

Szent István Egyetem
Biológiatudományi Doktori Iskola

**Trebon növényvédő szerek transz- és multigenerációs
hatásai *Folsomia candida* Willem 1902 ugróvillásra
(Collembola)**

Szabó Borbála
Doktori értekezés (PhD)

Gödöllő
2019

A doktori iskola

Megnevezése: SZIE Biológiai Tudományi Doktori Iskola

Tudományága: Biológia tudományok

Vezetője: Dr. Nagy Zoltán
egyetemi tanár, DSc
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar,
Növényteni és Ökofiziológiai Intézet

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

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

.....
Dr. Nagy Zoltán jóváhagyása

.....
Dr. Nagy Péter István jóváhagyása

.....
Dr. Seres Anikó jóváhagyása

Ez az értekezés 14 példányban készült. Ez a ... számú példány.

Tartalomjegyzék

Alapfogalmak	i
Rövidítés jegyzék	iii
1. Bevezetés.....	1
1.1 Célkitűzések	3
1.2 Irodalmi áttekintés.....	4
1.2.1 <i>Folsomia candida</i> (Collembola).....	4
1.2.2 Etofenprox	5
1.2.3 A xenobiotikumok által befolyásolt viselkedés	6
1.2.4 Transzgenerációs hatások.....	6
1.2.5 Multigenerációs hatások.....	7
1.2.6 A xenobiotikumok génexpresszióra kifejtett hatása.....	9
1.2.7 Epigenetika az ökotoxikológiában	10
2. Anyag és módszer	12
2.1 A vizsgált növényvédő szerek.....	12
2.2 Modellállat	13
2.3 Standard talajok.....	14
2.4 Pete-paraméterek mérése.....	14
2.5 Trebon 10 F inszekticid dózis-hatás kísérlet	15
2.6 Trebon 10 F inszekticid reprodukciós és táplálékválasztási teszt	16
2.6.1 Statisztika	18
2.7 Trebon 30 EC dózis hatás kísérlet.....	19
2.8 Trebon 30 EC inszekticid több generációs transzkripció vizsgálat	19
2.8.1 Kísérleti alapadatok.....	19
2.8.2 Kezelési csoportok	20
2.8.3 Kísérleti elrendezés	20
2.8.4 RNS kivonás.....	24
2.8.5 RNS minőség ellenőrzés	24
2.8.6 cDNS szintézis	24
2.8.7 Transzkripció analízis.....	24
2.8.8 Statisztika	25
2.9 Trebon 30 EC inszekticid viselkedési teszt.....	27
2.10. Trebon 30 EC inszekticid több generációs életmenet vizsgálat.....	28
2.10.1 Statisztika	30
3. Eredmények.....	31
3.1 Trebon 10 F dózis-hatás kísérlet	31
3.2 Trebon 10 F reprodukciós és táplálékválasztási teszt	31
3.2.1 Trebon 10 F reprodukciós kísérlet	31

3.2.2 Trebon 10 F táplálékválasztás	34
3.3 Trebon 30 EC dózis-hatás kísérlet	35
3.4 Trebon 30 EC több generációs transzkripció vizsgálat	35
3.4.1 Ökotoxikológiai vizsgálatok	35
3.4.2 Génexpresszió	38
3.5 Trebon 30 EC viselkedési teszt	45
3.6 Trebon 30 EC több generációs életmenet vizsgálat	48
4. Diszkusszió.....	56
4.1 Trebon 10 F dózis-hatás kísérlet	56
4.2 Trebon 10 F reprodukciós és táplálékválasztási teszt	56
4.2.1 Trebon 10 F reprodukciós kísérlet	56
4.2.2 Trebon 10 F táplálékválasztási kísérlet	59
4.3 Trebon 30 EC dózis-hatás kísérlet	59
4.4 Trebon 30 EC több generációs transzkripció vizsgálat	60
4.4.1 Ökotoxikológiai vizsgálatok	60
4.4.2 Génexpresszió	61
4.5 Trebon 30 EC viselkedési teszt	65
4.6 Trebon 30 EC több generációs életmenet vizsgálat	66
4.7 Következtetések	68
5. Új tudományos eredmények.....	70
6. Összefoglaló	71
7. Summary	72
8. Tudományos publikációk	73
9. Irodalomjegyzék.....	74
10. Köszönetnyilvánítás	91

Alapfogalmak

Abszolút növekedés: a disszertációban azt az összes hossznövekedést értjük alatta, amit a kísérlet ideje alatt az állat nőtt. Így kiszámolása úgy történt, hogy az állat kísérlet végi méretéből kivontam a kísérlet kezdeti méretét.

Csereviszony (trade-off): két biológiai paraméter negatív kapcsolata, mely során amennyiben az egyik növekszik, úgy az energia és anyag befektetés az első paraméterre fordítódik, tehát a másik paraméter csökken. Ennek oka, hogy az élőlény forrásai végesek. A disszertációban a növekedés és a szaporodás csereviszonyát vizsgálom.

Effektív koncentráció 50% (Effectiv concentration 50%, elfogadott rövidítés: EC50): azon xenobiotikum koncentráció, amely adott mért biológiai paraméterben 50%-os csökkenést okoz a kontroll csoporthoz képest. Ezt az értéket a koncentráció~paraméter által leírt görbéből számolják ki, szokás utána zárójelben megadni a becslés konfidencia intervallumát.

Epigenetika: a DNS kifejeződés megváltozása, a DNS szekvencia megváltozása nélkül. Erre jó példa a DNS metilációs mintázatának megváltozása, vagy a hisztonok funkciós csoportjainak (pl. metil, acetil, foszforil) áthelyezése, kicserélődése.

Epigenetikai variancia: az epigenetikai tényezők változatossága különböző egyed alatti és egyed feletti szerveződési szinteken.

Formuláció: a növényvédő szerek, peszticidek estén az adott hatóanyag eltérő koncentrációban, eltérő segédanyagok kíséretében és fizikai megjelenésben (por, granulátum, vizes oldat, emulzióképző oldat stb.) fordulhat elő. Adott hatóanyag különböző peszticidekben és fizikai formákban való megjelenését eltérő formulációnak nevezik.

Hormézisz: olyan biológiai jelenség, amelynél a pozitív hatás (stressz paraméterek csökkenése, növekedési és reprodukciós paraméterek növekedése) alacsonyabb dózisú expozíciónál jelentkezik, míg nagyobb expozíció esetén ugyanazon hatás stressz vagy mérgezési tüneteket, végül pusztulást okoz. Jó példa az esszenciális cink elem, mely kis mennyiségben serkenti az élőlényt, azonban nagyobb dózisban mérgezést és halált okoz.

Kurtózis: az eloszlás csúcsosságának mértékét jellemző statisztika. A kurtózis a vizsgált minta csúcsosságát egy referencia eloszláshoz, a normális eloszláshoz képest jellemzi. Pozitív kurtózis esetében a vizsgált eloszlás csúcsosabb, mint a referencia eloszlás. Negatív kurtózis esetében az eloszlás laposabb.

Legkisebb hatásos koncentráció (Lowest Observed Effect Concentration, elfogadott rövidítés: LOEC): azt a legkisebb kísérletben használt koncentrációt értik alatta, mely statisztikailag szignifikánsan eltér a kontroll csoporttól az adott paraméterben. Amennyiben nincs ilyen

koncentráció, abban az esetben a legnagyobb használt koncentrációtól nagyobb jelölést alkalmaznak.

Multigeneráció(s): a disszertációban azon csoportokra vonatkozik, amik ugyan azt a kezelést kapták, mint felmenőik.

Multitranszgeneráció: a disszertációban azon esetekre vonatkozik, amik egy multigenerációs vonal után, a leszármazott csoport nem kapott kezelést.

Legnagyobb hatástalan koncentráció (No Observed Effect Concentration, elfogadott rövidítés: NOEC): azt a legnagyobb kísérletben használt koncentrációt értik alatta, mely nem tér el szignifikánsan a kontroll csoporttól. Amennyiben nincs ilyen, akkor a legkisebb használt koncentrációtól kisebb jelölést alkalmaznak.

Szinkronizáció (*Folsomia candida*): a szinkronizáció egy olyan alap eljárás, amikor adult állatokat különítünk el így indukálva a petrakást, majd két nap múlva eltávolítjuk az adultokat. Az így hátramaradó peték egy-két nap különbséggel azonos korúak, szinkronban vannak. Tehát a kísérletben használt állatok egy-két nap különbséggel azonos korúak lesznek.

Transzkripció: a biológiában ez azt a folyamatot jelenti, melyben a DNS bizonyos szakaszáról RNS-másolat készül. A keletkező RNS-ek több csoportba is sorolhatóak. A három legfontosabb csoport az mRNS-ek, a tRNS-ek és az rRNS-ek csoportja. A disszertációban csak a mRNS vagy messenger RNS-sel foglalkozok.

Transzgeneráció(s): a disszertációban azon csoportokra vonatkozik, amiknél a szülő generáció kapott kezelést, de a leszármazottak egyike sem, így kizárólag anyai, illetve epigenetikai hatások figyelhetők meg a csoportokon.

Trend (statisztikai): irányvonalat jelent. Az adott paraméterek összefüggésének irányát jelenti. A disszertációban a szignifikáns főhatásokat nevezem trendnek, mely nem reflektál a kontroll csoporttól való eltérésre.

Xenobiotikum: bármely anyag, amely idegen az élőszervezetek számára. Ide tartoznak a gyógyszerek, a peszticidek és a karcinogén anyagok, de idegen élőlény által termelt toxinok is xenobiotikumnak számítanak.

Rövidítés jegyzék

ABC: ABC-transzporter (ATP-binding-cassette – ATP kötő kazetta)

CYP6N3v2: citokrómoxidáz P450 6N3v2

CYP6N4v1: citokrómoxidáz P450 6N4v1

DNS: dezoxiribonukleinsav

EC50: effektív koncentráció 50% (Effective Concentration 50%)

F1: első utódgeneráció

F2: második utódgeneráció

F3: harmadik utódgeneráció

HSP70: hősokkfehérje 70

IPNS: izopenicillin-N-szintetáz

K: kontroll

LOEC: legkisebb hatásos koncentráció (Lowest Observed Effect Concentration)

M: multigeneráció

MT: multitranszgeneráció

P: szülő generáció

PCR: polimeráz chain reaction

qPCR: kvantitatív Real-Time PCR

RNS: ribonukleinsav

s: megtett út hossza (mm)

SDHA: szukcinil-dehidrogenáz

T: transzgeneráció

t_a : állással töltött idő (sec)

t_m : mozgással töltött idő (sec)

YWHAZ: tirozin-3-monooxigenáz

vit1: vitellogenin fehérje termelő gén

vit2: vitellogeninszerű fehérje termelő gén

vitrec: vitellogenin receptor termelő gén

V: térfogat

v: sebesség (mm/sec)

WHC: vízkapacitás – talaj (Water Holding Capacity)

1. Bevezetés

A növényvédő szerek széleskörű elterjedése maga után vonta olyan nem kívánt mellékhatások létrejöttét is, melyet a korai ellenőrzési technikákkal még nem tudtak kimutatni. Éppen ezért szükségessé vált a nem-célszervezetekkel való kísérletek végzése, mely tevékenység azóta az engedélyezési eljárás kötelező eleme lett Európában (1107/2009/EK, 2009). Minden növényvédő szernek át kell esnie kötelezően giliszta, vízibolha, hal, madár és patkány teszteken. Ezek a vizsgálatok legtöbbször akut tesztek, míg krónikus tesztek csak a gerincesekre kötelező elvégezni. A standard akut vizsgálatok azonban nem alkalmasak a hosszútávú hatások kimutatására (Leon Paumen et al., 2008). Az úgynevezett szubletális tesztekben a mortalitáson kívül a finomabb reprodukciós, illetve életmenet paramétereket is megméri, amik már jobban extrapolálhatóak hosszabb távra is. Ilyenek például az ivarérés (Hafer et al., 2011), a szívritmus (Mäenpää et al., 2009), a növekedés (Odendaal és Reinecke, 1999) vagy a peteméret (Hafer és Pike, 2010). A több generációra kiterjedő, illetve transzkripciós vizsgálatok viszont még nem nyertek teret a kockázatbecslésben, kutatási munkákban azonban már egyre elterjedtebb az alkalmazásuk, melyek sorra fedik fel a generációkkal később jelentkező hatásokat, kihalásokat, rezisztenciát. (Hafer et al., 2011; Leon Paumen et al., 2008; Vandegehuchte et al., 2010; Vandegehuchte and Janssen, 2011) Szükséges lenne tehát a több-generációs kutatások bevezetése a kockázatbecslésbe is.

A piretroidokat elsőként a krizantémfélék virágporából készítették és használták rovarölő szerként. Hatásmechanismusukat tekintve az idegsejtek nátrium, kálium és klór ioncsatornáit támadhatják, egy erős hiperaktivitást okozva, majd az állandósult idegkiszülések végül görcsökhöz vezetnek. Rendszerint ebben pusztulnak el az állatok (Benoit et al., 1986; Rajashekar és Shivanandappa, 2017), de akár fel is épülhetnek ezekből a görcsökből (Alzogaray and Zerba, 1997). Rovarkártevők elleni alkalmazásuk ma is igen jelentős, míg az állandó testhőmérsékletű állatokban gyorsan bomlanak vagy kiválasztódnak, illetve az emlősök idegrendszerét védi a mielinhüvely is, így azokra nem jelentenek veszélyt (FAO, 2006). A Trebon növényvédő szerek, így a Trebon 10 F és Trebon 30 EC egy piretroid hatóanyagú rovarölő szer család tagjai, hatóanyaguk az etofenprox. Gyakori kártevőirtó szerek, használhatók mindenféle termesztett növényen és mindenféle ízeltlábú ellen, a molyoktól a burgonyabogárig. Az etofenprox hatásai igen kevésbé ismert nem célszervezetekre, mint amilyenek például az ugróvillások.

Az ugróvillások világszerte elterjedtek, az óceánok és a tengerek nyílt vizein kívül mindenütt előfordulnak. Jelentős tagjai a lebontó közösségeknek (Hopkin, 1997; Krogh, 2009), továbbá fontos táplálékai a talajlakó ragadozóknak, terjesztik a mikorrhiza gombákat, illetve szabályozzák azok növekedését (Dányi és Traser, 2008; Seres et al., 2007). Hozzájárulásuk a

dekompozícióhoz és a mineralizációhoz igen jelentős (Beare et al., 1992; Coleman et al., 2002; Verhoef és Brussaard, 1990). Meghatározó szerepük van a talaj táplálékhálózatában, annyira, hogy ezzel a közösség szerkezetet is meghatározhatják (Halaj és Wise, 2010; Kaneda és Kaneko, 2008). Emiatt bármilyen mezőgazdasági kezelés, mint például a peszticid kijuttatás, komoly következményekkel járhat rajtuk keresztül is az agroökoszisztémára. Mint nem célszervezetet, és a talaj életében jelentős állatcsoportot, érdemes tehát megvizsgálni őket ökotoxikológiai szempontból.

Az ugróvillások nagyon gyakran használt tesztállatok, standard (ISO, 1999; OECD, 2009) és nem standard tesztekben egyaránt. Utóbbiakban vizsgálják az állatok mortalitását és reprodukciós paramétereit (peteméret, peteszám, petealak) (Szabó és Bakonyi, 2017), ivarérését és petecsomóit (Hafer et al., 2011), valamint viselkedését (Szabó et al., 2018) a különböző xenobiotikumok hatására. Ezen tesztek az általános paraméter különbségeket és a dózis-hatás görbéket, illetve azok nevezetes pontjait (EC10, EC50, LOEC, NOEC) veszik alapul a toxicitás meghatározásához. Az ökotoxikológiában egyre gyakrabban elemzett szubletális hatások tekintetében az ugróvillásoknál általában a növekedést és a reprodukciós sikert vizsgálják (Bur et al., 2010; Crouau és Moïa, 2006; Folker-Hansen et al., 1996; Fountain és Hopkin, 2001; Nursita et al., 2005; Scott-Fordsmand et al., 1999; Staempfli et al., 2007). Más végpont lehet még például az előbbieken kívül lipidek és fehérjék aránya (Staempfli et al., 2007) vagy különböző gének transzkripciójának mértéke (Nota et al., 2008). A generációkon átívelő hatás jelentős tényező, hiszen ha több generáció fitneszét is rontjuk a szülőket ért szubletális hatásokkal, akkor az egyszeri szennyezésnél súlyosabb károkat okozhatunk a populációkban. Például megfigyelték állatoknál és növényeknél is, hogy a szülőt ért stresszhatások befolyásolhatják az utódok fejlődését és életmenetét, azon környezeti hatások mellett, melyek az utódokat érik (Hafer et al., 2011; Mousseau és Fox, 1998).

Az ugróvillások közül a legnépszerűbb ökotoxikológiai tesztállat a *Folsomia candida*, mert szemben a többi ugróvillás modellel, mint például a *Folsomia fimetaria* vagy az *Orchesella cincta*, szűznemzéssel szaporodik és nagyon könnyen tartható laboratóriumban (Driessen et al., 2007; Krogh et al., 2008). Ennek köszönhetően a generációkon átívelő ökotoxikológiai hatások vizsgálatára kiválóan alkalmas. Hafer et al. (2011) például a táplálék elérhetőség hatásait vizsgálták három generáción keresztül *F. candida* fajon. Kimutatták, hogy anyai és nagyanyai hatások is befolyásolják az életmenet-stratégiát, az ivarérés idejét és a peteszámot. Hasonló eredményt kaptak Campiche et al. (2007), akik növekedésgátló inszekticidekkel (methoprene, fenoxycarb, teflubenzuron, precocene II) kezelték a *F. candida* fajt és kimutatták, hogy szignifikáns növekedés van a mortalitásban, illetve csökkenés az utódok számában a második utódgenerációban, amennyiben teflubenzuron vagy methoprene a hatóanyag.

Verhoeven és Preite (2014) összefoglalója szerint az epigenetikai variancia különösen fontos az aszexuális vagy kis mozgásképességű szervezetek esetén, mivel a természetes varianciát generáló mechanizmusok a partenogenezis vagy a magas beltenyésztettség miatt nem működnek. Azonban az epigenetikai variancia részlegesen átveheti a variancia generáló szerepet. Mivel a *F. candida*, mint partenogenetikus szaporodású, mind pedig kis mozgásképességű faj (Hopkin, 1997), ezen modellállat esetén fontos lehet figyelembe venni az epigenetikus mintázatokat is.

1.1 Célkitűzések

Az etofenprox hatóanyagú növényvédő szerek hatásait föld felett élő állatokon már többször vizsgálták és számos esetben találtak káros mellékhatásokat nem célszervezeteken (Barros et al., 2015; Beloti et al., 2015; Souza et al., 2014). Talajállatokra vonatkozó publikált adatok azonban eddig nem álltak rendelkezésre. Ezért vizsgálataim során ki szerettem volna deríteni, hogy két elterjedten használt növényvédő szer, a Trebon 10 F és Trebon 30 EC milyen módokon befolyásolja a *Folsomia candida* (Collembola) ugróvillás faj életmenet tulajdonságait (beleértve bizonyos viselkedési paramétereket is) és egyes, kapcsolódó génexpressziós jelenségeket. Mivel a generációkon átívelő hatások igen kevésbé kutatottak az ökotoxikológiában, viszont jelentőségüket egyre inkább felismerik, fel kívántam deríteni az életmenet tulajdonságok változásainak egyes transz- és multigenerációs vonatkozásait is. Eredményeim hozzájárulnak a Trebon 10 F és Trebon 30 EC molekuláris és ökológiai hatásmechanizmusainak jobb megismeréséhez, és elősegíthetik ezeknek a növényvédő szereknek az okszerű használatát is.

Céljaim részletezve a következők voltak:

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

1.2 Irodalmi áttekintés

1.2.1 *Folsomia candida* (Collembola)

Az ugróvillások, azaz a Collembola rend, így a *Folsomia candida* Willem 1902 faj is a Hatlábúak törzsébe (Hexapoda) tartozik, így közeli rokona a rovarok rendjének (Timmermans et al., 2008). A Collembola renden belül az Isotomidae családba tartozik, melyre jellemző a fejlett furca (ugróvilla) (Fountain és Hopkin, 2005). Emiatt a *F. candida* faj zavarás hatására ugrik, az állatok szétszélednek (Krogh, 2009). Az állat maga 1,5-3 mm hosszú, enyhén sárgás színű (Fountain és Hopkin, 2005), potroha oldalán fehér folt sorral. Vak, euedafikus életmódú, alapvetően gombafogyasztó (Fountain és Hopkin, 2005; Hopkin, 1997). Kozmopolita elterjedésű, szerves-anyag gazdag talajokban mindenütt előfordul (Krogh et al., 2008), így a mezőgazdasági talajokban is. Ezáltal a mezőgazdasági kezelések, mint a peszticidek, gyomirtók és műtrágyák hatással lehetnek a *F. candida* fajra.

Az *F. candida* szabályozhatja a mikrobio faunát, ugyanis a fiatal állatok baktériumokat fogyasztanak (Bakonyi, 1989), míg a felnőtt egyedek a mikorrhiza gombák legelésével szabályozhatják annak növekedését, és terjeszthetik a mikorrhiza gombákat (Gange, 2000; Klironomos és Kendrick, 1995; Seres et al., 2007). Az ugróvillások alapvetően közepes denzitásban kedvezőek a mikorrhiza gombának (Bakonyi et al., 2002; Gormsen et al., 2004), mert serkentik annak növekedését és a kompetáló szaprofita gombák legelésével is kedvez nekik (Gange, 2000; Klironomos és Kendrick, 1995). Ez a tipikus haranggörbe azzal is magyarázható, hogy a növekedés stimulálása mellett a nitrogén és foszfor mineralizációjában is nagy szerepet játszanak, mely szintén kedvez a növény- mikorrhiza kettősnek (Gange, 2000; Klironomos és Kendrick, 1995). Az a hipotézis is fennáll, hogy a hifavégek legelésével, a gomba a hifát elágazva regenerálja, mely segíti a terjedést, illetve a mineralizációban a nagy mennyiségű ürülékkel vesz részt (Gange, 2000).

Gyakran használt modellállat számos ökotoxikológiai standard (pl. mortalitási és reprodukciós teszt (OECD, 2009) vagy az elkerülési teszt (ISO, 2011) és nem standardizált tesztben is (Krogh, 2009), mivel egyszerű laboratóriumban tartani (nem igényel különleges táplálékot csak sütő élesztőt) és könnyen szaporítható (Fountain és Hopkin, 2005; Hopkin, 1997; Krogh, 2009). Könnyű szaporításának oka a rá jellemző *Wolbachia* fertőzés (Hopkin, 1997). A *F. candida* esetén már obligát feltétele a szaporodásnak a *Wolbachia*, fertőzés szimbiózis szintű a kapcsolat (Pike és Kingcombe, 2009). A baktérium hiányában az állatok képesek normális méretű petecsomókat rakni, de azok nem kelnek ki. Tehát a *Wolbachia* fertőzésnek a petefejlődésben van szerepe az *F. candida* fajnál (Timmermans és Ellers, 2009). A fertőzés indukálta szűznemzés esetén mindig nőstény egyedek keletkeznek, mivel a *Wolbachia* baktérium nem fér el a spermiumban csak a petesejtben (Hopkin, 1997). Ezt igazolja az is, hogy a *F. candida* fajnál

nagyon ritkán találtak laboratóriumokban hím egyed (1:10 000 hím:nőstény arány) (Krogh, 2009).

A *F. candida* szaporodása önmagában igen variábilis, a pár darabtól a 62,8 átlagos peteszámot át (Krogh, 2009) az általam tapasztalt 150-200 pete/egyed értékig bezárólag bármilyen számú petét lerakhat (saját megfigyelés). A legjobb szaporodási sikert 21°C tartási hőmérséklet mellett lehet elérni, bár 15°C-on több petét raknak, de azok fejlődése hosszabb időt vesz igénybe ezen alacsony hőmérsékleten (Fountain és Hopkin, 2005). Ugyan nincsen szeme az állatnak, de konstans sötétben több petét raknak, így valószínűsíthető, hogy egyfajta fotoreceptorral rendelkeznek (Fountain és Hopkin, 2005). A *F. candida* szaporodása szorosan összekapcsolódik a vedléssel, mert szaporodó és nem-szaporodó stádiumok váltakoznak a vedlésekkel (Fountain és Hopkin, 2005).

1.2.2 Etofenprox

A piretroidok széleskörben használt peszticidek, mind a mezőgazdaságban, mind a ház körül előforduló kártevők ellen. Gyorsan felszívódnak és kifejtik a hatásukat a rovarok idegrendszerére. Kezdetben hiperaktivitást (Isman, 2006), majd bénulást és mozgáskoordinációs zavarokat okoznak az idegsejtek nátrium-csatornáinak tartós nyitottságának következtében. Ezt egy viszonylag gyors, úgynevezett „knock-down” folyamatnak hívjuk (Schleier III és Peterson, 2011). Részleteket lásd lentebb az 1.2.3. fejezetnél.

Az általam vizsgált növényvédő szerek, a Trebon 10 F és Trebon 30 EC (Mitsui Chemicals, Inc.) a széles körben használt piretroid inszekticid családba tartoznak, melyeket számos országban, főleg Ázsiában használnak. A hatóanyaguk az etofenprox (2-(4-etoxifenil)-2-metilpropil-3-fenoxibenzil-éter). A Trebon 10 F 100 g/L 10 m/m% hatóanyagot, míg a Trebon 30 EC 287,5 g/L 30 m/m% hatóanyagot tartalmaz. Az etofenprox felezési ideje 49,1-100 anaerob és 27,5 nap aerob körülmények között (22°C), mezőgazdasági talajok esetén (Vasquez et al., 2011). Erősen kötődik a talajszemcsékhez (EU, 2013). Különböző zöldségek, gabonafélék, gyümölcsök és dísznövények esetén javasolt a használata. Kínában az etofenprox a legfontosabb hatóanyag a káposztalepke (*Pieris brassicae*), a rizs kabóca (*Nilaparvata lugens*), illetve a gyapottok bagolylepke (*Helicoverpa armigera*) ellen (Zhang et al., 2013). Ez a hatóanyag az USA-ban is használatos citrus ültetvényeken (Boina és Bloomquist, 2015), Iránban szúnyogirtásra (Vatandoost et al., 2004) és Nyugat-Afrikában gyapottok bagolylepke ellen (Martin et al., 2002). A nem célfajokra gyakorolt mellékhatásai kevésbé ismertek. Szabóméhek esetén egy vizsgálat kimutatta, hogy igen toxikus az etofenprox (LD₅₀ 0,051 µg/méh) a légzésszámból mért stressz mértéke alapján (Piccolomini et al., 2018). Vízi, folyami ökoszisztéma kísérletben már a legkisebb koncentráció 0,04 µg/L 6 órás expozíciója után 9 nappal csökkentette a *Cloeon simile* kérész átalakulását (66% csökkenés) és az *Asellus aquaticus* (Isopoda) víziászka táplálkozási rátáját (44% csökkenés)

(Wieczorek et al., 2018). Alacsony a toxicitása az emlősökre (Yoshimoto et al., 1989), de nagyon toxikus a vízi élőlényekre nézve (ECHA, 2012), mint a szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*), a naphal (*Lepomis gibbosus*) (LC₅₀ 0,032 mg/L, 96 h, mindkét fajra), illetve mint a *Daphnia magna* (LC₅₀ 0,0027 mg/L, 48 h) (Certis, 2015).

Multi- vagy transzgenerációs vizsgálatok, illetve transzkripciós vizsgálatok nem ismertek etofenprox tartalmú növényvédő szerről.

1.2.3 A xenobiotikumok által befolyásolt viselkedés

A piretroidok által a rovarok idegrendszerére kifejtett knock-down hatást főleg olyan kártevőkön vizsgálták intenzíven, mint a szúnyogok (Liu, 2015; Lukwa et al., 2012), házilégy (Sawicki, 1962), készletbogarak (Toews et al., 2003), sáskák (Clements és May, 1977) és a vérszívó *Triatoma infestans* poloska (Alzogaray és Zerba, 1997). Más fajokon nem igazán ismeretes a hatás. Az etofenprox neurotoxin jellegű hatása miatt bizonyítékot találtak a viselkedés befolyásolására a *Doru luteipes* fülbemászó fajnál, (Campos et al., 2011), a házi méhnél (*Apis mellifera*) (Matsumoto, 2013), a *Riptortus pedestris* poloskafajnál (Maharjan és Jung, 2015) és az *Aedes aegypti* szúnyog esetén (Agramonte et al., 2017). Látható, hogy ez esetben is a kártevőkre, illetve a házi méhre, mint egyik legfontosabb nem célszervezetre koncentráltak a vizsgálatok.

Folyamatosan ismételt peszticid alkalmazás esetén felléphet a knock-down rezisztencia, emiatt ugyanannak a peszticidnek eltérő lehet a knock-down hatása egy faj különböző populációira. Ez a probléma különösen fontos a szúnyogirtás esetén, ahol piretroidokat hosszú időn keresztül ismételten használnak (Lukwa et al., 2012).

Mivel az etofenproxot olyan inszekticidek is tartalmazzák, amiket a szántóföldekre is kiszórnak, emiatt az ugróvillások peszticid kitettségének nagy a valószínűsége. Ráadásul az etofenprox hatásának neurotoxikus jellege miatt valószínűsíthetőek a viselkedést befolyásoló mellékhatások az ugróvillások esetén is. Más, hasonlóan talajszennyezéseket hatását kutató vizsgálatok szerint a *F. candida* ugrási képessége szignifikánsan lecsökkent a talaj réz és nikkel szennyezésének növekedésével (Kim és An, 2014). Alacsony kiszórási értékek mellett (az ajánlott dán kiszórási érték egynegyed és egynyolcad mennyisége) a Dimethoate inszekticid 400 g/L, EC (aktív hatóanyag: dimethoát) növelte a *F. candida* fordulási rátáját és az átlag sebességét 36 órás kísérletben (Sørensen et al., 1995).

1.2.4 Transzgenerációs hatások

Az irodalomban a transz- és multigenerációs hatásokra többféle fogalom is létezik, melyek eltérhetnek egymástól. Jelen tézisben a Skinner (2008) által használt fogalmakat használom, azaz a transzgeneráció(s) kifejezést akkor alkalmazom, amikor csak a szülők kaptak kezelést és az

utódok tiszta környezetben éltek, közvetlen inszekticid hatás nélkül. A multigeneráció(s) kifejezést akkor használom, amikor mind a szülők, mind az utódok ugyanazt a kezelést kapták.

A környezeti tényezők transzgenerációs hatásai az utóbbi évtizedekben kezdtek el érdekelni az ökológusokat (Bossdorf et al., 2008; Ledón-Rettig et al., 2013; Whitham et al., 2006). Ezek a hatások akár epigenetikai folyamatok eredményei is lehetnek, melyek a fenotípus nem genetikai megváltoztatását jelentik (Youngson és Whitelaw, 2008). A *Drosophila melanogaster* légy esetében például, amikor a szülő populációt hőmérséklet változásnak tették ki, az befolyásolta a hím utódok territoriális sikerét és fitneszét (Gilchrist és Huey, 2001; Zamudio et al., 1995). A *Plodia interpunctella* moly súlyát és az immunrendszer reakciókészségét a szülők által fogyasztott táplálék minősége határozta meg (Triggs és Knell, 2012). A *Daphnia magna* vízibolha esetén kimutatták, hogy a ragadozók képesek transzgenerációs hatásokon át indukálni az erősebb védekező képletek kialakulását, mellyel a ragadozó-préda rendszert is megváltoztatják (Agrawal et al., 1999). A *Protophormia terraenovae* légyfajnál kadmiummal szennyezett táplálék fogyasztása az immunrendszert aktiválta. Ez a hatás a következő generációban, mely csak tiszta táplálékot fogyasztott, szintén mérhető volt (Pölkki et al., 2012). A hőmérséklet és az elektromos mező mellett az *Ephestia kuehniella* lisztmoly szülő generációjának lítium ionoknak való kitettsége a csápok megrövidülését okozta a következő öt moly generációban (Pavelka és Koudelová, 2001). A burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata*) utódai kisebb felnőtt súlyt, magasabb lipid tartalmat és alacsony metabolikus rátát mutattak, ha a szüleiket alacsony koncentrációjú deltametrinnel kezelték (Piiroinen et al., 2014). Az Engeo Pleno® (lambda-cihalotrin és tiametoxam) és Tracer® (spinosad) inszekticidek alkalmazása a *Trichogramma galloi* parazitoid darázsfaj szülő generációján csökkentette az átalakulási rátát és a nőstények arányát a peték között az F1 generációban (Costa et al., 2014). Transzgenerációs kísérletek transzkriptom vagy metilációs minta mérésével igen ritkák a gerinctelenek esetében. A *Daphnia magna* cink expozíciója után két generációval a kezeletlen utódok DNS metilációs szintje csökkent (hipometiláció), míg a növekedés gátlás csak egy generációig terjedt ki (Vandegehuchte et al., 2010).

Hafer et al. (2011) *F. candida* fajjal végzett kísérletében felfedték, hogy a szülő generáció számára biztosított táplálék elérhetősége befolyásolta az F1 és F2 generáció első petecsomó méretét és az ivarérettség idejét. A metoprén és a teflubenzuron, két rovar növekedésgátló szer, a kezelés után két generációval is lecsökkentette a *F. candida* juvenilis számát, úgy, hogy az utódok nem találkoztak a vegyszerekkel (Campiche et al., 2006).

1.2.5 Multigenerációs hatások

Az ugyanazon szennyező anyagnak való hosszú távú kitettség gyakori jelenség a környezetben, különösen a lassan bomló xenobiotikumok alkalmazásának, illetve a peszticidek ismételt

kiszórásával járó mezőgazdasági gyakorlat következtében. A krónikus expozíciónak több multigenerációs hatása is lehet és potenciálisan megváltoztathatja a közösség szerkezetét és/vagy az ökoszisztéma funkciókat (Marvin-DiPasquale et al., 2000). Emiatt a multigenerációs hatások nem csak a kutatók számára érdekesek, de a huzamos ideig fennálló szennyezések hosszútávú hatásának ismerete közérdek, és a hatóságok (EPA, EFSA) számára is fontos információ.

A levegővel és a vízzel szemben, a talajban a szennyező anyagok eloszlása és mozgása korlátozott. Ráadásul a talajállatoknak tipikusan kicsi a diszperziós képességük, emiatt nem tudják a szennyezett területeket elhagyni (Hopkin, 1997). Több kutatást is végeztek olyan talajállatokkal, mint a földigiliszták (Andre et al., 2009; Hertel-Aas et al., 2007), a fonálféreg (Contreras et al., 2013; Schultz et al., 2016), talajlakó bogarak (Mozdzer et al., 2003) és az ugróvillások (Bakonyi et al., 2011), melyek eredményei jól mutatják a multigenerációs kísérletek fontosságát. Az *Enchytraeus crypticus* televényféreg multigenerációs réz kitettsége esetén az utódoknál az egyedsűrűség és a koncentráció között olyan interakció alakult ki, mely a szülő generációban még nem volt jelen. Így nagyobb egyed sűrűség esetén kisebb volt a toxicitás (Menezes-Oliveira et al., 2013). Tíz generáción át tartó nano ezüst és ezüst-nitrát kitettség a *Caenorhabditis elegans* szenzitizációját okozta. A későbbi generációkban a reprodukció erősebb csökkenést mutatott, mint az elsőben (Schultz et al., 2016).

F. candida tíz generáción keresztül, folyamatosan ki volt téve fenantrénnek, egy policiklus aromás szénhidrogénnek (Leon Paumen et al., 2008). A negyedik generáció után drasztikus változások következtek be, a nagyobb koncentrációkkal kezelt csoportok kihaltak, míg a kisebb koncentrációk esetén rezisztensek lettek. Két neonikotinoid vegyületet, az imidaklopridot és a tiaklopridot tesztelték a *F. candida* fajon (van Gestel et al. 2017). Az imidakloprid esetén a túlélés és a reprodukció egyértelmű multigenerációs hatást mutatott, míg a tiakloprod esetén az LC50 és EC50 értékek megnöttek F1 és F2 generációban a szülő generációhoz képest. Azonban egy 41 generáció időtartamú kísérletben, amikor a *F. candida* fajt réznek tették ki, két koncentrációban jelentősen megnőtt mortalitást, a méreteloszlás megváltozását és a metallothionein gén emelkedett expresszióját tapasztalták (Amorim et al., 2017). A multigenerációs ezüst expozíció késleltette a peterakást a *F. candida* fajnál (Mendes et al., 2018). Oliveira et al. (2018) az emberi gyógyszerhatóanyagoknak, mint a karbamazepin és a fluxetin multigenerációs kitettségének negatív hatásait találta az *F. candida* fajra, mint például a megváltozott fényelkerülést, emelkedett mortalitást és csökkent reprodukciót. Négy éven keresztül Bt-toxin termelő kukoricával etetve a *F. candida* fajt, megváltoztak az életmenet (life-history) paraméterei (nagyobb peték, nagyobb növekedési ráta) az izogénes párjával etetett csoporthoz képest (Szabó et al., 2017).

1.2.6 A xenobiotikumok génexpresszióra kifejtett hatása

A környezeti stresszorok, mint az inszekticidek, aktiválhatják, de csökkenthetik is bizonyos gének átíródását. A kontrolltól eltérő génszabályozás tulajdonképpen a homeosztázis zavarának korai indikátora. A stressz egy jelzője lehet, mivel a génszabályozás megváltozása elér a fehérje átíródásig és a bioszintézis környezeti válaszáig. A szerves anyagok biotranszformációja során az I. fázis az oxidációt és az egyszerűbb kötések hasítását foglalja magába, amit általában monooxigenázok vagy az ahhoz hasonló citokrómoxidázok végeznek (citokrómoxidáz P450, CYP enzimek) (Guengerich, 2001). Ez megmagyarázza, miért aktiválják egyes xenobiotikumok, mint a fenantrén, a citokrómoxidáz kódoló géneket (Holmstrup et al., 2014; Nota et al., 2009).

A lebontás során keletkező metabolitok sokszor reaktív oxigén gyököket (ROS) termelnek, amik az antioxidáns rendszert is aktiválják (Nota et al., 2009). Például a glutation-S-transzferáz expresszióját serkentik a szennyező anyagok, hogy a glutation bioszintézist fokozzák, ami kelátokat képez a reaktív metabolitokkal, így inaktíválva őket (II. fázis). Ezután általában az utolsó fázis a metabolit-glutation komplexek sejtből való eltávolítása, ami történhet ATP-kötő kazettás transzporterekkel (ATP-binding cassette, ABC transporters) (Sillapawattana és Schäffer, 2017; van Straalen és Roelofs, 2011). Így például a *F. candida* fenantrén kitétsége aktiválja az ABC-transzporter gén átírását (Nota et al., 2009).

A hősokk fehérjék (HSP) az általános stresszválasz részei, mind a környezetből eredő stresszre, mind a xenobiotikumok által okozott stresszre (Sørensen et al., 2003). A megemelkedett HSP szint megemeli a *Drosophila melanogaster* élettartamát (Sarup et al., 2014). Az optimális tartományon kívüli hőmérsékletre a *F. candida* a HSP gén aktivációjával reagál (de Boer et al., 2010; Nota et al., 2010; Waagner et al., 2012, 2010), míg a fenantrén és a szárazságstressz együtt additívan emelte a HSP gén átírását (Holmstrup et al., 2014).

A vitellogenin és vitellogenin-szerű fehérje alacsonyabb expressziója jele lehet a reprodukcióra gyakorolt káros hatásnak, mint ahogy a szubletális szulfoxafloz koncentráció lecsökkentette a vitellogenin expressziót és az *Apolygus lucorum* (Miridae) reprodukciós rátáját (Zhen et al., 2018). Hasonlóképpen zebra-dánióban (*Danio rerio*) a csökkent vitellogenin expresszió, lecsökkent reprodukcióval párosult benzo[a]pirén kitétségnél (Hoffmann és Oris, 2006). Bár a vitellogenin és a vitellogenin-szerű fehérje főként a reprodukcióban játszanak szerepet, azonban antioxidánsként is funkcionálhatnak. Méhek esetében ezáltal növelhetik az élettartamot (Corona et al., 2007; Park et al., 2018). A méhkirálynők mind hosszú életűek, mind termékenyek, míg a dolgozók, melyek ugyanazon genommal rendelkeznek, rövid életűek és sterilek. Az öreg királynők sokkal magasabb vitellogenin expressziót mutatnak, mint a dolgozók és ellenállóbbak az oxidatív stresszel szemben is (Corona et al., 2007).

A magas koncentrációjú xenobiotikumok érzékennyé tehetik a *F. candida* ugróvillást a fertőzésekre, ami az antibiotikum termelő géneket átírását aktiválhatja (Chen et al., 2015; Nota et

al., 2009). Valószínűleg ez esetben a stressz miatt az állatnak kevesebb energiája lesz az immunrendszerbe való fektetésre a detoxifikáció miatt, majd a fertőzés fellépésekor az antibiotikum termelő gének aktiválódnak.

1.2.7 Epigenetika az ökotoxikológiában

Az epigenetika egy jelenleg rosszul definiált kifejezés, ami sok jelentést hordoz magában (Bird, 2007). Viszonylag széleskörűen elfogadott a következő egyszerű megfogalmazás, miszerint az epigenetika azokkal a génexpresszió során bekövetkező és öröklődő változásokkal foglalkozik, amelyek nem járnak a DNS-szekvencia megváltozásával (Deans és Maggert, 2015; Ho és Burggren, 2010). Az utóbbi években az epigenetikai folyamatokra egyre több figyelem irányult (Head et al., 2012; Vandegehuchte és Janssen, 2014, 2011). Ökotoxikológiai epigenetikai hatásokat találtak számos gerinces (Anway et al., 2005) és gerinctelen modell állaton (Campiche et al., 2007; Collotta et al., 2013; Costa et al., 2014; Szabó et al., 2017). Az inszekticidek transzgenerációs és multigenerációs epigenetikai hatásainak vizsgálatai növekvő aggodalomra adnak okot, mert a környezeti kockázatbecslés hiányosságaira mutatnak rá (Shaw et al., 2017). A szakirodalomban található bizonyítékok arra utalnak, hogy a klasszikus genetikai mechanizmusok mellett a transzgenerációs epigenetikai öröklődés is fontos szerepet játszhat populációdinamikai folyamatokban (Uller, 2008), egyes növény-növényevő interakciókban (TerHorst és Lau, 2012), a biodiverzitás megváltozásában (Bonduriansky et al., 2012), és kémiai anyagok populációkra gyakorolt hatásaiban (Bickham et al., 2000).

A táplálékélelérhetőség és a tápláltsági állapot például epigenetikai változásokat indított el a háziméh (*Apis mellifera*) egyedfejlődésben és fenotípusában, tehát ettől függ hogy dolgozó vagy királynő fejlődik ki (Kucharski et al., 2008). Valamint a közönséges fülbemászóban is (*Forficula auricularia*), amikor az anyai táplálékélelérhetőséggel egyező körülmény növelte az utód túlélését (Raveh et al., 2016). Bingsohn et al. (2016) azt találták, hogy a kukorica-kisliszttogár (*Tribolium castaneum*) megfelelő korai indikátora a gyógyászati termékek transzgenerációs epigenetikai hatásainak, mivel az epigenetikai regulátor gének transzgenerációsan aktiválódtak.

A metilációs mintával foglalkozó vagy transzkriptom méréseket alkalmazó transzgenerációs epigenetikai vizsgálatok ritkák a gerinctelenek esetében. A *Daphnia magna* DNS metilációs szintje lecsökkent cink kitettség hatására két generációval a kezelés után is, míg a növekedés csökkenés csak a kezelés után egy generációra terjedt ki (Vandegehuchte et al., 2010).

Az epigenetikai hatások különösen fontosnak tűnnek az aszexuális élőlények esetén, mivel azok nem tudnak élni a meiózis adta rekombinációval. Így az epigenetikai folyamatok egy bizonyos mértékig átvehetik a variációt generáló funkciókat, melyek szexuális szaporodás hiányában kiesnek (Verhoeven és Preite, 2014). Ugyanakkor helytűlő vagy alacsony mobilitású élőlények esetén hasznos lehet az információ átadása a szülő környezetéről (Salinas et al., 2013;

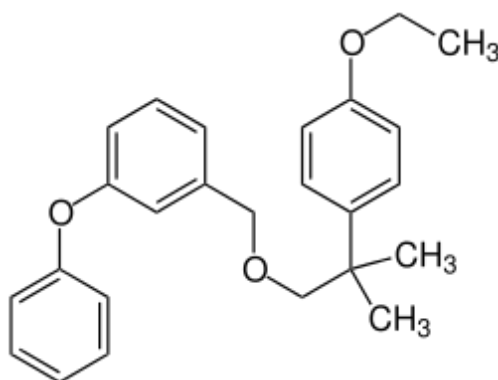
Verhoeven és Preite, 2014). A *F. candida* ugróvillás minden fenti feltételnek megfelel, hiszen szűznemzéssel szaporodó, talajlakó ízeltlábú (Fountain és Hopkin, 2005), ami euedafikus, tehát alacsony mobilitású faj (Hopkin, 1997). Az epigenetika fontosságát alátámasztják az irodalmi adatok is ennél a fajnál, mert több nála tapasztalt jelenség a klasszikus fenotípus-genotípus rendszerben nem magyarázható meg. Például a kísérletek hatalmas varianciája egy klónozó, tehát egy genotípussal rendelkező állatnál nem lenne lehetséges, ha csak nincs egy köztes variancia szint, az epigenetikai variancia. Ezt jól példázzák a OECD 232 számú ugróvillás reprodukciós és mortalitás teszt előtti körteszt eredményei, ahol ugyanazon populáció egyedeit, ugyanazon nehézfém adaggal és ugyanazon eszközökkel kezelték különböző laboratóriumokban (ring-teszt), mégis az eredmények igen variábilisak voltak (Krogh, 2009), tehát több fenotípust találtak. Ez ráadásul csoportos variancia, mely nagyobb mint az egyéni variancia. Az egyedileg tartott állatokkal végzett kísérletekben még nagyobb varianciára lehet számítani (Szabó et al., 2017; Szabó és Bakonyi, 2017). Mivel az epigenetikai mintázat rugalmas, újraírható, ugyanakkor örökíthető a következő generációba, emiatt ugyanabból a genotípusból több fenotípust is képes generálni (Salinas et al., 2013; Verhoeven és Preite, 2014). Ez a hipotézis megmagyarázza a *F. candida* fajjal végzett kísérletek varianciáját és megoldja az egy genotípus - több fenotípus paradoxont. A hipotézist alátámasztja a Tully és Potapov (2015) által leírt magas intraspecifikus variancia (klónvonalakon belül is), ami az öröklődő jelleget érintette. A fenti indokok miatt az epigenetikán keresztül, nem csak a klónvonalak közötti, de az egyedek közötti szelekció is érvényesülni tud a *F. candida* esetén.

Ha nem vesszük figyelembe az epigenetikai hatásokat, akkor is van az anyai hatásoknak varianciája. Mivel lehetetlen tökéletesen egyforma körülmények között nevelni minden egyedet, emiatt különbségek lehetnek az anyai hatásokban és az egyedek tulajdonságaiban. Végül, még variancia generáló tényező lehet az állatok különböző metagenomja. Mivel a *Wolbachia* egy baktérium, emiatt új tulajdonságokat akár plazmidokon vagy mutáción keresztül is gyorsan szerezhethet, amik kihathatnak a fertőzött egyedre. Ráadásul nem kontrollálható, hogy az állatok hány baktériumot tartalmaznak, ami szintén kihathat a fertőzött állatra. Emiatt nagy a valószínűsége, hogy az állatok metagenom szinten különböznek. Tehát annak ellenére, hogy a *F. candida* egy szűznemzéssel szaporodó állat, az eredmények értelmezésénél számolni kell a szelekcióval. Bár egyelőre úgy tűnik, hogy a *F. candida* fajnál nem találtak metilációs mintát (Noordhoek et al., 2018), azonban a tarnszkriptom analízis jól mutathatja az állatok megváltozott epigenetikai státuszát. A *F. candida* genomja elég jól ismert (Faddeeva-Vakhrusheva et al., 2017), ami előnyössé teszi genetikai, epigenetikai tesztekben a használatát.

2. Anyag és módszer

2.1 A vizsgált növényvédő szerek

Az etofenprox (2-(4-ethoxyphenyl)-2-methylpropyl 3-phenoxybenzyl éter, 1. ábra) hatóanyagot 1979-ben kezdték fejleszteni a japán Mitsui vállalatnál (Yoshimoto et al., 1989). Mára az ezt tartalmazó növényvédő szereket kiterjedten használják az egész világon (WHO, 2011). Ez a vegyület egy piretroid, erősen lipofil, állandó testhőmérsékletű állatokban gyorsan bomlik, és UV fényre is érzékeny (FAO, 2006). Hatását az axonikus idegvégződés nátrium ioncsatornáin fejti ki, tartós ingerületet létrehozva (FAO 2007).



1. ábra: Etofenprox szerkezeti képlet

Doktori munkámban két etofenprox hatóanyagú növényvédő szert, a Trebon 10 F és a Trebon 30 EC készítmény hatásait vizsgáltam. A Trebon 10 F növényvédő szert széles-körben használták 2015-ig, gyümölcsösök, kalászosok, kukorica és út menti fák védelmére. Ezután jelent meg a Trebon 30 EC nevű szer, amit Magyarországon almatermésűekre, burgonyára és cukorrépára alkalmaznak. Mindkét növényvédő szerre ugyanazon tulajdonságokat tüntette fel a gyártó. Főként az almamolyok, aknázómolyok, lepkehernyók, atkák, színkabócák és levélfogyszó bogarak, mint növényi kártevők ellen javasolt. Pontosabban következő kártevők ellen ajánlottak: *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*, *Eurygaster sp.*, *Scirtotrips dorsalis*, *Empoasca onukii*, *Lymantria dispar*. A talajban nem mosódnak ki az alsóbb rétegekbe, ám vízi élőlényekre erősen mérgezőek (MitsuiChemicals, 2008). Bomlási félidejük 7-21 nap aerob talajban (MitsuiChemicals, 2008).

2.2 Modellállat

Modellállatnak a *Folsomia candida* (Collembola) fajt választottam, mivel széles körben elterjedt a Föld szervesanyagban gazdag talajaiban, és fontos szerepet tölt be számos életközösségben, a talajok anyagforgalmában (Fountain és Hopkin, 2005; Krogh et al., 2008). A törzstenyészet a Szent István Egyetem Állattani és Állatökológiai Tanszék laboratóriumából származott (2. ábra). Az általunk tenyésztett *F. candida* a 'Berlin' klónvonalba tartozik. A tenyészetet 9 cm átmérőjű és 1 cm magasságú Petri csészében tartottam, melynek alján aktív szénrel kevert gipsz (1:10:10 aktív szén-gipsz-víz térfogat arány) volt elhelyezve kb. 0,5 cm magasságban (Goto, 1960). Ez esetben a páratartalom közel 100% a Petri csészékben. A tenyészetet $20\pm 0,2$ °C-on termosztátban tartottuk, és instant szárított élesztővel tápláltuk hetente egyszer ad libitum. Az állatokat teljes sötétségben tartottuk. A vizsgálatokat ugyan ezen termosztátban, ugyan ilyen körülmények között végeztük el.

A Trebon 30 EC OECD teszt és transzkripciós vizsgálatát Amszterdamban, a Vrije Universiteit, Department of Ecological Science nevű tanszékén végeztem, ahol a tesztállatok tartása eltért a fent említettől. Az ottani tenyészetet 16 ± 2 °C-os klímakamrában tartottam, műanyag dobozban, mely alján körülbelül 1 cm vastagságban aktív szénrel kevert gipsz volt (1:10 tömegarány). A kamra fény/sötét ciklusa 12/12 óra, relatív páratartalma 75% volt. A szinkronizáció, amikor az adult állatokat különítünk el így indukálva a petrakást, majd két nap múlva eltávolítjuk az adultokat. Az így hátramaradó peték egy-két nap különbséggel azonos korúak, szinkronban vannak. Tehát a kísérletben használt állatok egy-két nap különbséggel azonos korúak lesznek.

A szinkronizáció egy 20 ± 2 °C-os klímakamrában történt a fent leírt műanyag doboz típusban, 12/12 órás fény/sötét ciklussal. A kísérletek is a szinkronizációs körülményekkel megegyező, de elkülönített klímakamrában folytak. Az állatokat szárított instant élesztővel etettük (Algist Bruggeman N.V, Ghent, Belgium) ad libitum.



2. ábra: *F. candida* modellállat és petecsomója (Saját fotó)

2.3 Standard talajok

A dózis-hatás kísérletekben és a Trebon 10 F reprodukciós kísérletben, illetve a Trebon 30 EC transzkripciós vizsgálatban alkalmazott talajok a következő paramterekkel bírtak:

OECD talaj: A Trebon 10 F inszekticiddel végzett kísérletben standard OECD talajt használtam (OECD, 2009). Ez 74% kvarchomokot, 20% kaolint, 5% tőzeget és a pH beállításához ~1% CaCO₃-t tartalmazott. A talaj vízkapacitását az OECD (2009) szabvány alapján határoztam meg. Ezzel a módszerrel kiszámítva, a talaj vízkapacitása 18,22% lett, ami a használt 30 g talaj esetén 5,5 ml víz hozzáadását jelent.

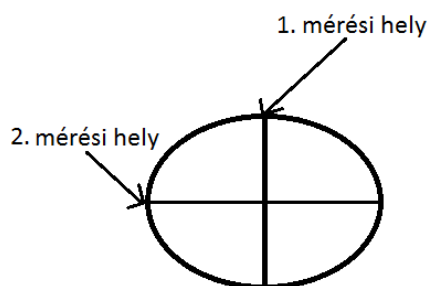
A mesterséges talaj pH-értékét Mettler Toledo Education Line műszerrel ellenőriztem. Négy-négy gramm mesterséges talajt raktam 3 kémcsőbe, melyet 2 nappal a teszt előtt előnedvesítettem 6 ml 1 M KCl oldattal. Az előnedvesítés után minden kémcsövet 5 percig Vortex-szel összeráztam. Ezután két nap ülepités következett. A pH-mérőt behelyeztem a kémcsőbe és megvártam, míg a kijelzőn fél percig nem változik a pH-érték. Ezt az értéket tekintettem a végleges pH-nak. A három értéket átlagoltam. A pH megfelelőnek bizonyult (pH = 7,29), így nem igényelt a talaj kalcium-karbonáttal vagy szerves savakkal történő pH korrekciós kezelést.

LUFA talaj: A Trebon 30 EC növényvédő szerrel LUFA 2.2 (Lufa Speyer, Germany) talajon végeztem az előzetes kísérleteket. A talaj adatlapja szerint ez egy vályog talaj $1,59 \pm 0,13\%$ szervesanyag tartalommal, a pH-ja $5,4 \pm 0,2$ 0,01 M CaCl₂ oldatban mérve. Vízkapacitása (WHC) $43,5 \pm 2,8\%$ a száraz súlyának. Tehát 30 g nedves talaj eléréséhez 5 ml oldatot kellett a talajhoz adni.

2.4 Pete-paraméterek mérése

A kísérletek során a peték térfogatának és pete alakját (átmérőinek arányát) minden kísérlet esetén azonos módon mértem le és számítottam ki. A gipszen lévő petéket egy nedves ecsettel finoman szétterítettem, majd sztereomikroszkóp alá tettem és mikroszkópra csatlakoztatható kamerával lefényképeztem. A 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 (Schneider et al., 2012) végeztem. A pete legnagyobb és legkisebb, egymásra merőleges átmérőjét mértem meg. A mérési pontok az 3. ábrán láthatóak.

A peteátmérőkből kiszámoltam a peték térfogatát prolét szferoid (orsószferoid) képlettel ($V = 4/3 \pi \times a \times b^2$, amiben „a” a hosszabb átmérő, „b” pedig a rövidebb átmérő (Satterly, 1960)). A statisztikai modellekben mindig a térfogat köbgyökét használtam, hogy az adatok normális eloszlást kövessenek. Ahol a peteátmérők arányát használtam, ott a hosszabb átmérőt osztottam a rövidebb átmérővel, így az arány mindig 0 és 1 közötti szám volt.



3. ábra: Petén végzett mérések helye

2.5 Trebon 10 F inszekticid dózis-hatás kísérlet

Ezt a kísérletet az OECD ugróvillás reprodukciós teszt (OECD, 2009) alapján végeztem, annyi változtatással, hogy az expozíciós idő nem 28 nap, hanem 20 nap volt, mivel ennyi a Trebon 10 F inszekticid bomlási félideje. A fent specifikált OECD talajt használtam.

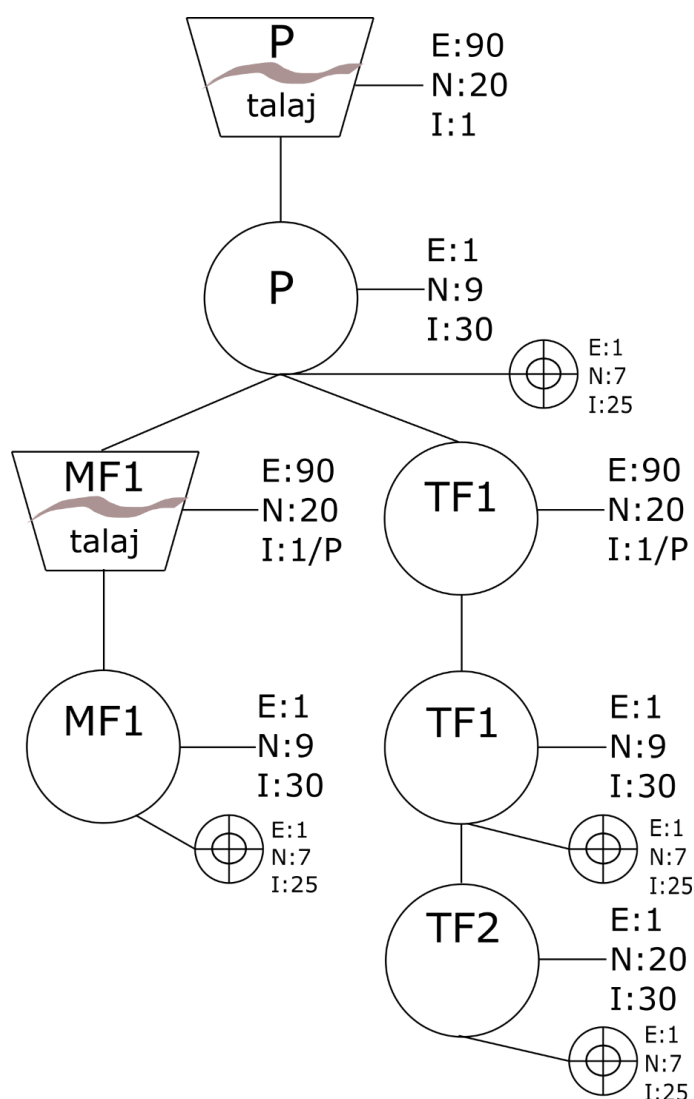
Nyolc Trebon 10 F koncentrációt (V/V) teszteltem, 1,8 szoros hígítási léptékkel, az OECD előírás alapján. Minden koncentrációból öt ismétlést alkalmaztam, a kontroll esetében pedig tízet (duplakontroll az OECD előírás alapján). Az OECD tesztben alkalmazott nyolc koncentrációt úgy számoltam ki, hogy a kalászosokra kiszámolt 2,85 ml szer/L víz koncentrációt tekintettem középső értéknek. A hígítási sorba beleestek a kalászosokra és a fákra és gyümölcsösökre javasolt koncentrációk is. Így a nyolc koncentráció a következő volt, ml Trebon 10 F/L víz koncentráció értékben megadva: 0,489; 0,882; 1,58; 2,85; 5,13; 9,23; 16,6 és 29,9 ml/L. Ennek megfelelően a hatóanyag koncentráció a talajban 10,96; 19,73; 35,52; 63,94; 115,09; 207,17; 372,9 és 671,22 mg/kg volt.

Harminc gramm nedves, adott koncentrációjú Trebon 10 F növényvédő szerrel alaposan összekevert mesterséges talajra raktam edényenként 10-10 darab 10-12 napos állatot. A műanyag edények mérete a következő volt: magasság 5 cm, alapátmérő 5,3 cm és felső átmérő 6,6 cm (100 ml térfogat). Az expozíciós idő 20 nap volt. A kísérlet a tenyészetekkel megegyező körülmények között, azonos termosztátban folyt. Az edényeket hetente egyszer felnyitottam etetés és levegőztetés céljából. Az expozíciós idő végén az edényeket vízzel árasztottam el, óvatosan összekevertem a talajjal és megszámláltam a felszínre felúszó adult és juvenilis állatokat. A teszt során csak az élő állatok úsznak fel, mivel csak azok tartalmaznak levegőt, ebből kismolható az adultak mortalitása, illetve a juvenilis szám. A LOEC és EC50 értéket a ToxRat programmal számoltam ki (ToxRat®Solutions.Gmbh, 2015). A koncentráció hatását a mortalitásra és a juvenilis számra általános lineáris modellel R Statisztikai programmal elemeztem (R Core Team, 2017).

2.6 Trebon 10 F inszekticid reprodukciós és táplálékválasztási teszt

A dózis-hatás kísérlet eredményei alapján és a gyümölcsösöknél és a fáknál használatos ajánlott koncentrációt figyelembe véve a 0,882 ml Trebon 10 F/L koncentrációt választottam további munkára. Az előbb említett átlagos koncentrációval, a tizedével és a tízszeresével egy szülő-utódgenerációra kiterjedő (1) reprodukciós és (2) táplálékválasztási kísérletsorozatot végeztem.

A reprodukciós és táplálékválasztási tesztben faktoriális kísérleti elrendezést alkalmaztam (4. ábra). Minden kezelésben (koncentrációnál és generációnál) három végpontot mértem. Végeztem egy táplálékválasztási tesztet (1), peteszámlálást (2) és petemérést (3) is.



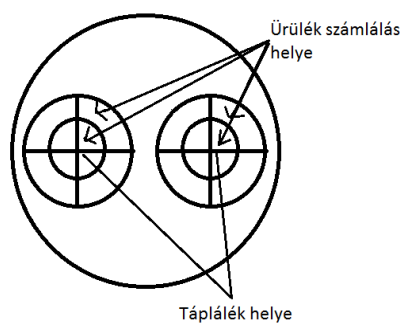
4. ábra: A Trebon 10 F inszekticid kísérleti elrendezése. Az állatok minden kezelésben és a kontrollban is így voltak kezelve. Trapéz: műanyag doboz, talajjal töltve, csapvízzel vagy oldattal keverve. Kör: Petri csésze aktívszenes gipsszel. Célkereszt: táplálékválasztási Petri csésze. E: egyedszám edényenként. N: edényben eltöltött napok száma, I: ismétlésszám. P: szülő generáció, MF1: kezelt utódgeneráció/multigeneráció, TF1: nem kezelt utódgeneráció/transzgeneráció, TF2: nem kezelt második utód generáció/ transzgeneráció

A reprodukciós tesztben mind a három koncentráció esetében 90 darab, 10-12 napos állatot raktam Trebon 10 F inszekticiddal kevert standard OECD talajra. Itt 20 napig tartottam az állatokat. Egy kontroll, szernélküli csoportot is tartottam vízzel kevert mesterséges talajon. Húsz nap után a talajt óvatosan kiborítottam egy nagy Petri csészére és a rögöket óvatosan szétválasztva kerestem meg az állatokat. Véletlenszerűen kiválasztottam 30 egyedet minden koncentrációból. Kiraktam őket aktív szenes, gipszes Petri csészékbe (lsd. fent). Egy Petri csészébe egy állat került, mindegyik Petri csésze egyedi azonosítót kapott. Az átrakással indukáltam a peterakást (Hopkin, 1997). Az állatokat instant élesztővel tápláltam.

A 9. napon a Petri csészékben lévő petéket szétterítettem majd sztereomikroszkóp alá tettem (Olympus SZH10) és mikroszkópra csatlakoztatható Olympus C7070 widezoom fényképezőgéppel és Olympus C5060 ADL optikával lefényképeztem és lemértem a peték átmérőjét a 2.4-es fejezetben leírtak szerint.

A kezelt szülőgenerációból 25 egyedet válogattam a táplálékválasztási tesztbe, illetve a kikelő utódok közül is válogattam 25 egyedet, ugyancsak a táplálékválasztási tesztbe. A szülő (P) generációnak volt egy nem kezelt, kontroll csoportja. Illetve az utódgenerációban (F1) volt egy Petri csészén nevelt (F1;0P) kontroll a nem kezelt csoportokhoz és egy talajon nevelt kontroll csoport (F1;0T) a kezelt csoportok kontrolljaként.

A táplálékválasztási tesztet mini Petri csészékben végeztem, amelyek átmérője 4 cm és magassága 1 cm volt. A Petri csészébe egy réteg nedves szűrőpapírt helyeztem a páratartalom fenntartására, illetve egy, a táplálékok helyét kijelölő nedves papírt (5. ábra). Táplálékkul Zamora kukoricafajta levéldarálékát és a tenyészetekben szokásos táplálékukat, az instant élesztőt kapták az ugróvillások. A kétféle táplálékot a kísérlet elején a 5. ábrán látható helyekre helyeztem el, és a kísérlet kezdetén az állatot a Petri csésze közepére tettem be, hogy egyenlő eséllyel juthasson el mindkét táplálék típushoz. Egy Petri csészében egy állat volt egy hétig, majd a jelölő körökön belül lévő ürülékeket megszámláltam tápláléktípusonként (Bakonyi et al., 2011).



5. ábra: A táplálékválasztási teszt: a táplálék helye (belső kör területe) és az ürülék számlálás helye (külső kör területe)

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

Az utódgenerációval végzett kísérletben így nyolc csoportom volt. Azok a csoportok, amelyeknek a szüleit és magukat is különböző koncentrációjú növényvédő szerrel kezeltem és azok a csoportok, amelyeknek a szüleiket kezeltem, őket magukat nem. Ezen kívül egy Petri csészében és egy talajon nevelt kontroll csoportot is vizsgáltam. Az előzőeken kívül végeztem még a nem kezelt első generációs állatok utódaival egy táplálékválasztási kísérletet, annak érdekében, hogy kiderítsem, két generáció elég-e a növényvédő szer hatásának megszűnéséhez.

2.6.1 Statisztika

A táplálékválasztási kísérlet eredményeit páros t-próbával elemeztem, kétoldali hipotézissel (Bakonyi et al., 2011). Minden egyedről feljegyeztem, hogy mennyi ürülékkel találtam az élesztő és a kukorica táplálékforrás mellett. Ezt az adatot használtam a próbához. Így megkaptam, hogy az egyed melyik élelmet preferálta, illetve a két táplálék közötti különbségekre, kísérletenként egy-egy konfidencia intervallumot állapítottam meg, továbbá az átlagos különbség nagyságát a két táplálékforrás mellett talált ürülék szám között.

A szülőgeneráció által rakott peték számának és méretének elemzése több modell segítségével történt. A koncentrációk logaritmusba kerültek a modellbe, mint magyarázó változó. A peteszám összefüggését a kezeléssel Wilcoxon-Mann-Whitney rang próbával vizsgáltam a reziduális deviancia instabilitása miatt.

A petetérfoghat tesztelésénél a modellben a koncentráció és a peteszám hatását teszteltem. Mivel egy Petri csészéből tíz petét mértem le, ezért feltételeztem, hogy az adatok nem függetlenek. A függetlenség problémájának kiküszöbölésére kevert lineáris modellt használtam az nlme csomagból (Pinheiro et al., 2013). Az egyedek azonosítóját használtam random hatásnak, mert ez mutatja meg, hogy azonos Petri csészéből származnak a peték. A kevert 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 függetlennek tekinthetők.

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 kevert lineáris modellel elemeztem, a koncentráció függvényében. Ezzel megkaphatjuk, hogy van-e valamilyen hatása a szernek az átmérők arányára.

2.7 Trebon 30 EC dózis hatás kísérlet

A tesztet az OECD ugróvillás reprodukciós teszt szerint végeztem el, LUFA 2.2 talajon (OECD, 2009). A kísérlet hossza 28 nap volt. Hét koncentrációt használtam, kétszeres hígítási léptékekkel. Minden koncentrációból öt ismétlést alkalmaztam, a kontroll esetében tízet. A Trebon 10 F inszekticid hatásából kiindulva hasonló hígítási koncentrációkat állítottam be. A hét koncentráció a következő volt, ml szer/L vízként megadva: 0,410; 0,819; 1,64; 3,28; 6,56; 13,11 és 26,22 ml/L. Hatóanyag koncentráció a talajban: 23,44; 46,88; 93,75; 187,5; 375; 700; és 1500 mg/kg volt. A kétszeres léptéket a technikailag egyszerűbb, hígítási sorral való előállítására indokolta.

Harminc gramm nedves, Trebon 30 EC inszekticiddel kevert mesterséges talajra raktam edényenként 10-10 darab 10-12 napos állatot. A használt üvegek 150 ml térfogatúak voltak. Az expozíciós idő 28 nap volt. Az edényeket hetente egyszer felnyitottam és pótoltam az elpárologt vizet, illetve a 14. napon etettem az állatokat. Az expozíciós idő végén az edényeket vízzel áraszottam el, óvatosan összekevertem a talajjal és megszámoltam a felszínre felúszó adult és juvenilis állatokat. A koncentráció hatását a mortalitásra és a juvenilis számra általános lineáris modellel, R Statisztikai programmal (R Core Team, 2017) elemeztem.

2.8 Trebon 30 EC inszekticid több generációs transzkripciós vizsgálat

2.8.1 Kísérleti alapadatok

A következő koncentrációkat használtam a kísérletben 107, 179, 299 és 500 mg etofenprox hatóanyag / kg száraz LUFA talaj és egy kontroll csoport, amit ionmentesített vízzel nedvesítettem (hatóanyag koncentráció a talajban: 1,87; 3,13; 5,23; és 8,74 ml/L). A koncentrációkat a Trebon 30 EC inszekticiddel végzett dózis-hatás teszt alapján állítottuk be, úgy hogy az 50% effektív koncentrációnál (EC_{50}) hígabb és töményebb koncentrációt is alkalmazunk. Minden Trebon 30 EC inszekticid oldatot egymástól függetlenül készítettem el. A talajt használat előtt 12 órával kevertem be a Trebon 30 EC inszekticid oldatokkal. Minden oldatot alaposan összekevertem a

talajjal, hogy homogén fázist érjek el. Ezután egy vegyifülke alatt hagytam az edényeket 12 órára, hogy az illó melléktermékek elpárologhassanak. Így a terepi viszonyokat is szimuláltuk, ahol a naftalin szabadon elpárologhat, míg ez a kísérletünkben alkalmazott zárt tesztedényekben nem lenne lehetséges. Használat előtt a talajok víztartalmát korrigáltam. 30 g nedves talaj került egy üvegcsébe (5 ml oldat és 25 g száraz talaj). A kontroll csoportban tíz ismétlés volt, míg öt ismétlés volt a kezelt csoportokban.

2.8.2 Kezelési csoportok

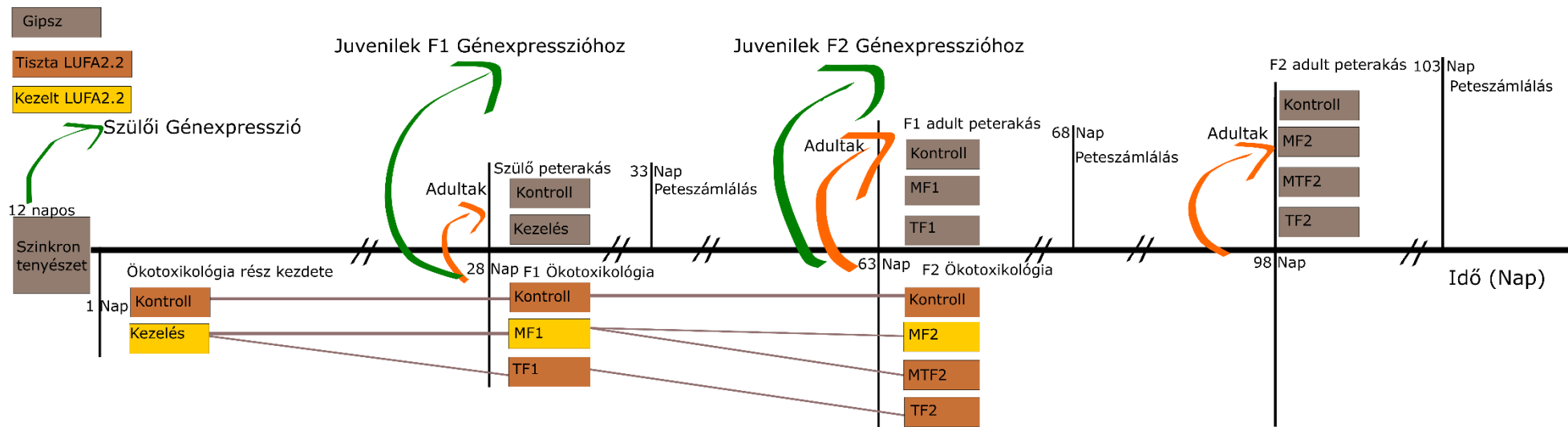
Az első generációban (P) egy kontroll csoportot és négy koncentrációval kezelt csoportot állítottam be (kísérleti elrendezést 6. és 7. ábrán ábrázoltam). Az állatok 10-12 naposak voltak minden generáció megkezdésekor. A második generációban (F1) egy kontroll (K), egy multigenerációs (MF1) és egy transzgenerációs (TF1) csoportot állítottunk be. A multigenerációs csoportban az ugróvillások kezelt talajba kerülnek. A transzgenerációs csoportban az ugróvillások tiszta talajba kerülnek (csak a szülőket ért kezelés koncentrációjának lehet rájuk hatása). A juvenil állatokat a szülői (P) generációból úgy nyertem ki, hogy elárasztottuk a talajt, majd egy szitával lemertem az állatokat a vízfelszínről. Az így kinyert állatok random kerültek vagy a multigenerációs (kezelt talaj) vagy a transzgenerációs (tiszta talaj) csoportba. A harmadik generációban (F2) fenntartottam a kontrollt és beállítottam a TF1 kezelés juvenil egyedeiből egy transzgenerációs csoportot (TF2). Az F1 multigenerációs juvenilis állatokat további két csoportra osztottam. Egy továbbra is multigenerációs csoportra (kezelt talaj, MF2) és egy multitranszgenerációs csoportra (tiszta talaj, MTF2).

2.8.3 Kísérleti elrendezés

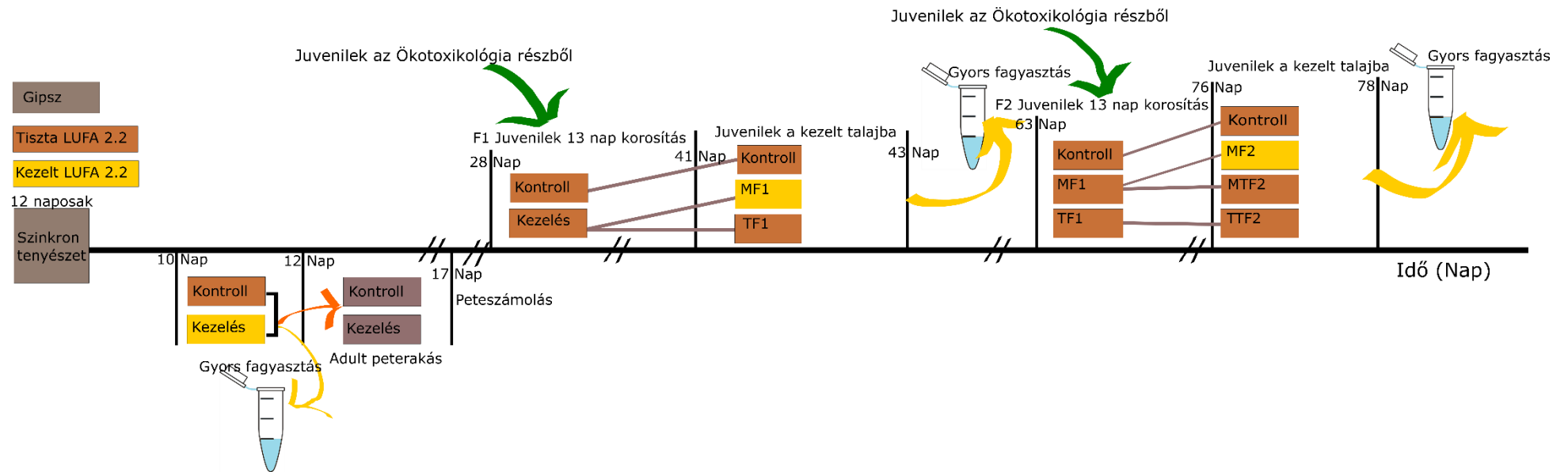
Az ökotoxikológiai rész kísérleti elrendezése a 6. ábrán, míg a génexpressziós rész a 7. ábrán látható. Az ökotoxikológia részben a P generáció 28 napig volt a talajban, majd az adult és a juvenil állatokat megszámloltam. Öt adult állatot egy gipszes műanyag edénybe tettem öt napra, így indukálva a peterakását. Öt nap után az adult állatokat eltávolítottam és a szétterített petecsomókról digitális fotót készítettem. Megszámloltam a petéket. Véletlenszerűen kiválasztottam egyedenként tíz petét, a legrövidebb és a leghosszabb átmérőket mértem le a petetérfogat kiszámolásához (Image J, Schneider et al. 2012). A petetérfogatot a prolét szferoid térfogat képletével számloltam ki (Satterly, 1960). A körülbelül 10-12 napos juvenileket egy szitával távolítottam el a víz felszínéről és átraktam őket a következő generáció talajába vagy a génexpressziós rész korosító talajába. Ezek után az F1 és F2 generációban a LUFA talajban töltött időt 35 napra növeltem (az eredeti 28 napról), annak érdekében, hogy elég 10-12 napos juvenilt találjak. Az ökotoxikológia

rész F1 és F2 generációjában az összes kezelési csoportban a fent leírtak szerint jártam el (adult és juvenil számolás, adult peterakás és pete paraméter mérések).

A génexpressziós kísérlet P generációban az állatokat 22 napos korukban ugyanabból a szinkron tenyészetből vettem ki, mint az ökotoxikológiai kísérletben. Az állatokat két napos kezelésnek tettem ki LUFA 2.2 talajban, a fent leírt koncentrációkkal. Harminc gramm nedves talaj volt minden üvegben, 50 állat a génexpressziós vizsgálathoz és 5 a reprodukciós gének szaporodással való összefüggésének ellenőrzésére. Két nap leteltével öt állatot kiraktam gipszes dobozba, hogy petét rakhassanak. Öt napot töltöttek a gipszes dobozban, aztán az adult állatokat eltávolítottam és a szétterített petecsomókról digitális fotót készítettem. A pete-paraméterek mérését a 2.4-es pontban leírtak szerint végeztem. A maradék állatot (50 db) folyékony nitrogénben ultragyorsan fagyasztottam és -80°C -on tároltam őket. Az F1 generációs juvenileket az ökotoxikológiai kísérlet P generációjától nyertük a 28. nap végén. Az F1 generációs juvenilek tiszta talajba kerültek 13 napra, hogy elérjék a génexpressziós vizsgálathoz szükséges kort (21-23 nap). Ez után ugyanolyan koncentrációjú kezelést kapák, mint az ökotoxikológiai kísérlet F1 generáció (multigeneráció és transzgeneráció) tagjai. A minta itt és a következő generáció esetében egyaránt 50 állatból állt. A kezelés végeztével az állatokat ultragyors-fagyasztottam és -80°C -on tároltam. Az F2 generációs juvenileket az ökotoxikológiai kísérlet F1 generáció üvegcséiből nyertem a 35. nap végén. Ezt követően 13 napig tiszta talajban tartottam az állatokat, majd ugyanazt a kezelést kapták, mint az F2 ökotoxikológiai kísérlet állatok (transz-, multi-, multitranszgeneráció). Két nap után ultragyors-fagyasztottam és -80°C -on tároltam őket.



6. ábra: Trebon 30 EC inszekticid ökotoxikológia kísérleti elrendezés, ami egy OECD teszt, peterakás és génexpressziós teszt váltakozását mutatja. A dobozok színe a szubsztrátot jelöli, amiben az állatokat tartottam a különböző kísérleti fázisokban (szürke: gipsz, barna: tiszta LUFA talaj, sárga: kezelt LUFA talaj). A vízszintes vonal az eltelt időt jelzi kísérleti napok számában, az ábra nem időarányos (megszakítások páros, az idővonalat keresztező haránt vonalakkal jelezve). A zöld nyíl jelzi, amikor collembolákat kivettem a tesztből a génexpressziós vizsgálathoz. A szürke vonalak a leszármazási viszonyokat jelölik. A függőleges fekete vonalak, amik áthaladnak az idővonalon a generációkat választják el. A kezelési kódok MF1: multigeneráció, TF1: transzgeneráció, MF2- F2 multigeneráció, TF2: F2 transzgeneráció, MTF2: multitranszgeneráció.



7. ábra: A génexpressziós kísérleti elrendezés a reprodukciós kapcsoltági teszt és a OECD tesztből bejövő juvenilek (zöld nyíl), az állatok korosítása, aztán egy rövid expozíció és az ultragyors fagyasztás váltakozik. A vízszintes vonal az eltelt időt jelzi kísérleti napok számában, az ábra nem időarányos (megszakítások páros, az idővonalat keresztező haránt vonalakkal jelezve). A zöld nyíl jelzi, amikor collembolákat kivettem a tesztből a génexpressziós vizsgálathoz. A szürke vonalak a leszármazási viszonyokat jelölik. A függőleges fekete vonalak, amik áthaladnak az idővonalon a generációkat választják el. A narancssárga nyíl a peterakáshoz elkülönített adultokat jelzik. A sárga nyíl az ultragyorsfagyasztáshoz kivett állatokat jelzi. A kezelési kódok MF1: multigeneráció, TF1: transzgeneráció, MF2: F2 multigeneráció, TF2: F2 transzgeneráció, MTF2: multitranzgeneráció.

2.8.4 RNS kivonás

Egy biológiai minta 50 ultragyors-fagyasztott állatból állt, melyből a teljes RNS mennyiséget kivontam (1,5 ml mikrocentrifuga cső). Az RNS kivonáshoz az SV Total RNA Isolation System nevű kitted (Promega Corporation, Madison, WI, USA) használtam a használati útmutatónak megfelelően. Annyi eltérés volt, hogy a DNáz inkubációs mixet 15 perc helyett 30 percig hagytam a membránon a még tökéletesebb tisztítás érdekében. Ezután az RNS koncentrációt NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Wilmington, DE, USA) mértem meg, majd a mintákat -80°C-on tároltam.

2.8.5 RNS minőség ellenőrzés

Az RNS-t etídium-bromidos 1%-os agaróz gélen (SphaeroQ) futtattam, hogy ellenőrizzem nem fragmentált-e. Ezután DNS szennyezést keresve PCR reakciót futtattam az összes RNS mintán. Egy háztartási gén, az eukarióta transzkripciós iniciációs faktor IA (E1ff) DNS primereket használtuk a Promega GO-taq PCR protokollal. Ez után a PCR termékeket 1,5%-os etidium-bromidos agaróz gélen elektorforézissel futtattam, hogy a DNS tartalmat vizuálisan ellenőrizhessem.

2.8.6 cDNS szintézis

Öt µl RNS mintát 70°C-on inkubáltam 5 percig, aztán jégen hirtelen lehűtöttem. 20 µl reverz transzkriptáz mixet adtam a mintához (5 µl 5x puffer, 1,5 µl 10mM dNTP, 0,5 µl oligo dT 1 µg/µl koncentrációs oldata, 1 µl mmLV reverz transzkriptáz, 12 µl nukleáz mentes víz). A keveréket a PCR-be raktam 5 percre 25°C-on, 60 percre 42°C-on, majd 15 percre 70°C-os programra. A cDNS-t 100 µl nukleáz mentes vízzel hígítottam.

2.8.7 Transzkripciós analízis

Két háztartási gént használtam referencia génként: tirozin-3-monooxigenáz (YWHAZ) és szukcinát-dehidrogenáz (SDHA) (de Boer et al., 2009). További öt általános stresszgén expresszióját mértem meg: ABC-transzporter (ABC), izopenicilin-N-szintetáz (IPNS), két citokróm P450 monooxigenáz típust (CYP6N3v2, CYP6N4v1) és a hő sokkfehérje 70-t (HSP70). Továbbá három szaporodással kapcsolt gént is vizsgáltam: vitellogenin fehérje (vit1), vitellogenin-szerű fehérje (vit2), vitellogenin receptor (vitrec). A vitellogenin és a vitellogenin-szerű fehérje is fontos alkotóeleme a petéknek. A vitellogenin-receptor nem csak a vitellogenin petébe jutásáért felel, hanem szerepe van az ováriumok érésében is (Cong et al., 2015). A gének bővebb adatait a 1. táblázatban tüntettem fel.

A génexpressziók mértékének megállapításához először a qPCR mixet elkészítettem (0,5 µl forward primer, 1,5 µl reverz primer, 7 µl nukleázmentes víz, 10 µl sybr zöld Bioline, UK) és 96-lyukú qPCR lemez lyukaiba mértem, ezen kívül 2 µl mintát is a lyukakba mértem. Biorad CFX q-PCR gépet használtam a mérésre.

2.8.8 Statisztika

Minden statisztikai analízist az R Statisztika 3.4.2 programmal végeztem (R Core Team, 2017). A Trebon 30 EC inszekticid koncentráció hatását a túlélésre, juvenil számra, peteszámra, az állatok számára és a normalizált RNS mennyiséget egyszerű lineáris modellel elemeztem. Post-hoc tesztnek a Dunett-tesztet használtam. Az F2 multitranszgenerációs kezelésben a koncentráció hatását a peteszámra több-szakaszos általánosított lineáris modellel elemeztem, mert az adatok közötti összefüggés nem volt lineáris (MASS csomag, Venables és Ripley, 2002). A koncentráció hatását a petetérfogatra kevert lineáris modellel elemeztem (nlme csomag, Pinheiro et al. 2013). Az egyedek azonosító száma volt a random faktor, ami megmutatta, hogy a peték azonos Petri-csészékből származnak. A normális eloszlás eléréséhez a petetérfogat köbgyökével dolgoztam. A génexpressziós szinteket log-transzformáltam (log10). Az inszekticid koncentráció génexpresszióra gyakorolt hatását lineáris modellel elemeztem. A szülő generáció IPNS expressziójának és az F2 multitranszgenerációs kezelés ABC expresszióját több-szakaszos általános lineáris modellel elemeztem. A transzformációk után az adatok normalitását diagnosztikai ábrákkal ellenőriztem (reziduális varianciák, QQ plot, Cook-féle távolság ábra). A három kezelési csoportot: M, MT, T külön elemeztem.

1. táblázat A qPCR génjeinek információi. F: forward primer, R: reverse primer. A teljes szekvenciák a <http://collembolomics.nl> oldalon találhatóak meg.

Gén funkció	Gén kód	Azonosító szám	F/R	Primer szekvencia	Hatékonyság
Vitellogenin fehérje ¹	vit1	Fcan01_28655	F	GAGTTTCTGCTGACGGACACCT	100,3
			R	TGTTTCAGACTCGCCACCAGAT	
Vitellogeninszerű fehérje	vit2	Fcan01_06376	F	GTTTCTGCTGACGGACACCTTC	95,3
			R	AAATGTTTCAGACTCGCCACCA	
Vitellogenin receptor ¹	vitrec	Fcan01_04245	F	TGTCCCGTAGGGATGTATCTTGA	85,6
			R	GATTGTGTTGTTGTACCCGATGAC	
Tirozin 3-monooxigenáz ²	YWHAZ	Fcan01_06830	F	CCTACAAAAACGTCGTCGGTG	89,3
			R	TGTTGCTTTCGTTTCAACC	
Szukcinát-dehidrogenáz ²	SDHA	Fcan01_08383	F	ACACTTTCAGCAATGCAGGAG	98,6
			R	TTTTTCAGCCTCAAATCGGCA	
ABC-transzporter ²	ABC	Fcan01_27073	F	GTGTGAAATCTGGCGAAAAGGT	90,6
			R	TTGAGCAGCAGAAGGCACTAATC	
Citokróm P450 monooxigenáz ²	CYP6N3v2	Fcan01_00866	F	GCGTTAAAAGCGAGGCAAGA	89,3
			R	GCGATATCCACGTTTCAATTGT	
Citokróm P450 monooxigenáz ²	CYP6N4v1	Fcan01_20588	F	TTCCATGCAAGTCATCACATCAG	106,5
			R	CGGAAACACAAAGATTCGTTCTG	
Hősokk fehérje 70 ²	HSP70	Fcan01_10021	F	TTGGTCGACGTAGCTCCACTCT	98,1
			R	TGGGCTTGTTTGCATGGAAT	
Izopenicillin-N-szintetáz ²	IPNS	Fcan01_06374	F	GACATGTCGGCAAAACTCCTTC	84,4
			R	GGGTAGCGAATAAGTCGCACTG	

1. Új eljárás

2. Bővebb specifikáció: Faddeeva-Vakhrusheva et al. (2017)

2.9 Trebon 30 EC inszekticid viselkedési teszt

A vizsgálatban a Szent István Egyetem Állattani Tanszékének tenyészetét használtam. A tenyészet leírását lásd a 2.2 fejezetben.

A kísérleteket 9 cm átmérőjű Petri-csészében végeztük Goto (1960) szerint. A kísérlet alatt folyamatosan nedvesen tartottam az edényeket, hogy 100% legyen a páratartalom. Három koncentrációt alkalmaztam: kontroll, 1,3 és 13 ml Trebon 30 EC/L víz. Az 1,3 ml/L a javasolt szántóföldi koncentráció a burgonyakártevők ellen. A Trebon 30 EC inszekticid Petri csészére vitele után egy órát hagytam szellőzni, hogy a naftalin, amely ennek az inszekticidnek egy komponense elpárologhasson, ahogyan az terepi viszonyok között is történne. Előkísérletünk alapján a naftalinnak elég óra adott kísérleti körülmények között az elpárolgáshoz.

Fiatal *F. candida* felnőtteket ($2,22 \pm 0,17$ mm) használtunk a kísérletben. Videófelvételek segítségével tanulmányoztam az ugróvillások viselkedését. Egy 15 mm átmérőjű műanyaggyűrűt a Petri-csésze közepére helyeztem és egy *F. candida* egyedeket helyeztem bele. A knock-down hatás különböző szakaszainak megismerése miatt két kísérlet sorozatot végeztem. Az első kísérletben az egyedekről rögtön az edénybe helyezés után videót készítettem (két koncentráció, egy kontroll csoport, 12 ismétlés/kezelés). A második kísérleti beállításban az egyedeket egy órán keresztül hagytam a műanyag gyűrűben, mielőtt elindítottam a videófelvételt (két koncentráció, egy kontroll, 4 ismétlés/kezelés). Mivel a második kísérletben egy óra elteltével már robosztusabb a hatás, emiatt úgy ítélem meg, hogy ez esetben kevesebb ismétlés is elegendő. A fedett Petri-csészéket egy STM9-TRI binokuláris mikroszkóp alá helyeztem. A megvilágítást száloptikás külső fényforrás segítségével homogenizáltam. A videófelvételt 3.2 MP MicroQ-W (widefield) PRO kamera segítségével, 12 frame/s feldolgozási sebességgel rögzítettem. A felvételeket a BORIS v. 3.60 program segítségével elemeztem (Friard és Gamba, 2016). Az állatok gyűrűn belüli mozgását 2 percen keresztül rögzítettem. A videófelvételek alapján meghatároztam a teljes mozgással töltött időt (t_m), a megtett út hosszát (s), az állással töltött időt (t_a) és a mozgás átlagos sebességét (v). A teljes videó hosszát (2 perc) fél másodperces szakaszokra osztottam. A fél másodperc alatt megtett út hosszát is meghatároztam, ezeknek a gyakorisági eloszlását hisztogrammon ábrázoltam és az adott csoport mozgásmintázataként értelmeztem.

A statisztikai analízist a PAST programmal végeztem (Hammer et al., 2001). A Trebon 30 EC inszekticid hatását az állas töltött időre, a mozgással töltött időre, a sebességre, a megtett út hosszára, a kurtózisra, és az eloszlás ferdeségére általánosított lineáris modellel elemeztem, mivel ez a modell jobban tűri az instabil reziduális varianciát. A mozgásmintázat eloszlásbeli különbségeit Mann-Whitney-Wilcoxon próbával teszteltem.

2.10. Trebon 30 EC inszekticid több generációs életmenet vizsgálat

A kísérletben 9 cm átmérőjű műanyag Petri csészét használtam. A korábbi kísérletektől eltérően a gipszhez nem aktív szenet, hanem grafitot adtam (8:1 gipsz:20 μ m grafitpor Sigma-Aldrich ® tömegarány) (Fountain és Hopkin, 2001). Mivel a grafit egy kémiaiilag inert anyag, nem tudja megkötni a Trebon 30 EC inszekticidet a kezelés után. A következő koncentrációjú oldatokat alkalmaztam a Petri csészék kezdeti szaturálására: 0,766 ml Trebon 30 EC/L víz, 1,303; 2,215; 3,765; 6,4 és egy vizes kontroll (43,830 mg hatóanyag/kg száraz talajra vetítve, 74,513; 126,671; 215,341; 366,08).

A szülő generációban kezelésként 15-15 állatot tartottam egyedileg. Az állatokat a Petri-csészék egyedi azonosítójával különböztettem meg. Az állatok által rakott petecsomókat áthelyeztem egy új tiszta Petri-csészére, ahol a petéket lefényképeztem számolás és méret felvétel céljából. A fényképek elkészítése és a peteparméterek lemérése (csomószám, első petecsomó mérete, első peterakás időpontja, peteszám, peteméret, peteátmérők aránya) a 2.4-es pontban leírtak szerint történt. Ezen túl a peték lerakásához képest tíz nap múlva újabb fotót készítettem a petecsomókról, így ellenőrizni tudtam a kelési sikertelenséget (megmaradt peték/ lerakott peték száma). Ezzel matematikai értelemben, ha a kelési siker arányszáma nő, akkor nagyobb a ki nem kelt peték száma, tehát kevésbé sikeres a kelés. Amennyiben a kelési siker arányszáma csökken, akkor kevesebb pete maradt meg, tehát nőtt a kelési siker.

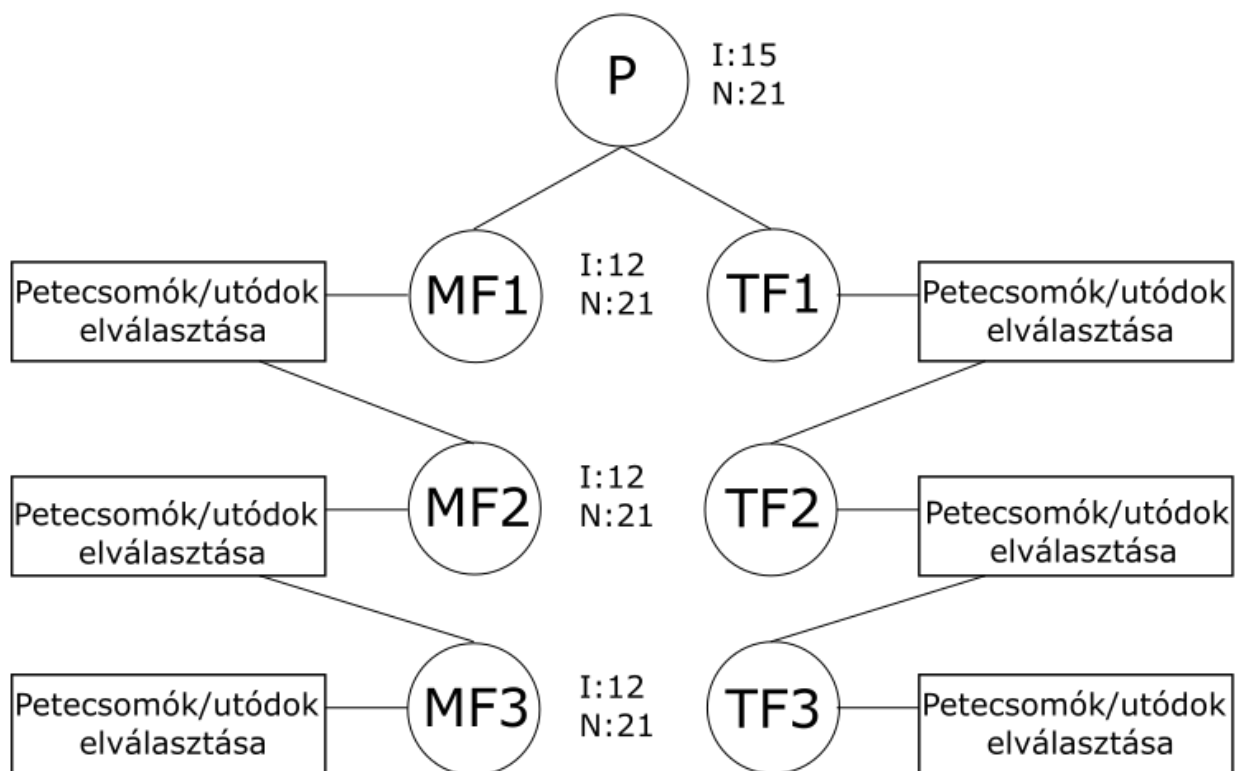
Az állatok élelemfogyasztását úgy mértem, hogy az ad libitum adott táplálékot az élesztőt, egy a táplálékválasztási tesztben használt körre mértem ki, melyen a kísérleti ideje alatt elfogyasztott táplálékot az ürülékek száma jelezte. Mivel a három hét alatt az ürülék túlságosan begombásodott volna, emiatt az első két hét után egy friss szűrőpapírt helyeztem be és a két szűrőpapíron talált ürülékek számának az összegét használtam a későbbiekben.

Az állatokat hetente kétszer sztereomikroszkóppal vizsgáltam (Olympus SZ60) és mikroszkópra csatlakoztatható fényképezőgéppel lefényképeztem (ISH130 és 0,5x objektív). A fej csápok közötti részétől (homlok) az utolsó potroh szelvény végéig mértem meg minden állat hosszát. Két egymást követő fényképet készítettem, hogy az esetleges mozgások, nézetbeli különbségek miatti pontatlanságot csökkentsem. A két mérés átlagát tekintettem az állat hosszának. Az adatokat ImageJ (Schneider et al., 2012) programmal elemeztem. A méréseket 21 napig végeztem, hetente kétszer, tehát a kísérlet végén az állatok 32-34 naposak voltak.

A fenti paramétereken kívül minden generációban elvégeztem a 21. napon az adult egyedekkel egy viselkedés tesztet a rövid viselkedési teszt protokollja szerint. Az állatokat friss tiszta Petri-csészébe helyeztem át és két perces videót készítettem róluk, mely alapján meghatároztam az állással töltött időt, a megtett utat és a sebességet.

Ezen túl a növekedés és szaporodás közötti csereviszonyt is teszteltem egy csereviszony (trade off) hányadossal, amikor az abszolút növekedést elosztottam a teljes szaporodási befektetéssel. A csereviszony fogalma alatt a következőt értem a disszertációban: amikor azt írom, hogy többet fektetnek az állatok valamibe, ott az energia utak megváltozására utalok (energy flow) és arra, hogy az adott paraméterbe több energiát fektetnek be az állatok.

Ez után a már 10-12 napos utódokat kettéosztottam egy kezelt Petri-csészére egyedileg kirakott (transzgenerációs) és egy kezelt Petri-csészére kirakott (multigenerációs) csoportra, az F1 generáción belül. Az állatokat ugyanúgy tartottam, mint a szülőgenerációt, és a méréseket is azonos módon végeztem el. Az F2 és F3 generációban a multigenerációs csoport utódait megtartottam kezelt Petri-csészéken, illetve a transzgenerációs csoport utódai is továbbra sem kaptak kezelést. Így a multigenerációs csoportban a kezelés hatásának esetleges akkumulálódását, illetve a transzgenerációs csoportban a kezelés fokozatos elmúlását vagy generációkon keresztüli átívelését figyelhettem meg. A kísérleti elrendezés az 8. ábrán látható.



8. ábra Kísérleti elrendezés. P: szülő generáció, MF1: multigenerációs, kezelést kapott vonal első generációja, TF1: transzgenerációs, kezelést nem kapott vonal első generációja, MF2: multigenerációs vonal második generációja, TF2: transzgenerációs vonal második generációja, MF3: multigenerációs vonal harmadik generációja, TF3: transzgenerációs vonal harmadik generációja, I: ismétlés szám, N: kísérleti napok száma

2.10.1 Statisztika

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 után kerültek. Ezután egy lineáris modellt illesztettem az adattáblára. Elemeztem az állat növekedésgörbéjének koncentrációfüggését. 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 abszolút növekedés írja le.

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 koncentrációkkal kezelt egyedek hosszúsága között a kísérlet első napján és az utolsón.

A pete-paramétereket a korábban leírt statisztikai módszerekkel elemeztem. Ahol a nem lineáris kapcsolatok szükségessé tették, több-szakaszos lineáris modellt (törtpálca modellként is ismert) alkalmaztam. Az állatonkénti teljes peteszám és az átlagos peteméret összeszorozásával megkaptam az átlagos szaporodási befektetést, mely pontosabb mérőszáma a szaporodásnak, mint a peteszám vagy a peteméret külön-külön. A kísérlet során a koncentráció hatását a mortalitárat az egyedi tartás miatt binomiális modellel elemeztem. A mozgásra fordított energiát a mozgással töltött idő és a sebesség szorzataként számoltam. A koncentráció hatását a csereviszonyra, a viselkedési paraméterekre általános lineáris modellel elemeztem.

3. Eredmények

3.1 Trebon 10 F dózis-hatás kísérlet

A dózis-hatás kísérlet eredményei szerint a *Folsomia candida* mortalitása a vizsgált dózisokban nem függött a Trebon 10 F koncentrációjától ($p= 0,113$, $F= 2,6$). Az utódok száma ezzel szemben erős koncentrációfüggést mutatott ($p= 0,007$, $F= 8,0$). A LOEC 29 ml/L koncentrációnál került meghatározásra, míg az EC_{50} érték 19,078 ml/L (konfidencia interallum: 0,246- 1184,012) volt.

3.2 Trebon 10 F reprodukciós és táplálékválasztási teszt

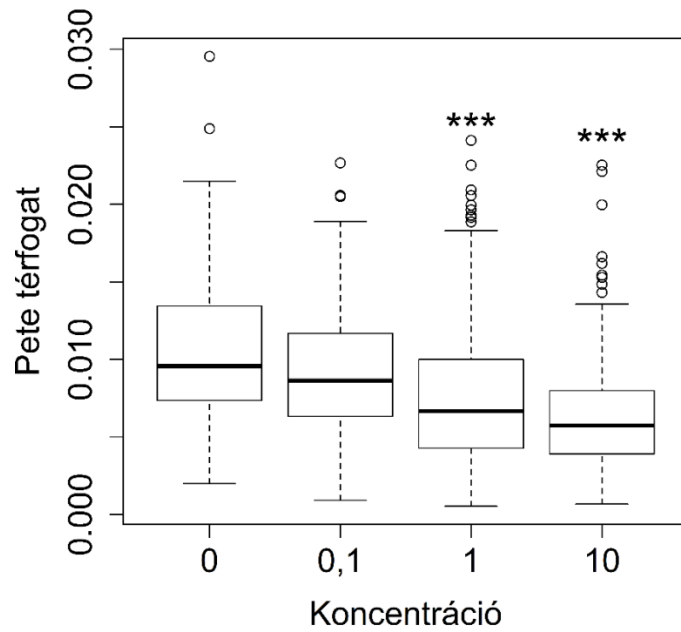
3.2.1 Trebon 10 F reprodukciós kísérlet

A 2. táblázatban mutatom be, hogy az egyes koncentrációk hogyan befolyásolták a petetérfogatot és a peteátmérők arányát a kontroll csoporthoz képest a különböző kezelésekben, melynek részleteit az alábbi bekezdésekben fejtem ki részletesen.

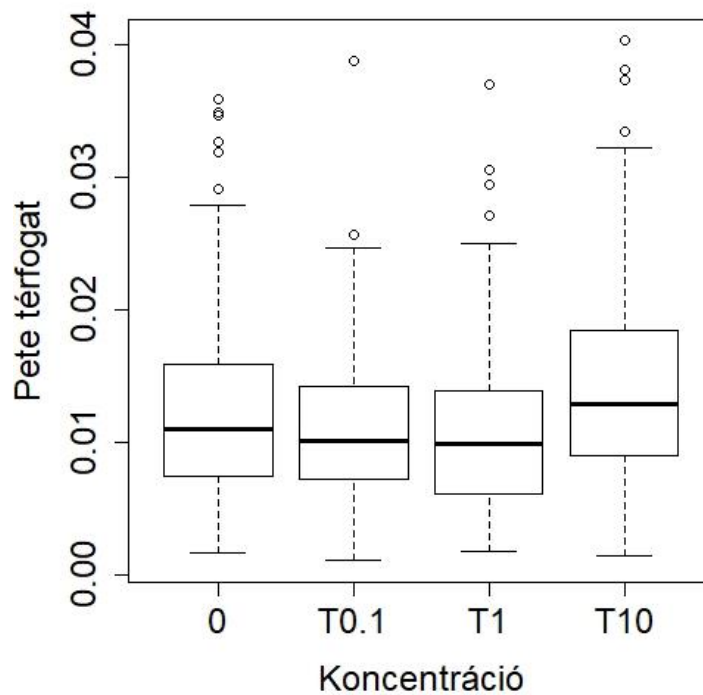
A szülőgenerációban (P) a peteszámra nem volt hatása a koncentrációnak. A petetérfogatra a Trebon 10 F koncentráció növekedése szignifikánsan negatív hatással volt (9. ábra). A peteszám hatása is szignifikáns volt a térfogatra ($p = 0,006$, $t = -2,9$). A peteátmérők arányára a Trebon 10 F hatása szignifikáns volt, csökkent az arány a koncentráció növekedésével.

Az F1 transzgenerációs csoportban a peteszámra nem volt szignifikáns hatása a Trebon 10 F-nek. A petetérfogatra a Trebon 10 F koncentrációnak szignifikáns hatása volt. A peteszám hatása is szignifikáns volt ($p = 0,002$, $t = -3,2$). Ha a Trebon 10 F koncentráció növekedett, az átmérő is nőtt (10. ábra), ha a peteszám nőtt, akkor csökkent az átmérő. Azonban ez csak trendszerű növekedés, a kontrolltól nem tértek el szignifikánsan az eredmények. A Trebon 10 F koncentrációjának nem volt szignifikáns hatása a peteátmérők arányára.

Az F1 multigenerációs vonalon a Trebon 10 F koncentrációjának nem volt hatása a peteszámra. Ugyanakkor a petetérfogatra szignifikánsan hatott a Trebon 10 F koncentráció. Ha a Trebon 10 F koncentráció növekedett, a petetérfogad is nőtt, míg ha a peteszám nőtt, akkor az átmérő csökkent. A peteszám hatása is szignifikáns volt ($p = 0,014$, $t = -2,5$). Az átmérők arányára nem volt szignifikáns trendszerű hatása a kezelésnek, de a legnagyobb koncentráció a kontrolltól eltért.



9. ábra: A szülőgeneráció (P) petetérfogata csökken a koncentráció függvényében, $p < 0,001$, a 0 a kontroll csoport, a 0,1 a legalacsonyabb koncentráció, az 1 a szántóföldi koncentráció, a 10 a legmagasabb koncentráció. A csillagok a kontrolltól való, szignifikáns eltérést jelentik.



10. ábra: F1 generáció (TF1). A pete térfogat a koncentráció függvényében, ahol 0 a kontroll csoport, a T0,1 a legalacsonyabb koncentráció, az T1 szántóföldi koncentráció, a T10 a legmagasabb koncentráció.

2. táblázat A Trebon 10 F inszekticid koncentráció hatása a petetérfogatra és a peteátmérők arányára. A kezeléseket a kontrollhoz hasonlítottuk. A szignifikáns eltérések félkövér betűtípussal jelöltek. Szülő generáció: P0,1 = tizedes hígítás, P1 = terepi koncentráció, P10 = tízszeres töménység. Az utódok szüleit kezeltük T0,1 = tizedes hígítás, T1 = terepi koncentráció, T10 = tízszeres töménység. A szülőket és az utódokat is kezeltük M0,1 = tizedes hígítás, M1 = terepi koncentráció, M10 = tízszeres töménység.

	Kezelés	df	t-érték	p-érték
Trebon 10 F hatása a petetérfogatra	P0,1	81	-1,1	0,256
	P1	81	-3,9	<0,001
	P10	81	-5,3	<0,001
	T0,1	88	-1,2	0,23
	T1	88	-1,6	0,105
	T10	88	1,7	0,091
	M0,1	95	-1	0,337
	M1	95	1,7	0,096
	M10	95	3,4	0,001
	Trebon 10 F hatása a peteátmérők arányára	P0,1	81	-3,2
P1		81	-3,5	0,001
P10		81	-3,4	0,001
T0,1		88	-0,6	0,556
T1		88	1,5	0,122
T10		88	-0,1	0,919
M0,1		95	-1,4	0,168
M1		95	-1,1	0,273
M10		95	-2	0,047

3.2.2 Trebon 10 F táplálékválasztás

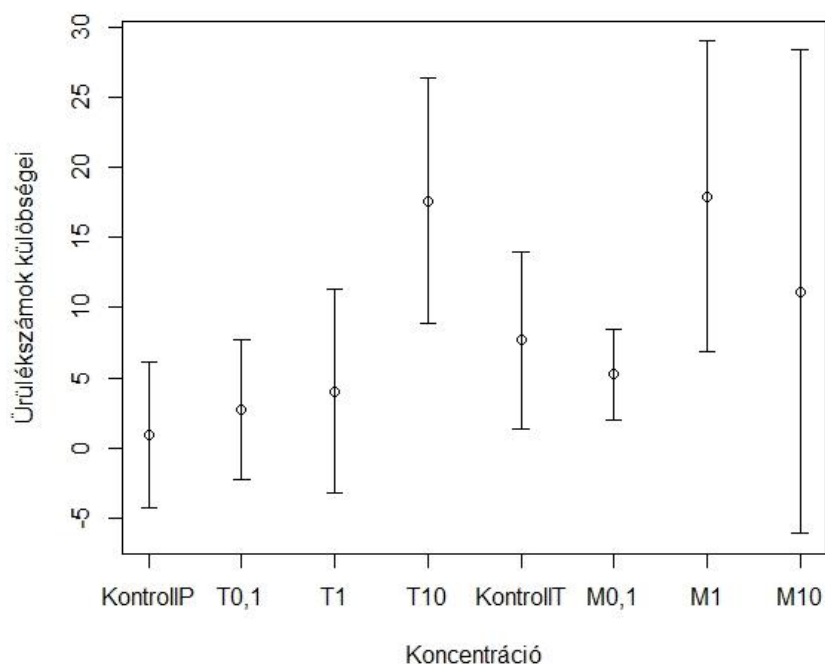
A szülői és az F1 generáció táplálékválasztási eredményei az 3. táblázatban láthatóak.

A táplálékválasztási tesztek elemzéséből nyert 95%-os konfidencia intervallumokból kiderül, hogy a két táplálékforrás körül talált ürülékszámok különbségeinek átlaga a koncentráció növekedése szerint tolódik el (11. ábra) a pozitív tartományba, vagyis az élesztő preferencia irányába. A negatív tartomány azt jelenti, hogy a kukoricát preferálják az állatok.

Ha az egyforma koncentrációkkal kezelt csoportokat összehasonlítva nézzük az egyes generációk konfidencia intervallumait, akkor kiderül, hogy a kontroll kezelés preferenciája változékony. A szántóföldi koncentrációnál hígabb koncentrációval kezelt csoportok (P0,1, T0,1, M0,1, TT0,1) preferencia értékei a 0 körül ingadoznak, vagyis e csoportok egyedei nem válogatnak. A szántóföldi koncentráció (P1, T1, M1, TT1) intervallumai már inkább a pozitív tartományba esnek, vagyis az élesztőt preferálták. Az első generáció kezelt csoportjainak (M1) intervalluma már egyértelműen a pozitív tartományba tartozik. A tízszeres töménységű koncentrációval kezelték (P10, T10, M10, TT10) közül a P10 és T10 kezelés állatai az élesztőt preferálták. A M10 és T10 kezeléseknél nem volt kimutatható preferencia. A szülőgeneráció (P) értékeihez képest az elsőgenerációs utódok (F1) intervalluma jobbra tolódott. Az M10 csoporton látszik, hogy a csökkent minta elemszám miatt a konfidencia intervallum kiszélesedett, ezért ezek az eredmények nem megbízhatóak. A második generációban egyetlen kezeletlen csoport sem válogatott a táplálékforrások között.

3. táblázat: A Trebon 10 F táplálékválasztási kísérlet első két generációjának az eredményei. A félkövér betűtípus a szignifikáns preferenciát jelöli. P: szülő generáció, F1;0P: első generáció Petri csészés kontroll, F1;0T: első generáció talajos kontroll, T: transzgenerációs csoport, M: multigenerációs csoport, 0,1: szántóföldi koncentráció tizede, 1: szántóföldi koncentráció, 10: szántóföldi koncentráció tízszerese

Kezelés	t-érték	p-érték	Preferencia
P;0	-5,3	< 0,001	Kukorica
P;0,1	2,0	0,06	Nincs
P;1	0,5	0,638	Nincs
P;10	2,3	0,033	Élesztő
F1;0P	0,4	0,707	Nincs
F1;0T	2,5	0,019	Élesztő
T0,1	1,1	0,258	Nincs
T1	1,2	0,261	Nincs
T10	4,2	< 0,001	Élesztő
M0,1	3,4	0,003	Élesztő
M1	3,4	0,003	Élesztő
M10	1,4	0,185	Nincs



11. ábra: Az első generáció (F1) állatai által produkált ürülékszámok különbségeinek átlagai és 95%-os konfidencia intervallumai. A negatív tartományban lévő intervallumok azt mutatják, hogy a kukoricát preferálták az állatok, a pozitív tartományban lévő intervallumok pedig azt jelentik, hogy az élesztőt preferálták az állatok. (T: transzgeneráció, M: multigeneráció, P: Petri csészében tartott, T: Talajon tartott, 0,1: a leghígabb koncentráció, 1: a szántóföldi koncentráció, 10: a legtöményebb koncentráció)

3.3 Trebon 30 EC dózis-hatás kísérlet

Ebben a kísérletben a növényvédő szer koncentráció emelkedése szignifikánsan növelte a mortalitást ($p < 0,001$, $t = -13,9$). A LOEC értéke 187,5 mg/kg koncentráció volt ($p = 0,016$, $t = -2,6$). Az LC_{50} értéke 422,7 mg/kg volt. A koncentráció emelkedése szignifikánsan csökkentette a juvenil számot ($p < 0,001$, $t = -7,9$). Már a legkisebb koncentráció (LOEC: 23,4 mg/kg) is szignifikánsan csökkentette a juvenil számot a kontrollhoz képest ($p = 0,030$, $t = -2,3$). A reprodukció EC_{50} értéke 367,3 mg/kg volt.

3.4 Trebon 30 EC több generációs transzkripciós vizsgálat

3.4.1 Ökotoxikológiai vizsgálatok

Az ökotoxikológiai vizsgálatok eredményeit, azaz a túlélés, a juvenilis szám és a petetérfogát részletes statisztikai értékeit a 4. táblázatban tüntettem fel. A P generációban a koncentráció növekedése csökkentette a túlélést, a LOEC 500 mg/kg volt. A juvenilis szám csökkent a koncentráció növekedésének hatására, a LOEC 107 mg/kg volt. A peteszámra nem volt

szignifikáns hatása a peszticid kezelésnek. A pete térfogat nőtt a koncentráció növekedésével, a LOEC 299 mg/kg volt.

Az MF1 generációban a túlélés csökkent a koncentráció növekedésével, a LOEC 500 mg/kg. A juvenilis szám csökkent a koncentráció emelkedésével, a LOEC 500 mg/kg volt. A peteszámra és a pete térfogatra nem volt szignifikáns hatása a peszticidnek.

A TF1 generációban a túlélés enyhén csökkent a koncentráció emelkedésével, ugyanakkor a kezelt csoportok nem különböztek szignifikánsan a kontrolltól. A juvenilis szám csökkent a koncentráció emelkedésével, a LOEC 500 mg/kg volt. A peteszámot nem befolyásolta szignifikánsan a peszticid. A pete térfogat enyhén nőtt a koncentráció emelkedésével, azonban nem volt szignifikáns különbség a kontrollhoz képest.

Az MF2 generációban a túlélés csökkent a koncentráció emelkedésével, a LOEC 179 mg/kg volt. A juvenilis szám csökkent a koncentráció emelkedésével, a LOEC 299 mg/kg volt. A peteszámra nem volt szignifikáns hatása az inszekticidnek. A petetérfogata szignifikánsan nagyobb volt a 179 mg/kg koncentrációban a kontrollhoz képest ($p = 0,012$, $t = 2,7$), hormézisz hatás lépett fel.

Az MTF2 generációban a túlélés csökkent a koncentráció emelkedésével, a LOEC 500 mg/kg volt. A juvenilis szám szignifikáns csökkenő trendet mutatott a koncentráció növekedésével, de a kezelt csoportok nem különböztek a kontrolltól. A peteszámra nem volt szignifikáns hatása az inszekticidnek. A petetérfogata szignifikánsan nagyobb volt a 107 mg/kg-os koncentrációban és egy erős hormetikus hatást mutatott ($p = 0,031$, $t = 2,3$).

A TF2 generációban sem a túlélést, sem a juvenilis számot, sem a peteszámot, sem a pete térfogatot nem befolyásolta a peszticid kezelés.

Mivel a peteszám nem követett lineáris dózis-hatás görbét, emiatt nem szerepel a statisztikai táblázatban.

Szignifikáns dózis-hatást választ találtam a túlélésre a P, F1M, F2M és F2MT kezeléseknél. A mortalitás az F2M kezelésben volt a legerőteljesebb, ahol az inszekticid már 179 mg/kg koncentrációban szignifikáns mortalitás növekedést okozott. A juvenilis szám alacsonyabb volt a P generációban, mint a kísérlet többi részében, mivel rövidebb idő állt rendelkezésre, mint a kísérlet többi részében. Szignifikáns dózis-hatás választ találtunk a juvenilis számra P, F1M, F1T és F2M kezeléseknél. A legerőteljesebb hatást a P generációban mutattuk ki, ahol már a legalacsonyabb, 107 mg/kg koncentráció is szignifikáns, átlagosan 79%-os mértékű csökkenést okozott a juvenilis számban.

4. táblázat: A Trebon 30 EC ökotoxikológiai vizsgálatának statisztikai összefoglalója. A trend alatt a koncentrációk kontrolltól való különbsége látszik. Ahol nem volt szignifikáns a trend, ott nem volt post-hoc teszt, így ott nincs megjelenítve eredmény. A szignifikáns értékeket félkövérrel szedtem. A függőleges vonal a generációkat választja el egymástól. A koncentrációkat mg aktív hatóanyag/kg száraz talajban adtam meg. *: hormézisz; P: szülők, TF1: transzgenerációs kezelés első generáció, MF1: multigenerációs kezelés első generáció, TF2: transzgenerációs kezelés második generáció, MF2: X multigenerációs kezelés második generáció, MTF2: multi-transzgenerációs kezelés második generáció.

Túlélés

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	< 0,001	-5,1	< 0,001	-4,7	0,049	-2,1	< 0,001	-7,8	< 0,001	-4,3	0,401	-0,9
107	0,498	1,4	0,991	-0,4	1	0	0,919	-0,8	1	0,2	—	—
179	0,498	1,4	0,991	-0,4	1	0	0,006	-3,8	0,761	-1,1	—	—
299	0,223	-2	0,325	-1,7	1	0	0,002	-4,1	0,628	-1,3	—	—
500	< 0,001	-5,9	< 0,001	-4,8	0,098	-2,4	< 0,001	-7	< 0,001	-4,8	—	—

Juvenilis szám

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	< 0,001	-5,6	< 0,001	-5,1	0,001	-3,7	< 0,001	-5,8	0,008	-2,9	0,242	-1,2
107	< 0,001	-6,1	0,968	-0,6	0,508	-1,4	0,211	-2,0	0,26	-1,9	—	—
179	< 0,001	-4,7	0,014	-3,3	0,546	-1,4	0,549	-1,4	0,111	-2,4	—	—
299	< 0,001	-6,8	0,011	-3,4	0,081	-2,5	0,007	-3,6	0,322	-1,6	—	—
500	< 0,001	-7,3	< 0,001	-4,5	0,016	-3,2	< 0,001	-5,3	0,053	-2,7	—	—

Peteterfogat

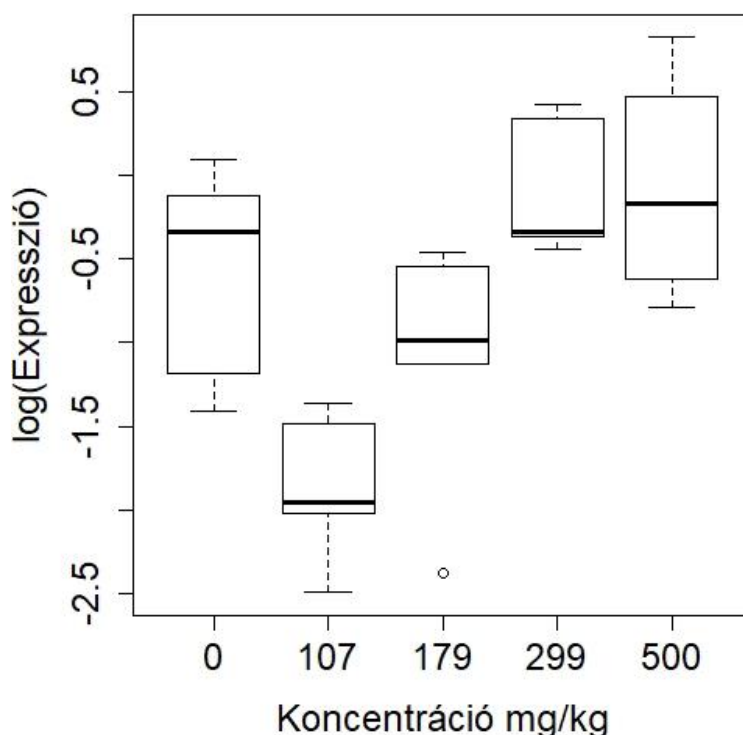
	P		MF1		TF1		MF2*		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	< 0,001	-5,6	0,934	-0,1	0,369	-0,9	0,986	0	0,904	-0,1	0,910	0,1
107	0,846	0,2	—	—	—	—	0,434	-0,8	—	—	—	—
179	0,177	1,4	—	—	—	—	0,012	2,9	—	—	—	—
299	0,017	2,7	—	—	—	—	0,956	0,1	—	—	—	—
500	0,004	3,4	—	—	—	—	0,821	-0,2	—	—	—	—

3.4.2 Génexpresszió

A génexpressziós vizsgálatok részletes statisztikai adatai az 5. táblázatban láthatóak, ebbe az IPNS adatai nem kerültek bele, mert nem követtek lineáris dózis-hatás görbét.

A P generációban az állatonként kinyert RNS mennyiség csökkent a koncentráció emelkedésével ($p = 0,004$, $t = -3,2$), a LOEC 500 mg /kg volt ($p = 0,039$, $t = -2,8$). A reprodukciós gének közt a vitrec csökkenő expresszióval reagált az emelkedő koncentrációra, a LOEC 500 mg/kg volt.

Majdnem minden stressz gén erőteljesen reagált az inszekticid kezelésre. Az ABC expresszió nőtt az emelkedő koncentrációval, a LOEC 500 mg/kg volt. Mind a CYP6N3v2, mind CYP6N4v1 expresszió erősen nőtt a növekedő koncentrációval, mindkét esetben 500 mg/kg volt a LOEC. A HSP70 expressziója egy enyhe növekedő trendet mutatott a koncentráció növekedésével, de nem volt különbség a koncentrációk között. Az IPNS expressziója (11. ábra) nem-lineáris dózis-hatás összefüggést mutatott. Az IPNS expressziója szignifikánsan visszaesett a leghígabb koncentrációban ($p < 0,001$, $t = -4,2$), majd szignifikánsan emelkedett az expresszió az emelkedő koncentrációval ($p = 0,010$, $t = 2,8$). A két legmagasabb koncentráció már nagyobb IPNS expressziót mutatott, mint a kontroll ($p < 0,001$, $t = 5,3$).



11. ábra: A szülő generáció (P) IPNS expressziója. A vastag vonal a dobozban a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. A üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis)

Az MF1 generációban az állatonkénti RNS mennyiség az emelkedő koncentrációval csökkent ($p < 0,001$, $t = -5,3$), a LOEC 179 mg/kg volt ($p = 0,048$, $t = -2,8$). A vit1 és vit2 gének expressziója megemelkedett a növekvő koncentrációval. A LOEC 299 mg/kg volt mindkét esetben. Mind a CYP6N3v2, mind a CYP6N4v1 expressziója erősen megemelkedett a koncentráció növekedésével, a LOEC mindkét esetben a legalacsonyabb koncentráció, azaz 107 mg/kg volt (12. ábra). A HSP70 expressziója nőtt az emelkedő koncentrációval, a LOEC 179 mg/kg volt. Az ABC ($p < 0,001$, $t = 6,0$) és IPNS ($p = 0,001$, $t = 4,4$) expresszió esetén az 500 mg/kg-os minta expressziós értéke egy kiugró érték volt, anélkül viszont nem volt szignifikáns dózis-hatás. De mindkét esetben az 500 mg/kg-os minta szignifikánsan sokkal nagyobb expressziót mutatott, mint a kontroll, de az csak egy minta, így eredményeit fenntartással kell kezelni.

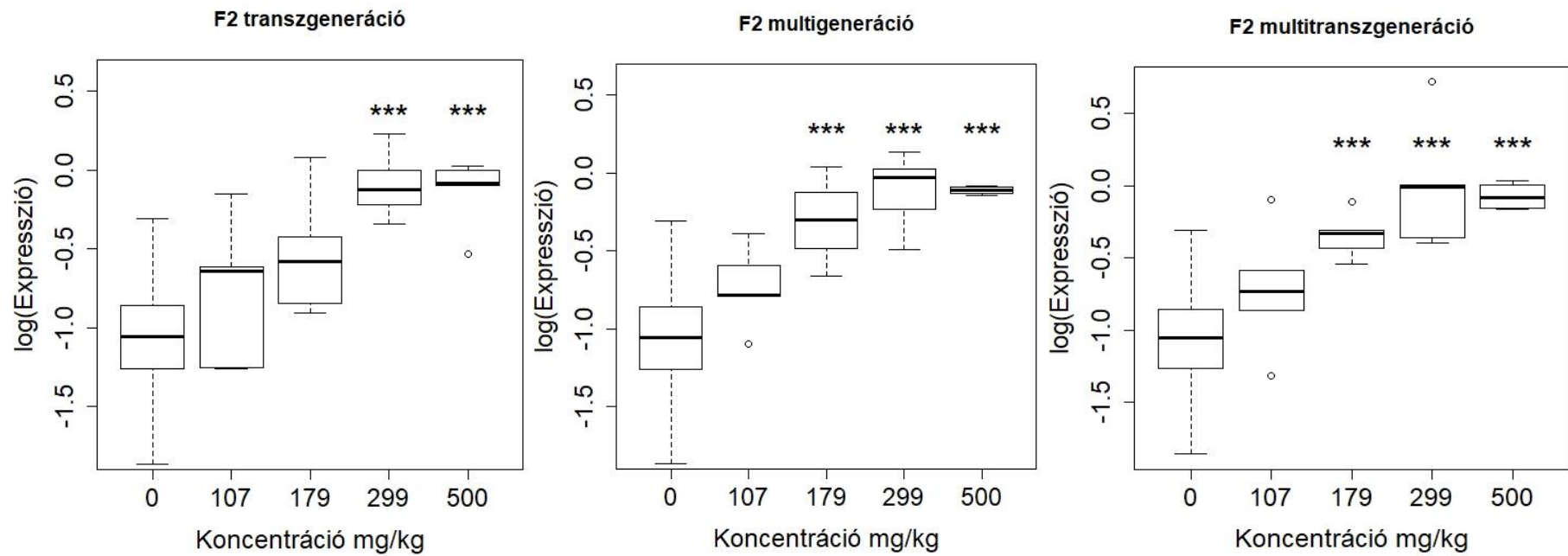
TF1 generációban az állatonkénti RNS mennyiség csökkent a koncentráció növekedésével ($p < 0,001$, $t = -4,1$), a LOEC 179 mg/kg volt ($p = 0,021$, $t = -3,2$). Csak a HSP70 mutatott megnövekedett transzkripciót, azonban ezt a 179 mg /kg koncentrációban tapasztalt hormézisz okozta ($p = 0,009$, $t = 3,4$).

Az MF2 generációban az állatonkénti RNS mennyiség csökkent a koncentráció növekedésével ($p < 0,001$, $t = -3,3$), a LOEC 299 mg/kg volt ($p = 0,05$, $t = -2,7$). A vitrec csökkenő trendet mutatott, azonban nem volt különbség a koncentrációk között. Az ABC expressziója nőtt a koncentrációval, a LOEC érték 299 mg/kg volt. Mind a CYP6N3v2, mint a CYP6N4v1 expressziója erőteljesen nőtt a koncentráció hatására, mindkét esetben a legalacsonyabb koncentráció a 107 mg/kg volt a LOEC. A HSP70 expressziója nőtt a koncentráció növekedésével (12. ábra), a LOEC 179 mg/kg.

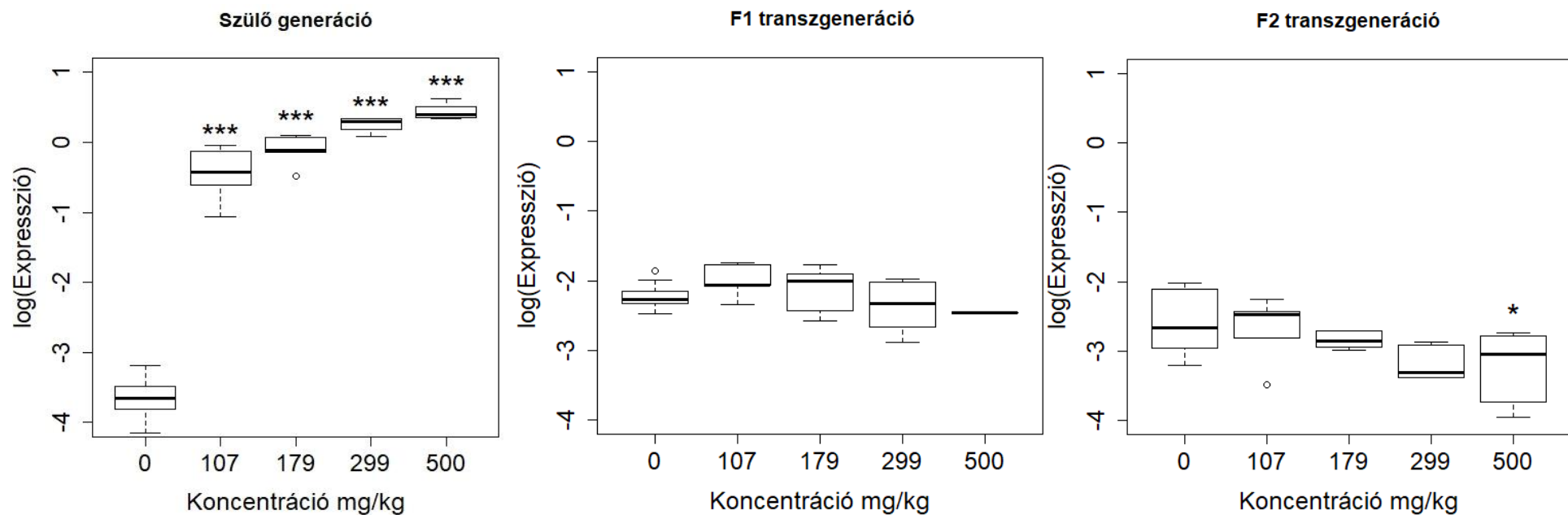
Az MTF2 generációban az állatonkénti RNS mennyiségre nem volt hatása a peszticidnek. Az ABC expresszió 107 mg/kg koncentrációnál egy igen erős horméziszt mutatott ($p = 0,038$, $t = 2,2$). A CYP6N3v2 expressziójában növekvő trend mutatkozott, de nem volt különbség a koncentrációk között. A CYP6N4v1 expressziója csökkent a koncentráció növekedésével, a LOEC 179 mg/kg volt. A HSP70 expressziója nőtt a koncentrációval, a LOEC 179 mg/kg volt (13. ábra).

A TF2 generációban az állatonkénti RNS mennyiségre nem volt a peszticidnek hatása. A HSP70 expressziója nőtt a koncentrációval, a LOEC 299 mg/kg volt (12. ábra). A CYP6N4v1 expressziója csökkent a növekvő koncentrációval, a LOEC 500 mg/kg volt (13. ábra).

Az expressziós eredmények összefoglaló táblázatában (6. táblázat) látható, hogy a multigenerációs csoport a stressz gének megnövekedett expressziójával reagál. A transzgenerációs csoport pedig a HSP70 konstans aktivációjával, illetve a CYP6N4v1 expressziójának csökkentésével reagál. A multitranszgenerációs csoport hasonlóan reagált az TF2 csoporthoz, azonban a CYP6N3v2 is megnövekedett aktivitást mutatott.



12. ábra: F2 generáció HSP70 expresszió a három kezelési csoportban. A vastag sáv a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. Az üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis). A három csillag: $p < 0,001$



13. ábra: A citokrómoxidáz 6N4v2 expressziója a transzgenerációs vonal három generációjában. A vastag sáv a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. Az üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis).*: $0,05 > p > 0,03$, ***: $p < 0,001$

5. táblázat: A Trebon 30 EC génexpressziós vizsgálatának statisztikai összefoglalója. A trend alatt a koncentrációk kontrolltól való különbsége látszik. Ahol nem volt szignifikáns a trend, ott nem volt post-hoc tesz, így ott nincs megjelenítve eredmény. A szignifikáns értékeket félkövérrel szedtem. A függőleges vonal a generációkat választja el egymástól. A koncentrációkat mg aktív hatóanyag/kg száraz talajban adtam meg. *: hormézisz; P: szülők, TF1: transzgenerációs kezelés első generáció, MF1: multigenerációs kezelés első generáció, TF2: transzgenerációs kezelés második generáció, MF2: multigenerációs kezelés második generáció, MTF2: multi-transzgenerációs kezelés második generáció. Az izopenicillin-N-szintetáz nem követett lineáris dózis-hatást, így nem került bele a táblázatba.

Vitellogenin-receptor

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	0,004	-3,1	0,3	1,0	0,383	0,9	0,033	-2,3	0,075	-1,9	0,123	-1,6
107	0,896	-0,8	—	—	—	—	0,869	-0,9	—	—	—	—
179	0,342	-1,7	—	—	—	—	0,823	-0,9	—	—	—	—
299	0,529	-1,4	—	—	—	—	0,156	-2,2	—	—	—	—
500	0,028	-3	—	—	—	—	0,338	-1,7	—	—	—	—

Vitellogenin

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	0,16	-1,4	< 0,001	4,0	0,876	0,2	0,243	-1,2	0,458	0,8	0,227	-1,2
107	—	—	0,643	1,2	—	—	—	—	—	—	—	—
179	—	—	0,984	0,5	—	—	—	—	—	—	—	—
299	—	—	0,019	3,2	—	—	—	—	—	—	—	—
500	—	—	0,013	3,4	—	—	—	—	—	—	—	—

Vitellogenin-szerű fehérje

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	0,280	-1,1	< 0,001	3,9	0,762	0,3	0,393	-0,9	0,42	0,8	0,302	-1,1
107	—	—	0,505	1,5	—	—	—	—	—	—	—	—
179	—	—	0,925	0,7	—	—	—	—	—	—	—	—
299	—	—	0,041	2,9	—	—	—	—	—	—	—	—
500	—	—	0,009	3,5	—	—	—	—	—	—	—	—

ABC-transzporter

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2*		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	< 0,001	5,1	0,967	0	0,547	0,6	0,001	3,7	0,687	0,4	0,338	1
107	0,665	-1,2	—	—	—	—	0,999	-0,3	0,038	2,2	—	—
179	0,792	1	—	—	—	—	0,605	1,3	—	—	—	—
299	0,064	2,6	—	—	—	—	0,006	3,7	—	—	—	—
500	< 0,001	4,8	—	—	—	—	0,049	2,7	—	—	—	—

Citokrómozidáz 6N3v2

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	< 0,001	9,6	< 0,001	9,9	0,177	1,4	< 0,001	5,9	0,041	2,2	0,709	0,4
107	< 0,001	21,7	< 0,001	14,2	—	—	< 0,001	9,4	0,455	1,5	—	—
179	< 0,001	27,1	< 0,001	16,8	—	—	< 0,001	8,4	0,997	0,3	—	—
299	< 0,001	35,4	< 0,001	20,1	—	—	< 0,001	9,1	0,757	1,1	—	—
500	< 0,001	33,2	< 0,001	12,4	—	—	< 0,001	10,1	0,118	2,3	—	—

Citokrómozidáz 6N4v1

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	<0,001	6,9	<0,001	11,6	0,273	-1,1	<0,001	5,2	0,022	-2,4	0,002	-3,4
107	<0,001	21,2	<0,001	17,5	—	—	<0,001	6,2	0,986	-0,5	0,998	-0,3
179	<0,001	23,4	<0,001	17,6	—	—	<0,001	5,5	0,036	-2,9	0,813	-1
299	<0,001	25,9	<0,001	23,6	—	—	<0,001	5,7	0,171	-2,1	0,093	-2,4
500	<0,001	25,2	<0,001	17,4	—	—	<0,001	6,9	0,201	-2	0,045	-2,8

Hősokkfehérje 70

	P		MF1		TF1		MF2		MTF2		TF2	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
trend	0,042	2,1	<0,001	6,1	0,005	3,1	<0,001	5,7	<0,001	5,4	<0,001	5,3
107	0,539	1,4	0,0746	2,6	0,571	1,2	0,211	2	0,31	1,8	0,501	1,4
179	0,93	0,7	0,001	4,3	0,009	3,4	<0,001	4,5	0,006	3,6	0,056	2,7
299	0,789	1	<0,001	5	0,055	2,6	<0,001	5,5	<0,001	5,3	<0,001	4,8
500	0,133	2,2	0,005	3,8	outlayer	outlayer	<0,001	5,8	<0,001	4,6	<0,001	4,6

6. táblázat: Génexpressziós eredmények az F2 generációban. Csak a szignifikáns dózis-hatással rendelkező géneket mutatom be. Vitrec: vitellogenin-receptor, ABC: ABC-transzporter, CYP6N3v2: citokrómoxidáz 6N3v2, CYP6N4v1: citokrómoxidáz 6N4v1, HSP70: hősokkfehérje 70. +: a génexpresszió megemelkedett a koncentráció hatására. -: génexpresszió csökkent a koncentráció hatására. 0: nincs dózis-hatás. Szignifikancia szint: +/- < 0,05; ++/-- < 0,005; +++/--- < 0,001.

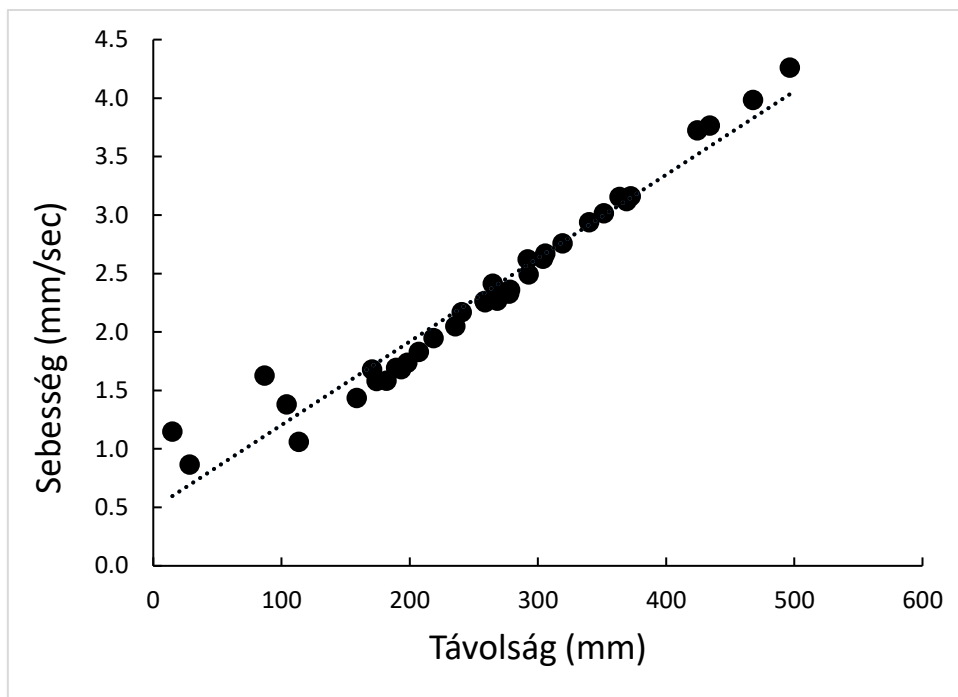
Gének	F2M	F2MT	F2T
Vitrec	-	0	0
ABC	++	0	0
CYP6N3v2	+++	+	0
CYP6N4v1	+++	-	--
HSP70	+++	+++	+++

3.5 Trebon 30 EC viselkedési teszt

Rögtön az inszekticid kezelés után hiperaktivitás volt tapasztalható az *F. candida* egyedeken. Az alkalmazott Trebon 30 EC koncentrációk nem hatottak sem a t_a , sem a t_m paraméterre. Koncentrációtól függetlenül azok az állatok, amelyek nagyobb távolságra mentek a vizsgálati időszak alatt, szignifikánsan gyorsabbak voltak ($y = 0,0087x$; $r = 0,95$; $p < 0,001$) (14. ábra). A nagyobb koncentrációban szignifikánsan gyorsabban és többet mozogtak a kontrollhoz és a kisebb koncentrációhoz képest. Ez a megnövekedett mozgásaktivitás a hiperaktivitás jele. Az akut eredmények statisztikai összefoglalója az 7. táblázatban olvasható.

7. táblázat: A *F. candida* mozgási paraméterei és a Trebon 30 EC koncentráció közötti kapcsolat az első két percben a Petri-csészére helyezés után. NS: nem szignifikáns

Viselkedés	Peszticid koncentrációval való viszonya	Szignifikancia (p)
Mozgással töltött idő (t_m) (sec)	$y = 0,39x + 104,4$	0,57 (NS)
Állás (t_a)	$y = -0,39x + 15,6$	0,57 (NS)
Megtett út hossza (s) (mm)	$y = 6,94x + 224,0$	0,024
Sebesség (v) (mm/sec)	$y = 0,06x + 2,1$	0,007

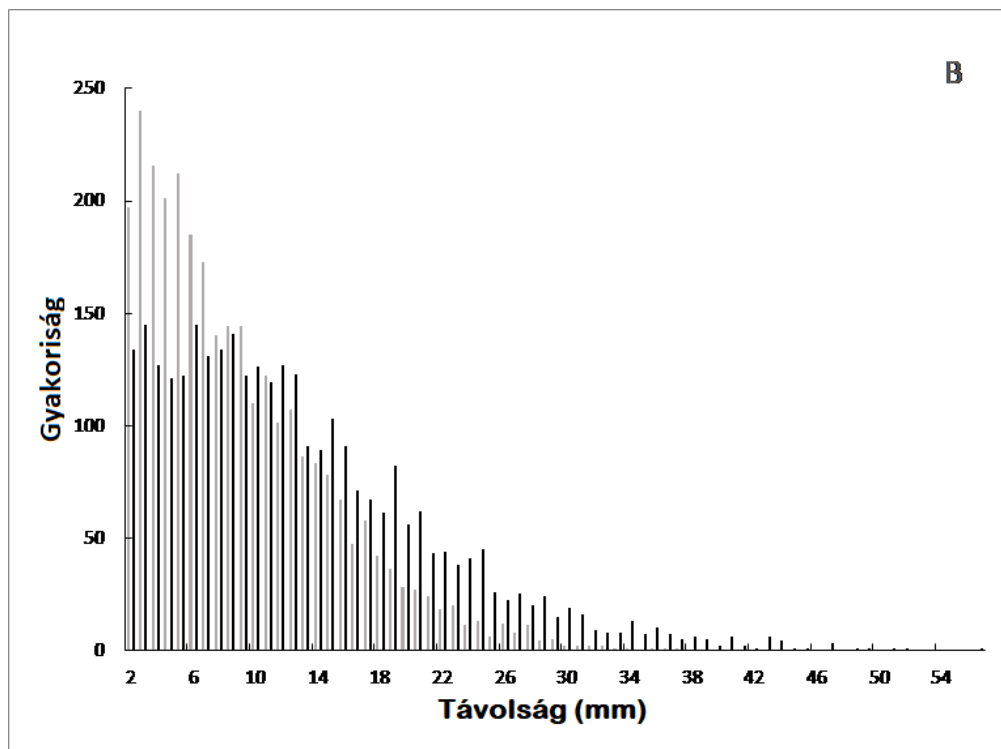
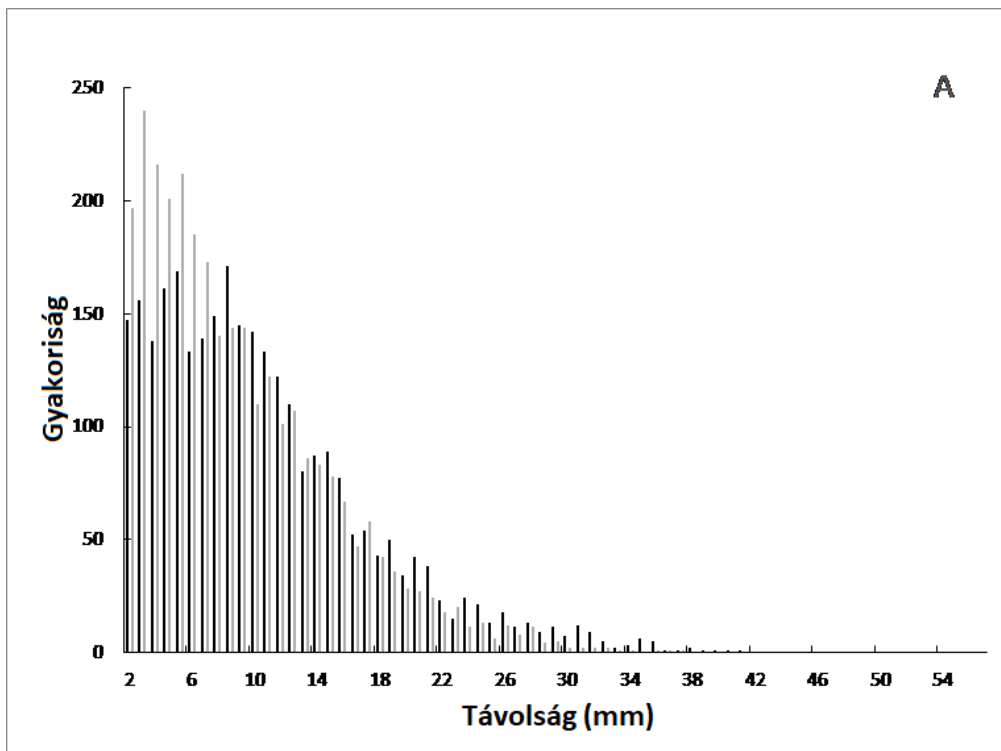


14. ábra: A megtett út és a sebesség közötti kapcsolat a *F. candida* esetén

A fél másodpercenként megtett úthosszak eloszlása megváltozott a kezelés hatására (15. ábra). A kontroll kezelésben a rövid távok domináltak, vagyis az ugróvillás gyakran rövid távolságokat tett meg. A nagyobb koncentrációban megnőtt a hosszabb távolságok dominanciája. A 0-5 mm hosszú távolságok aránya 35,7, 26,9, 21,1 százalék volt a kontrollban, az 1,3 és a 13 ml Trebon 30 EC/L-es kezelésekben, amik szignifikánsan különböztek egymástól ($p = 0,038$). Tehát megváltozott a mozgásmintázat, a megtett úthosszak eloszlása. A ferdeségi értékek minden esetben pozitívak voltak, ami azt jelenti, hogy az eloszlások jobbra eltoltak. Azonban a ferdeség egyre kisebb, ahogy a koncentráció növekszik (8. táblázat). A kurtózis értékek csökkentek a kezelés hatására. A 15. ábra megmutatja a kiugró értékeket, vagyis azt, hogy az extrém úthosszak gyakoribbá váltak a koncentráció emelkedésével (Westfall, 2014). A koncentráció növekedésével csökkenő ferdeség és kurtózis jele lehet az inszekticid kezelés hatására bekövetkező mozgás koordinátlanságnak is.

8. táblázat A *F. candida* fél másodperc alatt megtett út hossz eloszlásának ferdesége és kurtózisa a Trebon 30 EC koncentrációk szerinti lebontásban.

Trebon 30 EC (ml /L)	0	1,3	13
Ferdeség	1,62	1,23	0,88
Kurtózis	1,40	-0,03	-0,85



15. ábra: A fél másodperc alatt megtett úthosszak hisztogramja a *F. candida* mozgásaktivitása közben. A hisztogram 5 mm-enkénti csoportosítással lett létrehozva. A gyakoriság megmutatja minden csoport elemszámát. A: kontroll (szürke) és 1,3 ml Trebon 30 EC/L (fekete), B: kontroll (szürke) és 13 ml/L (fekete).

Az akut hatásokhoz képest nagyon különböző eredményeket kaptunk az egy órás kísérletben, ahol a *F. candida* egyedek egy órát voltak az inszekticides Petri-csészén a videóképzítés előtt. Ebben a kísérletben minden paraméter (t_m , t_a , s , v) szignifikánsan eltért a koncentráció emelkedésével (9. táblázat). A t_a nőtt, a t_m , s és v mind negatívan korrelált az inszekticid koncentráció növekedéssel

9. táblázat: A *F. candida* mozgási paraméterei és a Trebon 30 EC koncentráció közötti kapcsolat egy órával a Petri-csészére helyezés után.

Viselkedés	Peszticid koncentrációval való viszonya	Szignifikancia (p)
Mozgással töltött idő (t_m) (sec)	$y = -7,1x + 114,6$	0
Állás (t_a)	$y = 7,1x + 5,3$	0
Megtett út hossza (s) (mm)	$y = -19,1x + 261,9$	0
Sebesség (v) (mm/sec)	$y = -0,13x + 2,3$	0

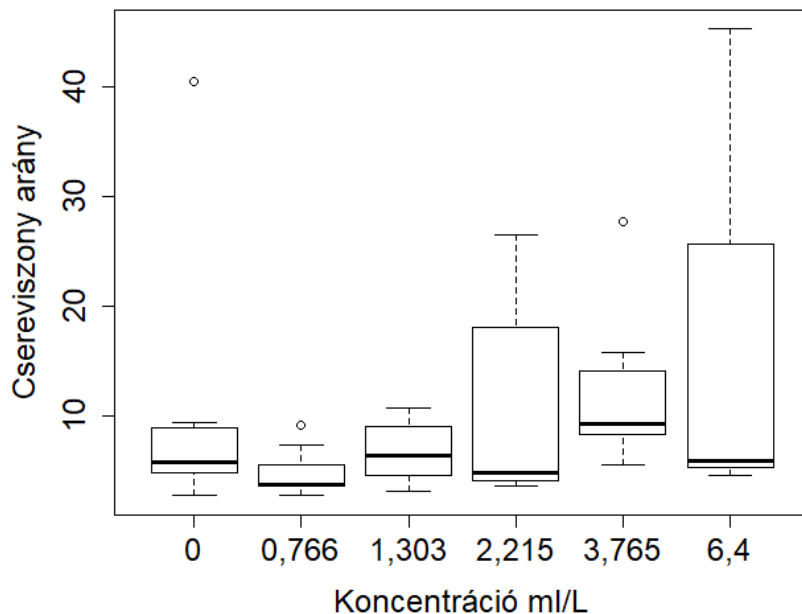
3.6 Trebon 30 EC több generációs életmenet vizsgálat

A generációk trendszerű statisztikai eredményei a 10. táblázatban találhatóak, a kontrolltól való különbségek alább olvashatóak, az eredmények szekcióban.

A szülő generáció különböző kezeléseiben az állatok hosszában a kísérlet kezdetén és a kísérlet végén sem volt különbség a csoportok között. A növekedési görbék között nem volt különbség. Az abszolút növekedés esetén a több-szakaszos lineáris modellben egy gyenge hormézist tapasztaltam ($p=0,049$, $t=2,0$). A teljes peteszámra, a petecsomók számára, az első peterakás időpontjára, a peteátmérők arányára, a petetérfogatra, a kelési sikerre és a szaporodási befektetésre nem volt szignifikáns hatása a kezelésnek. A mortalitás szignifikánsan növekvő dózis-hatást mutatott, azonban a koncentrációk között nem volt szignifikáns különbség (10. táblázat). A táplálékfogyasztásban nem volt különbség a csoportok között és sem a mozgási sebességben, sem a mozgásra fordított energiában nem volt szignifikáns különbség. A növekedés-szaporodás csereviszony nem különbözött szignifikánsan.

A F1 generáció multigenerációs csoportban az állatok kísérlet kezdeti nagyságában nem volt szignifikáns dózis-hatás, de a legmagasabb koncentrációból (6,4 ml/L) származó állatok szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a kontroll csoport egyedei ($p=0,035$, $t=2,2$). A végső hosszban nem volt szignifikáns különbség. A növekedési görbék szerint a koncentráció növekedésével szignifikánsan lassabban nőttek az állatok, a legtöményebb koncentrációban a kontrollhoz képest szignifikánsan lassabban nőttek ($p=0,001$, $t= -3,4$). Az abszolút növekedésben nem volt különbség az kezeléseik között. A teljes peteszám szignifikánsan csökkent a kezelés hatására, és a két legnagyobb koncentrációval kezelt csoport kevesebb petét

rakott, mint a kontroll ($p < 0,026$, $t < -2,3$). A petecsomók száma is szignifikánsan csökkent a kezelés hatására, és számuk kevesebb volt a két legnagyobb koncentrációval kezelt csoportban ($p < 0,012$, $t < -2,6$). Az első peterakás időpontjában, a peteátmérők arányában, a petetérfogásban, a kelési sikerben nem volt szignifikáns különbség. A szaporodási ráfordításban 50%-os hormézist tapasztaltam a legkisebb koncentrációban ($p = 0,024$, $t = 2,3$). A mortalitásban ez esetben is növekvő szignifikáns dózis-hatás volt, azonban nincs szignifikáns különbség a kezelések között (10. táblázat). A táplálékfogyasztás, a sebesség és mozgásba fektetett energia nem változott szignifikánsan a kezelés hatására. A növekedés-szaporodás csereviszony bár szignifikáns dózis-hatás szerint nőtt, vagyis az állatok többet nőttek, mint szaporodtak, de nincs szignifikáns növekedés a koncentráció hatására (16. ábra).

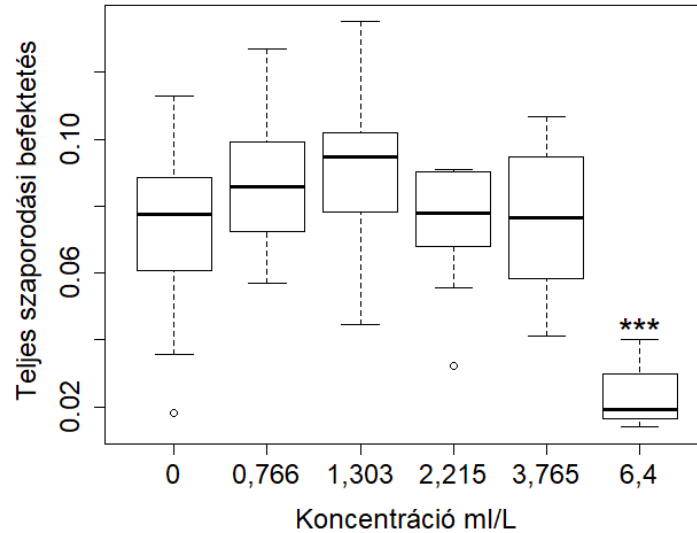


16. ábra: F1 multigeneráció növekedés-reprodukció trade-off aránya, minél nagyobb az arány, annál többet fektetnek a növekedésbe. A vastag sáv a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. Az üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis).

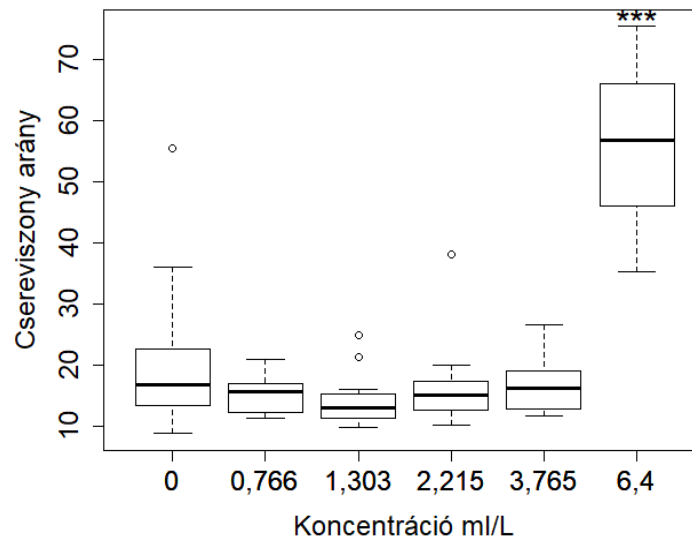
Az F1 generáció transzgenerációs csoportban a koncentráció szignifikáns dózis-hatás összefüggést mutatott a kezdeti mérettel. A multigenerációs csoporthoz hasonlóan a kísérlet kezdetén a legmagasabb koncentrációból (6,4 ml/L) származó állatok szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a kontroll csoport ($p=0,011$, $t=2,6$). A végső hosszban és a növekedési görbék között nem volt különbség. Az abszolút növekedés szignifikáns dózis-hatást mutatott, a legnagyobb koncentrációval kezelt csoport kevesebbet nőtt ($p=0,03$, $t=-2,2$). A teljes peteszám, petecsomók száma, első peterakás időpontja, peteátmérők aránya, petetérfogot, kelési arány, szaporodási ráfordítás, mortalitás, táplálékfogyasztás, sebesség és a mozgásba fektetett energia nem változott a kezelés hatására. A növekedés-szaporodás csereviszony nem különbözött szignifikánsan.

A F2 generáció multigenerációs csoportjában a kezdeti és a végső méretre is szignifikáns dózis-hatást gyakorolt a koncentráció növekedése. A legtöményebb koncentrációval kezelt csoport eleve kisebb mérettel kezdte a kísérletet ($p<0,001$, $t= -7,4$), kisebbek is voltak a kísérlet végén ($p=0,006$, $t= -2,8$). A növekedési görbék azt mutatták, hogy a koncentráció növelése hatására csökkent a növekedési sebesség, a legmagasabb koncentrációval kezelt csoport lassabban nőtt ($p<0,001$, $t= -4,2$). Az abszolút növekedésük nem tért el a többi csoporttól. A teljes peteszám szignifikáns dózis-hatás csökkenést mutatott. A teljes peteszám esetén az 1,3 ml/L-es koncentráció esetén 23%-os hormézist tapasztaltam ($p=0,027$, $t= 2,3$), míg a legtöményebb koncentráció állatai kevesebb petét raktak ($p<0,001$, $t= -6,2$). A petecsomók esetén is szignifikáns csökkenő dózis-hatást tapasztaltam. Az 1,3 ml/L és 2,2 ml/L-es koncentrációnál 20%-os hormézist találtam ($p= 0,024$, $t= 2,3$), és a legtöményebb koncentráció esetén kevesebb petecsomót raktak az állatok ($p<0,001$, $t= -6,1$). Az első peterakás időpontja esetében a többszakaszos lineáris modell az első négy koncentráció esetén az állatok peterakását korábbinak becsülte ($p=0,047$, $t= -2,0$), mint a kontrollt, viszont a legtöményebb koncentráció esetében az állatok később raktak petét ($p<0,001$, $t= -4,0$). A peteátmérők arányában, petetérfogatban, kelési sikerben nem volt szignifikáns különbség. A szaporodási befektetés szignifikánsan csökkent a koncentrációval. A legnagyobb koncentráció szaporodási befektetése lecsökkent ($p= 0,001$, $t= -3,4$) (17. ábra). A mortalitás szignifikánsan nőtt a koncentrációval. A legnagyobb koncentrációban a mortalitás szignifikánsan magasabb volt ($p= 0,035$, $z= 2,1$) (10. táblázat). A legnagyobb koncentrációval kezelt csoportot nem lehetett a következő generációba tovább vinni, mert a mortalitás és az alacsony reprodukció következtében ez a generáció kihalt. A táplálékfogyasztást a koncentráció növekedése szignifikánsan megnöveli. Az 1,3 ml/l-es koncentrációnak kitett csoport egyedei 62%-kal több táplálékot fogyasztottak a kontroll csoporthoz képest ($p=0,008$, $t=2,8$). A sebességben és a mozgásra fordított energiában nem volt különbség. A csereviszony hányados szignifikánsan nőtt a koncentrációval párhuzamosan, tehát többet fektettek az állatok a növekedésbe. Azonban

az 1,3 ml/L koncentrációban szignifikánsan kevesebbet fektettek az állatok a növekedésbe és többet a szaporodásba kontrollhoz képest ($p=0,038$, $t=-2,1$). A legmagasabb koncentráció esetén (6,4 ml/L) jelentősen többet fektettek az állatok a növekedésbe ($p<0,001$, $t= 4,6$) (18.ábra).



17. ábra: F2 multigeneráció teljes szaporodási befektetése. A vastag sáv a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. Az üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis). *** $p<0,001$



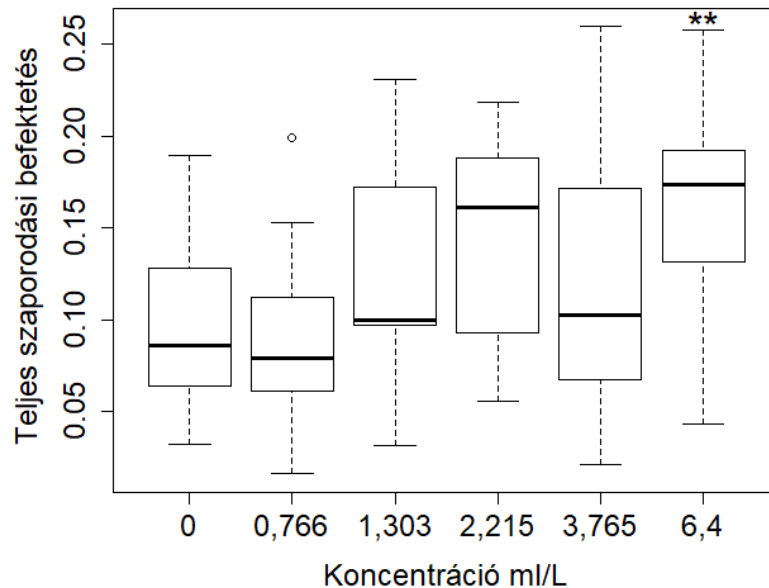
18. ábra: F2 multigeneráció növekedés-reprodukció trade-off aránya; minél nagyobb az arány, annál többet fektetnek a növekedésbe. A vastag sáv a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. Az üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis). *** $p<0,001$

Az F2 generáció transzgenerációs csoportban csak a kelési siker és a táplálékfogyasztás mutatott szignifikáns dózis-válasz hatást. A kelési arány szignifikánsan csökkent, de nem volt különbség a koncentrációk között. Az 1,3 ml/L, 3,8 ml/L és 6,4 ml/L-es koncentrációkkal kezelt állatok többet fogyasztottak, mint a kontroll ($p < 0,013$, $t > 2,55$). A kezdeti méret, végső méret, növekedési görbék, abszolút növekedés, a teljes peteszám, a petecsomók száma, az első peterakás időpontja, a peteátmérők aránya, a petetérfogát, a szaporodási ráfordítás, a mortalitás, a mozgási sebesség, a mozgásra fordított energia és a növekedés-szaporodás csereviszony nem különbözött szignifikánsan.

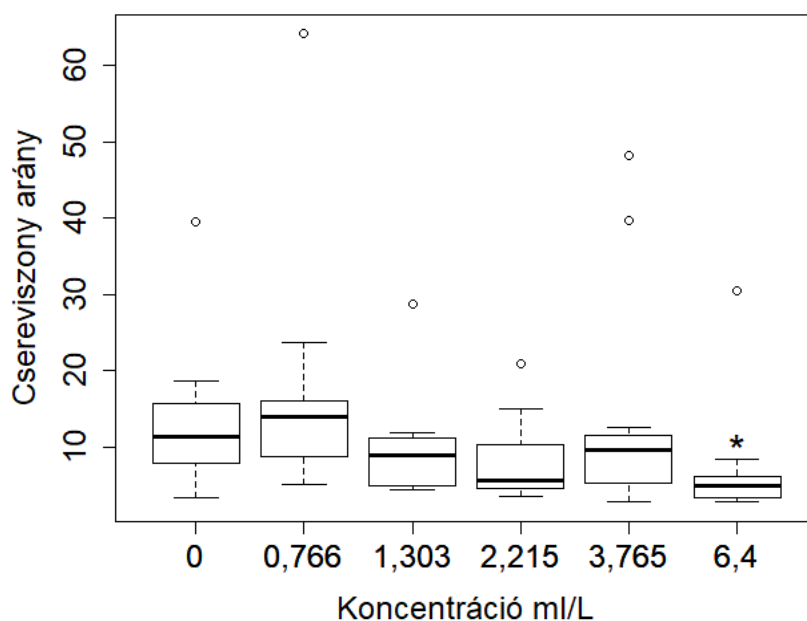
Az F3 generáció multigenerációs csoportjában sem a kezdeti, végső méretben, sem a növekedési görbék között, sem az abszolút növekedésben nem volt különbség. A teljes peteszám, a petecsomók számában, az első peterakás időpontjában, a peteátmérők arányában nem volt szignifikáns különbség. A petetérfogát szignifikánsan csökkent, azonban a koncentrációk hatásai között nem volt szignifikáns különbség. Azonban a kelési arány, vagyis a kelési siker szignifikánsan csökkent a koncentráció növekedésével és a két legközelebbi koncentrációban kisebb arányban keltek ki az egyedek ($p = 0,03$, $t = 2,20$, $p = 0,046$, $t = 2,02$). A teljes szaporodási ráfordításban és a mortalitásban nem volt különbség, a táplálékfogyasztásban, a sebességben és a mozgásba fektetett energiában és a növekedés-szaporodás csereviszonyban sem volt szignifikáns különbség.

Az F3 generáció transzgenerációs csoportjában a kezdeti méret szignifikáns dózis-hatás szerint csökkent a koncentrációval. Az 1,3 ml/L koncentráció állatai szignifikánsan kisebbek voltak ($p = 0,039$, $t = -2,1$). A végső méret szignifikáns dózis-hatás csökkenést mutatott a koncentráció növekedésével. Az állatok a legnagyobb koncentrációjú csoportban kisebbre nőttek, mint a kontroll csoport egyedei ($p = 0,011$, $t = -2,6$). A növekedési görbék között nem volt különbség. Az abszolút növekedés a koncentrációval szignifikáns dózis-hatás csökkenést mutatott. A legközelebbi koncentrációs csoport abszolút növekedése kisebb volt ($p = 0,011$, $t = -2,6$). A teljes peteszám és a petecsomók száma is szignifikáns dózis-hatást mutatott. A 2,2 ml/L és a 6,4 ml/L koncentrációban mindkét paraméter nagyobb volt a kontrollnál (peteszám: $p < 0,035$, $t > 2,2$; csomószám: $p < 0,038$, $t > 2,1$). Az első peterakás időpontja szignifikáns dózis-hatást mutatott és minden koncentrációcsoportban korábbra csúszott ($p < 0,012$, $t < -2,6$). A peteátmérők aránya nem különbözött a csoportok között. A petetérfogát esetén enyhe hormézist tapasztaltam (16%) az első két koncentráció esetén ($p = 0,031$, $t = 2,2$). A kelésben nem volt különbség a csoportok között. A szaporodási befektetés szignifikáns dózis-hatást mutatott és a legnagyobb koncentráció esetében nagyobb volt a kontrollnál ($p = 0,013$, $t = 2,6$) (19. ábra). Szignifikáns mortalitást nem tapasztaltam a transzgenerációs csoportnál. Bár nem volt egyértelmű dózis-hatás a táplálékfogyasztásban, de az 1,3 ml/L, 2,2 ml/L és a 6,4 ml/L

koncentrációkkal kezelt csoportok sokkal kevesebbet fogyasztottak, mint a kontroll csoport ($p < 0,032$, $t < -2,2$). A sebesség és a mozgásba fektetett energia bár szignifikánsan nőtt, a koncentrációk között azonban nem sikerült különbséget kimutatni. A csereviszony hányados szignifikánsan csökken a koncentrációval, tehát többet fektetnek az állatok a szaporodásba a kontrollhoz képest. A legtöményebb koncentráció esetében a hatás szignifikáns ($p = 0,012$, $t = -2,6$) (20. ábra).



19. ábra: F3 transzgeneráció teljes szaporodási befektetés. A vastag sáv a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. Az üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis). ** $0,001 < p < 0,01$



20. ábra: F3 transzgeneráció növekedés-reprodukció csereviszony arány, minél nagyobb az arány, annál többet fektetnek a növekedésbe. A vastag sáv a medián. A doboz alja és teteje az alsó és felső kvartilis. A talp vége a minimum és a maximum értéke az adatoknak a kiugró értékek nélkül. Az üres körök a kiugró értékek (több mint 3/2-del nagyobb, mint az alsó vagy a felső kvartilis). * $p < 0,05$

10. táblázat: Az életmenet stratégiákat vizsgáló kísérlet mortalitási adatai, százalékban megadva. A függőleges vonalak a különböző generációkat választják el egymástól.

Koncentráció (ml/L)	Szülő	MF1	TF1	MF2	TF2	MF3	TF3
0	0	0	0	8	8	8	8
0,776	0	8	0	0	17	0	8
1,303	0	8	0	0	4	17	8
2,215	7	17	0	17	2	17	0
3,765	0	8	17	8	0	8	8
6,4	20	58	8	55	8	—	0

11. táblázat: A több generációs életmenet vizsgálat statisztikai trendjei. A függőleges vonalak a generációkat választják el egymástól. P: szülő generáció, MF1: multigenerációs vonal F1 generáció, TF1: transzgenerációs vonal F1 generáció, MF2: multigenerációs vonal F2 generáció, TF2: transzgenerációs vonal F2 generáció, MF3: multigenerációs vonal F3 generáció, TF3: transzgenerációs vonal F3 generáció. *: hormézisz, félkövér betűtípus: szignifikáns eredmény, a t-érték pozitív vagy negatív volta, megadja a korreláció irányát.

Paraméter	P		MF1		TF1		MF2		TF2		MF3		TF3	
	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték	p-érték	t-érték
Kezdeti méret	0,151	1,4	0,069	1,8	0,011	2,6	<0,001	-5,3	0,321	1	0,514	-0,7	0,033	2,2
Végső méret	0,241	-1,2	0,182	-1,4	0,117	-1,6	0,015	-2,5	0,47	0,7	0,778	-0,3	0,003	-3,1
Növekedési görbék	0,137	-1,5	<0,001	-3,6	0,923	-0,1	<0,001	67	0,34	1	0,216	-1,3	0,316	1
Abszolút növekedés	0,049	2*	0,182	-1,4	0,004	-3	0,45	-0,8	0,575	0,6	0,994	0,01	<0,001	-3,6
Teljes peteszám	0,379	-0,9	<0,001	-4,2	0,664	0,4	<0,001	-4,9*	0,12	1,6	0,837	0,2	0,004	3
Petecsomó szám	0,7	0,4	<0,001	-4,2	0,403	-0,8	0,001	-3,4*	0,272	1,1	0,898	-0,1	0,022	2,4
Első peterakás időpontja	0,263	1,4	0,084	1,8	0,169	1,4	0,266	1,1	0,449	-0,8	0,559	0,6	0,008	-2,8
Peteátmérők aránya	0,606	-0,5	0,945	-0,1	0,18	1,4	0,137	-1,5	0,756	0,3	0,684	0,4	0,354	0,9
Petetérfogat	0,178	-1,4	0,476	-0,8	0,485	0,7	0,921	0,1	0,449	0,8	0,044	-2,1	0,493	-0,7
Kelési siker	0,488	-0,7	0,464	0,7	0,324	1	0,056	1,9	0,02	2,4	0,006	2,8	0,868	0,2
Szaporodási ráfordítás	0,078	-1,8	0,024	2,3*	0,371	1	0,005	-2,9	0,145	1,5	0,562	-0,6	0,008	2,7
Mortalitás	0,026	2,3	0,002	3,1	0,102	1,6	0,002	3,1	0,309	-1	0,604	0,5	0,56	-0,6
Táplálékfogyasztás	0,525	-0,6	0,106	-1,6	0,525	-0,6	0,008	2,8*	0,011	2,6	0,452	-0,8	0,253	-1,2
Mozgási sebesség	0,673	0,4	0,196	-1,3	0,121	-1,6	0,57	0,6	0,675	0,4	0,721	0,4	0,042	2,1
Mozgásra fordított energia	0,878	0,2	0,527	-0,6	0,445	-0,8	0,694	-0,4	0,729	-0,4	0,943	-0,1	0,014	2,5
Csereviszony	0,442	0,8	0,014	2,6	0,125	-1,6	0,003	3,1	0,073	-1,8	0,651	0,5	0,005	-2,9

4. Diskusszió

4.1 Trebon 10 F dózis-hatás kísérlet

A mortalitás nem függött a koncentrációtól, az utódok száma viszont erős koncentrációfüggést mutatott. Ez tipikus eredmény, mivel az élettani jellegek érzékenyebb paraméterek, mint a mortalitás (Crouau et al., 1999; San Miguel et al., 2008). Más, célszervezeteket célzó kísérletek során a Trebon 10 F az *Adoxophyes orana* (almailonca vagy almalevél sodrómoly) esetén például nem bizonyult hatékony inszekticidnek. Az AdorGV (Capex 2), etofenprox (Trebon 10 F), flufenoxurone (Cascade 5 EC) összehasonlításban a Trebon 10 F mellett maradt a legtöbb sérült hajtás a gyümölcsösökben (Kocourek et al., 2007). Ezzel szemben egy másik rokonvegyület, a Trebon EC 20%[®], a *Trichogamma dendrolimi* parazitoid darázs esetén közel 100 %-os mortalitást okozott a kiszórási koncentrációban, összehasonlítva a Bt vagy cartap inszekticidekkel, amik csak 20-40% mortalitást okoztak (Takada et al., 2001a). A mortalitást természetesen befolyásolhatja az különböző modell állatok eltérő érzékenysége, eltérő expozíciós viszonyok és a különböző formuláció is lehet. Sajnos az én kísérletem nem hasonlítható össze az irodalmi adatokkal, mivel sem *F. candida* vagy más ugróvillásra Trebon 10 F vagy más Trebon készítményre vonatkozó kísérleti eredményeket, sem EC₅₀, LOEC adatot nem találtam az irodalomban.

4.2 Trebon 10 F reprodukciós és táplálékválasztási teszt

4.2.1 Trebon 10 F reprodukciós kísérlet

A teljes peteszám és a peteméret között fordított összefüggés van a rovaroknál, ami a reprodukció és a reprodukció közötti csereviszony (trade-off) következménye (Mousseau és Fox, 1998). Azonban a Trebon 10 F esetén nem találtam dózis-hatás összefüggést a peteszámmal, sem a szülő, sem az utódgenerációban. A *F. candida* faj esetén ellentmondásos adatok találhatóak az irodalomban a különböző peszticidekre vonatkozóan. Crommentuijn *et al.* (1997) koncentrációfüggő csökkenést talált a teljes peteszámra, amikor a kloropirifosz inszekticidet és a trifeniltin-hidroxid fungicidet *F. candida* fajon tesztelte. Ellenben Widarto *et al.* (2007) a peteprodukció szignifikáns serkentését tapasztalta a nonilfenol (peszticid adjuváns) esetén. Cutler (2013) szerint a pete reprodukció és koncentráció korrelációja egy hormetikus dózis-hatás görbét követett. A karbaril 4, 5,5 és 7 mg kg⁻¹ koncentrációban a kontrollhoz képest növelte a teljes peteszámot (Cardoso et al., 2014). A mi eredményeink nem vágnak össze a fenti kísérletekkel, mivel a Trebon 10 F inszekticid nem volt hatással a teljes peteszámra sem a szülő-, sem az utódgenerációban. A legvalószínűbb oka ennek az lehet, hogy (i) a tesztelt koncentrációk a hatásos dózis alatt voltak

(vagyis a koncentráció alacsonyabb volt, mint a LOEC), vagy (ii) az általunk használt peszticidnek különböző a hatásmechanizmusa, mint a fenti vizsgálatokban használtaknak. Az etofenprox például az idegrendszer nátrium csatornáit blokkolja a repolarizációs fázisban (Soderlund et al., 2002). Az etofenproxtól eltérően mind a kloropirifosz (Crommentuijn et al., 1997), mind a karbaril (Cardoso et al., 2014) kolinészteráz enzim inhibitorok (Karanth és Pope, 2000; Metcalf et al., 1966).

A peteméret más eredményeket mutatott, mint a teljes peteszám, ugyanis a Trebon 10 F hatására módosult a peteméret. A szülőgenerációban az inszekticid kezelés koncentráció-függően csökkentette a petetérfogatot. Ezt alátámasztják korábbi kutatások is, miszerint csökken a reprodukcióba való befektetés, amennyiben rosszak a környezeti feltételek (Fox et al. 1997; Fox és Czesak 2000). Eszerint az elmélet szerint, a *F. candida* kisebb petéket rak, amennyiben nagy az egyedsűrűség és a táplálékelérhetőség limitált (Tully és Ferrière, 2008). A jelen kísérletben a Trebon 10 F inszekticid hasonló hatást fejtett ki a szülőgenerációban, kisebb petéket raktak az egyedek a koncentráció növekedésével. Ráadásul a peteszám negatívan korrelált a petemérettel, amit Tully és Ferrière (2008) is kimutatott. A Trebon 10 F embrionális fejlődésre gyakorolt serkentő hatásai is kiderültek ebben a vizsgálatban, mivel a peteátmérő aránya csökkent. Ez azt mutatja, hogy a peték kevésbé voltak kerekék, jobban megnyúlt alakjuk volt a szülő generációban. Hafer és Pike (2010) kimutatta, hogy a *F. candida* petealakja korrelál a pete életképességével. A kerekébb és szabályosabb peték kevésbé voltak életképesek, mint a diszkoid (szferoid) alakú peték (Hafer és Pike, 2010). Ezek az eredmények arra mutatnak, hogy a Trebon 10 F kezelés miatt a szülők kisebb energiát fektettek az utódokba. Ugyanakkor ez jele lehet egy energia-csereviszonynak is a szülők védekező mechanizmusai és a reprodukció között. Ez a hipotézis további vizsgálatokat igényel.

Mind a T, mind az M generációban ellentétes eredmény jött ki az inszekticidnek a peteméretre és a pete-alakra gyakorolt hatásában. A peteszám nem változott a kezelés hatására, de a peteméret nőtt a Trebon 10 F koncentráció növekedésével. Ez annak a jele, hogy az inszekticid kezelés dózis-függő módon megváltoztatta az ugróvillások epigenetikai státuszát. Az ilyen eredmények ritkák az ökotoxikológiában (Vandegehuchte és Janssen 2011, Head *et al.* 2012). Ráadásul a peteméret pozitívan korrelál a *F. candida* utódok életképességével (Tully és Ferrière, 2008). Hasonló eredményeket találtak több herbivór rovarnál (Awmack és Leather, 2002). Az eredményeim azt valószínűsítik, hogy az inszekticidrel kezelt szülők valamilyen módon átadják a stresszről az információt az utódaiknak, amik erre jobb minőségű petével reagálnak. A peszticid által okozott epigenetikai változás így megjelenhet (például hiszton modifikáció formájában). Azonban ebből a vizsgálatból még nem derül ki, hogy a *F. candida* milyen módon adja át az

információt a generációk között a Trebon 10 F inszekticid hatásáról. A mechanizmus felderítése további vizsgálatot igényel.

Az előbbi eredményeimhez hasonlóan fedezett fel Campiche *et al.* (2007), akik a fenoxikarb (egy endokrin diszruptor) szubletális multigenerációs hatását vizsgálták a *F. candida* szülő és első utódgenerációjára. Gyakori jelenség a peszticidek ilyen jellegű multigenerációs hatása, ipari alapanyagok és gyógyszeripari termékek esetében, mint ahogy ezt Martin *et al.* (2009) is demonstrálta.

A hatás jellege és mértéke természetesen, a xenobiotikum hatásmechanizmusától függ (Walker, 2014). A Trebon 10 F egy piretroid típusú inszekticid (FAO, 2006). A hatóanyaga az etofenprox, ami a rovarok idegrendszerében a nátrium-csatornákat blokkolja (EFSA, 2008). Az etofenprox ugróvillásokra gyakorolt pontos hatásmechanizmusa még nem ismert. Azonban az ezen vizsgálatból származó adatokból látszik, hogy hatása van a peteméretre és az embrionális fejlődésre is, mivel a petealak módosul a kezelés hatására.

Amennyiben csak a szülőgenerációt kezeltem (T csoport), az eredmények nagyon hasonlóak voltak a multigenerációs kezeléshez. Ez bizonyítja, hogy a Trebon 10 F-nek van transzgenerációs hatása. Inszekticidek transzgenerációs hatását korábban egy darázs fajon (*Trichogramma galloi*) (Costa *et al.*, 2014), illetve egy édesvízi puhatestűn (*Physa pomilia*) (Kimberly és Salice, 2014) is bizonyították. Hafer *et al.* (2011) a táplálékélérhetőség, míg Campiche *et al.* (2007) rovar növekedésszabályozók (metoprén és teflubenzuron) transzgenerációs hatásait mutatta ki a *F. candida* fajon. Az előző kísérletben alkalmazott peszticidekkel szemben az etofenproxnak, a Trebon 10 F hatóanyagának magas az oktanol/víz aránya ($\log K_{ow}$: 6,9), ami lehetővé teszi, hogy bioakkumulálódjon a zsírszövetben és a zsírban (például a *F. candida* pete citoplazmájában és a fejlődő embrióban) (Hopkin 1997, Walker *et al.* 2006). Amennyiben ez a hipotézis érvényes, érthetővé válik a Trebon 10 F hatása a peteméretre. Azonban az etofenprox hatásmechanizmusa a *F. candida* embrionális fejlődésre egyelőre ismeretlen.

Vizsgálataim eredményei rávilágítanak a Trebon 10 F multigenerációs és transzgenerációs hatásaira a *F. candida* pete-paramétereire, és úgy tűnik hogy elsősorban a peteméret az érintett tulajdonság. Ezek a hatások dózis-függőek. A fenti disszkusszióban érveket ismertettem arra vonatkozóan, hogy a petetulajdonságok megváltozása fontos következményekkel járhat az *F. candida* populációdinamikájára nézve. Hasonlóképpen, Benton *et al.* (2005) bizonyította, hogy a különböző peteméretű különböző populációs növekedési rátához vezetnek egy talajban élő atka populációjában (*Sancassania berlesei*).

4.2.2 Trebon 10 F táplálékválasztási kísérlet

A szülőgenerációban tapasztaltak alapján azt feltételeztem, hogy a kontroll csoportok azért fogyasztanak több kukorica levelet, mivel a monodietikus élesztőn tartás után, valamilyen olyan tápanyagot próbálnak nagyobb mennyiségben felvenni, amiben a kukorica levél gazdagabb. Ám az első generációs kísérletben a kontroll csoportoknál nem találtunk preferenciát, mely alapján ez a feltételezés nem állja meg a helyét. Alapvetően a *F. candida* esetén a szaprofita gomba preferencia az, amit korábbi kísérletek visszaigazolnak (Scheu és Simmerling, 2004).

A két generációban látható koncentráció szerinti elrendeződés alapján kapott eredmények azt mutatják, hogy a növényvédő szerrel kezelt állatoknak valószínűleg nagyobb szüksége van a jobb minőségű táplálékra (ebben az esetben az élesztőre), mint a kontroll csoportoknak (Jørgensen et al., 2008). Ugyanis a *F. candida* fitnessze akkor a legmagasabb, amikor a preferált táplálékkal etetik (Scheu és Simmerling, 2004). Nem publikált adataink szerint a *F. candida* számára az élesztő sokkal jobb minőségű táplálékot jelent, mint a kukorica.

A második generációnál arra voltam kíváncsi, hogy vajon ha a szülőket kezelem és az utána következő két generáció nem kap kezelést, az elég idő-e ahhoz, hogy elmúljanak a szer hatásai a vizsgált paraméterekre. Mivel a konfidencia intervallumok beszűkültek és a nulla köré rendeződtek, és az állatok nem válogattak, ezért a válasz a feltett kérdésre igen, két generáció már elég ahhoz, hogy a Trebon 10 F hatása megszűnjön. Egy generáció azonban nem bizonyult elégnek a hatás megszűnéséhez, mivel bizonyos transzgenerációs hatások maradtak fenn. Ezt támasztja alá Hafer et al. (2011) táplálékélérhetőséggel végzett kísérlete is, melyben az első petecsomó mérete lecsökkent és az ivarérés késett, amennyiben a nagyszülők táplálék-szegény környezetben voltak.

4.3 Trebon 30 EC dózis-hatás kísérlet

A dózis-hatás kísérletben a reprodukció érzékenyebbnek bizonyult (LOEC: 23,4 mg/kg), mint a mortalitás (LOEC: 187,5 mg/kg), ami elég tipikus reakció (Darvas és Székács, 2010), hiszen a Trebon 10 F esetén is ezt az eredményt kaptuk (mortalitás nem reagált, míg reprodukciós LOEC: 29 ml/L). Ez megerősítette azt a véleményemet, hogy a kísérleteket a reprodukciós és szubletális jellegekre fókuszálva kell folytatnom. A reprodukciós EC₅₀ és a szántóföldi alkalmazásra javasolt koncentrációk alapján választottam ki a génexpressziós vizsgálat és a szubletális teszt koncentrációit. A nagyfokú érzékenység miatt levontam azt a következtetést, hogy az edények zárása előtt 12 órát szellőztetni kell a talajt, illetve a gipszes Petri csészéket is legalább egy órát szellőztetni kell, hogy a naftalin, mely gyártási melléktermék, elpárologhasson. A tapasztalatok alapján a naftalin igen mérgező az állatok számára, de terepi viszonyok között a naftalinnak lehetősége van elpárologni.

A Trebon 30 EC igen hatékony inszekticid. A *Brevicoryne brassicae* (káposzta levéltetű) kezelése esetén az endosulfan (Endosulfan®) és a karbosulfan (Advantage®) kevésbé volt hatékony, mint a Trebon 30 EC, mivel a Trebon 30 EC még három nap után sem hagyta a levéltetű populációt növekedni (Aslam és Ahmad, 2002). A *Trichogamma dendrolimi* parazitoid darázs esetén Bt vagy cartap inszekticidok 20-40% mortalitást okoztak, míg a Trebon EC 20%® közel 100%-os mortalitást okozott a kiszórási koncentrációban (Takada et al., 2001b). Eredményeim alapján a Trebon 30 EC nem volt ilyen toxikus a *F. candida* ellen, melynek oka a különböző modell állatok különböző érzékenysége is lehet.

Sajnos az én kísérletem nem hasonlítható össze az irodalmi adatok, mivel sem *F. candida* vagy más Collembola fajok, Trebon 30 EC vagy más Trebon készítményes kísérleti adatot, sem EC50, LOEC adatot nem találtam az irodalomban.

4.4 Trebon 30 EC több generációs transzkripció vizsgálat

4.4.1 Ökotoxikológiai vizsgálatok

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

A túlélésre és a reprodukcióra gyakorolt transzgenerációs hatás még epigenetikai imprinting által, illetve a peszticid petén keresztüli átadásával is történhetett. A multigenerációs vonalon az inszekticid hatása minden mért paraméteren erősebb volt. Ezt okozhatta egy additív szülői és nagyszülői hatás. Ahogy a két generáción át tartó rossz táplálékélelérhetőség is csökkentette a *F. candida* peterakásainak számát (Hafer et al., 2011), így a Trebon 30 EC hatása is kumulálódni látszik a több generációs kezelés alatt. A szülő generáció csökkent peteszám és megnövekedett petetérfogata arra utal, hogy az ugróvillások megnövelték az egyes utódokba fektett energiát, így maximalizálva az utódszámot. A peteméret és a peteszám közötti negatív korreláció egy jól ismert jelenség (Szabó és Bakonyi, 2017; Tully és Ferrière, 2008). Crommentuijn et al. (1997) kimutatták, hogy a peteszám csökken a klórpírifosz inszekticid és a trifenil-ón-hidroxid fungicid koncentrációjának növekedésével, azonban ők nem mérték a peteméretet. Tehát nem lehet tudni, hogy a szülők mennyi energiát fektettek az egyes utódokba.

Valószínűnek tűnik az a hipotézis, miszerint az egy petébe fektetett megnövelt energia segítségével a teljes reprodukcióba fektetett energia csökkenthető a túlélés és a detoxifikáció javára. Ráadásul a nagyobb pete nagyobb utódot eredményez. A nagyobb utódok életképesebbek

lehetnek, így a fitness maximalizálható a stratégiaváltással (Tully és Ferrière, 2008). Továbbá a peteméret csökkenhet a jól ismert túlélés és reprodukció közötti csereviszony miatt is (Fox et al., 1997; Fox és Czesak, 2000; Mousseau és Fox, 1998). Azonban az én kísérletemben az F1 generációban a peteszám és a térfogat nem változott, míg az F2 generációban hormetikus hatást találtam. Ezt a mintázatot egyfajta adaptáció vagy talán epigenetikai imprinting magyarázhatja. A *F. candida* szaporodási stratégiája nagyon rugalmas, ahogy Tully és Ferrière (2008) bizonyította, azaz a szaporodási paramétereket gyorsan és nagy mértékben tudja változtatni.

A szülő generációban a legmagasabb Trebon 30 EC koncentrációban majdnem kihalt a populáció, de a túlélő egyedek az F1 és az F2 generációban jobban ellenálltak a kezelésnek, a túlélést és a juvenil számot tekintve (magasabb LOEC értékek). Ez ugyanúgy lehet epigenetikai imprinting eredménye, mint a palacknyakhatásé (bottleneck), ami a legrátermettebb állatokat válogatta ki. Az én vizsgálatomhoz hasonlóan a *Myzus persicae* levéltetvek, hormetikus tartományba eső imidakloprid koncentrációval kezelve, négy generáció múlva kevésbé voltak érzékenyek; több volt a túlélő ugyanolyan kezelés hatására, mint a szülő generációban (Rix és Cutler, 2018).

4.4.2 Génexpresszió

A csökkenő RNS mennyiség, ami egy nem kezelt generációig kiterjedt, mind a transz-, mind a multitranszgenerációs kezelésben, az állatok etofenprox hatására bekövetkező általánosan rosszabb egészségi állapotát tükrözi. Salinas et al. (2013) három különböző multigenerációs hatást különböztetett meg, amelyek jól magyarázzák az én eredményeimet is. Az első típus, amikor a szülői környezet befolyásolja az utód fenotípusát, de nincs meg a plaszticitás, ami az aktuális környezetre reagálna. Ebben az esetben a környezet és a fenotípus aszinkronizálódhat. A második típus, amikor a szülői hatás és a plaszticitás befolyásolja a fenotípust, de nincs interakció a két hatás között. A harmadik típus, amikor a szülői hatás és a fenotipikus plaszticitás interakcióba lép. A szülői hatás bekövetkezhet epigenetikai hatásra is, azonban annak stabilitása eltérhet a különböző gének között (Salinas et al., 2013; Verhoeven és Preite, 2014). Ez befolyásolhatja a szülők információ átadását az utódaik számára.

A szülő generációban a stresszének transzkripciója megemelkedett (ABC-transzporter, citokróm-oxidáz, hősokk fehérje). Ez összhangban van a korábbi eredményekkel, és stressz hatására bekövetkező emelkedett detoxifikációra és stresszválaszra utal (Holmstrup et al., 2014; Nota et al., 2009). Ezzel szemben az IPNS géntől egész más fajta reakciót tapasztaltam. A legkisebb koncentrációjú kezelésben erősen csökkent a transzkripció, majd a koncentráció emelkedésével dózis-válasz reakció szerint emelkedett a transzkripció. Először elérte a kontroll szintet, majd a két legmagasabb koncentráció a kontroll fölé nőtt. Ennek a jelenségnek több

magyarázata is lehet. Az első, hogy a Trebon 30 EC inszekticidnek antimikrobiális hatása van, ami lehetővé teszi, hogy a detoxifikációba fektesse az állat az energiát az antibiotikum termelés helyett. Azonban néhány xenobiotikum érzékenyíti az állatokat a fertőzésekkel szemben, mint például a fenantrén, ami az antimikrobiális gének aktivációjához vezetett (Nota et al., 2009), illetve a diclofenac, ami az immunitással kapcsolatos gének transzkripcióját emelte meg (Chen et al., 2015). Eredményeimhez hasonlóan, az *Eisenia fetida* trágyagiliszta citokróm P450 expressziós szintje hormetikus mintát mutatott enrofloxacin kezelés hatására (Li et al., 2018), így a hormézis is egy lehetséges magyarázata a jelenségnek. Egy további hipotézisem szerint az enyhébb stressz nem az IPNS-t, hanem más géneket aktivál, ami megmagyarázza a kisebb etofenprox koncentrációnál tapasztalt alacsony expressziót és a magasabb koncentrációknál való ismételt növekvő IPNS expresziót. Ez egy lehetséges magyarázat, mivel a fenantrén és a diclofenac kitettség esetén a *F. candida* IPNS génje nem aktiviálódott (Chen et al., 2015; Nota et al., 2009).

A multigenerációs kezelésben minden stresszgén (IPNS kivételével) erős dózis-függő mintázatot mutatott. Mind az F1, mind az F2 generáció transzgenerációs kitettségben a HSP70 transzgenerációs hatásokat mutatott dózis-függően. Ez egy stabil epigenetikai mósosulás is lehet a HSP70 génen (Verhoeven és Preite, 2014).

A HSP70 expressziós mintáját be lehet sorolni Salinas et al. (2013) egyik epigenetikai kategóriájába, mivel az F2 generációban nem látszik különbség a kezelési csoportok között. A CYP6N4v1 gén expressziója dózis-függően nőtt a szülőgenerációban, majd az F1 transzgenerációs csoportban a Trebon 30 EC inszekticidnek látszott hatása. Azonban az F2 transzgenerációs csoportban az expresszió csökkent a nagyszülői koncentráció növekedésével. Erre az eredményre többféle magyarázat is létezik. Az első, hogy a különböző expressziós minták, így az F2 generációban tapasztalható csökkenés egy random epigenetikai modifikáció eredménye (Verhoeven és Preite, 2014). De a random modifikáció nem magyarázza meg az F2 generációban található stabil trendet. A második lehetőség, hogy a mintázat a harmadik epigenetikai kategóriába sorolható (Salinas et al. 2013), amikor a környezet és az epigenetikai mintázat interakcióba lép egymással, így különböző lehet a mintázat a juvenil kitettség (F1) és a kezelés hiánya esetén (F2).

Az MTF2 generáció nagyon hasonló mintát mutatott, mint a TF2 kezelés. A HSP70 expresszió emelkedett, CYP6N4v1 csökkenést mutatott a szülői koncentrációval az MTF2 generációban. Általában a CYP6N4v1 transzkripciója nő a növekvő inszekticid kitettséggel. Például a fenantrén és a kadmium koncentráció növekedése (de Boer et al., 2013), vagy egy szeméttel talajával történt expozíció utáni a a CYP6N4v1 expresszió növekszik (Chen et al., 2014). A csökkent expresszió okai hasonlóak lehetnek a TF2 generációhoz; random epigenetikai modifikáció vagy harmadik típusú epigenetikai modifikáció (Salinas et al. 2013). MTF2 expressziós mintázata emelkedett stressz-szintről árulkodik, a megemelkedett ABC-transzporter

szinten keresztül. Az eredmények egybevágóak azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint az ABC-transzporter expresszió megemelkedik kadmium kitétség hatására, ugyanis kiszállítja a káros anyagokat a sejtekből (Chen et al., 2014), így az etofenproxot is eltávolíthatja a sejtéből.

A szaporodással kapcsolt gének a jól ismert energia-allokációs elmélet szerint reagáltak a inszekticid okozta stresszre (Congdon et al., 2001). A szülő generációban és az MF2 generációban a vitellogenin-receptor transzkripció csökkent a növekvő Trebon 30 EC koncentrációval. Mivel ez a gén nem csak a vitellogenin transzporttal, de az ivarérettség elérésével is kapcsolatban van (Cong et al., 2015), ezért ez arra utalhat, hogy az ugróvillások később érték el az ivarérettséget a magasabb Trebon 30 EC koncentrációk esetén. A fent említett vitellogenin receptor dózis-hatás összefüggés és a petetérfogathatás növekedés alátámasztja azt a hipotézist, hogy a szülők több energiát fektettek egy adott utódba. Ugyanezt az eredményt kaptuk a Trebon 10 F inszekticiddel végzett reprodukciós kísérletben is. A növekvő inszekticid koncentrációval nőtt a petetérfogathatás, de a peteszám nem változott, ami azt jelenti, hogy az ugróvillások több energiát fektettek egy adott utódba (Szabó és Bakonyi, 2017). A multigenerációs kezelés F1 generációjában megemelkedett a vitellogenin és a vitellogenin-szerű fehérje expressziója. Azonban ez nem járt sem a peteszám, sem a peteméret megnövekedésével, ami arra utal, hogy a vitellogenint és a vitellogenin-szerű fehérjét antioxidánsként használták fel az állatok. Corona et al. (2007) azt találta, hogy a mézelő méh (*Apis mellifera*) méhkirálynőiben a vitellogenin, mint a pete szikanyagának prekursora, antioxidánsként is felhasználható a méhek szervezetében, ami a királynők élettartamát is növelte. Ez azt sugallja, hogy a vitellogenin a *F. candida* fajban is lehet antioxidáns.

Multigenerációs kitétségénél az F2 generációban a petetérfogathatás és a peteszám hormetikus növekedést mutatott. Ez valószínűleg nem a vitellogenin transzkripciónak köszönhető, mivel a Trebon 30 EC nem befolyásolta ezt a végpontot az F2 generációban. Inkább a stresszgenek intenzív expressziója okozhatta a hormézist a szaporodásban. Amikor *Myzus persicae* alacsony imidakloprid koncentrációnak volt kitéve, az reprodukciót stimulált. Azonban a hormetikus hatás csereviszonyt váltott ki, mert a következő generációkban csökkent a reprodukció. A generációk alatti összes szaporodási ráfordítás viszont magasabb volt a hormetikus koncentrációban, mint a kontrollban (Ayyanath et al., 2013).

Az MF2 és az MTF2 kezelési csoportokban különbséget találtam a fitness maximalizáló stratégiában. A kisebb Trebon 30 EC koncentrációnál a multigenerációs csoport többet fektetett az egyes utódokba, így a juvenileknek nagyobb az esélye a túlélésre, ha később inszekticid kitétség lép fel (Tully és Ferrière, 2008). A multitranszgenerációs csoport inkább a több utód termelésébe fektetett energiát. Így valamennyi utód túlél szennyezés esetén is, de a tiszta talajban gyorsan vissza tud állni a populáció az eredeti méretére. A későbbi generációkban valószínűleg azért tűnik el a pozitív hatás (hormézis), mert a generációkon keresztüli kitétség összeadódik.

Az a hipotézisem, hogy az ugróvillásoknak több energiát kell a detoxifikációba fektetni a magasabb koncentrációkban. A megemelkedett stresszgén expresszió azt mutatja, hogy az ugróvillásoknak nem maradt elég energiájuk, hogy az utódokba fektessenek. Hasonló eredményeket találtak Vandegheuchte et al. (2010), amikor *Daphnia magna* populációt növekvő cink hatásának tették ki. A stresszgének expressziója megemelkedett, míg a juvenilisok száma és mérete csökkent az F1 és F2 generációban a kontrollhoz képest. A másik lehetőség, hogy az eredményeink egy korai rezisztenciát jeleznek, ahogy az alacsony imidacloprid koncentrációnak kitett *Myzus persicae* fajnál is történt. Négy generációnyi kitettség után a levéltetvek az inszekticid kezelésnek jobban ellenálltak (Rix és Cutler, 2018).

A TF2 csoportban a dózis-függő növekedése a HSP70 transzkripciónak és dózis-függő csökkenése a CYP6N4v1 transzkripciónak epigenetikai esemény lehet. Azonban van egy kis esély rá, hogy ezeket a HSP70 és CYP6N4v1 transzkripciós változásokat az F1 generációs állatok talajban való kitettsége okozza. Mivel a reprodukciós őssejtek már az embrionális fejlődés korai szakaszában megjelennek (Hopkin, 1997), ezáltal az F2 generációs állatok őssejt állapotú kitettsége sem kizárt. Azonban véleményem szerint ez a hatás nem lehet túl jelentős. Először is, a túlélés és a juvenilis szám sokkal kevésbé volt dózis-függő az MTF2 és a TF2 kezelésben, mint az MF2 kezelésben, ami arra utal, hogy az inszekticid kezelés hatása nem túl erős a két transzgenerációs típusú kezelésben. Másodsor, ha az érzékenyebb paramétert, a génexpressziót vesszük figyelembe, akkor is megkülönböztethetőek a különböző kezelés típusok. A transzgenerációs csoportban a CYP6N4v1 expresszió csökkent és csak a HSP70 stresszgén aktiválódott, míg a multigenerációs csoportban a legtöbb stresszgén aktiválódott és a vitrec is reagált a kezelésre. Így még ha az inszekticid gyakorolt is hatást az őssejtekre, az nem tűnik jelentős hatásnak az F2 generációban. Az epigenetikai módosulások vezethetnek inszekticid rezisztenciához (Brevik et al., 2018), de ennek a mechanizmusa kevésbé ismert.

Összefoglalva bizonyítékot találtam arra, hogy a Trebon 30 EC inszekticidnek van transzgenerációs és multigenerációs hatása is a *F. candida* ugróvillás fajra. A transzgenerációs kezelésben a túlélés és a reprodukció, mint végpont az F1 generációig reagált az inszekticid hatására. Ez valószínűleg az F1 generáció juvenilis egyedeinek kitettsége miatt lehetett. Transzgenerációs hatásokat a HSP70 és CYP6N4v1 gének transzkripciója esetében találtam az F2 generációban. Ekkor a HSP70 gén expressziója nőtt, míg a CYP6N4v1 gén expressziója csökkent a koncentráció növekedésével. Ezen mintázat mögötti molekuláris mechanizmusok felderítése további vizsgálatokat igényel.

A multigenerációs hatások az egyre magasabb juvenilis számban (LOEC alapján számolva) nyilvánulnak meg a generációk során.

A kivont RNS mennyiség dózis-függően csökkent a TF2 generáció kivételével, ami a Trebon által okozott általános rossz egészségi állapotra utalhat. A többi stresszgén dózis-függően reagált a Trebon 30 EC kezelésre. A vit1 és vit2 gének expressziós mintázata arra utal, hogy ezen gének által kódolt fehérjék antioxidánsként is funkcionálhatnak a *F.candida* fajban.

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

4.5 Trebon 30 EC viselkedési teszt

Rögtön az inszekticid kezelés után hiperaktivitás volt tapasztalható a *F. candida* egyedeken. Az alkalmazott Trebon 30 EC koncentrációk nem hatottak sem t_a , sem a t_m paraméterre. Azonban minél hosszabb volt a megtett út, annál gyorsabbak voltak az állatok az inszekticid koncentrációtól függetlenül. Hasonló eredményeket találtak futóbogaraknál a *Pterostichus cupreus* (Jensen et al., 1997) és a *Scarites quadriceps* fajoknál (Prasifka et al., 2008). A *Triatoma infestans* poloska három külön vonalán tesztelve is hiperaktivitást tapasztaltak amikor deltametrinnel, lambda-cihalotrinnal és tetrametrinnel kezelték őket (Sfara et al., 2006). Gyors horizontális mozgást tapasztaltak a mezőgazdasági kártevő ázsiai márványpoloskánál (*Halyomorpha halys*) közvetlenül az inszekticid kezelés után, kilenc féle piretroidot tesztelve (Lee et al., 2013). Egy organofoszfát hatóanyag, a dimethoát hiperaktivitást okoz szubletális koncentrációban az érdes pinceáskában (*Porcellio scaber*) (Bayley és Baatrup, 1996). Ezzel szemben egy ragadozó bogár (*Supputius cincticep*) a klorantraniliprol kezelés után hipoaktivitást mutatott (De Castro et al., 2013).

Az én kísérletemben a Trebon 30 EC azonnal növelte a *F. candida* sebességét és a megtett út hosszát, amelyek a hiperaktivitás jelei. Ez a reakció és az azonnali knock-down hiánya egy menekülési reakció lehet, ami biztosítja az állat túlélését a természetben. Ez a jelenség, egy sikeres evolúciós stratégia lehet, ami lehetőséget biztosít az ugróvillásoknak, hogy az inszekticid kiszórás után elmeneküljenek a krónikus kitétség hatásaitól. Megfigyeléseimmel egybevágó eredményt kaptak Lavtížar et al. (2016), akik gyors elkerülést tapasztaltak a *F. candida* fajnál klorantraniliprol (riánodin-receptor, a kalcium-csatorna agonistája) kezelés után. Sørensen et al., 1995 a dimethoát, egy organofoszfát inszekticid esetén nem tapasztaltak azonnali hiperaktivitást, csak 36 órával később csökkent a *F. candida* sebessége és úthossza. Egy másik vizsgálatban ez az ugróvillás faj nem tudta elkerülni a dimethoát szennyezett talajt. Valószínűleg azért, mert a dimethoát gátolja az acetilkolinészteráz aktivitást (Pereira et al., 2013). Ezek a tanulmányok azt mutatják, hogy a *F. candida* mozgásaktivitása igen változatos reakciót ad a különböző peszticid kezelésekre.

A kísérletben tapasztalható kiugróan nagy megtett úthosszak gyakoribbá váltak a koncentráció emelkedésével. A megtett úthossz eloszlás kisebb ferdeség és kurtózis értékei a nagyobb koncentrációval párhuzamosan az inszekticid hatására bekövetkező mozgászavarokra utalhatnak. A piretroid inszekticidek patkányokban okoznak mozgászavarokat (Weiner et al., 2009), de ennek gyakorisága és mechanizmusa még felderítetlen.

A knock-down hatás észlelése számos tényezőtől függhet egy kísérlet során (Schleier III és Peterson, 2011), így a rovar fajától, az inszekticid típusától, a kitétség típusától és mértékétől és a megfigyelési időtől is. Toews et al. (2003) a spinosad inszekticid knock-down hatását nyolc készletbogár fajon tesztelték és szignifikáns különbséget találtak a fajok között. Hasonlóképp Chen et al. (1985) különbséget találtak tíz piretroid hatása között a káposztamolyon (*Plutella xylostella*) tesztelve. A szóját károsító *Rachiplusia nu* moly különböző knock-down viselkedésformát mutatott négy cianopiretroid és permetrin kezelés hatására (Russo et al., 2012). A permetrin sokkal toxikusabbnak bizonyult kontakt kezelésben, amikor a lárvákat piretroiddal átítatott szűrőpapírra tették. A Fastac 50 EC (alfa-cipermetrin hatóanyagú) inszekticid knock-down hatása egy ragadozó futóbogárfajra pozitív korrelációt mutatott az alfa-cipermetrin koncentráció növekedésével (Tooming et al., 2014). Mindezek azt bizonyítják, hogy knock-down hatás különböző fajok esetében eltérő ökológiai jelentőséggel bírhat.

A direkt kitétség rövid- és hosszútávú hatásai jelentősen eltérhetnek egymástól (Fitches és Gatehouse, 1998; Jansen és Gomez, 2014). Az amerikai csótányon (*Periplaneta americana*) leírták azt az általános tünetegyüttest, ami a piretroid kezelést követően a mozgás aktivitásban jelentkezik (Benoit et al., 1986). Igazolták, hogy a hiperaktivitást (excitációs fázis) inkoordináltság és knock-down (tetanizációs fázis) követi. Ez a tünete sorozat ebben a vizsgálatban is megjelent. Azonban a mérések időablaka fontos tényező. A maximum járási sebesség a *F. candida* faj esetében 0,97 mm/sec volt egy laborkísérletben (Sørensen et al., 1995), míg ebben a vizsgálatban 4,3 mm/sec. Ez a sebesség elég ahhoz, hogy pár perccel az inszekticid kijuttatás után találjon az ugróvilla egy üres pórust, területet, mely mentes az inszekticid cseppektől. Azonban ezen hipotézis tesztelésére még a Trebon 30 EC riasztó és vonzó hatását is tesztelni kell.

4.6 Trebon 30 EC több generációs életmenet vizsgálat

A Trebon 30 EC inszekticid hatására multigenerációs és transzgenerációs változásokat tapasztaltam a *F. candida* faj élettörténetében. A szülő generációban a mortalitás enyhe volt, de csökkent a szaporodási befektetés és a növekedésben horméziszt tapasztaltam. A csökkent szaporodási befektetés a mortalitás enyhítésére általános reakciónak mondható a gerincteleneknél (Crommentuijn et al., 1997; Fox et al., 1997; Fox és Czesak, 2000; Vandegehuchte et al., 2010).

A növekedésbe való befektetés is egy védekező reakció lehet, mivel Tully és Ferrière (2008) kimutatták, hogy a nagyobb utód/egyed fitnessze is nagyobb. A szülő generációban tapasztalt kezdeti enyhe hatások után (a modell által becsült hatás mértéke) a transzgenerációs csoport F1 generációja enyhe növekedéscsökkenést produkált, illetve az F2 generációban megnövekedett táplálékigényt mutatott. Ilyen anyai hatásokat találtak a *F. candida* táplálékhiányos körülményei esetén az ivarérettségre és a petecsomók számára (Hafer et al., 2011). A saját eredményeim és Hafer et al. (2011). eredményei azoknak a hatásoknak a fokozatos elmúlására utalnak, melyeket az utódok lecsökkent fitnessének továbbadása, illetve a szer petébe való bekerülése okozhatott. Egyes gerincteleneknél transzgenerációs hatásokra bizonyítékot találtak spinosad esetén a *Trichogamma galloi* parazitoid darázs átalakulási rátájára (Costa et al., 2014) és a kadmiumnak a *Physa pomilia* édesvízi csiga kelési arányára és élettartamára gyakorolt hatása esetében (Kimberly és Salice, 2013).

A multigenerációs csoportban a következő hatások súlyosbodtak a szülő generációhoz képest: csökkent a peték száma, így a teljes szaporodási befektetés is, nőtt a mortalitás és az egyedek inkább a növekedésbe, mint a szaporodásba fektettek energiát. Ez egybevág az irodalomban található eredményekkel is, miszerint rossz körülmények között csökken a szaporodásba való befektetés (Crommentuijn et al., 1997; Fox et al., 1997; Mousseau és Fox, 1998). Ez a trend jellemezte az F2 multigenerációs csoportot is, ahol a kicsi szaporulat és nagy mortalitás miatt a legtöményebb koncentrációval kezelt csoport kihalt. Ez a jelenség a hatások felhalmozódását bizonyítja. A fokozatos fitnessz csökkenés kihaláshoz vezetett. A stressz hatására bekövetkezett csökkent szaporodási befektetés ismert jelenség a *F. candida* faj esetén is. Ezt tapasztalta Crommentuijn et al. (1997), és mi is a Trebon 10 F inszekticiddel végzett vizsgálatunk során (Szabó és Bakonyi, 2017), valamint kimutattuk a Trebon 30 EC génexpressziós vizsgálatban is (Szabó et al., Under review). Az F3 generáció drasztikusan más képet mutatott, mint az előzőek. A legnagyobb koncentráció mellett talált kihalás után a multigenerációs csoportban kissé csökkent a peteméret, de már nem érződtek a peszticid hatások. Az alacsonyabb koncentrációval kezelt csoportok rezisztensebbek lettek. Ez a jelenség hasonló a génexpressziós vizsgálat eredményeihez (Szabó et al. Under review), illetve nagyon hasonló a Leon Paumen et al. (2008) multigenerációs fenantrén kezelés hatására kapott eredményeivel, ahol a negyedik generációban – az én kísérletemhez hasonlóan – a magasabb koncentrációval kezelt csoportok kihaltak a szaporodás hiánya miatt, de az ötödik generációtól az alacsonyabb koncentrációval kezelt csoportok még metabolizálni is tudták a fenantrént. Ugyanakkor a kis koncentrációval kezelt ízeltlábúak szerhez való hozzászokására más példát is találhatunk az irodalomban. A *Myzus persicae* levéltetvek alacsony koncentrációjú imidaklopriddal kezelése esetén négy generáció alatt lecsökkent az állatok érzékenysége (Rix és Cutler, 2018).

A transzgenerációs csoportban egy, a szülőket ért kezelést kompenzáló folyamat indult meg. Az állatok általánosságban kisebbek voltak (kísérlet kezdeti mérete, végső mérete és az abszolút növekedésük is kisebb volt) és nőtt a szaporodási befektetésük a kontrollhoz képest, de egyedi szinten is a szaporodás felé tolódott el a csereviszony, emellett aktívabbak is voltak. Ez a szaporodás és növekedés közötti csereviszony megfelel az általános energia allokációs sémának (Congdon et al., 2001). A *D. magna* cink kitétsége esetén a stressz gének aktiválódnak, míg a reprodukció a következő két generációban csökken a védekezés és reprodukció közötti csereviszony miatt (Vandegheuchte et al., 2010). Az én kísérletemben ennek pont az ellentéte játszódott le, amikor két generációt inszekticid mentes környezetben töltenek az állatok, a stressz gének aktivációja a Trebon 30 EC génexpressziós vizsgálat eredményei alapján valószínűleg lecsökken, s így újra van energia az intenzív szaporodásra. Az ilyen kompenzáló jellegű kiugró szaporodási értékek bár csereviszonyban állnak a következő generációk szaporodásával, de a generációk összesített reprodukciós kimenete így is magasabb lehet, mint a kiugró reprodukció nélkül. Ezt találták a *M. persicae* esetén is, ahol szubletális imidaklopid kezelés hatására a reprodukció kiugró értékeket mutatott, de ez a következő két generációban csökkentette a reprodukciót. Összességében azonban a végső utódszáma így is a kezelt csoportnak volt magasabb, nem a kontrollnak (Ayyanath et al., 2013).

Az F3 generációban tapasztalt, az előző generációktól eltérő mintázat felveti az epigenetikai öröklődés lehetőségét is. A multigenerációs vonalon kialakuló rezisztencia lehet, hogy az epigenotípusok kiválogatódásának, vagy az epigenetikai mintázat megváltozásának az eredménye (Verhoeven és Preite, 2014). Jelen kísérlet eredményei hasonlóak a Trebon 30 EC génexpressziós vizsgálatban tapasztaltakhoz, melyben a magasabb koncentrációval kezelt állatok közel kerültek a kiháláshoz, de a multigenerációs vonalon a juvenilis számban látszik, hogy rezisztensebbek az egyedek (Szabó et al., Under review). Abban a kísérletben a transzgenerációs kezelés vonalán a hatás a generációk között kezd megszűnni, de a citokróm-oxidáz6N4v2 gén az F2 generációban újra expresszálódni kezd, amely adat megerősíteni látszik az epigenetikai jelenség hipotézisét.

4.7 Következtetések

Általánosságban elmondható, hogy mind a Trebon 10 F, mind a Trebon 30 EC inszekticid a gyártó által javasolt kiszórási értékekben kíméletesnek bizonyult a *Folsomia candida* ugróvillás fajra. Súlyosabb mellékhatásokat, mint a kihálás vagy a stressz gének transzgenerációs tartós aktivációja, csak jóval a gyártó által szabadföldi alkalmazásra javasolt koncentrációk felett tapasztaltam. Mindkét mellékhatást a Trebon 30 EC esetén mutattam ki, így valószínűsíthető, hogy a Trebon 10 F inszekticid alkalmazása kíméletesebb a *Folsomia candida* számára, mint a Trebon 30 EC. Erre

utal az is, hogy a táplálékválasztási teszt alapján a Trebon 10 F hatása az F2 generációban már nem tapasztalható. A Trebon 30 EC inszekticiddal végzett részletes élettörténet paraméterek vizsgálatban még az F3 generációban is lehetett peteméret csökkenést tapasztalni a multigenerációs vonalon, továbbá a transzgenerációs vonalon ekkor jelentkeztek intenzív kompenzáló folyamatok. Mindezek a jelenségek a Trebon 30 EC erőteljesebb hatására utalnak.

Mindkét peszticid a szülő generációban reprodukció-csökkenést okoz, mely transzkripciós mérések alapján a detoxifikációba és az általános stresszválaszba való energiabefektetés következménye lehet. Ez jellemző reakció, hasonló a *D. magna* fajjal végzett kísérlet eredményéhez, amikor cink kezelés hatására a reprodukció csökkent, de a stresszgének expressziója emelkedett (Vandegehuchte et al., 2010). A Trebon 10 F esetén, mind a multigenerációs, mind a transzgenerációs csoportban a szaporodásba való megnövekedett befektetést tapasztaltam, míg a Trebon 30 EC esetén a transzgenerációs csoportban nem tapasztaltam a kontrolltól eltérést. Ebben a kísérletben a multigenerációs csoport csökkentette a szaporodásba való befektetését a növekedés javára. A Trebon 10 F és Trebon 30 EC inszekticidok összehasonlításból szintén arra lehet következtetni, hogy a Trebon 30 EC erőteljesebb hatást fejt ki a *F. candida* fajra, mint a Trebon 10 F, mert hatására több energiát fektettek az ugróvillások a túlélésbe, mint a szaporodásba. A két inszekticid eltérő hatása valószínűleg a formuláció következménye. Az azonos hatóanyagú, de eltérő formulációjú inszekticidok eltérő hatása közismert jelenség az ökotoxikológiában (Pereira et al., 2009).

Mindkét peszticid esetén a több generációs kísérletek epigenetikai módosulásra engednek következtetni (Verhoeven és Preite, 2014), melyek a szaporodási paraméterekben és a transzkriptomokban is megnyilvánulnak (Szabó és Bakonyi 2017, Szabó et al., Under review).

Az élettörténet paraméterek részletes vizsgálatánál a negyedik generáció hozott kritikus eredményeket. Ez összevethető a cinknek a *D. magna* fajra gyakorolt hatásával, ahol szintén az F3 generációban tapasztaltak ellentétes reakciókat, illetve haltak ki a magas koncentrációval kezelt populációk (Vandegehuchte et al., 2010). Ezekből az adatokból arra következtettek, hogy a négy generáción át folytatott kísérletekből tudunk következtetni a *F. candida* esetében a hosszútávú hatásokra, érdemes lenne ennek konzisztenciáját megvizsgálni. Amennyiben a négy generáció konzisztensnek bizonyul, egy ilyen tartamú teszt standardizálása és bevezetése a kockázatbecslési módszerek közé hiánypótló lenne.

5. Új tudományos eredmények

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

6. Összefoglaló

A piretroid tartalmú inszekticideket napjainkban elterjedten használják, mivel alacsony a toxicitása a gerinces állatokra. Szántóföldön alkalmazzák ezeket a szereket a mezőgazdaságban, valamint ház körüli rovarirtásra. A Trebon 10 F és újabb formulációja a Trebon 30 EC, etofenprox hatóanyagú piretroid peszticidek.

A *Folsomia candida* (Collembola) fontos tagja a talajok lebontó közösségének, szabályozza a mikroba populációkat, többek között a mikorrhizákat is. Táplálékláncokban, mint prédaállat fontos szerepet tölt be. A Föld szerves anyagban gazdag talajaiban mindenhol elterjedt és laboratóriumban könnyen fenntartható. Emiatt standard modellállat az ökotoxikológiai kísérletekben. Disszertációmban a következő fő célokat tűztem ki: a Trebon 10 F, illetve a Trebon 30 EC inszekticidnek van-e transz- és/vagy multigenerációs hatása, és/vagy epigenetika hatása a *F. candida* ugróvillás faj reprodukciós, növekedési paramétereire, mortalitására, illetve stresszgén transzkriptomjaira.

A Trebon 10 F inszekticid kezelés a szülőgenerációban dózis-hatás összefüggés szerint csökkentette a peteméretet, vagyis a szaporodásba való befektetett energiát. A transz- és multigenerációs csoportokban hasonló eredményt kaptam. Mindkét esetben nőtt a peteméret a kezelés hatásának nagyságával párhuzamosan. Ez a jelenség epigenetikai hatásokra utalhat. A táplálékválasztási teszt alapján az állatok a kezelés hatására egyre inkább a jobb minőségű táplálékot, az élesztőt preferálták, azonban ez a hatás két kezeletlen generáció alatt elmúlt.

A Trebon 30 EC inszekticid kezelés esetében is találtam transz- és multigenerációs hatásokat. A multigenerációs csoport esetén az epigenotípusok kiválogatódásával az állatok szaporodása és túlélése kevésbé volt érzékeny az inszekticidre az F2, illetve az F3 generációban. Az F2 generációban a legnagyobb koncentrációval kezelt csoport a magas mortalitás és az igen alacsony reprodukció miatt kihalt. A transzgenerációs kezeléseknél a hőszokkfehérje generációkon át tartó aktivációját, illetve a citokrómoxidáz 6N4v2 dózis-hatás függő csökkenését tapasztaltam az F2 generációban. A TF1 és TF2 generációban eltűnő élettörténeti hatások után a TF3 generációban egy kompenzáló szaporodás indult meg, melyre az energiát a növekedéséből irányították át az állatok. Valószínűleg ez a hatás epigenetikai módosuláson át valósulhatott meg.

Összességében, mindkét növényvédő szer esetében kimutattam transz- és multigenerációs hatásokat is. A reprodukciós hatások alapján, a Trebon 10 F kevésbé bizonyult mérgezőnek a *F. candida* fajra, mint a Trebon 30 EC. Három, illetve négy generációs kísérleteimben, a multigenerációs kezeléseknél az állatok kevésbé lettek érzékenyek az alacsonyabb koncentrációkra. Ez a jelenség egy epigenomikus szelekció által kialakult rezisztenciának, illetve a stresszgének stabil epigenetikai aktivációjának a következménye lehet.

7. Summary

Nowadays, the use of pyrethroids is more and more common, because in contrast with the earlier used organophosphates, they are not very toxic to vertebrates. These are used in agriculture as insecticides and as domestic insecticides, too. Trebon 10 F and its successor, Trebon 30 EC are pyrethroid pesticides with etofenprox as active ingredient.

Folsomia candida (Collembola) is an essential member of the soil decomposer community, it regulates the microbe populations, including mycorrhizas. It is an important prey in the soil food webs. It is widespread in the organic matter rich soils of the Earth and easy to rear in the laboratory. Because of these traits, it is worth to use *F. candida* as a model animal in ecotoxicological experiments.

My aims were in my dissertation to reveal, whether the Trebon 10 F pesticide has a trans- and multigeneration effect, and the Trebon 30 EC pesticide has a trans- and multigeneration effect, or an epigenetic effect on the reproduction, growth parameters mortality or stress gene transcriptomes of *F. candida*.

In case of Trebon 10 F, parent generation decreased the egg size, thus the investment into the reproduction. The trans- and multigeneration groups showed a similar picture, in both cases the egg size increased with the treatment, what hints epigenetic effects. Based on the food choice test, the animals chose the foodsource of better quality (yeast) if treated, but this effect faded in two non-treated generations.

In case of Trebon 30 EC, trans- and multigeneration effects were found, too. In the multigeneration groups, the reproduction and survival became less sensitive in F2 and F3 generations, most probably because of the selection of the more adaptive epigenotypes. But in F2 generation the group treated with the highest concentration went extinct because of the high mortality and extremely low reproduction. In the transgeneration groups, the heatshock protein gene was activated through generations, and the cytochrome-oxidase 6N4v2 have shown a dose-dependent down-regulation in the F2 generation. After the disappearing life-history effects in F1 and F2 generations, a compensating reproduction was seen in the F3 generation, which was covered from the energy taken from growth. Probably, this effect realized through an epigenetic modification.

In summary, both pesticides has shown trans- and multigenerational effects. However, based on the effects on reproduction Trebon 10 F is less toxic to 6N4v2 than Trebon 30 EC. In my three and four generation experiments, the animals became less sensitive to the lower concentrations, which could be the results of a resistance by epigenomic selection or the stabile epigenetic activation of the stressgenes.

8. Tudományos publikációk

Disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Szabó B. A Trebon 10 F generációkon átívelő hatásai a *Folsomia candida* (Collembola) faj táplálékválasztására; A biológia jövője, a jövő biológusai: Avagy szemelvények a magyarországi felsőoktatási intézményekben végzett tudományos munka eredményeiből.; Szeged: JATE Press, 2014 pp. 81-89.(ISBN:978-963-315-212-6)

Bánszegi O, Kosztolányi A, Bakonyi G, **Szabó B**, Dombos M (2014) New Method for Automatic Body Length Measurement of the Collembolan, *Folsomia candida* Willem 1902 (Insecta: Collembola). PLoS ONE 9(6): e98230. doi: 10.1371/journal.pone.0098230 IF: 3,234

Bakonyi G, **Szabó B.** (2016) Epigenetika, az ökotoxikológia új kihívása, Magyar Tudomány, 117 (8), 997-1004

Bakonyi G., **Szabó B.**, Seres A. (2017) A hormézis, mint ökotoxikológiai jelenség, különös tekintettel a növényvédelemre, BioKontroll, 8:2, in press

Szabó B., Bakonyi G. (2017) The influence of different substrates on the reproduction traits of *Folsomia candida* (Collembola) in an insecticide test, Columella, 4(2): 33-40.

Szabó B., Bakonyi G. (2017) Multigenerational and transgenerational side-effects of an insecticide on eggs of *Folsomia candida* (Collembola), Polish Journal of Ecology, 65, 110–121, doi: 10.3161/15052249PJE2017.65.1.010 IF: 0,436

Szabó B., Seres A., Bakonyi G. (2018) *Folsomia candida* (Collembola) locomotor activity pattern is changed by a neurotoxicant pesticide, Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 64(4), 355-368. IF: 0,846

Szabó B; Lang Zs; Bakonyi G; Märien J; Roelofs D; van Gestel C.A.M, Seres A. Transgenerational and multigenerational stress gene responses to the insecticide etofenprox in *Folsomia candida* (Collembola), Ecotoxicology and Environmental Safety, Under review

Független publikációk:

Szabó B., Seres A, Bakonyi G. (2017) Long-term consumption and food replacment of near-isogenic by Bt-maize alter life-history traits of *Folsomia candida* Willem 1902 (Collembola), Applied Ecology and Environmental Research, 15(4):1275-1286. IF: 0,721

9. Irodalomjegyzék

- 1107/2009/EK, 2009. Az Európai Parlament és a Tanács 1107/2009/EK rendelete.
- Agramonte, N.M., Bloomquist, J.R., Bernier, U.R., 2017. Pyrethroid resistance alters the blood-feeding behavior in Puerto Rican *Aedes aegypti* mosquitoes exposed to treated fabric. PLoS Negl. Trop. Dis. 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005954>
- Agrawal, A., Laforsch, C., Tollrian, R., 1999. Transgenerational induction of defences in animals and plants. Nature 401, 60–63. <https://doi.org/10.1038/43425>
- Alzogaray, R.A., Zerba, E.N., 1997. Incoordination, paralysis and recovery after pyrethroid treatment on nymphs III of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz 92, 431–435. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000300023>
- Amorim, M.J.B., Pereira, C., Soares, A.M.V.M., Scott-Fordsmand, J.J., 2017. Does long term low impact stress cause population extinction? Environ. Pollut. 220, 1014–1023. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.044>
- Andre, J., Charnock, J., Sturzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., Hodson, M.E., 2009. Accumulated metal speciation in earthworm populations with multigenerational exposure to metalliferous soils: cell fractionation and high-energy synchrotron analyses. Environ. Sci. Technol. 43, 6822–6829.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, N., Skinner, M.K., 2005. Toxicology: Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. Science (80-.). 308, 1466–1469. <https://doi.org/10.1126/science.1108190>
- Aslam, M., Ahmad, M., 2002. Effectiveness of some insecticides against cabbage aphid, *Brevicoryne brassicae* (Linnaeus) (Aphididae: Homoptera). J. Res. 13, 145–150.
- Awmack, C.S., Leather, S.R., 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. Annu. Rev. Entomol. 47, 817–844. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145300>
- Ayyanath, M.M., Cutler, G.C., Scott-Dupree, C.D., Sibley, P.K., 2013. Transgenerational shifts in reproduction hormesis in green peach aphid exposed to low concentrations of Imidacloprid. PLoS One 8, 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074532>
- Bakonyi, G., 1989. Effects of *Folsomia candida* (Collembola) on the microbial biomass in a grassland soil. Biol. Fertil. Soils 7, 138–141.
- Bakonyi, G., Dolezsai, A., Mátrai, N., Székács, A., 2011. Effects of consumption of Bt-maize (MON 810) on the Collembolan *Folsomia candida*, over multiple generations: a laboratory study. Insects 2, 243–252. <https://doi.org/10.3390/insects2020243>
- Bakonyi, G., Posta, K., Kiss, I., Fábrián, M., Nagy, P., Nosek, J.N., 2002. Density-dependent regulation of arbuscular mycorrhiza by collembola. Soil Biol. Biochem. 34, 661–664.

[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00228-0)

- Barros, E.C., Bacci, L., Picanco, M.C., Martins, J.C., Rosado, J.F., Silva, G. a., 2015. Physiological selectivity and activity reduction of insecticides by rainfall to predatory wasps of *Tuta absoluta*. *J. Environ. Sci. Heal. Part B* 50, 45–54. <https://doi.org/10.1080/03601234.2015.965621>
- Bayley, M., Baatrup, E., 1996. Pesticide uptake and locomotor behaviour in the woodlouse: an experimental study employing video tracking and 14C-labelling. *Ecotoxicology* 5, 35–45. <https://doi.org/10.1007/BF00116322>
- Beare, M.H., Parmelee, R.W., Hendrix, P.F., Cheng, W., Coleman, D.C., Crossley, D.A., 1992. Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decomposition in agroecosystems. *Ecol. Monogr.* 62, 569–591. <https://doi.org/10.2307/2937317>
- Beloti, V.H., Alves, G.R., Araújo, D.F.D., Picoli, M.M., Moral, R.D.A., Demétrio, C.G.B., Yamamoto, P.T., 2015. Lethal and sublethal effects of insecticides used on citrus, on the ectoparasitoid *Tamarixia radiata*. *PLoS One* 10, e0132128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132128>
- Benoit, M., Bruneau, P., Meinard, C., 1986. Compare activity of Tralomethrin and Deltamethrin on *Periplaneta americana*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 26, 286–291.
- Benton, T.G., Plaistow, S.J., Beckerman, a P., Lapsley, C.T., Littlejohns, S., 2005. Changes in maternal investment in eggs can affect population dynamics. *Proc. Biol. Sci.* 272, 1351–1356. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3081>
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 463, 33–51.
- Bingsohn, L., Knorr, E., Vilcinskis, A., 2016. The model beetle *Tribolium castaneum* can be used as an early warning system for transgenerational epigenetic side effects caused by pharmaceuticals. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 185–186, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.002>
- Bird, A., 2007. Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396–398.
- Boina, D.R., Bloomquist, J.R., 2015. Chemical control of the Asian citrus psyllid and of huanglongbing disease in citrus. *Pest Manag. Sci.* 71, 808–823. <https://doi.org/10.1002/ps.3957>
- Bonduriansky, R., Crean, A.J., Day, T., 2012. The implications of nongenetic inheritance for evolution in changing environments. *Evol. Appl.* 5, 192–201. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00213.x>
- Bossdorf, O., Richards, C.L., Pigliucci, M., 2008. Epigenetics for ecologists. *Ecol. Lett.* 11, 106–

115. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01130.x>
- Brevik, K., Lindström, L., McKay, S.D., Chen, Y.H., 2018. Transgenerational effects of insecticides-implications for rapid pest evolution in agroecosystems. *Curr. Opin. Insect Sci.* 26, 34–40.
- Bur, T., Probst, A., Bianco, A., Gandois, L., Crouau, Y., 2010. Determining cadmium critical concentrations in natural soils by assessing *Collembola* mortality, reproduction and growth. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 415–422. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.10.010>
- Campiche, S., Becker-van Slooten, K., Ridreau, C., Tarradellas, J., 2006. Effects of insect growth regulators on the nontarget soil arthropod *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63, 216–225. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.07.004>
- Campiche, S., L'Ambert, G., Tarradellas, J., Becker-van Slooten, K., 2007. Multigeneration effects of insect growth regulators on the springtail *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.009>
- Campos, M.R., Picanço, M.C., Martins, J.C., Tomaz, a. C., Guedes, R.N.C., 2011. Insecticide selectivity and behavioral response of the earwig *Doru luteipes*. *Crop Prot.* 30, 1535–1540. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.013>
- Cardoso, D.F., Bastos, A.C., Soares, A.M., Loureiro, S., 2014. Short-term exposure to carbaryl and UV radiation increases the reproduction output of the collembolan *Folsomia candida*. *J. Soils Sediments* 14, 1559–1567.
- Certis, 2015. Trebon 30 EC, Safety data sheet. [WWW Document]. <http://www.certiseurope.co.uk/products/insecticides/detail/article/trebon-30-ec-1.html>.
- Chen, G., de Boer, T.E., Wagelmans, M., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2014. Integrating transcriptomics into triad-based soil-quality assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 900–909. <https://doi.org/10.1002/etc.2508>
- Chen, G., den Braver, M.W., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2015. Ecotoxicogenomic assessment of diclofenac toxicity in soil. *Environ. Pollut.* 199, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.01.032>
- Chen, J.S., Lee, C.J., Yao, M.G., Sun, C.N., 1985. Effect of pyrethroids on knockdown and lack of coordination responses of susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 78, 1198–1202.
- Clements, A.N., May, T.E., 1977. The actions of pyrethroids upon the peripheral nervous system and associated organs in the locust. *Pest Manag. Sci.* 8, 661–680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ps.2780080611>
- Coleman, D., Fu, S., Hendrix, P., Crossley, D., 2002. Soil foodwebs in agroecosystems: Impacts of herbivory and tillage management. *Eur. J. Soil Biol.* 38, 21–28.

[https://doi.org/10.1016/S1164-5563\(01\)01118-9](https://doi.org/10.1016/S1164-5563(01)01118-9)

- Collotta, M., Bertazzi, P.A., Bollati, V., 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* 307, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.01.017>
- Cong, L., Yang, W.J., Jiang, X.Z., Niu, J.Z., Shen, G.M., Ran, C., Wang, J.J., 2015. The essential role of vitellogenin receptor in ovary development and vitellogenin uptake in *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Int. J. Mol. Sci.* 16, 18368–18383. <https://doi.org/10.3390/ijms160818368>
- Congdon, J.D., Dunham, A.E., Hopkins, W.A., Rowe, C.L., Hinton, T.G., 2001. Resource allocation-based life-histories: A conceptual basis for studies of ecological toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1698–1703. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/etc.5620200811>
- Contreras, E.Q., Cho, M., Zhu, H., Puppala, H.L., Escalera, G., Zhong, Weiwei, Colvin, V.L., 2013. Toxicity of quantum dots and cadmium salt to *Caenorhabditis elegans* after multigenerational exposure. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1148–1154. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., Robinson, G.E., 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 7128–7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>
- Costa, M.A., Moscardini, V.F., da Costa Gontijo, P., Carvalho, G.A., de Oliveira, R.L., de Oliveira, H.N., 2014. Sublethal and transgenerational effects of insecticides in developing *Trichogramma galloi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Ecotoxicology* 23, 1399–1408.
- Crommentuijn, T., Doodeman, C.J.A.M., Doornekamp, A., van Gestel, C.A.M., 1997. Life-table study with the springtail *Folsomia candida* (Willem) exposed to cadmium, chlorpyrifos and triphenyltin hydroxide, in: *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soil*. Springer US, pp. 275–291.
- Crouau, Y., Chenon, P., Gisclard, C., 1999. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Appl. Soil Ecol.* 12, 103–111. [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(99\)00002-5](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(99)00002-5)
- Crouau, Y., Moïa, C., 2006. The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: an indicator of soil toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 115–21. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.06.002>
- Cutler, G.C., 2013. Insects, insecticides and hormesis: Evidence and considerations for study. *Dose-Response* 11, 154–177. <https://doi.org/10.2203/dose-response.12-008.Cutler>
- Dányi, L., Traser, G., 2008. Magyarország ugróvillásai, in: *A Kárpátmedence Állatvilágának Kialakulása*. pp. 21–28.

- Darvas, B., Székács, A., 2010. Mezőgazdasági ökotoxikológia. L'Harmattan Kiadó, Budapest.
- de Boer, M.E., de Boer, T.E., Mariën, J., Timmermans, M.J.T.N., Nota, B., van Straalen, N.M., Ellers, J., Roelofs, D., 2009. Reference genes for QRT-PCR tested under various stress conditions in *Folsomia candida* and *Orchesella cincta* (Insecta, Collembola). *BMC Mol. Biol.* 10, 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-10-54>
- de Boer, M.E., Ellers, J., van Gestel, C.A.M., den Dunnen, J.T., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2013. Transcriptional responses indicate attenuated oxidative stress in the springtail *Folsomia candida* exposed to mixtures of cadmium and phenanthrene. *Ecotoxicology* 22, 619–631. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1053-1>
- de Boer, T.E., Holmstrup, M., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2010. The effect of soil pH and temperature on *Folsomia candida* transcriptional regulation. *J. Insect Physiol.* 56, 350–355. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.004>
- De Castro, A.A., Corrêa, A.S., Legaspi, J.C., Guedes, R.N.C., Serrão, J.E., Zanuncio, J.C., 2013. Survival and behavior of the insecticide-exposed predators *Podisus nigrispinus* and *Supputius cincticeps* (Heteroptera: Pentatomidae). *Chemosphere* 93, 1043–1050. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.075>
- Deans, C., Maggert, K.A., 2015. What do you mean, “epigenetic”? *Genetics* 199, 887–896. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>
- Driessen, G., Ellers, J., Van Straalen, N.M., 2007. Variation, selection and heritability of thermal reaction norms for juvenile growth in *Orchesella cincta* (Collembola: Entomobryidae). *Eur. J. Entomol.* 104, 39–46.
- ECHA, 2012. Opinion proposing harmonised classification and labelling at EU level of Etofenprox., Committee for Risk Assessment. RAC, Helsinki.
- EFSA, 2008. Conclusion on pesticide peer review: Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance: etofenprox. *EFSA Sci. Rep.* 213, 1–131.
- EU, 2013. Regulation (EU) n°528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Evaluation of active substances. Etofenprox (PT 18). Austria.
- Faddeeva-Vakhrusheva, A., Kraaijeveld, K., Derks, M.F.L., Anvar, S.Y., Agamennone, V., Suring, W., Kampfraath, A.A., Ellers, J., Ngoc, G. Le, van Gestel, C.A.M., Mariën, J., Smit, S., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2017. Coping with living in the soil: the genome of the parthenogenetic springtail *Folsomia candida*. *BMC Genomics* 18, 493–506. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3852-x>
- FAO, 2006. FAO specifications and evaluations for agricultural pesticides: Etofenprox [WWW Document]. http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/Etofen

prox07.pdf.

- Fitches, E., Gatehouse, J.A., 1998. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). *J. Insect Physiol.* 44, 1213–1224. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00090-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00090-0)
- Folker-Hansen, P., Krogh, P.H., Holmstrup, M., 1996. Effect of dimethoate on body growth of representatives of the soil living mesofauna. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33, 207–216. <https://doi.org/10.1006/eesa.1996.0027>
- Fountain, M.T., Hopkin, S.P., 2005. *Folsomia candida* (Collembola): a “standard” soil arthropod. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 201–222. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130331>
- Fountain, M.T., Hopkin, S.P., 2001. Continuous monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a metal exposure test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 48, 275–86. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2007>
- Fox, C.W., Czesak, M.E., 2000. Evolutionary ecology of plant diseases in natural ecosystems. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 341–369. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.021202.110417>
- Fox, C.W., Thakar, M.S., Mousseau, T.A., 1997. Egg size plasticity in seed beetle: an adaptive maternal effect. *Am. Nat.* 149, 149–163. <https://doi.org/10.1086/285983>
- Friard, O., Gamba, M., 2016. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- Gange, A., 2000. Arbuscular mycorrhizal fungi, Collembola and plant growth. *Trends Ecol. Evol.* 15, 369–372.
- Gilchrist, G.W., Huey, R.B., 2001. Parental and developmental temperature effects on the thermal dependence of fitness in *Drosophila melanogaster*. *Evolution (N. Y.)* 55, 209–214.
- Gormsen, D., Olsson, P.A., Hedlund, K., 2004. The influence of collembolans and earthworms on AM fungal mycelium. *Appl. Soil Ecol.* 27, 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2004.06.001>
- Goto, H.E., 1960. Simple techniques for the rearing of Collembola and a note on the use of a fungistatic substance in the cultures. *Entomol. Mon. Mag.* 96, 138–140.
- Guengerich, F.P., 2001. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 611–650. <https://doi.org/10.1021/tx0002583>
- Hafer, N., Ebil, S., Uller, T., Pike, N., 2011. Transgenerational effects of food availability on age at maturity and reproductive output in an asexual collembolan species. *Biol. Lett.* 7, 755–758. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0139>

- Hafer, N., Pike, N., 2010. Shape change in viable eggs of the collembolan *Folsomia candida* provides insight into the role of *Wolbachia* endosymbionts. *Zool. Res.* 31, 623–626. <https://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2010.06623>
- Halaj, J., Wise, D.H., 2002. Impact of a Detrital Subsidy on Trophic Cascades in a Terrestrial Grazing Food Web. *Ecology* 83, 3141–3151. <https://doi.org/10.2307/3071849>
- Hammer, Ø., Harper, D.A.T. a. T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.025>
- Head, J.A., Dolinoy, D.C., Basu, N., 2012. Epigenetics for ecotoxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 221–227. <https://doi.org/10.1002/etc.1707>
- Hertel-Aas, T., Oughton, D.H., Jaworska, A., Bjerke, H., Salbu, B., Brunborg, G., 2007. Effects of chronic gamma irradiation on reproduction in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Radiat. Res.* 168, 515–526.
- Ho, D.H., Burggren, W.W., 2010. Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective *D. J. Exp. Biol.* 213, 3–16. <https://doi.org/10.1242/jeb.019752>
- Hoffmann, J.L., Oris, J.T., 2006. Altered gene expression: A mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.* 78, 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.007>
- Holmstrup, M., Slotsbo, S., Schmidt, S.N., Mayer, P., Damgaard, C., Sorensen, J.G., 2014. Physiological and molecular responses of springtails exposed to phenanthrene and drought. *Environ. Pollut.* 184, 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.005>
- Hopkin, S.P., 1997. *Biology of the springtails (Insecta: Collembola)*. Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo.
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu. Rev. Entomol.* 51, 45–66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- ISO, 2011. Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*). *Int. Stand. ISO 17512-*.
- ISO, 1999. Soil quality-inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants., International Standards Organisation. Geneva, Switzerland. <https://doi.org/10.1515/ci.2000.22.6.167>
- Jansen, J.-P., Gomez, G.S.M.Y., 2014. A large field trial to assess the short-term and long-term effects of 5 insecticides used to control the pollen beetle on parasitic hymenoptera in oilseed rape. *IOBC-WPRS Bull.* 103, 9–16.

- Jensen, C.S., Garsdal, L., Baatrup, E., 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1727–1732. <https://doi.org/10.1002/etc.5620160822>
- Jørgensen, H.B., Hedlund, K., Axelsen, J.A., 2008. Life-history traits of soil collembolans in relation to food quality. *Appl. Soil Ecol.* 38, 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2007.10.003>
- Kaneda, S., Kaneko, N., 2008. Collembolans feeding on soil affect carbon and nitrogen mineralization by their influence on microbial and nematode activities. *Biol. Fertil. Soils* 44, 435–442. <https://doi.org/10.1007/s00374-007-0222-x>
- Karant, S., Pope, C., 2000. Carboxylesterase and A-esterase activities during maturation and aging: Relationship to the toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol. Sci.* 58, 282–289. <https://doi.org/10.1093/toxsci/58.2.282>
- Kim, S.W., An, Y.J., 2014. Jumping behavior of the springtail *Folsomia candida* as a novel soil quality indicator in metal-contaminated soils. *Ecol. Indic.* 38, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.10.033>
- Kimberly, D. a., Salice, C.J., 2014. If you could turn back time: Understanding transgenerational latent effects of developmental exposure to contaminants. *Environ. Pollut.* 184, 419–425. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.09.018>
- Kimberly, D.A., Salice, C.J., 2013. Interactive effects of contaminants and climate-related stressors: High temperature increases sensitivity to cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1337–1343. <https://doi.org/10.1002/etc.2198>
- Klironomos, J.N., Kendrick, W.B., 1995. Stimulative effects of arthropods on endomycorrhizas of sugar maple in the presence of decaying litter. *Funct. Ecol.* 9, 528–536.
- Kocourek, F., Pultar, O., Stará, J., 2007. Comparison of the efficacy of AdorGV and chemical insecticides against the Summer fruit tortrix, *Adoxophyes orana*, in commercial apple orchards in the Czech Republic. *Insect Pathog. Insect Parasit. Nematodes* 30, 171–176.
- Krogh, P.H., 2009. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. Danish Minist. Environment Environmental Proj. No. 1256 2009 1–66.
- Krogh, P.H., João, M., Amorim, D.B., Andrés, P., Slooten, K.B. Van, Domene, X., Geujin, I., Kaneko, N., Knäbe, S., Lana, J., Moser, T., Princz, J., Scott-Fordsmand, J.J., Stubberud, H., Wilke, B.-M., 2008. Toxicity testing with the collembolans *Folsomia fimetaria* and *Folsomia candida* and the results of a ringtest. MiljøMinisteriet, Denmark 1–44.
- Kucharski, R., Maleszka, J., Foret, S., Maleszka, R., 2008. Nutritional control of reproductive

- status in honeybees via DNA methylation. *Science* (80-.). 319, 1827–1830. <https://doi.org/10.1126/science.1153069>
- Lavtižar, V., Berggren, K., Trebše, P., Kraak, M.H.S., Verweij, R.A., van Gestel, C.A.M., 2016. Comparative ecotoxicity of chlorantraniliprole to non-target soil invertebrates. *Chemosphere* 159, 473–479. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.06.036>
- Ledón-Rettig, C.C., Richards, C.L., Martin, L.B., 2013. Epigenetics for behavioral ecologists. *Behav. Ecol.* 24, 311–324. <https://doi.org/10.1093/beheco/ars145>
- Lee, D.-H., Wright, S.E., Leskey, T.C., 2013. Impact of insecticide residue exposure on the invasive pest, *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae): Analysis of adult mobility. *J. Econ. Entomol.* 106, 150–158. <https://doi.org/10.1603/EC12265>
- Leon Paumen, M., Steenbergen, E., Kraak, M.H.S., van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., 2008. Multigeneration exposure of the springtail *Folsomia candida* to phenanthrene : from dose - response relationships to threshold concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6985–6990.
- Li, Y., Zhao, C., Lu, X., Ai, X., Qiu, J., 2018. Identification of a cytochrome P450 gene in the earthworm *Eisenia fetida* and its mRNA expression under enrofloxacin stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.020>
- Liu, N., 2015. Insecticide resistance in mosquitoes: impact, mechanisms, and research directions. *Annu. Rev. Entomol.* 60, 537–559. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020828>
- Lukwa, N., Sande, S., Munosiyei, P., Zimba, M., 2012. Insecticide susceptibility tests conducted in Kamhororo, Masakadza and Chilonga villages in Zimbabwe during the 2011 malaria period. *J. Entomol. Acarol. Res.* 44, 107–114. <https://doi.org/10.4081/jear.2012.e19>
- Mäenpää, K., Leppänen, M.T., Kukkonen, J.V.K., 2009. Sublethal toxicity and biotransformation of pyrene in *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta). *Sci. Total Environ.* 407, 2666–2672. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.01.019>
- Maharjan, R., Jung, C., 2015. Insecticide-mediated behavioral avoidance by bean bug, *Riptortus pedestris* (Heteroptera: Alydidae). *Entomol. Res.* 45, 184–192. <https://doi.org/10.1111/1748-5967.12113>
- Martin, M.T., Mendez, E., Corum, D.G., Judson, R.S., Kavlock, R.J., Rotroff, D.M., Dix, D.J., 2009. Profiling the reproductive toxicity of chemicals from multigeneration studies in the toxicity reference database. *Toxicol. Sci.* 110, 181–190. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp080>
- Martin, T., Chandre, F., Ochou, O.G., Vaissayre, M., Fournier, D., 2002. Pyrethroid resistance mechanisms in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) from West Africa. *Pestic. Biochem. Physiol.* 74, 17–26. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(02\)00117-7](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(02)00117-7)

- Marvin-DiPasquale, M., Agee, J., McGowan, C., Oremland, R.S., Thomas, M., Krabbenhoft, D., Gilmour, C.C., 2000. Methyl-mercury degradation pathways: A comparison among three mercury-impacted ecosystems. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4908–4916. <https://doi.org/10.1021/es0013125>
- Matsumoto, T., 2013. Reduction in homing flights in the honey bee *Apis mellifera* after a sublethal dose of neonicotinoid insecticides. *Bull. Insectology* 66, 1–9.
- Mendes, L.A., Maria, V.L., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B., 2018. Multigenerational exposure of *Folsomia candida* to silver: Effect of different contamination scenarios (continuous versus pulsed and recovery). *Sci. Total Environ.* 631–632, 326–333. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.332>
- Menezes-Oliveira, V.B., Damgaard, C., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B., 2013. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* - Comparing first and second generation effects. *Sci. Total Environ.* 458–460, 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.053>
- Metcalf, R.L., Fukuto, T., Wilkinson, C., Fahmy, M.H., El-Aziz, A.A., Metcalf, E.R., 1966. Mode of action of carbamate synergists. *J. Agric. Food Chem.* 14, 555–562.
- MitsuiChemicals, 2008. Trebon 10 F [WWW Document]. URL <http://www.mitsuichemicals.com/trebon.htm>
- Mousseau, T.A., Fox, C.W., 1998. The adaptive significance of maternal effects. *Trends Ecol. Evol.* 13, 403–407. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01472-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01472-4)
- Mozdzer, T.J., Kramarz, P.E., Piśkiewicz, A., Niklińska, M., 2003. Effects of cadmium and zinc on larval growth and survival in the ground beetle, *Pterostichus oblongopunctatus*. *Environ. Int.* 28, 737–742. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00107-1](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00107-1)
- Noordhoek, J.W., Koning, J.T., Mariën, J., Kamstra, J.H., Amorim, M.J.B., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2018. Exploring DNA methylation patterns in copper exposed *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus*. *Pedobiologia (Jena)*. 66, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2017.10.001>
- Nota, B., Bosse, M., Ylstra, B., van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2009. Transcriptomics reveals extensive inducible biotransformation in the soil-dwelling invertebrate *Folsomia candida* exposed to phenanthrene. *BMC Genomics* 10:236, 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-236>
- Nota, B., Timmermans, M.J.T.N., Franken, O., Montagne-Wajer, K., Mariën, J., De Boer, M.E., De Boer, T.E., Ylstra, B., Van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2008. Gene expression analysis of collembola in cadmium containing soil. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8152–7. <https://doi.org/10.1021/es801472r>

- Nota, B., Van Straalen, N.M., Ylstra, B., Roelofs, D., 2010. Gene expression microarray analysis of heat stress in the soil invertebrate *Folsomia candida*. *Insect Mol. Biol.* 19, 315–322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00990.x>
- Nursita, A.I., Singh, B., Lees, E., 2005. The effects of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proistoma minuta* Tullberg (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 306–14. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.05.001>
- Odendaal, J.P., Reinecke, a. J., 1999. The toxicity of sublethal lead concentrations for the woodlouse, *Porcellio laevis* (Crustacea, Isopoda). *Biol. Fertil. Soils* 29, 146–151. <https://doi.org/10.1007/s003740050537>
- OECD, 2009. OECD Guidelines for testing chemicals 232 Collembolan reproduction test in soil.
- Oliveira, M., Cardoso, D.N., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2018. Toxic effects of human pharmaceuticals to *Folsomia candida* – A multigeneration approach. *Sci. Total Environ.* 625, 1225–1233. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.319>
- Park, H.G., Lee, K.S., Kim, B.Y., Yoon, H.J., Choi, Y.S., Lee, K.Y., Wan, H., Li, J., Jin, B.R., 2018. Honeybee (*Apis cerana*) vitellogenin acts as an antimicrobial and antioxidant agent in the body and venom. *Dev. Comp. Immunol.* 85, 51–60. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2018.04.001>
- Pavelka, J., Koudelová, J., 2001. Inheritance of a temperature-modified phenotype of the short antennae (sa) mutation in a moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Hered.* 92, 234–242.
- Pereira, C.M.S., Novais, S.C., Soares, A.M.V.M., Amorim, M.J.B., 2013. Dimethoate affects cholinesterases in *Folsomia candida* and their locomotion - False negative results of an avoidance behaviour test. *Sci. Total Environ.* 443, 821–827. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.044>
- Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Gonçalves, A.M.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: Commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455–463. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0300-y>
- Piccolomini, A.M., Whiten, S.R., Flenniken, M.L., O'Neill, K.M., Peterson, R.K.D., 2018. Acute toxicity of permethrin, deltamethrin, and etofenprox to the Alfalfa leafcutting bee. *J. Econ. Entomol.* 111, 1001–1005. <https://doi.org/10.1093/jee/toy014>
- Piironen, S., Boman, S., Lyytinen, A., Mappes, J., Lindström, L., 2014. Sublethal effects of deltamethrin exposure of parental generations on physiological traits and overwintering in *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Appl. Entomol.* 138, 149–158. <https://doi.org/10.1111/jen.12088>

- Pike, N., Kingcombe, R., 2009. Antibiotic treatment leads to the elimination of *Wolbachia* endosymbionts and sterility in the diplodiploid collembolan *Folsomia candida*. *BMC Biol.* 7, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-54>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., R Core Team, 2013. nlme: Linear and non-linear mixed effect models.
- Pölkki, M., Kangassalo, K., Rantala, M.J., 2012. Transgenerational effects of heavy metal pollution on immune defense of the blow fly *Protophormia terraenovae*. *PLoS One* 7, e38832. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038832>
- Prasifka, J.R., Lopez, M.D., Hellmich, R.L., Prasifka, P.L., 2008. Effects of insecticide exposure on movement and population size estimates of predatory ground beetles (Coleoptera: Carabidae). *Pest Manag. Sci.* 64, 30–36. <https://doi.org/10.1002/ps.1460>
- R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rajashekar, Y., Shivanandappa, T., 2017. Mode of action of the natural insecticide, decalacide involves sodium pump inhibition. *PLoS One* 12, 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170836>
- Raveh, S., Vogt, D., Kölliker, M., 2016. Maternal programming of offspring in relation to food availability in an insect (*Forficula auricularia*). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2936>
- Rix, R.R., Cutler, G.C., 2018. Does multigenerational exposure to hormetic concentrations of imidacloprid precondition aphids for increased insecticide tolerance? *Pest Manag. Sci.* 74, 314–322. <https://doi.org/10.1002/ps.4731>
- Russo, R., Gamundi, J.C., Alzogaray, R.A., 2012. Evaluation of pyrethroids toxicity in a laboratory strain and a field population of *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae) using two bioassay techniques. *Rev. la Soc. Entomológica Argentina* 71, 115–123.
- Salinas, S., Brown, S.C., Mangel, M., Munch, S.B., 2013. Non-genetic inheritance and changing environments. *Non-Genetic Inherit.* 1, 38–50. <https://doi.org/10.2478/ngi-2013-0005>
- San Miguel, A., Raveton, M., Lempérière, G., Ravanel, P., 2008. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). *Soil Biol. Biochem.* 40, 2351–2357. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.05.014>
- Sarup, P., Sørensen, P., Loeschcke, V., 2014. The long-term effects of a life-prolonging heat treatment on the *Drosophila melanogaster* transcriptome suggest that heat shock proteins extend lifespan. *Exp. Gerontol.* 50, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.017>
- Satterly, J., 1960. Formulae for volumes, surface areas and radii of gyration of spheres, ellipsoids and spheroids. *Math. Gaz.* 44, 15–19.

- Sawicki, R.M., 1962. Insecticidal activity of pyrethrum extract and its four insecticidal constituents against house flies. III.*—Knock-down and recovery of flies treated with pyrethrum extract with and without piperonyl butoxide. *J. Sci. Food Agric.* 13, 283–292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jsfa.2740130503>
- Scheu, S., Simmerling, F., 2004. Growth and reproduction of fungal feeding Collembola as affected by fungal species, melanin and mixed diets. *Oecologia* 139, 347–353. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1513-7>
- Schleier III, J.J., Peterson, R.K., 2011. Pyrethrins and pyrethroid insecticides, in: Lopez, O., Fernández-Bolanos, J.G. (Eds.), *Green Trends in Insect Control*. Royal Society of Chemistry, pp. 94–131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039/9781849732901-00094>
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Schultz, C.L., Wamucho, A., Tsyusko, O. V., Unrine, J.M., Crossley, A., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2016. Multigenerational exposure to silver ions and silver nanoparticles reveals heightened sensitivity and epigenetic memory in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152911. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2911>
- Scott-Fordsmand, J.J., Krogh, P.H., Hopkin, S.P., 1999. Toxicity of nickel to a soil-dwelling springtail, *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43, 57–61. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1758>
- Seres, A., Bakonyi, G., Posta, K., 2007. Collembola (Insecta) disperse the arbuscular mycorrhizal fungi in the soil: pot experiment. *Polish J. Ecol.* 55, 395–399.
- Sfara, V., Zerba, E.N., Alzogaray, R.A., 2006. Toxicity of pyrethroids and repellency of diethyltoluamide in two deltamethrin-resistant colonies of *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Hemiptera: Reduviidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 101, 89–94. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000100017>
- Shaw, J.L.A., Judy, J.D., Kumar, A., Bertsch, P., Wang, M.B., Kirby, J.K., 2017. Incorporating transgenerational epigenetic inheritance into ecological risk assessment frameworks. *Environ. Sci. Technol.* 51, 9433–9445. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b01094>
- Sillapawattana, P., Schäffer, A., 2017. Effects of imidacloprid on detoxifying enzyme glutathione S-transferase on *Folsomia candida* (Collembola). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 11111–11119. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6686-1>
- Skinner, M.K., 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype?. F3 or F2. *Reprod. Toxicol.* 25, 2–6. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.09.001>
- Soderlund, D.M., Clark, J.M., Sheets, L.P., Mullin, L.S., Piccirillo, V.J., Sargent, D., Stevens, J.T., Weiner, M.L., 2002. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative

- risk assessment. *Toxicology* 171, 3–59. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00569-8](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00569-8)
- Sørensen, F.F., Bayley, M., Baatrup, E., 1995. The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (Isotomidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 1587–1590. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/etc.5620140919>
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025–1037. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x>
- Souza, J.R., Carvalho, G. a, Moura, A.P., Couto, M.H., Maia, J.B., 2014. Toxicity of some insecticides used in maize crop on *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera, Trichogrammatidae) immature stages. *Chil. J. Agric. Res.* 74, 234–239. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392014000200016>
- Staempfli, C., Tarradellas, J., Becker-van Slooten, K., 2007. Effects of dinoseb on energy reserves in the soil arthropod *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 263–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.007>
- Szabó, B., Bakonyi, G., 2017. Multigenerational and transgenerational side-effects of an insecticide on eggs of *Folsomia candida* (Collembola). *Polish J. Ecol.* 65, 110–121. <https://doi.org/10.3161/15052249PJE2017.65.1.010>
- Szabó, B., Lang, Z., Bakonyi, G., Märien, J., Roelofs, D., van Gestel, C.A.M., Seres, A., 2019. Transgenerational and multigenerational stress gene responses to the insecticide etofenprox in *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Under review.
- Szabó, B., Seres, A., Bakonyi, G., 2018. *Folsomia candida* (Collembola) locomotor activity pattern is changed by a neurotoxicant pesticide. *Acta Zool. Acad. Sci. Hungaricae* 64, 355–368.
- Szabó, B., Seres, A., Bakonyi, G., 2017. Long-term consumption and food replacement of near-isogenic by BT-maize alter life-history traits of *Folsomia candida* Willem 1902 (Collembola). *Appl. Ecol. Environ. Res.* 15, 1275–1286. https://doi.org/10.15666/aeer/1504_12751286
- Takada, Y., Kawamura, S., Tanaka, T., 2001a. Effects of various insecticides on the development of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 1340–1343. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.6.1340>
- Takada, Y., Kawamura, S., Tanaka, T., 2001b. Effects of various insecticides on the development of the egg parasitoid *Trichogramma dendrolimi* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *J. Econ. Entomol.* 94, 1340–1343. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.6.1340>
- TerHorst, C.P., Lau, J.A., 2012. Direct and indirect transgenerational effects alter plant-herbivore interactions. *Evol. Ecol.* 26, 1469–1480. <https://doi.org/10.1007/s10682-012-9560-8>

- Timmermans, M., Roelofs, D., Mariën, J., Straalen, N.M. Van, 2008. 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 Evol. Biol.* 8:83, doi:10.1186/1471-2148-8-83. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-83>
- Timmermans, M.J.T.N., Ellers, J., 2009. *Wolbachia* endosymbiont is essential for egg hatching in a parthenogenetic arthropod. *Evol. Ecol.* 23, 931–942. <https://doi.org/10.1007/s10682-008-9282-0>
- Toews, M.D., Subramanyam, B., Rowan, J.M., 2003. Knockdown and mortality of adults of eight species of stored-product beetles exposed to four surfaces treated with spinosad. *J. Econ. Entomol.* 96, 1967–73. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-96.6.1967>
- Tooming, E., Merivee, E., Must, A., Sibul, I., Williams, I., 2014. Sub-lethal effects of the neurotoxic pyrethroid insecticide Fastac 50EC on the general motor and locomotor activities of the non-targeted beneficial carabid beetle *Platynus assimilis* (Coleoptera: Carabidae). *Pest Manag. Sci.* 70, 959–966. <https://doi.org/10.1002/ps.3636>
- ToxRat@Solutions.Gmbh, 2015. ToxRat Professionals 3.2.1.
- Triggs, A.M., Knell, R.J., 2012. Parental diet has strong transgenerational effects on offspring immunity. *Funct. Ecol.* 26, 1409–1417. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02051.x>
- Tully, T., Ferrière, R., 2008. Reproductive flexibility: genetic variation, genetic costs and long-term evolution in a collembola. *PLoS One* 3, e3207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003207>
- Tully, T., Potapov, M., 2015. Intraspecific phenotypic variation and morphological divergence of strains of *Folsomia candida* (Willem) (Collembola: Isotomidae), the "standard" test springtaill. *PLoS One* 10, pp.e0136047. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136047>
- Uller, T., 2008. Developmental plasticity and the evolution of parental effects. *Trends Ecol. Evol.* 23, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.04.005>
- van Gestel, C.A.M., de Lima e Silva, C., Lam, T., Koekkoek, J.C., Lamoree, M.H., Verweij, R.A., 2017. Multigeneration toxicity of imidacloprid and thiacloprid to *Folsomia candida*. *Ecotoxicology* 26, 320–328. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1765-8>
- van Straalen, N.M., Roelofs, D., 2011. An introduction to ecological genomics, Second Edi. ed. Oxford University Press, Oxford.
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2014. Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutat. Res.* 764–765, 36–45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.08.008>
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20, 607–624. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0634-0>

- Vandegehuchte, M.B., Vandenbrouck, T., de Coninck, D., de Coen, W.M., Janssen, C.R., 2010. Gene transcription and higher-level effects of multigenerational Zn exposure in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 80, 1014–1020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.032>
- Vasquez, M.E., Holstege, D.M., Tjeerdema, R.S., 2011. Aerobic versus anaerobic microbial degradation of etofenprox in a California rice field soil. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2486–2492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf1037773>
- Vatandoost, H., Ezeddinloo, L., Mahvi, A.H., Abai, M.R., Kia, E.B., Mobedi, I., 2004. Enhanced tolerance of house mosquito to different insecticides due to agricultural and household pesticides in sewage system of Tehran, Iran. *Iran. J Env Heal. Sci Eng*, 1, 42–45.
- Venables, W.N., Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York.
- Verhoef, H.A., Brussaard, L., 1990. Decomposition and nitrogen mineralization in natural and agroecosystems: the contribution of soil animals. *Biogeochemistry* 11, 175–211. <https://doi.org/10.1007/BF00004496>
- Verhoeven, K.J.F., Preite, V., 2014. Epigenetic variation in asexually reproducing organisms. *Evolution* (N. Y). 68, 644–655. <https://doi.org/10.1111/evo.12320>
- Wagner, D., Bayley, M., Mariën, J., Holmstrup, M., Ellers, J., Roelofs, D., 2012. Ecological and molecular consequences of prolonged drought and subsequent rehydration in *Folsomia candida* (Collembola). *J. Insect Physiol.* 58, 130–137. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.10.008>
- Wagner, D., Heckmann, L.H., Malmendal, A., Nielsen, N.C., Holmstrup, M., Bayley, M., 2010. Hsp70 expression and metabolite composition in response to short-term thermal changes in *Folsomia candida* (Collembola). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 157, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.171>
- Walker, C., 2014. *Ecotoxicology: Effects of pollutants on the natural environment*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2006. *Principles of ecotoxicology*, Third Edit. ed. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Weiner, M.L., Nemeč, M., Sheets, L., Sargent, D., Breckenridge, C., 2009. Comparative functional observational battery study of twelve commercial pyrethroid insecticides in male rats following acute oral exposure. *Neurotoxicology* 30. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.08.014>
- Westfall, P.H., 2014. Kurtosis as Peakedness, 1905 - 2014. R.I.P. *Am. Stat.* 68, 191–195. <https://doi.org/10.1080/00031305.2014.917055>
- Whitham, T.G., Bailey, J.K., Schweitzer, J.A., Shuster, S.M., Bangert, R.K., LeRoy, C.J., Lonsdorf, E.V., Allan, G.J., DiFazio, S.P., Potts, B.M., Fischer, D.G., Gehring, C.A.,

- Lindroth, R.L., Marks, J.C., Hart, S.C., Wimp, G.M., Wooley, S.C., 2006. A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nat. Rev. Genet.* 7, 510–523.
- WHO, 2011. Global insecticide use for vector-borne disease control: A 10 year assessment (2000–2009). http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241502153_eng.pdf.
- Widarto, T.H., Krogh, P.H., Forbes, V.E., 2007. Nonylphenol stimulates fecundity but not population growth rate (λ) of *Folsomia candida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.11.005>
- Wieczorek, M. V., Bakanov, N., Bilancia, D., Szöcs, E., Stehle, S., Bundschuh, M., Schulz, R., 2018. Structural and functional effects of a short-term pyrethroid pulse exposure on invertebrates in outdoor stream mesocosms. *Sci. Total Environ.* 610–611, 810–819. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.048>
- Yoshimoto, T., Ogawa, S., Udagawa, T., Numata, S., 1989. Development of a new insecticide, etofenprox. *J. Pestic. Sci.* 14, 259–268.
- Youngson, N.A., Whitelaw, E., 2008. Transgenerational epigenetic effects. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 223–257. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164445>.
- Zamudio, K.R., Huey, R.B., Crill, W.D., 1995. Bigger isn't always better: body size, developmental and parental temperature and male territorial success in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 49, 671–677. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(95\)90042-X](https://doi.org/10.1016/0003-3472(95)90042-X)
- Zhang, X., Liu, J., Fan, Z., 2013. Stability of etofenprox in water emulsion induced by block copolymer and surfactant. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 422, 191–198. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.01.046>
- Zhen, C., Miao, L., Gao, X., 2018. Sublethal effects of sulfoxaflor on biological characteristics and vitellogenin gene (ALVg) expression in the mirid bug, *Apolygus lucorum* (Meyer-Dür). *Pestic. Biochem. Physiol.* 144, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.11.008>

10. Köszönetnyilvánítás

Lehetetlen mindenkinek kellőképp megköszönni azt a sok munkát és támogatást, amit nyújtott, hogy ez a doktori munka elkészülhessen, azonban kétségtelen hogy voltak olyan személyek, akik kiemelten sokat tettek azért, hogy idáig eljuthassak.

Azt hiszem helyén való az akkor még Szent István Egyetemhez tartozó Állatorvostudományi Kar, most már Állatorvostudományi Egyetem Biológia BSc és MSc szakjainak, tanári karának köszönetet mondanom. Az ott megszerzett tudás számtalanszor bizonyult hasznosnak a munkám során, sőt tette könnyűvé a másoknak csak gyötrelmes utánajárás során megoldható feladatokat.

Szeretnék köszönetet mondani azoknak, akik a labormunkában segítségemre voltak: Ványiné Surman Ildikónak, Esztergályos Adélnak, Marcia Melo-nak, Kocsis Ramónának, Szabados Rékának, Janine Märien-nek és Rudo Vervij-nek. De nem csak a fizikai kivitelezésben segítettek nekem, hanem sokat tanulhattam tőlük, kitől az új technikákat sajátíthattam el, ki pedig engem tanított meg, hogyan kell helyesen átadni egy új technikát.

Külön köszönet illeti Dr. Lang Zsoltot nem csak a kiváló statisztikai alapokért, amit tőle tanultam, hanem a tanórától független tanácsokért és az új technikák megtanításáért, amiket hosszútávon is jól fel tudok majd használni.

Köszönettel tartozom az Erasmus (2015, 15/KA1HE/225/SMP-G012) és Campus Mundi (2017, CM-SMP-KA103/155768/2016, 16/1/KA103/022506/SMP-G008) pályázatoknak, amiért támogatta az Amszterdamban, a Vrije Universiteit Állatökológiai Tanszékén tartózkodásomat, ami a teljes transzkriptomikai vizsgálatom feltétele volt. Kétségkívül enélkül a dolgozatom sokkal kevésbé jutott volna határozott konklúzióra.

Ugyanakkor a Vrije Universiteit-en folytatott munkám során Dr. Dick Roelofs és Dr. Kees van Gestel voltak a témavezetőim. Nekik is köszönöm, mind a vizsgálataim anyagi támogatását, mind azt a sok új dolgot, amit tőlük tanulhattam, nem csak technikai értelemben, de a tudományos élethez való hozzáállásról és a kapcsolati hálók fontosságáról.

Köszönettel tartozom az ÚNKP (2017, ÚNKP-17-3-IV/SZIE-12sz) ösztöndíjat adó Emberi Erőforrások Minisztériumának, mely anyagilag támogatta a kísérleteimet.

Köszönöm témavezetőimnek, Dr. Nagy Péter Istvánnak és Dr. Seres Anikónak, hogy bevezettek az Állattani és Állatökológiai Tanszék oktatói-kutatói családjába. Szakmai segítségük nélkülözhetetlen volt a munkámban. Különösen Anikónak köszönöm, aki számolatlan oldalt nézett át „még egyszer” csak, hogy az én lelkem megnyugtassa.

Köszönöm a családomnak, hogy erőssé tettek, mert enélkül nem tudtam volna végig csinálni ezt a munkát. Köszönöm barátaimnak a végtelen órákat, amit azzal töltöttek, hogy meghallgattak és támogattak, ahogy csak tudtak.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Dr. Bakonyi Gábornak, aki a BSc és MSc képzés alatt volt a témavezetőm, de a PhD dolgozatom során is mentorált. Mert tőle tanultam meg mit jelent kutatónak lenni. „A puro pura defluit aqua.”

Acta est fabula.