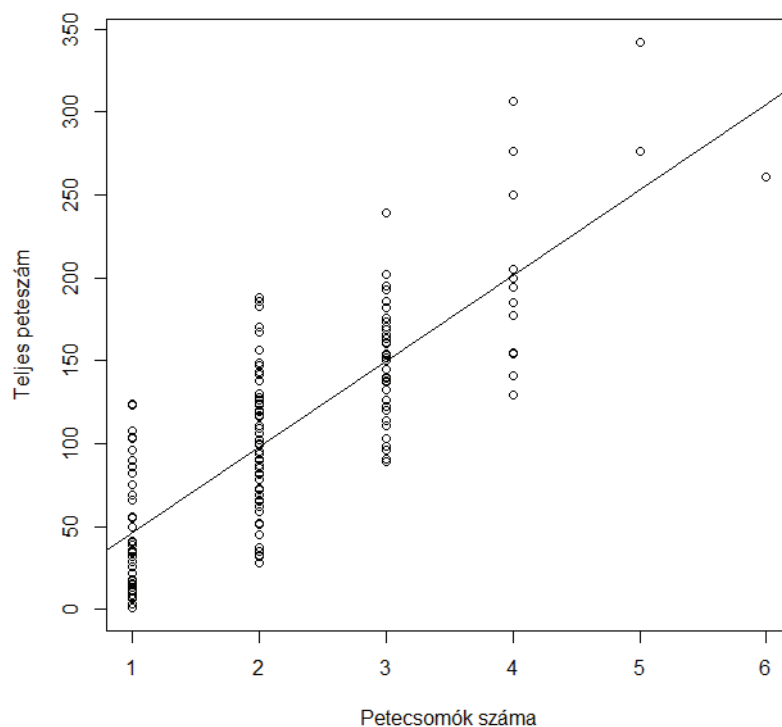
A **22. ábrán** jól látszik, hogy elkülönül az egy, kettő és annál több petecsomót lerakó állatok első peterakásba fektetett energiája a teljes peterakáshoz képest. Azok az állatok, amelyek csak egy petecsomót raktak le, azok az első peterakásba igyekeztek a számukra elérhető legtöbb energiát befektetni, mivel nekik ez volt az egyetlen alkalom erre. Azok, amelyek kétszer raktak petét már inkább egyenlően osztották meg az energiáikat a két peterakás között. Amelyek kettőnél több petecsomót raktak, azok az első peterakásba kevés energiát fektettek, de összességében nagy sikert értek el, mivel sok petecsomóból, nagy végső peteszám jött ki.



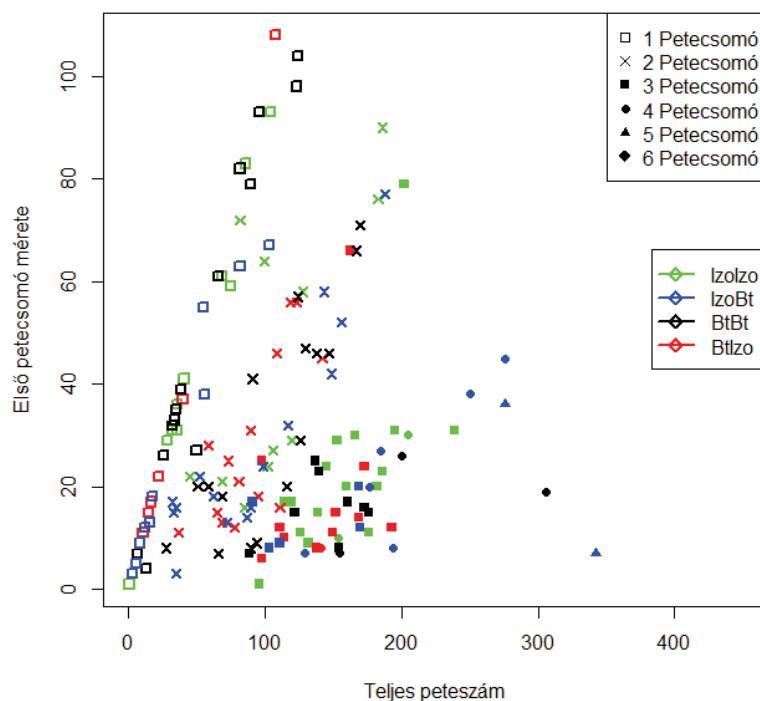
19. ábra: MON810 kísérlet: a petecsomók számának hatása az első petecsomó méretére
($p < 0,001$)



20. ábra: MON810 kísérlet: első peterakás időpontjának hatása az első petecsomó méretére
($p < 0,001$)



21. ábra: MON810 kísérlet: a petecsomók számának a hatása a teljes peteszámra ($p < 0,001$)



22. ábra. MON810 kísérlet: a teljes peteszám és az első petecsomó méretének összefüggése, a petecsomók száma és a kezelések szerint elkülönítve, IzoIzo-Izogénest fogyasztók, IzoBt- Izogénes fogyasztásáról áttért Bt-re, BtIzo- Bt fogyasztásról áttért Izogénesre, BtBt-Bt-t fogyasztók

3.3 A CollScope módszertani fejlesztésének eredményei

A mérés pontosságának ellenőrzésénél a CollScope által mért értéktől sem az általam mért értékek ($p=0,676$; standard hiba= $0,074$), sem a munkatársam által mért értékek nem különböztek szignifikánsan ($p=0,563$; standard hiba= $0,081$).

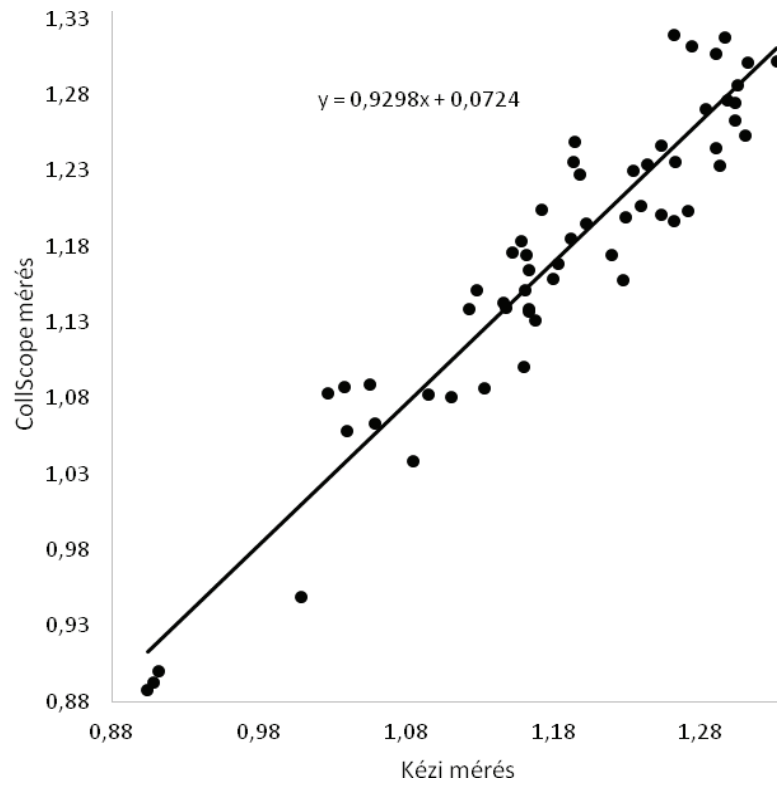
Az ökotoxikológiai teszt esetén az összes adatra illesztett modellnél a koncentrációnak szignifikáns hatása volt a méretre ($p<0,001$; standard hiba $<0,001$), a mérés típusától azonban nem függött, hogy melyik módszerrel mértünk ($p=0,743$, standard hiba= $0,029$). A **23-26. ábrákon** látszik, hogy a CollScope-pal és a kézi méréssel mért értékek egy közel 45° -os egyenesre illeszkednek.

A 7. napon mért adatok esetén a CollScope-pal mért adatoknál ($p<0,001$, standard hiba $<0,001$) és a kézi mérésnél ($p<0,001$, standard hiba $<0,001$) a koncentráció szignifikáns hatással volt a méretre. A CollScope mérés esetén az EC10 $80,37$ mg/kg, az EC50 $401,87$ mg/kg, míg a kézi mérés esetén EC10 $78,66$ mg/kg, az EC50 $393,31$ mg/kg értékeket adott.

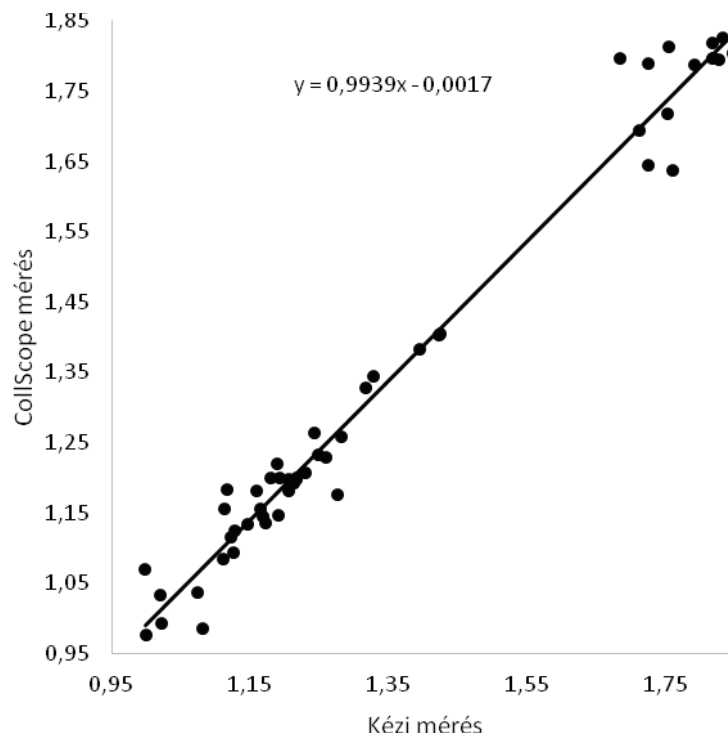
A 14. napon mért adatok esetén a CollScope-pal mért adatoknál a koncentrációnak szignifikáns hatása volt a méretre ($p<0,001$, standard hiba $<0,001$), a kézi mérésnél szintén szignifikáns hatást találtam ($p<0,001$, standard hiba $<0,001$). A CollScope esetén az EC10 $64,83$ mg/kg, az EC50 $324,16$ mg/kg, míg a kézi mérés esetén EC10 $63,27$ mg/kg, az EC50 $316,37$ mg/kg értékeket adott.

A 21. napon mért adatoknál a CollScope-pal mért adatok esetén a koncentráció szignifikáns hatással volt a méretre ($p<0,001$, standard hiba $<0,001$), és a kézi mérésnél szintén ezt tapasztaltam ($p<0,001$, standard hiba $<0,001$). A CollScope esetén az EC10 $64,83$ mg/kg, az EC50 $324,16$ mg/kg, míg a kézi mérés esetén EC10 $62,78$ mg/kg, az EC50 $313,94$ mg/kg értékeket adott.

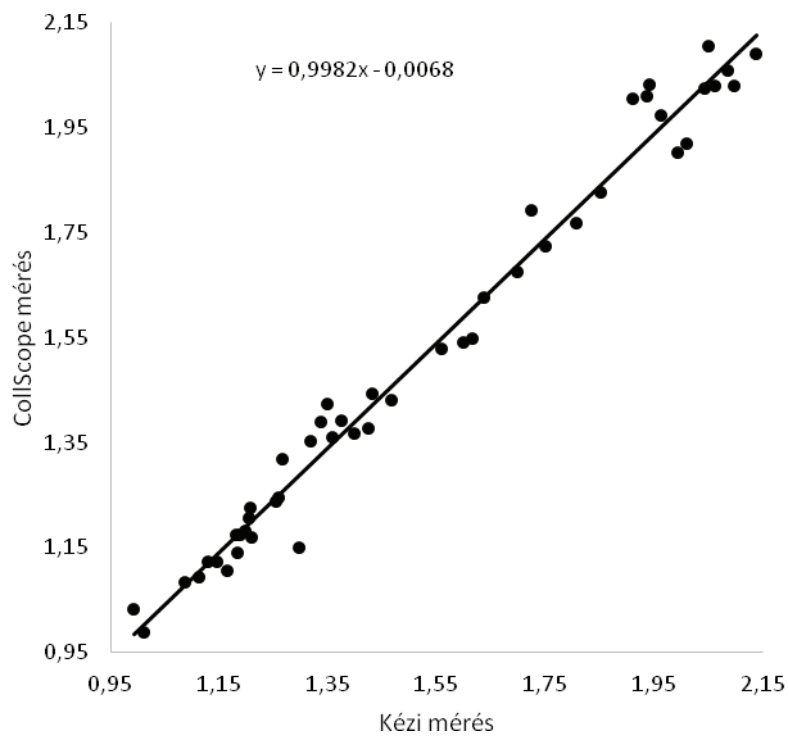
Az EC10 értékek ($p=0,036$, $t=5,14$). és az EC50 értékek is szignifikánsan eltértek egymástól ($p=0,036$, $t=5,15$).



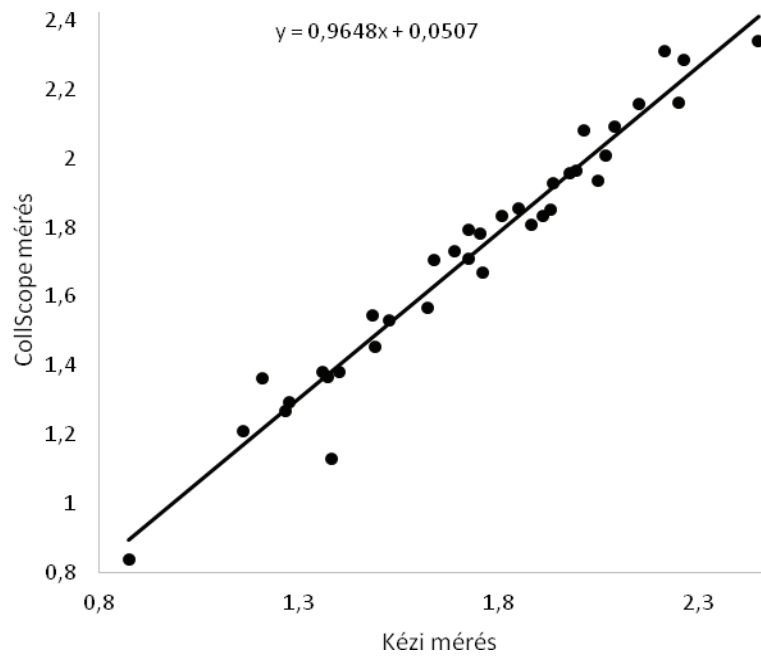
23. ábra: A CollScope és a kézi mérés adatainak ábrázolása a 0. napon



24. ábra: A CollScope és a kézi mérés adatainak ábrázolása a 7. napon



25. ábra: A CollScope és a kézi mérés adatainak ábrázolása a 14. napon



26. ábra: A CollScope és a kézi mérés adatainak ábrázolása a 21. napon

3.3.1 A CollScope protokoll

Ebben a fejezetben angol nyelvű programok használatának leírása következik. A programokban szereplő szavakat nem fordítom le magyarra, mert néhányuk ugyan van elfogadott magyar neve, de soknak nincs. Az egyértelműség kedvéért is hasznos az angol szavak megtartása. Mindennek viszont az a következménye, hogy a szöveg (pl. a ragozás) nehézkes lesz. A használati utasítás követhetőségének érdekében sajnos erre van szükség.

Fényképező program: Csatlakoztassuk a kamerát a számítógéphez és a CollScope Shooting Software automatikusan felismeri. Futtassuk a CollScope Shooting Software-t és a felugró ablakban válasszuk ki a használni kívánt kamerát, ez után a kamera által látott kép megjelenik.

Mindenképpen be kell állítani a paramétereket, és a mentési helyet, mert előtte nem lesz aktív a Shot indító menü. A paramétereket a File/Parameter menüpontban kiválasztjuk és beállítjuk a Start Index-et, mely a képek számozásának kezdetét adja meg, a No. of Images-t, mely az elkészített képek számát jelenti. Ezt mindenképpen tízre kell állítani, sem többre, sem kevesebbre, mivel az elemző program csak akkor működik megfelelően, ha az almappában tíz kép lesz (kép fájlok elrendezését lásd később). Illetve még be kell állítani a Time intervallt, mely a két kép közt eltelt másodperceket jelenti. Mi a kísérletek során három másodpercet használtunk. A mentési helyet a File/Save As menüpontban tudjuk beállítani. Ez után aktív lesz a Shot. Az első képsorozat elkészítése akkor ér véget, ha a Shot menü mellett megjelenik az 1-es szám.

Fénykép fájlok elhelyezése: A fájloknak készíteni kell egy főmappát, melybe aztán lemért állatonként egy mappát kell elhelyezni. Minden mappában pontosan tíz kép fájlnak kell lennie, hogy a Fiji makró el tudja készíteni a különbözőzeti képeket, más esetben hibaüzenettel leáll az elemzés. Az almappákban a képfájlokon kívül más típusú fájl nem lehet, mert az szintén az elemzés megakadását okozza.

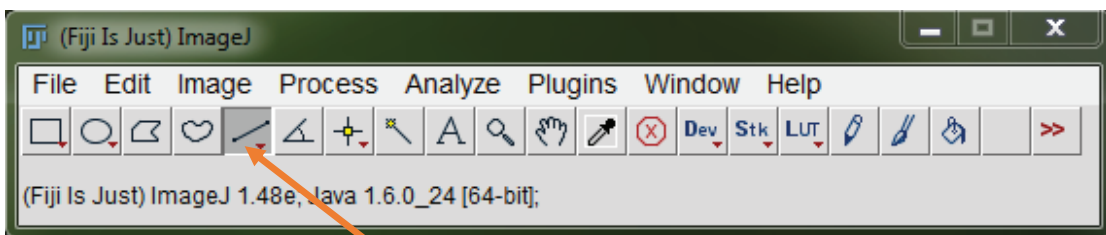
Fiji telepítése: A Fiji ingyenesen letölthető a <http://fiji.sc/Downloads> oldalról. Figyeljünk arra, hogy amennyiben XP-nél újabb Windows-t használunk, akkor semmiképpen ne a Program Files-ba töltsük le a programot, hanem valamilyen felhasználói mappába. Amennyiben nem így teszünk, a rendszer nem fogja engedélyezni a programnak a frissítéseket. Ez után csomagoljuk ki a letöltött fájlt, és az Operációs rendszerünknek megfelelő "ImageJ-win64.exe" vagy "ImageJ-win86.exe" fájlt futtassuk.

Fiji kalibrálása: Ha rendelkezünk standard kalibrációs tárgylemezzel, akkor azt használjuk, ha nem, akkor készíthető skála vektorgrafikus programmal is, mint például az InkScape

(<http://inkscape.org/>), ami teljesen ingyenes. A vectorgrafikus programmal készíthetünk egy centiméteres skálát egy milliméteres beosztással. Általában ezt a felbontást egy átlagos nyomtató is jól láthatóan ki tudja nyomtatni. Nyomtatás után egy tolómérővel vagy más standardizált mérőeszközzel validálnunk kell a skálánkat.

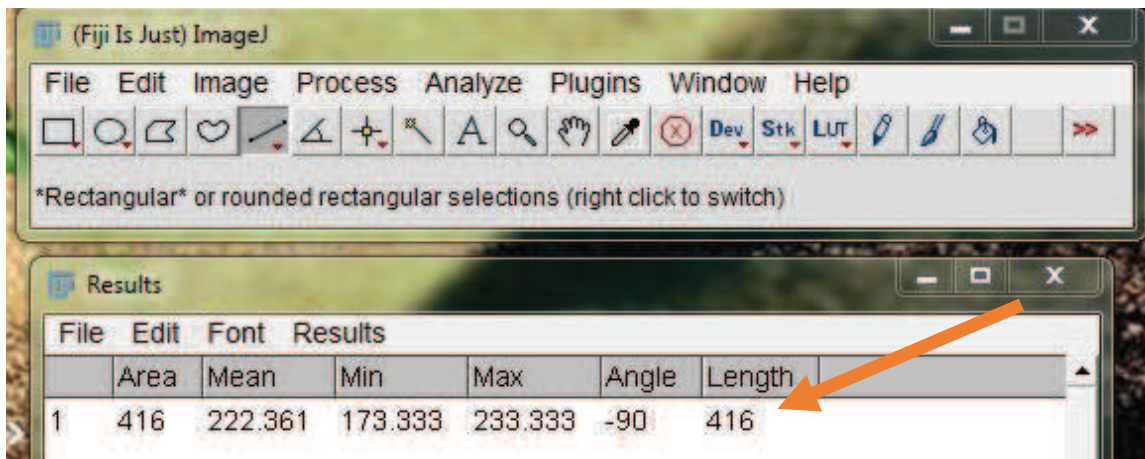
Ha csak kameránk van, szükségünk van hozzá megfelelő állványra, mivel a mérések csak akkor lesznek pontosak, ha a kalibrálás és a mérés pontosan ugyanabban a magasságban történik. Ha a kamera egy mikroszkópra van csatlakoztatva, akkor minden használt nagyítást kalibrálni kell.

A kamerával képeket kell készíteni a skáláról, minimum ötöt, de minél több annál pontosabb lesz a kalibrálás. A skálát ugyanabban a magasságban kell elhelyezni, ahol később az állatok lesznek fotózva. Ha megvannak a képek a skáláról, el kell indítani a Fiji-t. Nyissuk meg az első képet a File/Open picture menüponntal vagy a CTRL+O paranccsal. Aktiváljuk a Straight gombot és mérjük meg a skálát az elejétől a végéig (lásd **27. ábra**).



27. ábra Straight gomb helye a kezelő felületen

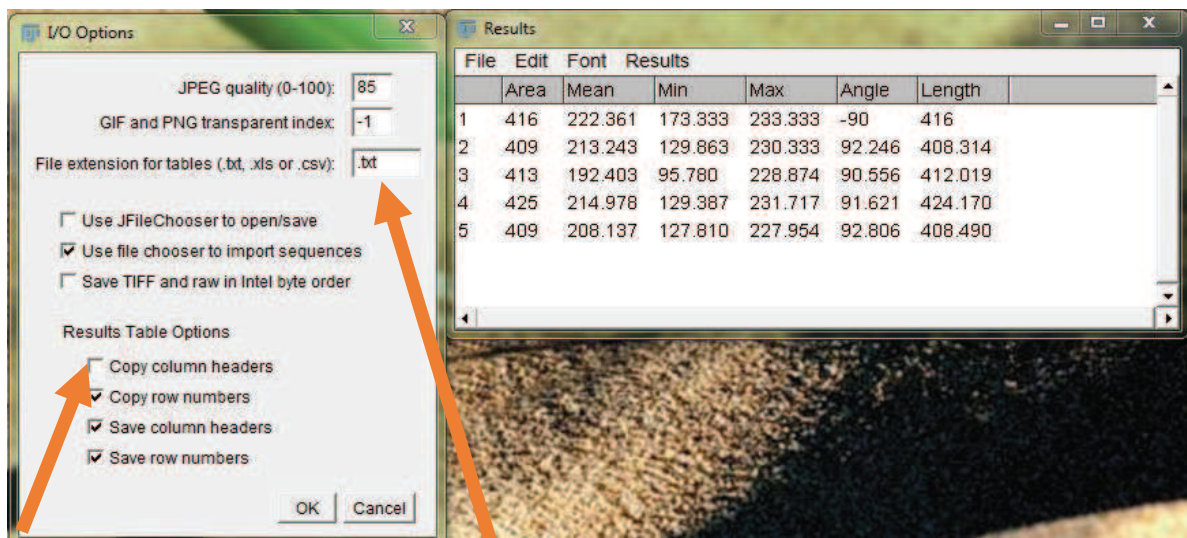
Lenyomjuk az egér bal gombját a skála kezdetén és lent tartjuk, amíg el nem érjük a skála végét. Ez után az egyenes végpontjait úgy kell igazítani, hogy teljesen egyenes legyen, ne legyenek benne pixel lépcsők, mert akkor lesz a legpontosabb a mérés. Ez után kattintsunk az Analyze/Measure gombra. A Results ablak felugrik, ahol sorban kiírja a különböző adatokat a kijelölt szakasról. Nekünk ebből a hossz szükséges, mely azt jelenti, hogy hány pixelt tartalmaz a kijelölt szakasz az elejétől a végéig (lásd **28. ábra**).



28. ábra: A Results ablak és a benne található adatok, melyből a hosszra/Length-re van szükség a kalibráláshoz

Anélkül, hogy bezárnánk a Results ablakot, megnyitjuk a következő képet az előző módszer vagy a File/Open Next paranccsal, és ismét megmérjük a skálát. Ezt addig ismételjük, amíg végig nem érünk az összes képen. Semmiképp ne zárjuk be a Results ablakot!

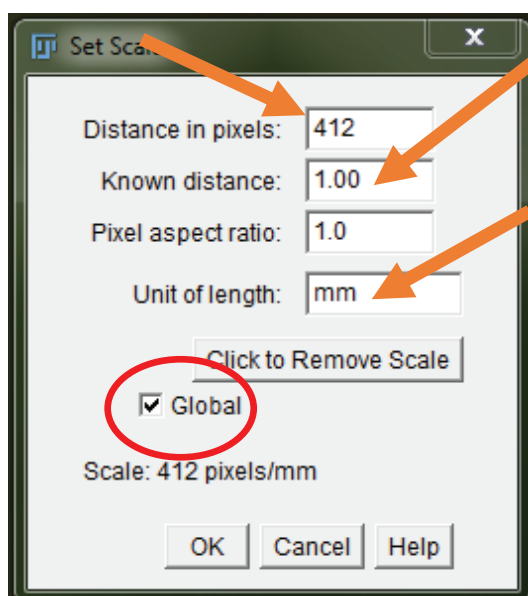
Ha elkészültek a mérések, elmentjük az eredményeket a Results ablakon belül. Először megnyitjuk a Results/Options ablakot. Itt kiválasztjuk a számunkra legkényelmesebb fájl formátumot, talán a legpraktikusabb az .xls, de bármelyik másik használható. Jelöljük be, hogy kérjük az oszlopnevek elmentését, mert ez segíti a későbbi tájékozódást (Copy the column headers). (lásd **29. ábra**)



29. ábra: az eredmények elmentésének beállítása, melynél a fájl formátumot és a Copy column headers-t kell beállítani.

Ha elmentettük, szükségünk van a pixelszám átlagára a Length oszlopból. Ez az átlag megmutatja, milyen hosszú a skálánk a virtuális térben. Fontos megjegyezni, hogy ez a szám csak akkor pontos, ha méréseinket ugyanabban a kameramagasságban és nagyításban végezzük, mint amilyen a kalibrációs időpontban volt. Ha a kamera magasságát megváltoztatjuk, vagy más nagyítást használunk, új kalibrációt kell készítenünk.

Az elemzés előtt be kell állítanunk a program belső skáláját. Nyissunk meg egy képet a programmal (File/Open), ez esetben bármilyen kép megfelel. Utána kattintsunk az Analyze/Set Scale menüpontra, és írjuk be a korábban kapott átlagos pixelszámot a Distance in pixels cellába. Ez után adjuk meg a skálánk valós hosszát a Known distance cellában, majd adjuk meg a méret egységét is a Unit of length cellában. Fontos bejelölnünk a Globalt, mivel enélkül az elemzés nem fog rendesen lefutni, mert ez jelöli, hogy amíg meg van nyitva a program, addig minden képre vonatkozik ez a skála. (beállítást lásd **30. ábra**). Zárjuk be a korábban megnyitott képet.



30. ábra: A Fiji belső skálájának beállítása, a pixelszám bizonyos távolságon, illetve hogy Globálisan minden képre vonatkozik ez a skála

Minden alkalommal, amikor megnyitjuk a Fijit a belső skálát be kell állítani! Ha ezt megtettük, a program készen áll az elemzésre.

Az elemzés elvégzése: A Plug in/Makro/Run menüpontra keressük meg a „CollScope Image analysis.txt” makró fájl elérési útvonalát, és válasszuk ki. Ez után meg fog jelenni egy ablak, amelyben az általunk készített képek főmappáját kell kiválasztanunk, majd a Run gombbal elindítani a mérést. A program elkezd az analízist, és ha végező, egy almappával kiírja, hogy OK, ha minden rendben van, vagy ERRORt, ha hibát talál. A hiba oka lehet a

nem megfelelő számú fájl, a nem megfelelő mappaszerkezet, vagy a speciális karakterek a fájl névben.

Minden befejezett mappa után egy új mappát hoz létre a program a főmappában, melynek neve `r_'elemzett mappa neve'`, mely tartalmazza a nyolc különböző képet. Az elemzett mappa nevével ellátott text fájlt is elhelyezi a főmappában, mely az adott képsorra vonatkozó eredményeket tartalmazza. Ezeket a text fájlokat gyűjtjük össze egy külön mappába. Ez után indítsuk el az R programot, a File/Change dir menüpontban válasszuk ki a mappát, ahol a text fájlokat összegyűjtöttük. Ez után a File/Source R code menüben válasszuk ki a Coll.R script-et. A kódsor létrehozza a size.csv fájlt a text fájlok mellett, mely tartalmaz egy Sample oszlopot a text fájl nevével, amiből az adatot nyerte, egy Mean oszlopot, mely az állat átlagos hosszát tartalmazza, egy Num oszlopot, mely a mérési tartományba eső adatok számát mutatja. Továbbá egy SD és egy SE oszlopot, mely a becsült átlag standard hibáját és a méret adatokból számolt szórást mutatja, illetve egy MIN és MAX oszlopot, mely a méretadatok minimumát és maximumát mutatja.

4. Diszkusszió

4.1 A Trebon növényvédő szerrel végzett kísérlet diszkussziója

Az én kísérleteimben egyetlen generáció esetében sem sikerült kimutatni, hogy akármelyik vizsgált koncentráció hatással lenne a peteszámra. Ez az eredmény ellentmond más vizsgálatok eredményeinek, ahol kimutattak ilyen jellegű hatásokat (AL-ASSIUTY - KHALIL, 1996; CHOI et al, 2008). Ez a különbség adódhat abból, hogy a vizsgálatokban különböző fajokat használtak (*Entomobrya musatica*, *Paronychiurus kimi*), és abból is, hogy ott az ugróvillásokat csoportosan tartották, nem egyedileg.

A szülő generációban (P) a peteátmérőre nem volt hatása a szernek. A kezelést kapott utódoknál volt a szernek peteátmérőt csökkentő hatása. Ez különbözik az előző kísérletemben tapasztaltaktól, ahol a szer a szülő generációban csökkentette a peteátmérőt, az utódoknál pedig növelte (SZABÓ, 2012). A különbség abból adódhat, hogy a korábbi munkában az állatok kezelése más közegben, mesterségesen talajon történt, mostani munkámban pedig aktív szénrel kevert gipszen. Az aktív szén megköthette a Trebon egy részét csökkentve annak hatását. Mivel a két közeg jelentősen különbözött egymástól (a mesterséges talaj járataiba bejuthattak az állatok, az aktív szénrel kevert gipsznek csak a felszínén mozoghattak), ezért az abiotikus tényezők különbségei és a táplálékhoz való hozzáférés eltérései is befolyásolhatták az állatok élettörténetét. Ezek a különbségek is vezethettek az

eltérő eredményekhez. Az, hogy sem a szülőknél, sem a nem kezelt utódok esetén nem volt hatás, de a kezelt utódoknál igen, egy akkumulálódó hatásra utalnak, hasonlóan a phenanthren esetén kimutatott több generációs hatáshoz (PAUMEN et al, 2008).

A szülő generációban a Trebon nem hatott az állatok növekedésére, de az utód generációkban igen. Ez az eredmény felveti a hipotézist, hogy a *F. candida* képes valamilyen módon az utódoknak információt átadni a környezetről (a szülő generációt ért hatásokról), és ehhez igazodik az utódok stratégiája (TULLY- FERRIERE, 2008). Ilyen transzgenerációs hatásra sok példa van különböző fajok esetében (PAUMEN et al, 2008, TRIGGS-KNELL, 2012, WEINHOLD, 2012).

Ez a stratégia flexibilis, így akár egy egyed is képes lehet két szaporodás között megváltoztatni szaporodási stratégiáját. Erre számos példa van az irodalomban, mind egyes gerincesek (REZNICK-YANG, 1993., BASHEY, 2006, KONTIANINEN et al.,2008), mind egyes gerinctelenek (GLIWICZ-GUISANDE, 1992, FOX et al., 1997, FISCHER et al., 2006, ALLEN et al., 2008) esetében. A flexibilitás jelenségét megerősítheti az az eredményem is, hogy a szülő generációban nem volt eltérés az első peterakás időpontjában, de az utód generációkban igen.

Mivel kimutatható volt, hogy a peteszámra nincs hatással a Trebon, viszont a nagyobb koncentrációval kezelt állatoknak kevesebb utódja van, ezért valószínűleg az utódok mortalitása nagy a Trebon jelenlétében. Ezt okozhatja egyszerűen az az ismert tény, hogy a fiatal állatok sokkal érzékenyebbek a káros hatásokkal szemben, mint a kifejlettek (CAMPICHE et al, 2007, SCOTT-FORDSMAND et al, 1999).

HAFER et al. (2011) a táplálék elérhetőség transzgenerációs hatásait vizsgálták a *F. candida* fajon. Az ivarézés időpontjára találtak anyai és nagyanyai hatásokat, mivel azok az állatok, amelyeknek a nagyanyja és az anyja is jó körülmények közt élt, de maga alacsony táplálék ellátottságban részesült, lassabban érte el az ivarérettséget, mint azok az állatok, amelyeknek az anyja és nagyanyja, vagy csak a nagyanyja alacsony táplálékszint mellett élt. Az anyai és nagyanyai környezet az első petecsomó méretét is befolyásolta, mivel amely állatoknak az anyja és a nagyanyja vagy csak az anyja magas táplálékszint mellett élt, az több petét tudott lerakni rossz körülmények közt is azokhoz képest, akiknek a felmenői is rossz körülmények közt éltek. A jó körülmények között élő állatok több petecsomót raktak, és ez szintén erősen javítja a következő generáció petecsomó számát. Bár más paramétereken, de a transzgenerációs hatás kimutatható az én kutatásomban is. Esetünkben, mint HAFER et al (2011) kutatásában is, az eredmények epigenetikai változásokkal, és/vagy a peték összetételének megváltozásával magyarázhatók.

CAMPICHE et al. (2007) az *F.candida* fajon vizsgálták növekedésgátlók hatását a mortalitásra és a juvenilis számra két generáción keresztül. Az én vizsgálatomhoz hasonlóan volt olyan első generációs csoport, amely nem kapott kezelést, és csak a szülői hatások érvényesültek, míg a második generáció esetén teljes mértékig a szülői és nagyanyai hatások érvényesülnek. A fenoxycarb és a methoprene esetén az első és a második generációs utódok dózis-hatás görbéje nagyon hasonló volt a szülőkéhez, annak ellenére, hogy maguk az utódok nem voltak kitéve ezen szerek hatásainak. Egyszerű magyarázatként felvetik, hogy a szülő generáció lecsökkent fitnessze rossz minőségű első generációt eredményez, mely tovább öröklődik a második generációra. Másik magyarázatként felvetik, hogy ezek a szerek felhalmozódhatnak a zsírszövetben, s mivel a peték tartaléktápanyaga nagyrészt lipid, emiatt annak képzésekor ezek az anyagok és rezidumaik is átadódnak a következő generációba. A harmadik magyarázat a már említett epigenetikai változások voltak. Ugyanebben a vizsgálatban a teflobenzuron generációkon átívelő hatását is sikerült kimutatni, azonban ennek a szernek a bioakkumulációjáról nincs adat, így ez esetben kizárható ez a hipotézis.

Összességében a célkitűzésnek megfelelően sikerült a Trebon 10 F növényvédő szernek generáción átívelő hatását kimutatni.

4.2 A MON810-es kukorica fajtával végzett kísérlet eredményeinek diszkussziója

Ha a Bt-toxint tartalmazó kukoricát hat éven át fogyasztó *F. candida* populációk egyedeit közel-izogénes kukoricával kezdjük el táplálni, akkor azok a kísérletünkben gyorsabban nőttek, mint a folyamatosan Bt-toxint, vagy közel-izogénes kukoricát fogyasztó populációk egyedei. Ez a jelenség arra utalhat, hogy a Bt-toxint tartalmazó kukoricával történő etetés alatt az állatokat erős szelekció érte és alkalmazkodtak ehhez a táplálékhoz. A két kukorica vonal N, C és C/N arány értékei nem különböztek jelentősen egymástól (BAKONYI et al. 2006). Ismert viszont, hogy egyes eredmények szerint *CryIAb* toxint termelő kukorica vonal lignin-tartalma magasabb a közel-izogénes vonalénál (SAXENA-STOTZKY, 2001b). Emiatt elképzelhető, hogy a jobban emészthető közel-izogénes vonal etetésével gyorsabban el tudják érni az állatok a maximális méretet.

Az abszolút növekedés a folyamatosan Bt-toxint fogyasztó és a Bt-toxin fogyasztásról közel-izogénes vonalra áttérteknél valószínűleg azért alacsonyabb a folyamatosan közel-izogéneset fogyasztó és a közel-izogénes vonalról a Bt-toxint tartalmazó vonalra áttérteknél, mert a Cry toxin tartalmú táplálék generációkon átívelő hatása csökkentheti a növekedést.

Mivel az közel-izogénes vonalról, a Bt-toxint tartalmazó vonalra áttértékénél még nem tapasztalható eltérés, ezért valószínűleg több generáció alatt akkumulálódik ez a hatás. Azonban, mivel a *F. candida* rövid generációs idejű faj (a generációs idő nagyjából egy hónap), ezért a kukorica tenyészidőszaka alatt több generáció-váltás is történik. PAUMEN et al. (2008) hasonló eredményeket talált phenanthrene esetén, ahol a káros hatások a generációk teltevel felhalmozódtak. HAFER et al. (2011) a táplálékellátottság hatását vizsgálták reprodukciós paramétereken, és ők is arra a következtetésre jutottak, hogy a negatív hatások a generációkon keresztül akkumulálódhatnak.

Marginálisan szignifikánsan volt nagyobb a folyamatosan Bt-toxint fogyasztók peteátmérője a folyamatosan közel-izogénes vonal fogyasztókhoz képest. Előző vizsgálatomban (SZABÓ, 2012) az állatok Trebon növényvédő szerrel történő kezelése az utódoknál szintén növelte a peteátmérőt. Elképzelhető, hogy a *F. candida* a peték jobb tápanyag ellátásával próbálja ellensúlyozni a rosszabb körülményeket, így növelve az utódok túlélését. Ez a peték méretébe való megnövekedett energiabefektetés lecsökkentette az összes peteszámot és a lerakott petecsomók számát. Ezen kívül, azt az összefüggést is sikerült kimutatni, hogy az első petecsomó mérete, annál kisebb, minél több a petecsomók száma. Ez szintén a szaporodásba befektethető teljes energiamennyiség, teljes élethosszon történő elosztására utal. Kimutatható volt továbbá, hogy minél később rakják le az állatok az első petecsomót, az annál nagyobb lesz. Ez a jelenség arra utal, hogy ha az állatnak több ideje van felkészülni a peterakásra, akkor több petét tud lerakni.

A teljes peteszám és az első petecsomó közötti energia elosztás jelensége arra utal, hogy valószínűleg a sokszor, de kevesebb pete lerakása az előnyösebb stratégia. Ez egybevág HAFER et al. (2011) hipotézisével, mely szerint az evolúciósan támogatott stratégia ennél a fajnál valószínűleg a többször kevés pete lerakása.

Bár a kezelésnek a teljes peteszámra nem volt szignifikáns hatása, de egy elég erős trendet azért meg lehetett figyelni. Véleményem szerint, a folyamatosan közel-izogénes vonalat fogyasztók és a folyamatosan Bt-toxint termelő kukoricát fogyasztók azért tértek el a legkevésbé, mert a hosszú idő óta Bt-toxint termelő kukoricával etetett állatok, már kiszelektálódtak, és/vagy alkalmazkodtak ehhez a táplálékhoz. A táplálékváltásos csoportok a trend szerint kevesebb petét raknak. Ez a jelenség amiatt lehet, hogy a közel-izogénes vonalról Bt-toxinos vonalra áttértek még nem alkalmazkodtak a Bt-toxin tartalmú táplálékhoz, de Bt-toxin fogyasztásról közel-izogénes vonalra áttértek szintén nem a megszokott táplálékát fogyasztották. Bt-toxin fogyasztásról közel-izogénes vonalra áttértek nagyobb peteszáma a közel-izogénes vonalról Bt-toxinos vonalra áttértekhez képest valószínűleg amiatt van, hogy a

közel-izogénes vonal fogyasztása előnyösebb, mint a Bt-toxint termelő kukorica vonalé (SAXENA – STOTZKY, 2001b).

Összességében, a célkitűzésnek megfelelően, sikerült egy hosszú távú fogyasztás által okozott hatást kimutatni. A célkitűzésben nem szereplő, de új eredmény, hogy sikerült többféle életmenet-startégiát kimutatni a *F. candida* szaporodásban, aszerint, hogy egy egyed hányszor szaporodik és milyen intenzitással.

4.3 A CollScope módszertani fejlesztésének diszkussziója

A kézi mérések adatai nem különböztek szignifikánsan a CollScope eszközzel mértektől, sem a pontosság ellenőrzésénél, sem a kadmiummal végzett dózis-hatás vizsgálatnál. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a CollScope eszközzel (1) megfelelő mérési pontosságot lehet elérni, (2) az eszköz a gyakorlati életben is jól használható. A módszer alkalmasságát bizonyítja az is, hogy a kétféle módszer adatai alapján kiszámolt EC értékek nem tértek el jelentősen egymástól.

Velünk egy időben nagyon hasonló módszert fejlesztettek ki MALLARD et al. (2013) az ImageJ software-hez. Az ő módszerük a sok állat egyszerre történő mérésére (több, mint száz állat) és megszámlálására alkalmas, míg az általunk kifejlesztett módszer az egyedi követéses vizsgálatokra. Tehát a két módszer kiegészíti egymást, azonban a másik módszer a testméretbecslés pontosságát nem tesztelte rendszerén.

Összességében elmondható, hogy sikerült a célkitűzést teljesíteni, és egy gyors és hatékony módszert kifejleszteni a *F. candida* növekedésvizsgálatának kivitelezésére. A módszer nagy előnye, hogy a mérésekhez szükséges képek elkészítéshez sokkal kevesebb idő kell, mivel a CollScope Shooting Software akár harminc másodperc alatt elkészíti a kívánt képmennyiséget az állatról. További előny, hogy a Fiji CollScope makrója, pár perc alatt az összes kép kiértékelését elvégzi, ezért a kutatóknak nem kell minden képen egyesével elvégezni a méréseket, melyeket a makró igen pontosan kivitelez.

5. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm Seres Anikónak, Ványiné Surman Ildikónak és Weisz Máténak a MON810 vizsgálatban, a peték áthelyezésben és a petés képek elkészítésében nyújtott segítségét. Köszönet illeti Bánszegi Oxánát, Dombos Miklóst, Kosztolányi Andrászt és Virág Tibort a CollScope-nál nyújtott segítségükért. Külön köszönet illeti Bakonyi Gábort, aki minden munkafolyamat megtervezésében és lebonyolításában segédkezett.

6. Összefoglaló

Növekedési vizsgálatok a *Folsomia candida* (Collembola) fajon és a növekedésvizsgálatok módszertanának fejlesztése

Az ugróvillások fontos szerepet töltenek be a talajok anyagforgalmában, ezért érdemes megismerni az inszekticidek rájuk gyakorolt hatásainak különböző aspektusait. Kísérleteimben a Trebon 10 F inszekticid generációkon átívelő hatását vizsgáltam a *Folsomia candida* Willem (Collembola) faj növekedésére és reprodukciójára, valamint a MON810 Bt-toxint termelő kukorica vonal hosszútávú fogyasztásának hatásait vizsgáltam a növekedésre és a reprodukciós paraméterekre. Mivel a növekedésvizsgálatok végzése igen időigényes feladat, ezért céлом volt még egy gyors és effektív módszer kifejlesztése a *F. candida* fajon végzett növekedésvizsgálatokhoz.

A Trebon a szülő generációban és a kezelést nem kapott utódoknál nem csökkentette a peteméretet, míg a kezelést kapott utódoknál igen. Ez arra utalhat, hogy egy (1)¹ akkumulálódó hatásról van szó. A szülők növekedésére nem hatott a Trebon, de mind a két utód generáció növekedésére igen. Ez az eredményem felveti azt a hipotézist (2), hogy a *F. candida* képes valamilyen módon információt átadni az utódoknak az adott környezetről. Ez irodalmi adatok alapján epigenetikai változásokkal és/vagy peteösszetétel változással történhet.

Mivel a Trebon kezelésnek kimutatható hatása nem volt a peteszámra, de a töményebb koncentrációval kezelt állatoknak kevesebb utódja volt, ezért valószínűleg az utódok mortalitása volt nagy (a mortalitást nem mértük), tehát (3) a fiatal állatok sokkal érzékenyebbek. Összességében sikerült egy generációkon átívelő hatást kimutatni a Trebon 10 F esetén.

Ha a Bt-toxint tartalmazó kukoricát hat éven át fogyasztó *F. candida* populációk egyedeit közel-izogénes kukoricával kezdjük el táplálni, akkor azok a kísérletünkben gyorsabban nőttek, mint a folyamatosan Bt-toxint vagy közel-izogénes kukoricát fogyasztó populációk egyedei. Ez a jelenség arra utalhat, hogy (4) a Bt-toxint tartalmazó kukoricával történő etetés alatt az állatokat erős szelekció érte, és alkalmazkodtak ehhez a táplálékhoz. Mivel a Bt-toxint tartalmazó vonalnak magasabb a lignin tartalma, ezért (5) a jobban emészthető izogénes vonal fogyasztása esetén valószínűleg gyorsabban elérhető a maximális méret.

Az abszolút növekedés a folyamatosan Bt-toxint fogyasztó és a Bt-toxin fogyasztásról közel-izogénes vonalra áttérteknél alacsonyabb a folyamatosan közel-izogéneset fogyasztó és a

¹ Zárójelben az új eredményeim számát jelzem.

közel-izogénes vonalról a Bt-toxint tartalmazó vonalra áttértékénél, valószínűleg azért, mert (6) a Cry toxin tartalmú táplálék generációkon átívelő hatása csökkentheti a növekedést. Mivel az közel-izogénes vonalról a Bt-toxint tartalmazó vonalra áttértékénél még nem tapasztalható eltérés, ezért (7) valószínűleg több generáció alatt akkumulálódik ez a hatás.

Sikerült kimutatni több életmenet-stratégiát, aszerint, hogy az állatok egyszer, kétszer vagy többször raknak-e petét. Amennyiben (8) csak egyszer raknak petét, próbálják maximalizálni az utódokba való energiabefektetést már az első peterakásnál. Több peterakás esetén egyenletesen osztják meg energiáikat a peterakások közt.

A növekedés-vizsgálatokra sikerült egy gyors és hatékony módszert a CollScope csomagot kifejleszteni (9), mely a *F. candida* egyedek hosszát képes megmérni. A programcsomag gyorsan elkészíti egy állatról a kívánt mennyiségű képet, és az összes állat képeit képes pár perc alatt kiértékelni.

7. Summary

***Folsomia candida* (Collembola) growth and developing of the growth tests methods**

Collembolan have significant role in the integrating processes of the soils. Consequently, studying different aspects of side-effects of insecticides has a high priority. I was interested in the multigeneration effects of the insecticide Trebon 10 F and the effects of long-term feeding of Bt-toxin producing maize MON810 on the growth and reproduction of the collembolan *Folsomia candida* Willem (Collembola). Measurement of the collembolan body length is time-consuming, that is why I intended to develop a fast and effective method for this purpose.

The insecticide Trebon did not decrease egg size in the parent generation, but treated offsprings had smaller egg size. It may be possible that there is (1)² an accumulating effect of Trebon. Parents' growth was not affected by Trebon, but both offspring generations were affected. It may arise the hypothesis (2), that *F. candida* parents are able to give information from their environment in some way to their offsprings. Previous results suggest that epigenetic changes and/or egg compound changes may explain this result.

Trebon had no detectable effect on egg number, but animals treated with higher concentration had lesser offspring. It supposed that the mortality of offsprings was high (we did not measured offspring mortality), so (3) young animals are more sensitive to pesticide effect. In summary, I was able to detect a multigeneration effect of the pesticide Trebon 10 F.

² Number in parentheses designates my new results

F.candida individuals were fed with Bt-containing maize for six years. Those animals which were fed with near-isogenic line grew faster than those, which consumed Bt-toxin containing or near-isogenic maize line. This result support the hypothesis that (4) during the feeding with Bt-toxin producing maize, animals were under a strong selection and they adapted to that food. Because Bt-toxin producing maize line has a higher lignin content, (5) feeding on near-isogenic maize line helps them to reach their maximal body size faster.

The absolute growth of the animals which continuously fed on Bt-toxin producing maize line and newly near-isogenic line consumers were smaller than the continuously near-isogene line consumers and newly Bt-toxin producing maize line consumers. This is probably because of (6) the multigenerational effects of a Cry toxin containing food which decreases growth. Newly Bt-toxin producing maize line consumers do not have any difference. That is why probably (7) the effect is accumulating.

I detected more life-history trait according to the animal egg laying strategies. If (8) they lay eggs only once during their life, they try investing as much energy as possible in the first egg laying. If they are laying several times eggs, animals are dividing their energy more or less evenly between reproduction periods.

There was developed a fast and effective method, the so called CollScope program, which (9) can measure the body length of the *F. candida* effectively. With the aid of this program it is possible to perform rapidly the proper amount of pictures from an animal and perform the evaluation pictures of all animals in a few minutes.

8. Irodalomjegyzék

- ABRÀMOFF, M. D., HOSPITALS, I., MAGALHÃES, P. J. and ABRÀMOFF, M. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 2004. 11, 36–42 URL: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- AL-ASSIUTY, A. I. M. and KHALIL, M. A. Effects of the herbicide atrazine on *Entomobrya musatica* (Collembola) in field and laboratory experiments. *Applied Soil Ecology* 1996. 4, 139–146
- ALLEN, R. M., BUCKLEY, Y. M. and MARSHALL, D. J.: Offspring size plasticity in response to intraspecific competition: An adaptive maternal effect across life-history stages. *American Naturalist*, 2008. 171. 225–237
- ARONSON, A. I. and SHAI, Y.: Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action, *FEMS Microbiology Letters*, 2001, 195, 1-8
- BAKONYI, G.; SZIRA, F.; KISS, I.; VILLÁNYI, I.; SERES, A. and SZÉKÁCS, A. Preference tests with collembolas on isogenic and Bt-maize. *European Journal of Soil Biology*, 2006, 42, 132–135.
- BÁNSZEGI O, KOSZTOLÁNYI A, BAKONYI G, SZABÓ B and DOMBOS M: New method for automatic body length measurement of the collembolan, *Folsomia candida* Willem 1902 (Insecta: Collembola), *PLOS ONE*, 2014, publikálás alatt: PLOS ONE PONE-D-13-53512R1
- BAUMGARTE, S and TEBBE, C: Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt-toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere, *Molecular Ecology*, 2005, 14, 2539-2551
- BASHEY, F.: Cross-generational environmental effects and the evolution of offspring size in the Trinidadian guppy *Poecilia reticulata*, *Evolution*, 2006. 60. 348-361
- BENGTSSON, G; GUNNARSSON, T. and RUNDGREN, S: Growth changes caused by metal uptake in a population of *Onychiurus armatus* (Collembola) feeding on metal polluted soil, *Oikos*, 1983, 40, 216-225
- BUR ,T., PROBST, A., BIANCO, A., GANDOIS, L. and CROUAU, Y.: Determining cadmium critical concentrations in natural soils by assessing *Collembola* mortality, reproduction and growth, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2010., 73, 415-422

- CAMPICHE, S., L'AMBERT, G., TARRADELLAS, J. and BECKER-VAN SLOOTEN, K.: Multigeneration effects of insect growth regulators on the springtail *Folsomia candida*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007, 67, 180-189
- CHOI, W. I., NEHER, D. A. and RYOO, M. I. Life-history trade-offs of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) populations exposed to paraquat. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008. 69, 227–232
- CLARK, B. W. and COATS, J. R.: Subacute effects of Cry1Ab Bt corn litter on the Earthworm *Eisenia fetida* and the springtail *Folsomia candida*, *Environmental Entomology*, 2006, 35, 1121-1129
- CORTET, J; GRIFFITHS, B. S.; BOHANEK, M; DEMSAR, D; ANDERSEN, M. N.; CAUL, S; BIRCH, A. N. E.; PERNIN, C; TABONE, E; DE VAUFLEURY, A; KE, X. and KROGH, P. H.: Evaluation of effects of transgenic Bt maize on microarthropods in a European multi-site experiment, *Pedobiologia*, 2007, 51, 207-218
- CROUAU, Y. and MOIA, C.: The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in laboratory: An indicator of soil toxicity, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2006, 64, 115-121
- DÁNYI L. ÉS TRAESER GY. 2008.: Magyarország ugróvillásai. [Springtails of Hungary] – IN FORRÓ, L. (ed.): A Kárpát-medence állatvilágának kialakulása. [The origin of the fauna of the Carpathian Basin.] Magyar Természettudományi Múzeum, Budapest, 21-28
- DAMGAARD, C and KJELLSSON, G: Gene flow of oilseed rape (*Brassica napus*) according to isolation distance and buffer zone, *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 2005, 108, 291-301
- DARVAS B. and SZÉKÁCS A: Mezőgazdasági ökotoxikológia. L'Harmattan Budapest 2006. 41, 75-76, 117-139, 143-266
- DE VAUFLEURY, A.; KRAMARZ, P. E.; BINET, P; CORTET, J; CAUL, S; ANDERSEN, M. N; PLUMEY, E; COEURDASSIER, M. and KROGH, P. H.: Exposure and effects assessments of Bt-maize on non-target organisms (gastropods, microarthropods, mycorrhizal fungi) in microcosms, *Pedobiologia*, 2007, 51, 185-194
- DUTTON, A.; KLEIN, H., ROMEIS, J. and BIGLER, F.: Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*, *Ecological Entomology*, 2002, 27, 441-447
- EFSA PANEL ON GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS (GMO): Scientific Opinion on annual Post-Market Environmental Monitoring (PMEM) report from Monsanto Europe

- S.A. on the cultivation of genetically modified maize MON810 in 2011, *EFSA Journal*, 2013, 11(12):3500
- FISCHER, K., BOT, A. N. M., BRAKEFIELD, P. M. and ZWAAN, B. J.: Do mothers producing larger offspring have to sacrifice fecundity?, *Journal of Evolutionary Biology*, 2006. 19. 2. 380-391
- FAO specification and evaluations for agricultural pesticides etofenprox. 2006, http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Etofenprox07.pdf
- FOLKER-HANSEN, P, KROGH,, P. H and HOLMSTRUP, M.: Effect of Dimethoate on body growth of representatives of the soil living mesofauna, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1996. 33, 207-216
- FOUNTAIN, M. T. and HOPKIN, S. P: Continuous monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in metal exposure test, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2001. 48, 275-286
- FOUNTAIN, M. T. and HOPKIN, S.P.: *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod, *Annual review of Entomology* 2005. 50: 201-222
- FOX, C.W., THAKAR, M.S., MOUSSEAU, T.A.: Egg size plasticity in a seed beetle: An adaptive maternal effect. *American Naturalist*, 1997. 149. 149–163
- GLIWICZ, Z. M. and GUISANDE, C: Family planning in *Daphnia*: resistance to starvation in offspring born to mothers grown at different food levels, *Oecologia*, 1992. 91. 4. 463-464
- GOTO, H. E.: Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomologists' Monthly Magazine* 1960. 96. 138-14
- GRIFFITHS, B. S; CAUL, S; THOMPSON, J; BIRCH, A. N. E; SCRIMGEOUR, C; CORTET, J; FOGGO, A; HACKETT, C. A. and KROGH P. H.: Soil Microbial and Faunal Community Responses to Bt Maize and Insecticide in Two Soils, *Journal of Environmental Quality*, 2006, 85, 734-741
- HAFER, N, EBIL, S, ULLER, T and PIKE, N: Transgenerational effects of food availability on age at maturity and reproductive output in an asexual collembolan species. *Biology Letters*, 2011. 7. 5pp. 755-758
- HECKMANN, L. H; GRIFFITHS, B. S; CAUL, S; THOMPSON, PUSZTAI-CAREY, M; MOAR, W. J; ANDERSEN, M. N. and KROGH, P. H.: Consequences for *Protaphorura armata* (Collembola: Onychiuridae) following exposure to genetically modified *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize and non-Bt maize, *Environmental Pollution*, 2006, 142, 212-216

- HILBECK, A; BAUMGARTE, M; FRIED, P. M. and BIGLER, F. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae), *Environmental Entomology*, 1998, 27, 480-487
- HOPKIN S.P. 1997. Biology of Springtails (Insecta: Collembola) Oxford UK, Oxford University Press, 4-6, 142-148
- ICOZ, I; SAXENA, D; ANDOW, D. A.; ZWAHLEN, C. and STOTZKY, G.: Microbial Populations and Enzyme Activities in Soil In Situ under Transgenic Corn Expressing Cry Proteins from *Bacillus thuringiensis*, *Journal of Environment Quality*, 2008, 37, 647-662
- KONTIAINEN, P, BROMMER, J., E, KARELL, P. and PIETIAINEN, H: Heritability, plasticity and canalization of Ural owl egg size in cyclic environment. *Journal of Evolutionary Biology*, 2008. 21. 88-96
- KROGH, P.H.: Toxicity Testing with the Collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the Results of a Ringtest. Danish Environmental Protection Agency, 2008. pp. 44
- LEHEL J. and LACZAY P: Toxikológia az Ökotoxikológus MSc Szak hallgatói számára, Budapest, Szent István Egyetem Állatorvos-Tudományi Kar, 2011, 125-126
- LIU, B; WANG, L; ZENG, Q; MENG, J; HU, W; LI, X; ZHOU, K; XUE, K; LIU, D. and ZHENG, Y.: Assessing effects of transgenic Cry1Ac cotton on the earthworm *Eisenia fetida*, *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41, 1841-1846
- LU, Y; WU, K; JIANG, Y; GUO, Y. and DESNEUX, N.: Widespread adoption of Bt cotton and insecticide decrease promotes biocontrol services, *Nature*, 2012, 487, 362-365
- MAFI, S. A. and OHBAYASHI, N. Toxicity of insecticides to the citrus leafminer, *Phyllocnistis citrella*, and its parasitoids, *Chrysocharis pentheus* and *Sympiesis striatipes* (Hymenoptera: Eulophidae). *Applied Entomology and Zoology*, 2006. 41, 33–39
- MALLARD, F; LE BOURLOT, V and TULLY, T: An Automated Image Analysis System to Measure and Count Organisms in Laboratory Microcosms, *PLOS ONE*, 2013, DOI: 10.1371/journal.pone.0064387, Letöltve: 2014.02.05
- MITSUI CHEMICALS: <http://www.mitsuichemicals.com/trebon.htm>, Megtekintés: 2011.11.22, 2014.01.28
- MOUSSEAU, T. A. and FOX, C. W.: The adaptive significance of maternal effects, *Trends in Ecology & Evolution*, 1998, 13, 403-407

- NURSITA, A. I., SINGH, B and. LEES, E: The effects of cadmium, copper, lead and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta* Tullberg (Collembola), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005., 60, 306-314
- PAUMEN, M. L; STEENBERGEN, E; KRAAK, M. H. S; VAN STRAALEN, N. M. and VAN GESTEL, C. A. M: Multigeneration Exposure of the Springtail *Folsomia candida* to Phenanthrene : From Dose - Response Relationships to Threshold Concentrations, *Environmental Science & Technology*, 2008, 42, 6985-6990
- PINHEIRO J., BATES D., DEBROY, S, SARKAR D and THE R DEVELOPMENT CORE TEAM (2013). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-113.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, 2012, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>
- REZNICK, D. and YANG, A. P.: The influence of fluctuating resources on life history patterns of allocation and plasticity in female guppies, *Ecology* 1993. 74. 2011-2019
- SAXENA, D and STOTZKY G: Bacillus thuringiensis (Bt) toxin released from root exudates and biomass of Bt corn has no apparent effect on earthworms, nematodes, protozoa, bacteria, and fungi in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001a, 33, 1225-1230
- SAXENA D and STOTZKY G.: Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany*, 2001b, 88, 1704-1706.
- SCINDELIN, J ;ARGANDA-CARREREA, I; FRISE, E; KAYNIG, V; LONGAIR, M; PIETZSCH, T; PREIBISCH, S; RUEDEN, C; SAALFELD, S; SCHMID, B; TINEVEZ, J; WHITE, D J; HARTENSTEIN, V; ELICEIRI, K; TOMANCAK, P. and CARDONA, A: Fiji: an open-source platform for biological-image analysis, *Nature Methodes*, 2012, 9, 676-682
- SCHIMMEL, S. C., GARNAS, R. L., JR, J. M. P. and MOORE, J. C. Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC 222,705, benthocarb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1983. 31, 104-113
- SCOTT-FORDSMAND, J. J. , KROGH, P. H. and HOPKIN, S. P: Toxicity of nickel to a soil-dwelling springtail, *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae), *Ecotoxicology and Environmental Safety* 1999. 43, 57-61

- SMIT, C and VAN GESTEL, C: Influence of temperature on the regulation and toxicity of zinc in *Folsomia candida* (Collembola), *Ecotoxicology and environmental safety*, 1997, 37, 213-222
- STAEMPFLI, C., TARRADELLAS, J. and BECKER-VAN SOOLTEN, K.: Effects of dinoseb of the energy reserves in the soil arthropod *Folsomia candida*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007. 68, 263-271
- STERENBORG, I. and ROELOFS, D: Field-selected cadmium tolerance in the springtail *Orchesella cincta* is correlated with increased metallothionein mRNA expression, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2003. 33. 7. 741-747
- STOTZKY, G: Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants, *Plant and Soil*, 2004, 266, 77-89
- SZABÓ BORBÁLA: A Trebon 10 F növényvédő szer hatásai a *Folsomia candida* (Collembola) faj reprodukciójára és táplálékválasztására c. szakdolgozat, *Szent István Egyetem Állatorvostudományi Kar, Biológia Intézet*, 2012, 21-25
- TIMMERMANS, M. J, ROELOFS, T. N. D, MARIËN, J and VAN STRAALLEN, N. M.: Revealing pancrustacean relationships: Phylogenetic analysis of ribosomal protein genes places Collembola (springtails) in a monophyletic Hexapoda and reinforces the discrepancy between mitochondrial and nuclear DNA markers, *BMC Evolutionary Biology*, 2008. 8. 83. p. 1471-2148
- TRANVIK, L; BENGSTON, G. and RUNDGREN, S: Relative abundance and resistance traits of two Collembola species under metal stress, *Journal of Applied Ecology*, 1993, 30, 43-52
- TRIGGS, A. M. and KNELL, R. J: Parental diet has strong transgenerational effects on offspring immunity, *Functional Ecology*, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2435.2012.02051.x ,Letöltve: 2014.03.23
- TULLY, T and FERRIERE, R. :Reproductive flexibility: genetic variation, genetic costs and long-term evolution in a Collembola, *PLoS ONE*, 2008. 3. 9. e3207, 11 oldal, URL: <http://www.plosone.org/article/info:doi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0003207>, Letöltés időpontja: 2011. 02.13.
- WALKER, C. H, HOPKIN, S. P, SIBLY, R. M. and PEAKALL, D. B.: Principles of Ecotoxicology: Third Edition, Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2006., 199, 264-265

9. Nyilatkozatok

HuVetA - SZIA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név:Szabó Borbála.....

Elérhetőség (e-mail cím):.....szbori001@gmail.com.....

A feltöltendő mű címe: Növekedésvizsgálatok a *Folsomia candida* (Collembola) fajon és a növekedésvizsgálatok módszertanának fejlesztése.....

A mű megjelenési adatai:.....

Az átadott fájlok száma:

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédelem PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg (**egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel**):

engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,

a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,

csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak sem milyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 201 . évhónap

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.

TÉMAVEZETŐI NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Bakonyi Gábor kijelentem, hogy Szabó Borbála „Növekedésvizsgálatok a *Folsomia candida* (Collembola) fajon és a növekedésvizsgálatok módszertanának fejlesztése” című szakdolgozatának tartalmát ismerem, azzal egyetértek és védésre javaslom.

Budapest,

.....

Aláírás

Dr. Bakonyi Gábor

Témavezető

TÉMAVEZETŐI NYILATKOZAT

Alulírott Dr. Dombos Miklós kijelentem, hogy Szabó Borbála „Növekedésvizsgálatok a *Folsomia candida* (Collembola) fajon és a növekedésvizsgálatok módszertanának fejlesztése” című szakdolgozatának tartalmát ismerem, azzal egyetértek és védésre javaslom.

Budapest,

.....

Aláírás

Dr. Dombos Miklós

Témavezető