

VESZPRÉMI EGYETEM
GEORGIKON MEZŐGAZDASÁGTUDOMÁNYI KAR
Növényvédelmi Intézet
Növényvédelmi Állattani Tanszék

INTERDISZCIPLINÁRIS DOKTORI ISKOLA
Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok Tudományág

Iskolavezető:

Dr. VÁRNAGY LÁSZLÓ
az MTA doktora

Témavezető:

Dr. habil. NÁDASY MIKLÓS
a mezőgazdasági tudomány kandidátusa

**NÖVÉNYI ÉS ÁLLATI EREDETŰ TÁPLÁLKOZÁST GÁTLÓK
HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA FITOFÁG ROVAROKON**

Készítette:

KUTAS JÁNOS

KESZTHELY
2006

NÖVÉNYI ÉS ÁLLATI EREDETŰ TÁPLÁLKOZÁST GÁTLÓK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA FITOFÁG ROVAROKON

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:

KUTAS JÁNOS

Készült a Veszprémi Egyetem
Interdiszciplináris Doktori Iskolája keretében,
a Növénytermesztési és Kertészeti Tudományok Tudományágban

Témavezető: Dr. habil. Nádasy Miklós

Elfogadásra javaslom: igen /nem

.....
aláírás

A jelölt a doktori szigorlaton%-ot ért el.

Keszthely,

.....
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen/nem

.....
aláírás

Bíráló neve: igen/nem

.....
aláírás

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Keszthely,

.....
a Bíráló Bizottság elnöke

A doktori (Phd) oklevél minősítése

.....
az EDT elnöke

TARTALOMJEGYZÉK

KIVONAT.....	6
ABSTRACT.....	7
ZUSAMMENFASSUNG.....	8
1. BEVEZETÉS.....	9
1.1. A táplálkozásgátló anyag fogalma.....	9
1.2. Célkitűzések.....	12
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	13
2.1. Növényi eredetű táplálkozásgátlók.....	13
2.1.1. Tápnövényválasztás.....	13
2.1.1.1. A káposztalepke kontakt kemoszenzoros érzékelése.....	14
2.1.1.2. A burgonyabogár kontakt kemoszenzoros érzékelése.....	15
2.1.2. Növények és kivonatok.....	16
2.1.3. Levélkorongos tesztek és hibáik.....	22
2.2. Állati eredetű táplálkozásgátlók.....	25
2.2.1. Proteázok és proteáz inhibitorok.....	25
2.2.2. Proteáz inhibitorok szerepe a növények védekezési mechanizmusában.....	26
2.2.3. Rovarok fehérjeemésztése és növényi proteáz inhibitorok.....	27
2.2.4. Proteáz inhibitorot kifejező transzgénikus növények.....	28
2.2.5. Burgonya-inhibitorok és burgonyabogár proteázok.....	30
2.2.6. A burgonyabogár elleni védekezés proteáz inhibitorokkal.....	32
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	34
3.1. Tesztállatok.....	34
3.2. Tápnövények.....	34
3.3. Növényi kivonatok.....	35
3.3.1. Vizes kivonatok.....	35
3.3.2. Metanolos kivonatok.....	35
3.3.3. NeemAzal T/S.....	36
3.4. Levélkorongos tesztek.....	36
3.4.1. Kettős választású levélkorongos tesztek (I.).....	36
3.4.2. Választás nélküli teszt (I.).....	38
3.4.3. Kettős választású levélkorongos tesztek (II.).....	39
3.4.4. Választás nélküli levélkorongos teszt (II.).....	41
3.4.5. A magatartás megfigyelése.....	42
3.5. Statisztikai értékelés.....	42
3.6. Laboratóriumi etetéses vizsgálatok SGTCl-t kifejező transzgénikus burgonyával.....	43

4. EREDMÉNYEK	45
4.1. Vizes kivonatokkal végzett levélkorongos kísérletek eredményei	45
4.1.1. Kísérletek burgonyabogár imágókkal	45
4.1.2. Kísérletek repcedarázs álhernyókkal.....	45
4.1.3. Kísérletek csipkézőbarkó imágókkal	46
4.2. Az <i>Ajuga chamaepitys</i> és <i>Azadirachta indica</i> kivonatok táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása céljából elvégzett kísérletsorozat eredményei	47
4.2.1. Kísérletek burgonyabogár imágókkal	47
4.2.2. Kísérletek repcedarázs álhernyókkal.....	47
4.2.3. Kísérletek káposztalepke hernyókkal.....	48
4.2.4. Kísérletek lucerna-csipkézőbarkó imágókkal	49
4.3. Metanolos kivonatokkal végzett kísérletek eredményei	49
4.3.1. Kísérletek burgonyabogár lárvákkal	49
4.3.1.1. Kettős választású tesztek.....	49
4.3.1.2. Választás nélküli teszt	51
4.3.1.3. A magatartás megfigyelése	53
4.3.2. Kísérletek burgonyabogár imágókkal	55
4.3.3. Kísérletek gyapjaslepke hernyókkal.....	56
4.4. Az SGTCI peptidet kifejező transzgénikus burgonyanövényekkel végzett etetéses vizsgálatok eredményei	57
5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	61
5.1. Növényi kivonatok	61
5.1.1. Vizes kivonatok.....	61
5.1.2. <i>Ajuga chamaepitys</i> kivonat és a NeemAzal T/S összehasonlítása.....	61
5.1.3. Metanolos kivonatok	63
5.2. Állati eredetű proteáz inhibitor (SGTCI)	66
6. ÖSSZEFOGLALÁS	68
Köszönetnyilvánítás	73
7. IRODALOMJEGYZÉK.....	74
ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	89
NEW SCIENTIFIC RESULTS	90

KIVONAT

Növényi és állati eredetű táplálkozást gátlók hatásának vizsgálata fitofág rovarokon

Összesen 15 növényfajból készült kivonat táplálkozást gátló hatásának vizsgálatára került sor a következő rovarkártevőkön: burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata* SAY), káposztalepke (*Pieris brassicae* LINNAEUS), repcedarázs (*Athalia rosae* LINNAEUS), lucerna-csipkézőbarkó (*Sitona humeralis* STEPHENS), valamint gyapjaslepke (*Lymantria dispar* LINNAEUS). A növényi kivonatokkal laboratóriumban elvégzett kísérletek módszerei közé tartozott a választás nélküli és kettős választású levélkorongos bioteszt esetenként magatartás-megfigyeléssel kiegészítve. A vizes kivonatok közül a kislevelű hárs (*Tilia cordata* MILL.) deterrens hatása volt a legerősebb csipkézőbarkó imágókon, míg a metanolos kivonatok esetében a kaporlevelű ebszékfű (*Matricaria inodora* LINNAEUS) bizonyult a leghatásosabbnak burgonyabogár lárvák ellen. A metanolos kivonatok között standard kontrollként szereplő *Ajuga chamaepitys* (L.) SCHREB. kivonat fagoinhibitor hatását összehasonlítva az *Azadirachta indica* A. JUSS kivonatéval (NeemAzal T/S, ha.: azadirachtin A 1%), kiderült, hogy az *Ajuga* kivonat a vizsgált kártevők többségének táplálkozását az azadirachtin hatásával azonos mértékben képes gátolni.

A sivatagi sáskából izolált *Schistocerca gregaria* trypsin chymotrypsin inhibitor (SGTCI) peptid, mint állati eredetű táplálkozást gátló hatásának vizsgálata burgonyabogár lárvákon történt transzgenikus burgonyanövények segítségével. A laboratóriumi vizsgálatok során a naponta friss levelekkel etetett és bábozódásukig higrosztátban nevelt lárvák tömegét mértük. A multifunkcionális proteínáz inhibitor (SGTCI) peptidet kifejező burgonyanövényeket fogyasztó lárvák tömegének gyarapodása kismértékben, de szignifikánsan elmaradt a kontroll növényeken nevelt lárvák növekedéséhez képest.

ABSTRACT

Feeding inhibitory effects of several extracts of plant and animal origin on some phytophagous insect species

Antifeedant activities of extracts from 15 plant species were assessed against the following insect pests: Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* SAY), large white butterfly (*Pieris brassicae* LINNAEUS), turnip sawfly (*Athalia rosae* LINNAEUS), Sitona weevil (*Sitona humeralis* STEPHENS) and gypsy moth (*Lymantria dispar* LINNAEUS). Dual choice and no-choice leaf disc bioassays were carried out in the laboratory sometimes supplemented with direct observations on insect behaviour. Among the aqueous extracts *Tilia cordata* MILL. was the most potent antifeedant against Sitona weevil adults, while in the case of methanolic extracts *Matricaria inodora* LINNAEUS strongly inhibited the feeding of Colorado potato beetle larvae. The antifeedant activity of *Ajuga chamaepitys* (L.) SCHREB. methanolic extract (applied as standard of methanolic extracts) was compared with the antifeedant activity of *Azadirachta indica* A. JUSS extract (NeemAzal T/S, a. i. 1% azadirachtin A) and the results show that *A. chamaepitys* can inhibit the feeding of most of the examined pest species as strongly as azadirachtin.

The feeding inhibitory effect of transgenic potato plant expressing trypsin chymotrypsin inhibitor (SGTCI), a peptid isolated from the desert locust (*Schistocerca gregaria*) was examined on Colorado potato beetle larvae. During the laboratory feeding trials larvae were reared in hygrostates, were fed with fresh leaves and were weighed every 24 h until the pupation. Larvae were reared on the multifunctional proteinase inhibitor (SGTCI) expressing transgenic potato plants have grown slightly but significantly more slowly than those on control potato leaves.

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen von Frassinhibitoren an phytophagen Insekten

Die frassinhibitorischen Wirkungen der aus insgesamt 15 Pflanzenarten preparierten Extrakten waren an den folgenden phytophagen Insekten untersucht: *Leptinotarsa decemlineata* SAY, *Pieris brassicae* LINNAEUS, *Athalia rosae* LINNAEUS, *Sitona humeralis* STEPHENS, *Lymantria dispar* LINNAEUS. Unter den mit pflanzlichen Extrakten durchgeführten laboratorischen Testmethoden waren auch die Blattscheiben-Tests (zweiwählige oder wahllose), fallweise ergänzt mit Verhaltensbeobachtungen. Unter den wässrigen Extrakten war die Wirkung von *Tilia cordata* MILL. an *Sitona humeralis* am stärksten, unter methanol-Extrakten zeigte sich aber *Matricaria inodora* LINNAEUS wirkungsvoll gegen die *Leptinotarsa decemlineata* Larven. Aus dem Vergleich der frassinhibitorischen Wirkung von dem unter den methanol-Extrakten untersuchten *Ajuga chamaepitys* (L.) SCHREB. als Standardkontroll und *Azadirachta indica* A. JUSS (NeemAzal T/S, ha: azadirachtin A 1%) stellte sich heraus, daß das Extrakt von *Ajuga* die Nahrungsaufnahme der meißten beobachteten Arten gleichmäßig wie azadirachtin hindern kann.

Die frassinhibitorische Wirkung von aus *Schistocerca gregaria* isolierten SGTCI (Trypsin Chymotrypsin Inhibitor) war an Kartoffelkäfer-Larven mit der Hilfe transgenetischer Kartoffel-Pflanzen untersucht. Bei den laboratorischen Untersuchungen war das Gewicht der täglich mit frischen Blättern gefütterten Larven gemessen. Die Gewichtszunahme der Larven – die mit Kartoffelpflanzen mit SGTCI-Inhalt gefütterter waren – war kleiner als der Larven in der Kontrollgruppe. Der Unterschied war zwar klein aber signifikant.

1. BEVEZETÉS

1.1. A táplálkozásgátló anyag fogalma

A környezetkímélő növényvédelem koncepciójának megszületése maga után vonta a nem vegyszeres védekezési eljárások (fizikai, mechanikai, agrotechnikai, biológiai és biotechnikai) előtérbe kerülését. Ennek hatására számos kutató fordult a táplálkozást gátló anyagok vizsgálata felé (JERMY, 1990), mely anyagok a fent említett nem vegyszeres védekezési eljárások közül a biológiai védekezéstől jogosan elkülönített biotechnikai (vagy BATRA /1982/ szerint bioracionális) védekezési módszerek közé tartoznak (VÁRNAGY és BUDAI, 1995; SEPRŐS, 1999).

Tágabb értelmezésben táplálkozásgátló anyagok közé sorolandó minden olyan anyag, amely a fitofág rovar táplálékfelvételét, a tápcsatornába jutott táplálék megemésztését, felszívódását, vagy beépülését, esetleg raktározását bármi módon gátolni vagy csökkenteni képes. Ennek alapján FRAZIER és CHYB (1995) a táplálkozásgátló anyagokat három csoportra bontotta (1. ábra). Az első csoportba (preingestive feeding inhibitors) azok az anyagok tartoznak, melyek a táplálék lenyelését megelőzően fejtik ki hatásukat. Ezek az anyagok olyan fiziológiai mechanizmusokat befolyásolnak, melyek a rovar orientációjával, kereső magatartásával és táplálékválasztásával hozhatók kapcsolatba. Az ilyen típusú táplálkozásgátló anyagok mindig kontakt kemorecepció útján (ízérzékelés) fejtik ki hatásukat általában másodpercek (vagy néhány perc) leforgása alatt. A szűken értelmezett táplálkozást (és petézést) gátló anyagok (deterrensek, fagoinhibitorok, „antifidánsok”) ebbe a csoportba tartoznak (SZENTESI, 1990). A második csoportba (ingestive inhibitors) tartozó anyagok képesek gátolni egyrészt a nyálban található enzimek szintézisét, elválasztását, másrészt (vagy) a feji ízek mozgatásáért felelős izmok ingerületvezetését, illetve a nyelőcső és előbél perisztaltikáját. A harmadik csoportba (postingestive inhibitors) olyan táplálkozásgátló anyagok tartoznak, melyek a táplálék lenyelését követően (középbélbe jutás után) az emésztés, felszívódás és raktározás fiziológiai folyamataiba avatkozva fejtik ki hatásukat. Az ebbe a csoportba tartozó anyagok további három funkcionális osztályba sorolhatók: (1) „Emésztésgátló” anyagok, melyek a tápcsatorna epiteliális sejtjeire hatva gátolják azok emésztőenzim szintézisét és elválasztását vagy esetleg magukat az emésztőenzimeket. (2) „Visszacsatolás-gátló” anyagok, melyek azon idegi és hormonális folyamatokat blokkolják, amelyen keresztül a központi idegrendszer a tápcsatorna működését irányítja. (3) A „feldolgozás-gátló” anyagok a központi idegrendszerbe (főleg a kontakt kemoreceptorokból) bejövő (érző) információkat feldolgozó interneuronok működését befolyásolják.

FIZIOLÓGIA MECHANIZMUSOK	TÁPLÁLKOZÁS ÉS FELDOLGOZÁS LÉPÉSEI	LEHETSÉGES TÁPLÁLKOZÁSGÁTLÁSI CÉLPONTOK
a, preingestive mechanizmusok többszörös érzékelő inputok feldolgozás a KI-ben függelékek mozgása	ORIENTÁCIÓ 	nincs
főleg kemoszenzoros inputok feldolgozás a KI-ben szájszervek mozgása	TÁPLÁLÉK- VÁLASZTÁS 	kemoszenzoros és kiegészítő sejtek

b, ingestive mechanizmusok kemo- és mechanoszenzoros inputok feldolgozás a KI-ben nyáleválasztás szájszervek mozgása	TÁPLÁLÉK- FELVÉTEL (FOGYASZTÁS) 	kemoszenzoros és kiegészítő sejtek előbél izmai nyál enzimeik KI interneuronok

c, postingestive mechanizmusok mechanoszenzoros inputok feldolgozás a KI-ben és feedback bélmozgások	RAKTÁROZÁS 	mechanoszenzoros sejtek előbél izmai és beidegzése emésztőenzimek
enzimindukció és kiválasztás enzimatikus hidrolízis feldolgozás a KI-ben és feedback bélmozgások	EMÉSZTÉS 	középbél-epitélium középbél izmai és beidegzése emésztőenzimek KI interneuronok
tápanyag transzport víz/ion transzport feldolgozás a KI-ben tápanyag/víz feedback (?)	FELSZÍVÁS 	középbél-epitélium utóbél és beidegzése KI interneuronok Malpighi csövek
	ANYAGCSERE 	a fent említettek mindegyike és biokémiai reakcióutak transzport rendszerek
	KIVÁLASZTÁS	

1. ábra. A táplálkozás és a táplálék feldolgozás lépései a rovarokban. A fiziológiai mechanizmusok mindegyik szintjén lehetőség van a táplálkozási folyamat gátlására (FRAZIER és CHYB, 1995).

Elméletileg bármely anyag gátolhatja bármely fitofág rovar táplálkozását (SZENTESI, 1990). Elfogadva ezt a kijelentést láthatjuk, hogy a táplálkozásgátló anyagok forrásai rendkívül sokfélék, ezért csoportosításukra is több lehetőség adódik. Legkézenfekvőbbnek az eredet szerinti csoportosítás tűnik, ami alapvetően két főcsoportra osztja fel a táplálkozást gátlókat. Az első főcsoportba a természetes eredetű (A) anyagok tartoznak, míg a másodikba a szintetikus eredetűek (B). Az első csoportba (A) tartozó anyagok tovább bonthatók növényi (A1), állati (A2) és esetleg gomba (A3) eredet szerint. A növényi eredetű anyagok (A1) teszik ki az eddig ismert táplálkozást gátlók döntő hányadát. Ezek szinte minden esetben másodlagos növényi anyagok (allelokemikáliák), amelyek változatossága a növényvilágban kimeríthetetlennek tűnik. Óvatos becsléssel is közel 400 ezerre tehető a természetben fellelhető másodlagos növényi anyagok száma és ezen anyagok mindössze 1%-ának vizsgálták ez ideig a lehetséges táplálkozásgátló hatását meghatározott számú rovarfajon. Hozzátevé ehhez azt, hogy a legtöbb növényevő rovar táplálkozását gátolja a nem-tápnövényből származó allelokemikália (SCHOONHOVEN és mtsai, 1998), biztosak lehetünk abban, hogy még számtalan felderítésre váró hatásos vegyület rejtőzik a növényvilágban. A növényi eredetű táplálkozásgátlók legtöbbször a deterrencekhez tartozik, tehát kontakt kemorecepció útján fejtik ki hatásukat.

A természetes eredetű anyagok második csoportját (A2) az állatokból izolált (tág értelmezésű) táplálkozást gátlók jelentik. Ezek főleg peptid természetű molekulák, melyek a növényevő rovar emésztőenzimeit (főleg fehérjebontó enzimeket) képesek blokkolni (proteáz inhibitorok). Meg kell jegyezni azonban, hogy ilyen inhibitorokat számos növény is képes előállítani (részben) a rovarok elleni védekezés céljából. Ezek az anyagok minden esetben csak a táplálék felvétele után, az emésztés során fejtik ki gyakran csak pár nap múlva jelentkező hatásukat, és gyakorlati alkalmazásuk legvalószínűbb módja a transzgénikus növényekben rejlik.

A természetes eredetű táplálkozásgátló anyagok harmadik csoportját (A3) a gombákból származó kivonatok alkotják ez ideig legalábbis inkább csak elméletileg. Egyetlen gyakorlati példa létezik, ami az *Acremonium lolii* (LATCH, CHRISTENSEN and SAMUELS) nevű endofita gombából izolált peramin (ROWAN és TAPPER, 1989). Az angolperjét (*Lolium perenne* LINNAEUS) parazitáló gomba által termelt alkaloid (peramin) ellenállóbbá teszi a növényt a rovarkártevőkkel szemben.

A szintetikus eredetű táplálkozást gátló anyagok (B) is rendkívül sokfélék kémiai természetüket tekintve. További felosztásuk történhet a megszokott peszticid kategóriáknak megfelelően (herbicidek, fungicidek, zoocidok stb.), de ez nem jelenti azt, hogy ebbe a főcsoportba kizárólag növényvédő szerek tartoznának (hiszen bármilyen célból előállított szintetikus anyag is szóba jöhet).

Vajon a táplálkozásgátló anyagokat széleskörűen fogják alkalmazni a jövő mezőgazdaságában? Nem valószínű, hogy ezek az anyagok valaha is a végső megoldást (módszert) jelentenék a kártevők elleni védekezésben (SCHOONHOVEN és mtsai, 1998). Azonban a környezetkímélő növényvédelem igényének erősödésével nem engedhetjük meg magunknak azt, hogy a természet által előállított több ezer lehetséges „növényvédő szert” hagyjunk felderítetlenül. A tény, hogy számos növényfaj termel ilyen gátló anyagokat saját védelme céljából, alátámasztja a növényvilág folyamatos kutatásának szükségességét ilyen szempontból is. A neem alapú készítmények alkalmazása során elért eredmények feljogosítanak minket arra, hogy elfogadjuk FRAZIER és CHYB (1995) megállapítását, miszerint: „A természetes táplálkozásgátló anyagok kártevők elleni gyakorlati alkalmazása egyre inkább realitássá válik.”

1.2. Célkitűzések

Munkánkkal szeretnénk felhívni a figyelmet olyan természetes eredetű vegyületekre, melyek magukban rejthetik új, szelektív és környezetkímélő, a gyakorlati növényvédelem számára is hasznosítható anyagok kifejlesztésének lehetőségét.

- Különböző kártevő rovarfajokkal szemben deterrens hatású allelokemikáliákkal rendelkező növényfajok keresése vizes kivonataik táplálkozásgátló hatásának megállapítása által, kis ismétlésszámú gyorstesztsek segítségével.
- A metanolos kivonatokkal végzett tesztek során standard kontrollként használt *Ajuga chamaepitys*-ből készült metanolos kivonat táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása a legtöbb kártevővel szemben bizonyítottan erős deterrens hatású *Azadirachta indica* kivonat (NeemAzal T/S növényvédő szer formájában) hatékonyságával.
- 12 különböző növényfajból készített metanolos kivonat (köztük az *A. chamaepitys*) táplálkozásgátló hatásának megállapítása, a hatékony kivonatok hatásmechanizmusának felderítése.
- Az állati eredetű peptidet, a *Schistocerca gregaria* trypsin chymotrypsin inhibitor-t (SGTCI) kifejező transzgénikus burgonyanövények burgonyabogár lárvák táplálkozására, növekedésére gyakorolt hatásának megállapítása.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Növényi eredetű táplálkozásgátlók

2.1.1. Tápnövényválasztás

A fitofág rovarok táplálék-specializációja feltételezi azon képesség meglétét, ami a tápnövény megtalálásához és felismeréséhez vezet még egy fajgazdag, komplex vegetációval rendelkező természetes élőhelyen is. A táplálékválasztás (vagy peterakási hely választás) folyamata minden esetben egy hierarchikus természetű viselkedéssorozatként értelmezhető. Mindegyik egymást követő fázis (viselkedési forma) csak akkor következik be, ha az előző fázist elegendő stimuláció érte a folytatáshoz (DETHIER, 1982; BERNAYS és CHAPMAN, 1994). Az egyik fázisból a másikba történő átmenetet a központi idegrendszer döntéshozó folyamatai szabályozzák. Mostanra nyilvánvalóvá vált, hogy a döntés meghozatalában a növény kémiaiájáról gyűjtött kemoszenzoros információ alapvető szerepet játszik (STÄDLER, 1992; BERNAYS és CHAPMAN, 1994). A tápnövényválasztás folyamatában két fő fázist különítünk el: (1) a tápnövény bizonyos távolságból való keresése, mely során a rovar vizuális és olfaktórikus ingerek vezetnek (szaglás által kiváltott vizuális orientáció, valamint pozitív, illat-vezérelt optomotor anemotaxis), és amely folyamat végül a tápnövény megtalálásával zárul(hat) (VISSER, 1986; STÄDLER, 1992). (2) kontakt tesztelés a (táp)növényen, mely során a rovar egyrészt mechanoszenzoros információt gyűjt a felület textúrájáról, másrészt a kontakt kemoreceptorai segítségével „megízleli” a növény felületét és/vagy a növény belsejének kémiai összetételét. A második fázis vége a növény tápnövényként való elfogadása vagy visszautasítása. A elfogadás alapja az, hogy a növény komplex kémiai profilját érzékelő kontakt kemoreceptorok olyan kódot tartalmazó neurális üzenetet küldenek az agyba, ami megfelel az ott tárolt hipotetikus templátnak (DETHIER, 1982; SCHOONHOVEN, 1987; SIMMONDS és BLANEY, 1991; FRAZIER, 1992).

Több fitofág rovarral végzett összehasonlító kutatás néhány általános elv megszületését eredményezte. (1) A nem-tápnövények általában deterrenceket tartalmaznak. (2) A mono- és oligofág rovarfajok általában érzékenyebbek a nem-tápnövényből származó deterrencekre, mint a polifágok (BERNAYS és CHAPMAN, 1994). (3) Deterrencek nemcsak a nem-tápnövényekben találhatók, hanem néhány esetben a tápnövényben is, ilyenkor a gátló hatást serkentő anyagok közömbösítik (JERMY, 1966; CHEW és RENWICK, 1995). Összefoglalva az eddigieket, a következő kép rajzolódik ki előttünk: a fitofág rovarra tápnövényválasztás közben gyakorolt, elsődleges vagy másodlagos növényi anyagok által kiváltott serkentő és gátló hatások ellensúlyozzák egymást és a közöttük lévő egyensúly megbillenése határozza meg a

döntéshozatali folyamat lehetséges kimenetelét, más szóval a visszautasítást vagy elfogadást (DETHIER, 1982; BERNAYS és CHAPMAN, 1994). Polifág fajoknál néhány közös primer növényi anyag elég táplálkozásserkentő hatást biztosít sok növényfaj elfogadásához, és csak azokat a növényeket utasítják vissza, melyek olyan mennyiségben vagy minőségben termelnek deterrenceket, amivel a serkentő hatást képesek kioltani. Hasonló elvek alakítják azon oligofág fajok tápnövénykörét, melyek táplálékválasztásuk során nem használnak taxonspecifikus jelző stimulust. A harmadik kategóriába azok a mono- és oligofág fajok tartoznak, melyeknek a tápnövény elfogadásához szükségük van jelző stimulusra. Ebben az esetben a serkentő jel egy határozott kémiai szerkezettel rendelkező taxonspecifikus másodlagos növényi anyag, amelyeket gyakran arra specializált ízlelő receptorok érzékelnek. Mivel a tápnövény-választás kontakt kemoreceptoros fázisának mélyreható ismerete elengedhetetlen a szenzoros úton ható táplálkozásgátló anyagok működésének megértéséhez, ezért az általánosságok után a továbbiakban két sokat tanulmányozott kártevő faj (általunk is használt tesztrovarek) konkrét példáján mutatjuk be a témával foglalkozó legújabb eredményeket.

2.1.1.1. *A káposztalepke kontakt kemoszenzoros érzékelése*

A káposztalepke (*Pieris brassicae* LINNAEUS) a keresztesvirágú növények specialistája. A *Cruciferae* család másodlagos anyagcseretermékei közül a kemotaxonómiailag e családra jellemző glükozinolátokat (pl.: szinigrin) használja jelző stimulusként. Glükozinolát érzékeny receptorsejtek találhatóak az állkapcsok galea részének mindkét oldali styloconica szenzillájában és az általuk közvetített információ mindig a tápnövény elfogadására serkenti a hernyókat (SCHOONHOVEN, 1967). Hasonlóan stimuláló hatást közvetítenek a galea-n található (cukor receptorokat találtak az epipharynx-on is) cukor-érzékeny, valamint aminosav-érzékeny receptorok (MA, 1972). A *Pieris* hernyók – sok más Lepidopterához hasonlóan – rendelkeznek ún. általános deterrens receptorokkal, melyek a nem-tápnövényekben előforduló másodlagos növényi anyagok széles spektrumát képesek érzékelni. Ezek többnyire az állkapocs mediális styloconica szenzillájában találhatóak (SCHOONHOVEN és mtsai, 1992). A káposztalepke azonban rendelkezik egy másfajta, egy sokkal specializáltabb deterrens receptorral is, melyet az állkapocs laterális styloconica szenzillájában találtak meg (VAN LOON, 1990). Ez a sejt rendkívül érzékeny (10^{-8} mol/l) a kardenolidokra, melyek a *Cruciferae* család bizonyos nemzetségeire jellemzőek. Ez a kardenolid-érzékeny sejt az egyedüli ismert példája a specializált deterrens receptoroknak napjainkig. Érdekes módon, az általános deterrens receptor is érzékeli a kardenolidokat, de csak 50-100-szor nagyobb koncentrációban (VAN LOON és SCHOONHOVEN, 1999). Ha a próbaharapás

során az agyba jutó összesített receptor információkból a deterrens sejtekből származók vannak túlsúlyban szemben a stimuláló hatású cukor, aminosav és szinigrin receptorokból érkezőkkel, akkor a káposztalepke hernyó visszautasítja a növényt. Tovább bonyolítja a dolgot egyrészt az, hogy bizonyos másodlagos anyagok nemcsak a deterrens sejteket serkentetik, hanem a cukor-érzékeny receptorokat is gátolhatják. Ennek ellenkezője is előfordulhat, amikor serkentő anyagok gátolnak deterrens receptorokat (SHIELDS és MITCHELL, 1995), másrészt pedig az, hogy a kétféle deterrens receptor érzékenysége valamennyire átfedi egymást. VAN LOON és SCHOONHOVEN (1999) kimutatta, hogy ha kettős választású biotesztnben *Pieris* hernyóknak kardenoliddal kezelt és *Cruciferae*-ben nem-előforduló deterrensszel kezelt káposztakorongot kínálnak fel, akkor a hernyók a kardenoliddal kezeltet választják. Viszont, ha a kardenoliddal kezelttel szemben kezeletlen káposztalevél-korong van, akkor inkább az utóbbit preferálják. Ez azt bizonyítja, hogy bizonyos esetekben a két deterrens receptor aktivitásának egyensúlya határozza meg a döntési folyamatot.

Itt teszünk említést arról – a saját kísérleteink szempontjából is – fontos felfedezésről, amelyben szintén káposztalepke hernyók szerepelnek. LUO és munkatársai (1995) mutattak ki először ok-okozati összefüggést az általános deterrens receptor kisülési frekvenciája és a kettős választású bioteszt eredményeként közölt táplálkozást gátló hatás %-os értéke (antifeedant index, A.I.%) között; egészen pontosan a két változó között lineáris kapcsolatot (szignifikáns korreláció) találtak.

2.1.1.2. A burgonyabogár kontakt kemoszensoros érzékelése

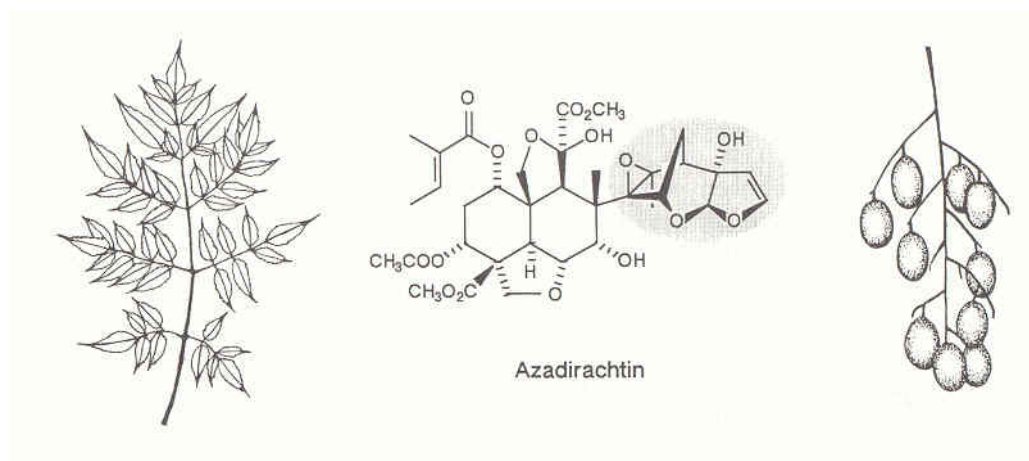
A burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata* SAY) – a káposztalepkéhez hasonlóan – oligofág kártevőnek számít, mivel tápnövényköre a *Solanaceae* család bizonyos fajaira korlátozódik. A burgonyabogár állkapcsi tapogatóin 370 érzékszőr található, melyeket ultrastruktúrájuk alapján négy típusba sorolnak. A négy típusból három megtalálható a 130, ajaktapogatóon lévő érzékszőr között is. Ezek az érzékszőrök egyesesen tartalmazhatnak ízlelő-, szagló- és mechano-receptorokat (MITCHELL, 1994). A tapogatókon kívül a galea is hordoz 10-12 ízérzékelő szenzillát (MITCHELL és GREGORY, 1981). Az imágóknak jelentősen több szenzillájuk és kemoreceptoruk van, mint a lárváknak (CHAPMAN, 1982). A legtöbb szenzilla négy kemoreceptor sejtet tartalmaz, melyek a szenzilla pórúsával közvetlen kapcsolatban vannak (SUTCLIFFE és MITCHELL, 1980). Az egyik kemoreceptor a cukron kívül érzékeny két aminosavra (alanin és GABA) – mindhárom anyag táplálkozást stimuláló hatású – valamint az általánosan előforduló zöld növényi illatanyagra, az E-2-hexanolra (MITCHELL és MCCASHIN,

1994). Az intenzív kutatások ellenére mind a mai napig nem ismeretes semmilyen specifikus, ún. jelző stimulus, amely egyértelműen jelezné a megfelelő tápnövényt a rovar számára (SZENTESI és JERMY, 2002). De nem találtak még (lehet, hogy nem is létezik) egyetlen – a Lepidopterákéval analóg – deterrens receptort sem (VAN LOON, 1996). A *Solanaceae* család alkaloidjainak ennek ellenére van egy nem-specifikus gátló hatása, amely tulajdonképpen a serkentő anyagokra érzékeny receptorok aktivitását csökkenti (MITCHELL és GREGORY, 1979). Például az egyik galea-n található receptor cukor-érzékenységet csökkenti a tomatin, szolanin, papaverin és spartein, míg ugyanezen sejt GABA-érzékenységet a kinin és papaverin. Egyetlen alkaloidról, az atropinról bizonyították be eddig, hogy valódi táplálkozásgátló hatással bír az imágóval szemben (MITCHELL, 1994), de a pontos hatásmechanizmus nem tisztázott. Mindezekből nem derül ki egyértelműen, hogy a burgonyabogár mi alapján tesz különbséget a tápnövény és nem-tápnövény között. Az egyik legelfogadottabb elmélet szerint az érzékszőrök négy kemoreceptor sejtje valahogyan rá van hangolva a tápnövény kémiai profiljára. Ha a burgonyabogár burgonyalevélbe „harap”, akkor az egyik receptorsejt, a „fősejt” erősen stimulált lesz, miközben a másik három gátolt. (Ez a másik három sejt gyenge és erősen változékony jeleket produkál, ebből gondolják, hogy aktivitásuk kevés információt hordoz (MITCHELL és mtsai, 1990). Ha a bogár paradicsomlevélen végez próbaharapást, akkor a „fősejt” nem aktív, a másik három sejt pedig nem annyira gátolt, mint a burgonya esetében, hanem inkább többsejtes és sporadikus válaszprofilt nyújt. A központi idegrendszer tehát merőben különböző ingerületmintázatot kap burgonya és paradicsom ízlelésekor, ami valószínűleg az egyik esetben elfogadást, a másikban visszautasítást eredményez (HALEY SPERLING és MITCHELL, 1991).

2.1.2. Növények és kivonatok

A deterrens hatású anyagok fő forrása mind a mai napig a növényvilág. Az egyik legjobban dokumentált példa az Indiában őshonos neem-fa (*Azadirachta indica* A. JUSS; *Meliaceae*) és a rokonfajnak mondható afrikai *Melia azedarach* LINNAEUS. Több ezer éve használatosak az indiai növénytermesztésben különféle káros rovarok ellen (SZENTESI, 1990). Több mint fél évszázaddal ezelőtt egy algériai agronómus észrevette, hogy egy sáskajárás után csak a neem-fák maradtak épen, és be is bizonyította, hogy a fa leveleinek kivonata deterrens hatású a sivatagi sáskára (VOLKONSKY, 1937). A DDT és egyéb széles hatásspektrumú szintetikus inszekticidek bevezetésével azonban a neem feledésbe merült egészen az 1970-es évekig, amikor is egy német entomológus, H. SCHMUTTERER arra kezdte buzdítani a világ tudósait, hogy vizsgálják a neem hasznos tulajdonságait (SCHMUTTERER, 1995).

A modern fitokémiai eljárások hatékony vegyületek egész arsenálját mutatták ki a fajból. Az *A. indica* főleg a levelében és a termésében termel C-seco-meliacinokat (azadirachtinok: azadirachtin A-K, isovepaol, nimbin, nimbinene, szalannin, szalannol, vepaol stb.), protomeliacinokat (meliantriol stb.), limonoidokat (gedunin, mahmoodin, meldenin, nimbidinin, nimbinin, nimbocinol, vepinin, vilasinin stb.), és C-seco-limonoidokat (margosinolide, salannolide stb.). A neem-magolajban az inszekticid hatásért felelős fő összetevők a C-seco-meliacinok (a kivonható több mint 70 triterpén közül), azok közül is a legfontosabb és leghatásosabb az azadirachtin A (JACOBSON, 1988). Az azadirachtin egy (erősen oxidált) ún. tetranortriterpenoid limonoid – melynek jelenleg 7 izomerje ismeretes – sok egymáshoz közel elhelyezkedő reaktív funkciós csoporttal rendelkezik. Főleg a növény magjából lehet kivonni, ahol a koncentrációja eléri a 3,5 mg/g száraz mag értéket. Több származéka okoz zavarokat a rovarok metamorfózisában – táplálkozást gátló hatásuk mellett. Bár a neem-olaj egyéb célokra is alkalmas, mégis a kártevők elleni felhasználás a domináló. Ilyen a növényeket károsító fonálférgek, atkák és rovarok elleni alkalmazás. Jelenleg (bizonyos szelektivitás ellenére) kb. 200 rovarfaj ellen ismeretes hatása a Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Thysanoptera, Lepidoptera és Orthoptera rendekben. Ezenkívül három atka és öt fonálféreg fajra is hatásos (SZENTESI, 1990).



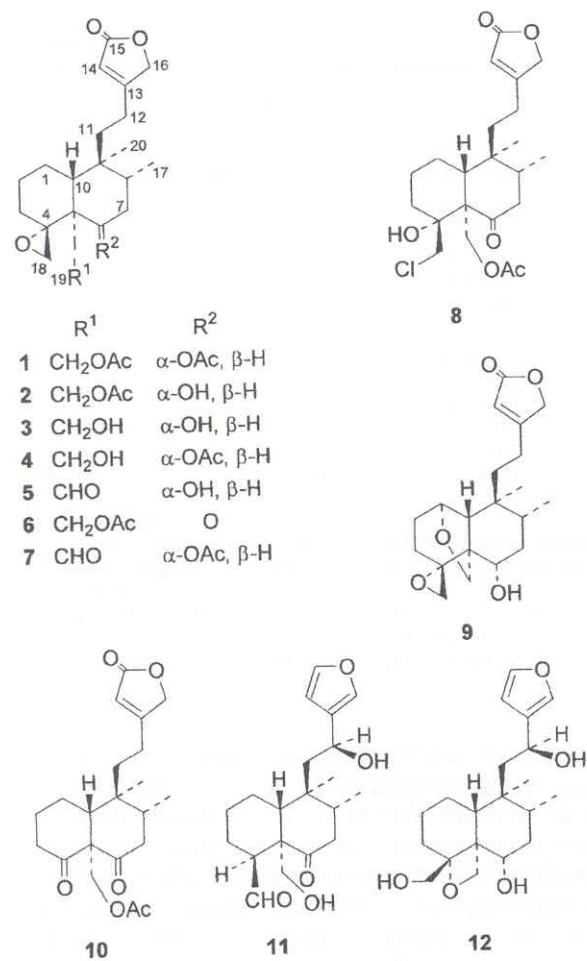
2. ábra. A neem-fa (*Azadirachta indica*) levele, termése és az azadirachtin molekula szerkezeti képlete (SCHOONHOVEN és mtsai, 1998).

Az összes növényi eredetű táplálkozást (vagy petézést) gátló anyag közül az azadirachtin kínálja a legnagyobb lehetőséget a széleskörű alkalmazáshoz (National Research Council, Washington, DC, 1992). A neem kivonat egy potenciális inszekticid, ami főleg a táplálkozásra

hat és befolyásolja a rovarok denzitását, mivel az adott populációra nézve egyed- és fajfenntartási szempontból mindig előnytelen dezorientáló hatást vált ki (JACOBSON, 1988; National Research Council, Washington, DC, 1992; SCHMUTTERER, 1995). Számos szabadföldi kísérletben bizonyította a hatását, például burgonyabogár ellen burgonyára permetezve (ZEHNDER és WARTHEN, 1988; HARE, 1990), vagy tarka szőlómoly (*Lobesia botrana* DENIS et SCHIFFERMÜLLER) ellen szőlőn (GRAZZI és ROVESTI, 1996). Sok tekintetben teljesíti egy ideális táplálkozásgátló anyaggal szemben támasztott követelményeket, például ártalmatlan a hasznos szervezetekre, az emlősökre nem mérgező és szisztémikus hatású (ARPAIA és VAN LOON, 1993), ami biztosítja a szívó kártevőkkel szembeni védelmet is (SAXENA, 1987). Hátránya a molekulának, hogy UV fényre érzékeny (ZEHNDER és WARTHEN, 1988), ezért a formálás során fényszűrő anyagot adnak a készítményekhez. Még mindig a frissen szedett magokból vonják ki az alapanyagot, habár a kémiai szintézis is megoldott (DENHOLM és mtsai, 1995), hasonlóan az in vitro szövettenyésztésen alapuló előállításához (ALLAN és mtsai, 1994).

A fagoinhibitor hatású botanikai eredetű anyagok közül ez ideig csak a neem-fa kivonatából készült formált növényvédő szer, amit számos országban forgalmaznak. Egyéb növényi kivonatokkal is folynak biztató kísérletek, így várható, hogy a közeljövőben újabb deterrens hatású anyagok futnak be az azadirachtinéhoz hasonló karriert. Az egyik ilyen új, potenciális vegyületcsoport forrása az ínfű (*Ajuga*) nemzetség. Az *Ajuga* fajok (*Lamiaceae*) jelentős mennyiségű, általában táplálkozásgátló hatású diterpenoid neoklerodánt (pl. ajugarinok, ajugareptansin, ivainok, ajugapitinek, ajugamarinok stb.) és rovar-fejlődésszabályozó hatású fitoekdiszteroidokat tartalmaznak (DARVAS, 1991). A diterpenoid klerodánok rovarokon táplálkozást gátló hatásukkal tűnnek ki. Nevüket a *Clerodendron infortunatum* (GAERTN.)-ről (*Verbenaceae*) kapták, amelyben előfordulásukat először észlelték. Növények közül a *Baccharis tricuneata* (Lf) PERSOON (*Asteraceae*), a *Leonurus cardiaca* LINNAEUS (*Lamiaceae*) és a *Teucrium africanum* THUNB. (*Lamiaceae*) (JACOBSON, 1990) termeli őket jelentősebb mennyiségben, azonban az ínfű-félék (*Ajuga* fajok) közül kerülnek ki a legjelentősebb neoklerodán-termelők. Az ínfű fajok kivonatából többen próbáltak botanikai inszekticidhez jutni. SCHMUTTERER és TERVOOREN (1980) *Ajuga bracteosa* BENTH. és *Ajuga reptans* LINNAEUS metilalkoholos kivonatát *Epilachna varivestis* MULSANT-on (Coccinellidae) tesztelve táplálkozást gátló hatást és vedlési rendellenességeket észleltek, vagy LÓPEZ-OLGUÍN és munkatársai (1999) a *Teucrium* fajok kivonatát találták hatásosnak burgonyabogár ellen. DARVAS és munkatársai (1996) az *Ajuga chamaepitys* (L.) SCHREB. kivonatát tesztelve erős fagoinhibitor hatást mutattak ki amerikai csótány (*Periplaneta americana* LINNAEUS) imágókon és *Spodoptera littoralis* BOISDUVAL (Noctuidae) hernyókon (az utóbbi esetben már 0,5%-os

dózisban). LAUBER és munkatársai (2004) *A. chamaepitys* örleményt kevertek aszalványmoly (*Plodia interpunctella* HÜBNER) tápjába és jelentős táplálkozásgátló hatást tapasztaltak. BELLÉS és munkatársai (1985) szerint az *A. chamaepitys* az ajugapitineknek köszönheti táplálkozást gátló hatását, de valószínűleg az ajugachin és a chamaepitin is rendelkezik deterrens hatással (LAUBER és mtsai 2004). NÁDASY és GÁL (1995) ugyanennek a növényfajnak a metanolos kivonatát találta hatásosnak lucerna-csipkézőbarkó (*Sitona humeralis*) imágók és káposztalepke (*Pieris brassicae*) hernyók ellen.



3. ábra. Az *Ajuga* fajokra jellemző 12 neoklerodán diterpenoid molekula kémiai szerkezete (CABALLERO és mtsai, 2001).

A gyalogakácban (*Amorpha fruticosa* LINNAEUS) található rotenon, egy régóta ismert botanikai inszekticid, amely hatásmechanizmusát tekintve a NAD oxidációját gátolja, összességében pedig az oxidatív foszforilációt. Ezenkívül, képes az idegek közötti kapcsolatok blokkolására is. Régóta használják méregként rovarok és egyéb ízeltlábúak ellen (RAY, 1991), de

táplálkozásgátló hatása is ismert több bogár- – köztük a burgonyabogár is (GOMBOS és GASKÓ, 1977) – és néhány lepkefajjal szemben (LANE és mtsai, 1985; NAWROT és mtsai, 1991).

A gilisztaűző varádics (*Tanacetum vulgare* LINNAEUS) általános, rovarokkal szembeni repellens hatása is már régebb óta tanulmányozott (DUKE, 1985). Eddig már majdnem 100 összetevőjét azonosították (főleg monoterpenoidokat), mint például: tujon, kámfor, borneol, karvon és terpinén (SHEARER, 1984, JACOBSON, 1990). A növényből készült vizes kivonat gátolta répalepke (*Pieris rapae* LINNAEUS) és *Plutella xylostella* LINNAEUS (Plutellidae) lárvák táplálkozását (BREWER és BALL, 1981; HOUGHGOLDSTEIN és HAHN, 1992). Burgonyabogárral szemben PANASIUK (1984) repellens hatást bizonyított, míg HOUGHGOLDSTEIN (1990) a 10%-os vizes kivonat deterrens hatását mutatta ki.

A *Matricaria* fajok közül az orvosi székfű (*Matricaria chamomilla* LINNAEUS) humán egészségügyi vonatkozásai jól ismertek, így nem meglepő, hogy a növény másodlagos anyagszertermékeiről is többet tudunk. Ezek közül fontosabbak a következők: axillarin, krizoeriol, bizabolol, kamazulen és matricin (HARBORNE és BAXTER, 1993). Jóval kevesebbet tudunk viszont a kaporlevelű ebszékfűben (*Matricaria maritima* LINNAEUS subsp. *inodora* (L.) SOÓ, syn.: *Matricaria inodora* LINNAEUS) található anyagokról. A gyökérben talált dehidromatrikária-észteren kívül (HARBORNE és BAXTER, 1993) a növény (a szár acetonos kivonata) tartalmaz fenilpropanoidokat is, melyek MUCKENSTURM és munkatársai (1981) szerint erősen gátolják a hordabagoly *Mythimna unipuncta* (HAWORTH) (Noctuidae) és burgonyabogár lárvák táplálkozását.

A *Citrus* fajok (pl.: citrom, narancs, grapefruit) jelentős mennyiségben tartalmaznak különböző fitokemikáliákat (HARBORNE és BAXTER /1993/ szerint a fontosabbak: heszperetin, heszperidin, narirutin, neoeriocitrin, floroglucinol), de ezek közül a mind az orvostudomány, mind a mezőgazdaság számára a legfontosabbak a limonoidok. A *Citrus* limonoidok (limonin, nomilin, epilimonol) nagy mennyiségben és könnyen kivonhatók a *Citrus* fajok magjából (HASSANALI és mtsai, 1986), valamint szinte korlátlan mennyiségben hozzáférhetőek, mint a „citrus-ipar” melléktermékei (KLOCKE és KUBO, 1982). A limonoidok a tetranortriterpének csoportjába tartoznak (ahova az azadirachtin is), így nem meglepő, hogy erős deterrens hatásukat burgonyabogárral szemben is számos esetben bizonyították (ALFORD és mtsai, 1987; BENTLEY és mtsai, 1988; LIU és mtsai, 1990).

A páfrányfenyő (*Ginkgo biloba* LINNAEUS), a legősibb ma is élő fafaj. MAJOR (1967) szerint kivételes, kártevőkkel és kórokozókkal szembeni rezisztenciával rendelkezik. Szakirodalmi adatok alapján rovarokra és atkákra toxikus és/vagy deterrens anyagokat tartalmaz (DABROWSKI, 1973; CYMOREK, 1984; MATSUMOTO és SEI, 1987). A növény fontosabb fitokemikáliái a

következők: ginkgolid A, B és C, ginnol, szciadopitizin, szeszkviterpén, bilobalid (HARBORNE és BAXTER, 1993). MAJOR (1967) szerint a ginkgo leveleit még az extrém polifág japán cserebogár, *Popillia japonica* (NEWMAN) imágók sem szeretik, míg FU-SHUN és munkatársai (1990) a levelek kivonatát deterrensnek találták káposztalepke (*Pieris brassicae*) hernyókkal szemben.

A közönséges cickafark (*Achillea millefolium* LINNAEUS), melyből régóta (a kamillához hasonlóan) gyógyteát készítünk, számos szekunder anyagcseretermékkel rendelkezik. Ilyen például a trigonellin, achillein, kadabin, santolin, kamazulen, matricin (HARBORNE és BAXTER, 1993). A szár acetonos kivonata gátolta a *M. unipuncta* lárvák táplálkozását, viszont burgonyabogár lárvákkal szemben csak gyenge hatása volt (MUCKENSTURM és mtsai, 1981).

A borostyánban (*Hedera helix* LINNAEUS) eddig talált fitokemikáliák közül a karotatoxin, szkopolin, hederin és hederagenin érdemelnek említést (HARBORNE és BAXTER, 1993). A friss levelekből préselt kivonat megvédte a kukoricamagvakat a *Melanotus communis* (GYLLENHAL) (Elateridae) és a *Diabrotica undecimpunctata howardi* BARBER (Chrysomelidae) kártételétől (VILLANI és mtsai, 1985; VILLANI és GOULD, 1985).

A pásztortáska (*Capsella bursa-pastoris* /L./ MEDIC.) másodlagos anyagait (szintén) kevésbé tanulmányozták. Két azonosított vegyületről tudunk: garbanzol és luteolin (HARBORNE és BAXTER, 1993). METZGER és GRANT (1932) szerint a növényből készült kivonat repellens hatású *P. japonica* imágóval szemben.

A nagy útifűről (*Plantago major* LINNAEUS) keveset tudunk. HARBORNE és BAXTER (1993) a növényben található fitokemikáliák közül csak a plantamajosid-ot említi, míg METZGER és GRANT (1932) a növényből készült acetonos kivonatot nem találta repellensnek *P. japonica* imágóval szemben. A növényből készült vizes kivonat nem gátolta burgonyabogár imágók táplálkozását (KUTAS és mtsai, 2003).

A káposztarepce (*Brassica napus* LINNAEUS) fitokémiája a humán ételmezésben betöltött szerepe miatt jól ismert (erukasav-, glükozinolát-tartalom), viszont táplálkozásgátló hatásával keveset foglalkoztak. EDIZ és DAVIS (1980) a magok etanolos kivonatát repellensnek találta kukoricabogár (*Tribolium castaneum* HERBST) és kis lisztbogár (*T. castaneum* JACQUELIN DU VAL) imágókkal szemben.

A kislevelű hárs (*Tilia cordata* MILL.) és a selyemmályva (*Abutilon theophrasti* MEDIC.) szekunder növényi anyagairól, illetve azok esetleges táplálkozásgátló hatásáról szinte semmit nem tudunk. A hárs vizes kivonata jelentősen gátolta csipkézöbarkó (*Sitona humeralis*) imágók táplálkozását (KUTAS és mtsai, 2003).

Többféle megfontolás alapján dönthetjük el, hogy mely növényfajt tartjuk érdemesnek arra, hogy kísérleteket végezzünk a belőle készített kivonattal esetleges táplálkozásgátló hatásának

megállapítása végett. Először mindenképpen a szakirodalmat célszerű áttanulmányoznunk. Aztán alapvetően két lehetőség marad. Vagy olyan növényfajt választunk, amelynek kivonatát valaki már (valamilyen módszerrel) kipróbálta valamelyik rovar ellen (és valamilyen gátló hatást tapasztalt), vagy olyant, amit legjobb tudásunk szerint még senki nem vizsgált. Az első esetben választásunkat az teszi indokoltá, hogy ugyanannak a növényfajnak egy más extrakciós eljárással készült kivonatát egy másik kártevővel szemben kipróbálva kaphatunk más (vagy inkább új) eredményt elődünkéhez képest. Különböző növényfajok deterrens hatása csak akkor hasonlítható össze, ha mindegyik kivonat megegyező eljárással készült, ha a kísérletek beállítása teljesen azonos volt, és természetesen, ha ugyanazt a rovarfajt használtuk tesztlátatként. Harmadik, vagy inkább kiegészítő lehetőség az, amikor mi magunk végzünk gyorseszteket, melyek eredményei megmutatják, hogy érdemes-e foglalkozni egy növényvel vagy nem. Az általunk vizsgált növényfajok kiválasztása során vegyesen alkalmaztuk az előbb említett elveket.

2.1.3. Levélkorongos tesztek és hibáik

A táplálkozásgátló anyagok vizsgálata céljából, a laboratóriumban elvégzett kísérletek alapvető és fő módszere mind a mai napig a levélkorongos bioteszt. Ennek lényege, hogy a rovar tápnövényének leveleiből azonos méretű korongokat vágnak ki, melyeket a vizsgálati anyaggal történő kezelés után egy arra alkalmas tesztarénában felkínálnak a rovarnak. A kísérleti elrendezésnek két alapvető fajtája terjedt el: (1) választás nélküli teszt (no-choice), mely során egy tesztarénában egyszerre csak egyféle táplálékot (kezelt vagy kezeletlen levélkorong formájában) kínálunk fel a rovar számára (az ilyen elrendezés előnye SCHOONHOVEN /1982/ szerint, hogy jobban hasonlít a természetes körülményekhez), illetve (2) a kettős választású teszt (dual-, binary choice), amikor egy tesztarénában egyszerre van jelen a kezelt és a kezeletlen levélkorong, melyek közül a rovar választhat (az ilyen tesztek mindig érzékenyebbek a választás nélkülieknél). Az utóbbit tekinthetjük az eredeti (vagy klasszikus) fajtának, mely már évtizedek óta használatos világszerte. Nem könnyű megállapítani, hogy kinek a nevéhez fűződik a felfedezése, azaz másképpen fogalmazva ki végezte az első levélkorongos tesztet? Nem tévedhetünk nagyot, ha JERMY TIBOR nevét az elsők között említjük, hiszen az ő, rovar-növény kölcsönhatások terén végzett, egészen az 1950-es évekig visszanyúló munkásságát világszerte elismerik. A levélkorongos tesztek egyik különleges fajtája az ún. szendvics-teszt (két tápnövény levélkorong között egy nem-tápnövény korong helyezkedik el) biztosan az ő nevéhez fűződik (JERMY, 1958), de a levélkorongos tesztek „klasszikus” fajtájának egyik első leírását (JERMY,

1961) szintén neki tulajdoníthatjuk, míg maga JERMY (1966) az ötletet egészen VERSCHAFFELT (1910) idejére vezeti vissza.

A levélkorongos tesztek elterjedt használata ellenére igen sok kritika éri őket. A levélből kivágott korongok használatát a legtöbb igényes munka nem ajánlja különféle okok, például a korong széli részeinek gyors kémiai változása, vízvesztés stb. miatt. Hasonló problémák merülnek fel akkor is, ha a korongok helyett egész leveleket, vagy hajtásokat használunk (MARQUIS és BRAKER /1987/ szerint még akkor is, ha vízbe állítjuk ezeket), de ilyenkor a levelek eltérő mérete miatt a kísérlet egzakt kiértékelésének lehetősége is elvész. A korongok további előnye a levelekkel szemben, hogy alakjuk azonos, míg a levelek alakja eltérő (látási) ingereket képviselhet (SZENTESI és JERMY, 1999). Fontos megjegyeznünk azonban, hogy a levélkorongoknak, mint sérült növényi részeknek a kémiai összetétele és nedvességtartalma jelentősen eltér egy sérülésmentes, ép növénytől, ami vizsgálataink eredményeit nagyban befolyásolhatja. Ismerünk olyan példát, amikor egy rovar különböző növényfajokkal szembeni preferencia sorrendje megfordul, ha ép növények helyett levélkorongokon vizsgálják azt (RISCH, 1985). A levélkorongos tesztek esetében (főleg a kettős választásúaknál) az objektumok (korongok) prezentálásának módja is sok problémát generál (SZENTESI és JERMY, 1999). JONES és COLEMAN (1988) például a levélkorongok méretének fontosságára hívják fel a figyelmet. Egyáltalán nem mindegy szerintük, hogy a korong széle (kerülete) hogyan aránylik a felülethez. Kis korongok esetében a korong szélének hatása (gondoljunk a frissen kivágott korong szélének kémiaiájára) elég erős lehet ahhoz, hogy a korong belső felületéről származó „kezeléshatást” befolyásolja. A következők figyelembe vételét javasolják a korong méretének megválasztásakor: (1) a rovar táplálkozási szokása (a levél szélét vagy a közepét rágja-e), (2) a rovar mérete (a koronghoz képest), (3) a teszt típusa; például táplálkozásgátló anyagok teszteléskor javasolt a nagyobb korongméret a széli hatás ellensúlyozása miatt. A korongméret mellett fontos jellemző a kezelt és a kontroll korongok közötti távolság a tesztarénán belül (HORTON, 1995), hiszen ez a távolság és a rovar mozgékonyasága együttesen befolyásolják mindkét fajta korong többszöri megtalálásának esélyét. Van olyan kritikai észrevétel, mely szerint a bináris választási tesztek túl nagy esélyt adnak arra, hogy ha a kísérleti állat egy objektumot meglátogat, ott is marad. Mások szerint (VAILLANT és DERRIDJ, 1992) az 50%-os válasz-megoszlásnak nagy a valószínűsége. Egy másik lényeges kérdés a kísérletek befejezése (azaz mikor legyen vége egy levélkorongos biotesztnak). LOCKWOOD (1998) szerint háromféle befejezési szabály létezik. A leggyakoribb a rögzített idő szabály, amely azt mondja ki, hogy a kísérlet felszámolásra kerül egy bizonyos meghatározott idő múlva, tekintet nélkül arra, hogy az egyes ismétlésben szereplő rovar egyedek meddig jutottak a fogyasztásban. A második, a rögzített fogyasztás szabály viszonylag ritkábban

alkalmazott módszer munkaigényessége következtében, mert valamennyi ismétlés esetében közel hasonló elfogyasztott mennyiségnél kell befejezni a kísérleteket, ami többszöri anyaglemérést jelent. A harmadik eljárás, a kevert befejezési szabály abban áll, hogy egy bizonyos teszt-időtartam (négy-nyolc óra) mellett az elfogyasztott mennyiséget is figyeljük (70-80%-os fogyasztást engedünk meg). A kísérletek eredményessége szempontjából, a fentieken túlmenően is, fontos a kísérlet tartama. USHER és munkatársai (1988) összehasonlították a rövid- és hosszútávú táplálkozásgátlási tesztek eredményeit és arra a következtetésre jutottak, hogy csak a hosszútávú tesztek alkalmasak a vizsgált anyag lehetséges gyakorlati alkalmazásának felderítésére, míg a rövidtávú tesztek a rovarok magatartásának megfigyelésével kiegészítve, fontos részleteket tárhatnak fel a rovarok viselkedéséről. A hosszútávú tesztek a habituáció lehetőségét jelezhetik, ami a vizsgált deterrens gyakorlati alkalmazásának lehetőségét kizárja. A hosszútávú tesztek ellen szól viszont az, hogy a levélkorongokban néhány óra elteltével biokémiai degradációs folyamatok indulnak meg (WOLFSON, 1988). A kísérletező újabb problémákkal szembesül a levélkorongos tesztek befejezése után, amikor a kiértékelésre kerül sor. A kiértékelés lényege, hogy az elfogyasztott levélmennyiség minél pontosabban legyen meghatározva. Számos módszer (a vizuális becsléstől a számítógépes eljárásig) létezik – alapvető különbségtétel lehet a tömeg- és a felületmérés –, de mindegyik pontosságát (a mérőműszer pontosságán kívül) nagyban befolyásolja a levélkorongok homogenitása és minősége. Eredményeink pontossága érdekében azonos korú, méretű és textúrájú levelekből célszerű korongokat készíteni úgy, hogy csak az egészséges, lapos és nagyobb erektől mentes területek kerüljenek kivágásra. A tökéletes megoldás persze az lenne (ESCOUBAS és mtsai, 1993), ha a teszt elvégzése előtt is lemérnénk az összes korongot, hiszen így a teszt során (például a korongok vízvesztése miatt) bekövetkező tömeg- és felületváltozásokat is nyomon lehet követni, de ezt a módszert időigényessége miatt általában senki nem választja. Eredményeink variációjának nagyságához nagyban hozzájárul a levélkorongok változatosságán és azok mérési pontosságán kívül a tesztrovar-egyedek heterogenitása. Ezt úgy csökkenthetjük, hogy arénánként csak egy egyedet alkalmazunk (SZENTESI és JERMY /1999/ szerint több egyed zavarhatja egymást), és odafigyelünk arra is, hogy a kísérleteinkben (mind az egy kezeléshez tartozó ismétlésekben, mind a különböző kezelések során) szereplő rovarok tömegükben, korukban és kiéhezettettségük szintjében mindinkább azonosak legyenek.

A választásos levélkorongos tesztek eredményeinek statisztikai értékelésekor is felmerülnek bizonyos problémák. A választás nélküli tesztek statisztikai értékelése nem jelent gondot, mivel a kétmintás t-próba és nem-paraméteres megfelelője, a Mann-Whitney teszt alkalmazható ilyen

esetekben. A kettős választású tesztek esetében azonban felmerül az ún. függetlenségi probléma, amit SZENTESI és JERMY (1999) a következőképpen fogalmazzák meg: „az azonos térben elhelyezett ingerek egymás fogyasztását, hatását stb. befolyásolják, ezért az eredmény kialakításában közösen vesznek részt. Azaz a „kezelések” egymástól nem függetlenek, a hatások egymással korrelálnak. A „szokásos” statisztikai tesztek azonban feltételezik a kezelések függetlenségét (térbeli elkülönülését), valamint azt is, hogy a kísérleti állat csak egyféle kezelés hatása alatt áll.” Az egyetlen kivétel a páros t-teszt, illetve nem-paraméteres megfelelője, a Wilcoxon páros előjelteszt (HORTON, 1995), amelyek tehát a bináris választási helyzetek értékelését lehetővé teszik (SZENTESI és mtsai, 1979). A többszörös (kettőnél több) választási helyzetek értékelésére viszont nincs megfelelő statisztikai eljárás, ezért ilyen kísérletek beállítása nem ajánlott (SCHOONHOVEN és mtsai, 1998).

2.2. Állati eredetű táplálkozásgátlók

2.2.1. Proteázok és proteáz inhibitorok

A növényevő rovarok táplálkozásában limitáló tényező lehet a fehérje, mivel a növények nem bővelkednek a rovarok számára hasznosítható nitrogénben. Éppen ezért a fehérjeemésztés gátlásának, mint védekezési eljárásnak a fitofág rovarok ellen, létjogosultsága lehet a modern növényvédelemben.

A táplálkozás során felvett fehérjék emésztését proteázok végzik, melyek peptideket és aminosavakat szabadítanak fel a fehérjelánc bontása során. A proteázokat két csoportra – (1) proteinázok és (2) exo-peptidázok – lehet bontani. A proteinázok a fehérjelánc meghatározott helyein hasítanak, míg az exo-peptidázok aminosavakat szabadítanak fel a C- vagy az N-végről. A fehérjék emésztését, azaz a proteázok működését gátló anyagokat proteáz inhibitoroknak (PI) nevezzük. Valószínűleg az összes többsejtű élőlényben található PI-ok. A növényekben először 1938-ban READ és HAAS mutatta ki ezeket a fehérjetermészetű anyagokat, melyek nagyobb mennyiségben a magvakban, illetve a raktározó szervekben (pl.: a burgonyagumó összes proteintartalmának 5-15%-a) található. A növényi proteáz inhibitorokról régóta sejtették, hogy a növény kártevők elleni védekezésében is szerepet játszhatnak, hiszen számos kutató rámutatott arra, hogy a PI-ok negatívan befolyásolják az állatok növekedését (HAM és SANDSTEDT, 1945; KLOSE és mtsai, 1946; WESTFALL és HAUGE, 1948). Annak ellenére, hogy ezt az elméletet alátámasztotta az a tény is, hogy a növényekben található PI-ok mennyisége jóval meghaladja az intracelluláris proteolízis szabályozásához elegendő mennyiséget, közvetlen bizonyítékkal csak GREEN és RYAN 1972-es munkája szolgált. Az említett szerzők kimutatták, hogy az ép

levelekben normálisan nagyon alacsony mennyiségben jelen lévő PI-ok a fitofág rovar támadásának hatására nagy mennyiségben termelődnek. Tehát amellet, hogy bizonyos növényi részekben állandóan jelen vannak (konstitutív), a növény képes ezeket a károsítás helyén nagyobb mennyiségben előállítani (sebzés által indukált), a károsítók elleni védekezés céljából. Az eddig vizsgált növényi PI-ok többsége három növény családból származik, nevezetesen: *Leguminosae*, *Solanaceae* és *Gramineae* (RICHARDSON, 1991).

A valódi szövetekkel rendelkező állatokban a proteázok fontos szerepet játszanak olyan élettani folyamatokban, mint például: emésztés, vérárvadás, embriógenézis, szövetreorganizáció (pl.: sebgyógyulás, vedlés, metamorfózis), védekező mechanizmusok és immunválaszok. Ezen folyamatok nagy része proteolitikus kaszkád, ami ha egyszer beindul, akkor gyorsan és irreverzibilis módon egy specifikus sejtválaszt eredményez. A proteolitikus kaszkád folyamatok elindítása és leállítása szigorúan szabályozott a következő szinteken: proteázgén transzkripció, mRNS transláció, zimogén aktiválás, szubsztrát specifitász, enzimkinetika és enzimgátlás inhibitorokkal. A legtöbb állat képes szintetizálni különböző specifitászú PI-okat, melyek feladata a nem kívánt proteolízis megakadályozása (LAWRENCE és KOUNDAL, 2002).

A növényi és állati eredetű PI-okat négy osztályba lehet sorolni a proteolitikus enzimek reakciócentrumában lévő aktív aminosavak alapján (BARRETT, 1986). Ezek a következők: szerin, cisztein, aszparaginsav és metallo proteáz inhibitorok.

2.2.2. Proteáz inhibitorok szerepe a növények védekezési mechanizmusában

Miután GREEN és RYAN (1972) bebizonyította, hogy a burgonyanövényekben a PI-ok termelése indukálható mechanikai sérüléssel vagy a bogarak rágásával, számos kutató kezdett a témával foglalkozni. NELSON és munkatársai (1983) kimutatták, hogy a fiatal burgonyafélékben a szerin PI-ok felhalmozódása a sebzés után négy-öt órával kezdődik, de egy későbbi másodík sebzés hatására a PI szint szignifikánsan nő. Tehát az ismétlődő rovarrágások fokozott PI termelésre serkentik a növényeket. Amellet, hogy a PI-ok a sebzés környékén lokálsan szintetizálódnak, egy jelzőanyag áramlik szét a floómen keresztül a növényben, általános PI termelésre serkentve az egész organizmust (PENA-CORTES és mtsai, 1988). A sebzési válasz transzlokációjáért az elektromos jelzőrendszeren kívül három különböző jelzőanyag (messenger) lehet felelős: egy oligoszacharid molekula (PIIF), az abszcizinsav, de a legesélyesebb jelölt egy szisztemin nevű, 18 aminosavból álló polipeptid (PEARCE és mtsai, 1991).

Az említett kísérletek eredményei azt sugallják, hogy a növények rendelkeznek egy aktív mechanizmussal, mely megvédi őket a rovarok támadásával szemben. Ennek közvetlen

bizonyítása akkor történt meg, amikor paradicsomnövényekben antiszensz proszisztemin gént expresszáltattak, aminek eredményeként a növények rezisztenciája lecsökkent *Manduca sexta* (LINNAEUS) (Sphingidae) lárvákkal szemben (OROZCO-CARDENAS és mtsai, 1993). Ezekben a transzgénikus növényekben csak a lárvák táplálkozásának megkezdése utáni hatodik napon kezdett valamennyi PI termelődni, miközben a lárvák addigra már a kontrollhoz képest háromszoros testtömeggel rendelkeztek, annak ellenére, hogy egyéb védekező proteinek szintje a transzgénikus növényekben is a kísérlet kezdetétől gyorsan nőtt. Ezek a megfigyelések két dologra világítottak rá: egyrészt a szisztemin fontosságára a szisztémikus riadóztatásban, másrészt pedig a PI-oknak a növények természetes védekezésében betöltött elsődleges szerepére.

Miután nyilvánvalóvá vált, hogy a növények PI-okkal is védekeznek a növényevő rovarok ellen, a kutatók elkezdtek vizsgálni ezen inhibitoroknak a rovarok fitness paramétereire gyakorolt hatását. Az olyan in vitro kísérletek eredményei, melyek során bélsatorna extraktumot kevertek össze tisztított PI-ral, azt mutatták, hogy számos PI képes gátolni a rovarok emésztőenzimeit, így hatásos lehet a rovar táplálékába keverve (legyen az mesterséges táplálék, illetve a levelekre felkent anyag), vagy a rovar tápnövényében expresszáva. Azonban az in vivo táplálkozási kísérletek eredményei nem voltak ennyire biztatóak. Ahhoz, hogy megértsük a kezdeti próbálkozások sikertelenségének okát, tudnunk kell, hogy a PI sikeres működéséhez mely tényezőket kell figyelembe vennünk. Ezek a következők: a PI koncentrációja, a K_i állandó értéke (az enzim és az inhibitor disszociációs állandója) a proteázzal való kölcsönhatás során, a PI stabilitása a rovar tápcsatornájában, az összes fehérjebontó enzimet gátolni képes inhibitor keverék jelenléte, valamint a rovar azon képessége, hogy a proteáz génexpresszió megváltoztatásával mennyire képes adaptálódni az inhibitorok hatásához. Másodlagos jelentőségű lehet még a tápláltsági tényező, mely befolyásolhatja a tünetek súlyosságát (JONGSMA és BOLTER, 1997).

2.2.3. Rovarok fehérjeemésztése és növényi proteáz inhibitorok

BAKER és munkatársai (1984) szerint a rovar bélsatornájában történő proteáz szekréció inkább függ a középbelbe jutott táplálék fehérjetartalmától, mint a táplálék térfogatától. A fehérjebontó enzimek elválasztásában két mechanizmus játszhat szerepet: (1) a táplálék-részecskék (proteinek) közvetlen hatást gyakorolnak a középbeli epitel sejteire, vagy (2) táplálékfelvétel által kiváltott hormonális hatás áll a háttérben (APPLEBAUM, 1985). A rovarok középbelében a proteolitikus enzimek szintézisének és kiválasztásának modellje szerint (BROVOSKY, 1986) az elfogyasztott proteinek váltják ki az enzimek elválasztását a középbel

poszterior szakaszának epitél sejtjeiből. Az enzimek a citoskeletonhoz kapcsolódó membrán vezikulumokban szállítódnak a felhasználási helyükre. A peptidázok az ektoperitrofikus térbe ürülve, onnan transzverzálisan mozogva a bél lumenébe kerülnek, ahol a proteinek bontása történik (EGUCHI és mtsai, 1982).

A kártevő rovarok fehérjeemésztésük során különböző osztályba tartozó proteázokat használnak. A Coleoptera és Hemiptera fajokban a fehérjék bontását főleg cisztein proteázok végzik (MURDOCK és mtsai, 1987), míg a Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera és Diptera fajokban szerin proteázok (RYAN, 1990; WOLFSON és MURDOCK, 1990).

A növények proteáz inhibitorainak a rovarok proteázaihoz való kötődésének mechanizmusa valószínűleg megegyezik az inhibitorok mind a négy osztálya esetében. Az inhibitor hozzákötődik az enzim aktív helyéhez, ami által egy nagyon alacsony (10^{-7} – 10^{-14} M semleges pH tartományban) disszociációs állandójú komplex keletkezik, más szóval, az aktív centrum blokkolva lesz. Az inhibitor működése során utánozza az enzim normál szubsztrátját, de nem engedi, hogy a peptidkötés bontásának enzim mechanizmusa kiteljesedjen, azaz a végtermék disszociációja bekövetkezzen (WALKER és mtsai, 1998).

Az egyértelmű, hogy a PI-ok a proteázokhoz kötődve megakadályozzák azok működését, de az még kevésbé tisztázott, hogy a rovarok által elfogyasztott PI-ok hogyan eredményeznek antimetabolikus hatást, azaz hogyan fejtik ki (negatív) hatásukat a rovarok növekedésére és fejlődésére. Az egyik elmélet szerint, a fehérjebontó enzimek gátlása rontja az étkezési fehérjék lebontásának hatékonyságát, ami a felvehető esszenciális aminosavak mennyiségét csökkenti (ALMQUIST és MERRITT, 1951). A másik elmélet (amit először emlősökre dolgoztak ki) viszont azt mondja, hogy a kontrollhoz viszonyított testtömeg-csökkenést hiperaktív pankreász (az elmélet kiterjeszhető rovarokra is, ilyenkor hiperszekrécióról beszélünk) okozza, amely nagy mennyiségű proteáz termeléssel kívánja kompenzálni az inhibitorok miatt lecsökkent aktivitást, elvonva ezzel az egyéb esszenciális fehérjék felépüléséhez szükséges aminosavakat (LYMAN és LEPKOVSKY, 1957). Az elméletek megszületése óta számos kísérleti eredmény született pro és kontra mindkettő esetében. Újabban a téma szakértői azon az állásponton vannak, hogy az eredeti hipotézis helyes, tehát az inhibitorok direkt módon gátolnák a fehérjék emésztését (JONGSMA és BOLTER, 1997).

2.2.4. Proteáz inhibitorot kifejező transzgénikus növények

Proteáz inhibitorok növényvédelmi célú felhasználásával már régóta próbálkoznak. A képlet egyszerűnek tűnik: először meg kell határozni, hogy az illető rovarkártevőben milyen proteázok

vesznek részt a fehérjék bontásában és milyen arányban. Ezután keresni kell egy olyan PI-t, amely in vitro körülmények között jól gátolja a fő fehérjebontó enzimet. Az alkalmas inhibitor megtalálása után a legegészsőbb megoldás az, amikor a modern biotechnológiát felhasználva a PI-t kódoló génszakaszt a kultúrnövénybe beviszik, ezáltal a mai növényvédelmi trendnek megfelelően egy rovarrezisztens transzgenikus növényt állítanak elő.

Napjainkig legalább 14 különböző növényi eredetű PI-t vittek be kultúrnövényekbe. Főleg a *Fabaceae*, *Solanaceae* és *Poaceae* növény családkból származó szerin PI-okat vetettek be többnyire Lepidoptera-k ellen, de néhány esetben Coleoptera vagy Orthoptera volt a célállat. Ez ideig legtöbbször a tehénborsó (*Vigna sinensis* LINNAEUS) tripszin inhibitor (CpTI) próbálták ki legalább tíz különböző növényfajban (SCHULER és mtsai, 1998). Transzgenikus növényekkel és mesterséges táplálékkal laboratóriumban végzett kísérletekből tudjuk, hogy a CpTI nagyon sok lepke és bogárfajra van hatással, ennek ellenére a szántóföldi kísérletek eredményei sorra elmaradnak a várakozástól. Például a Kaliforniában tesztelt CpTI-t kifejező transzgenikus dohánynövények jelentős lárvamortalitást okoztak *Helicoverpa zea* (BODDIE) (Noctuidae) esetében, de ez az eredmény jóval elmaradt attól, amit a Bt-toxint kifejező transzgenikus dohánynövények produkáltak (HOFFMANN és mtsai, 1992).

Mi az oka annak, hogy PI-t kifejező rovarrezisztens transzgenikus kultúrnövények hatékonysága (még) nem éri el azt a szintet, amit a gyakorlati növényvédelem elvárna? Mi sem bizonyítja ezt jobban, mint az, hogy mai napig nem került kereskedelmi forgalomba PI-t kifejező növényfajta, szemben a már régóta bevált Bt-toxinnal módosított transzgenikus fajtákkal. Az okok között talán a két legalapvetőbb a következő: Az (1.) eddig használt egyszerű PI-ok gátlási spektruma korlátolt, általában csak egyetlen osztályba (szerin, cisztein stb.) tartozó proteázokat képesek gátolni (miközben a célrovar proteázai mindig több osztályból kerülnek ki, hiszen BOWN és mtsai /1997/ szerint a rovarok közepbelében 1020 különböző proteáz található), ezáltal az emésztési közegben mindig maradnak szabad proteázok (BARRETT, 1994). A (2.) rovar emésztőrendszerébe került PI-okat a rovar egyes fehérjebontó enzimeit lebontják, így ezek hatásukat veszítik (MICHAUD és mtsai, 1996). A (3.), kevésbé nyilvánvaló oka az idegen PI csökkent hatásának az, amikor a transzgenikus növény által normálisan termelt (nem a transzgen által) PI-ok és a transzgen PI specifikitása megegyezik. Ilyenkor a szinergisztikus kölcsönhatás miatt a növény saját PI-ai kioltják a transzgen PI hatását (JONGSMA és mtsai, 1995). Az is előfordulhat, hogy a növény endogén proteázai bontják le a transzgen PI-t (OUTCHKOUROV és mtsai, 2003). A (4.) ok a rovarok alkalmazkodóképességében keresendő. Az eddig vizsgált rovarok nagy része képes olyan proteázokat termelni, amelyek érzéketlenek a tápnövény inhibitoraira. Ez azt jelenti, hogy a kártevő a rovar-tápnövény kapcsolatból adódó szelekciós

nyomás miatt eleve rendelkezik olyan proteáz génekkel, melyeket a tápnövény inhibitorai nem képesek gátolni, sőt a rovarba kerülve, éppen ezek kapcsolják be az említett „érzékeny” proteázokat termelő géneket. Úgy kell tehát elképzelnünk, hogy az ilyen képességgel rendelkező rovarok a proteáz aktivitásukat folyamatosan szabályozzák egy visszacsatoló elven működő monitoring rendszer segítségével (JONGSMA és mtsai, 1996).

A fentiekből következik, hogy a kártevők PI-okkal történő leküzdése nem egyszerű feladat. A növények válaszul a rovarok érzéketlen proteázaira kifejlesztették a többfunkciós (multifunctional) inhibitorokat. Számos olyan növényi PI-t ismerünk, mely egymaga képes gátolni szerin, cisztein, aszparaginsav proteázokat is (RICHARDSON, 1991). Az ember azonban még többre képes a biokémia és biotechnológia segítségével. Egyrészt kereshetünk olyan nem-tápnövény eredetű inhibitorokat, melyek képesek gátolni az érzéketlen proteázokat. Ennek alapja az, hogy a rovar nem-tápnövény között nem volt olyan evolúciós kapcsolat, ami érzéketlen proteázok kifejlesztését eredményezte volna (DUAN és mtsai, 1996). Másrészt kereshetünk alkalmas PI-okat magában a célrovarban is, hiszen annak saját PI-a biztosan gátolja a „saját proteázát”, sőt általában még toxikus is (gondoljunk a nem emésztőszervi proteázok gátlására) (BRUNKE és mtsai, 1995). Végül említsük meg a legelőremutatóbb lehetőséget, ami a molekuláris biológiának köszönhetően napjainkra realitássá vált. Ma már képesek vagyunk arra, hogy mi magunk tervezzünk és készítsünk olyan, részben mesterséges és többfunkciós inhibitorokat, melyekkel a kártevő teljes proteáz spektruma gátolható (JONGSMA és mtsai, 1996), nem emésztődnek meg a kártevő bélcsatornájában és egyben aktívak az érzéketlen proteázokkal szemben is.

2.2.5. Burgonya-inhibitorok és burgonyabogár proteázok

A burgonyabogár (lárva és imágó) tápcsatornájában a fehérjék emésztését mai tudásunk szerint főleg cisztein proteázok végzik (BOLTER és JONGSMA, 1995; GRUDEN és mtsai, 1998), de az aszparaginsav proteázok szerepe is számottevő, valamint kimutatható valamekkora szerin és metallo proteáz aktivitás is (NOVILLO és mtsai, 1997). A különböző osztályba tartozó enzimek egymáshoz való aránya hozzávetőlegesen a következő: cisztein proteázok 60%, aszparaginsav proteázok 30%, szerin és metallo proteázok 10% (WOLFSON és MURDOCK, 1987; BOLTER és LATOSZEK-GREEN, 1997). A burgonyabogár tápcsatornájának közege gyengén savas (átlagos pH=6,5, az előbélben 5,9, míg a középbél poszterior szakaszában 6,6) (GRAYSON, 1958).

A burgonyanövények a kártevők fehérjeemésztésének megzavarása céljából PI-okat termelnek. Mechanikai sérülés (pl.: rovarrágás) által indukált védekező proteinek (PI is) lokális

és szisztémikus akkumulációját „wound-signalling pathways” mechanizmusok gén transzkripció szinten szabályozzák. Nagyon sokféle PI-t sikerült már kimutatni burgonyából (pl.: potato inhibitor I és II, katepszin D inhibitor, ciszatinok stb.), melyek között van szerin (SANCHEZ-SERRANO és mtsai, 1986), cisztein (BRZIN és mtsai, 1988), aszparaginsav PI (STRUKELJ, 1992), valamint karboxi-peptidáz inhibitor (RYAN és mtsai, 1974). ORTEGO és munkatársai (2001) pontosan meghatározták a rovarok által megrágott burgonyalevelek gátlási kapacitását. Ezek alapján egy normál burgonyalevél erősen gátolja a tripszin, kimotripszin, elasztáz, karboxipeptidáz A, valamint gyengébben a karboxipeptidáz B enzimek működését. Természetesen az evolúció során, a burgonyabogár alkalmazkodni tudott a burgonya inhibitoraihoz. Ezt bizonyítja annak az ötletes kísérletnek az eredménye, melynek során olyan transzgénikus burgonyanövényeket hoztak létre, melyek nem voltak képesek PI-ok termelésére. Összehasonlítva az inhibitor termelésre képtelen és normál növényeken nevelt lárvák enzimaktivitását, kiderült, hogy a négy napig transzgénikus növényeket fogyasztó lárvák endoproteolitikus aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a normál leveleket fogyasztó lárvákéhoz képest, miközben a kontroll lárvák tömeggyarapodása 14-31%-kal elmaradt az inhibitor termelésre képtelen növényeken nevelt lárvákéhoz képest. Ebből az következik, hogy a normál burgonyanövényeken élő lárvák az étkezési fehérjék lebontásához szükséges proteolitikus aktivitási szintnél magasabb szintet tartanak fenn (amiért akár a testtömeggyarapodásuk 30%-át kitevő metabolikus árat kell fizetniük) valószínűleg azért, hogy a burgonya védekező mechanizmusai által kiváltott táplálkozási stresszt kompenzálják (ORTEGO és mtsai, 2001). A burgonyabogár képes kivédeni a metil-jázmínsavval kezelt (metil-jázmínsav természetes körülmények között szisztémán hatására termelődik a növényben és az inhibitorokat kódoló gének expresszióját aktiválja) burgonyalombban indukált natív PI-ok gátló hatását oly módon is, hogy új, a burgonya inhibitoraival szemben érzéketlen proteinázokat termel (BOLTER és JONGSMA, 1995). A burgonyabogár olyan kivételes képességekkel rendelkezik, melyek lehetővé teszik számára, hogy a fehérjeemésztő rendszerét mindenkor az elfogyasztott táplálék „tulajdonságaihoz” igazítsa azáltal, hogy proteolitikus aktivitását minőségileg és mennyiségileg is módosítani tudja (OVERNEY és mtsai, 1997). GRUDEN és munkatársai (2003) nagy mennyiségű PI-t termelő burgonyaleveleken nevelt burgonyabogár lárvák cisztein proteázait vizsgálták. A mesterségesen magas inhibitorszinthez alkalmazkodott lárvák tápcsatornájában három különböző cisztein proteázot találtak. Az 1. számú, a legnagyobb mennyiségben termelődő, széles specifitású proteáz, amit viszont a legtöbb inhibitor gátolni képes. A 2. számú az 1. számúval megegyező szubsztrát specifitással rendelkezik, de a burgonya cisztein PI-ok nem képesek gátolni az aktivitását. Ebből az következik, hogy a 2. számú proteáz végzi a fehérjék bontását az

adaptálódott rovarokban, kikerülve a növény védekező rendszerét. A 3. számú, kisebb mennyiségben jelen lévő enzim viszont képes lebontani, ezáltal inaktiválni a burgonyabogár tápcsatornájába kerülő inhibitorokat (ciszttatinokat) lehetővé téve ezáltal a különben az inhibitorok által gátolt (PI-ra érzékeny) enzimek (pl.: 1. számú) működését.

Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a rovarok PI-okhoz való adaptációja nem egyszerűen azt jelenti, hogy a rovarok vagy a növényi PI-okkal szemben rezisztens enzimek termelése, vagy a már meglévő enzimek túltermelése révén oldják fel a fehérjeemésztő enzimek gátlását, mint ahogy azt régebben gondolták (BROADWAY és DUFFEY, 1986; JONGSMA és mtsai, 1995). Inkább egy meglehetősen bonyolult folyamatról van szó, mely során kombinálódik az inhibitorokkal szemben rezisztens enzimek expressziója, az inhibitorokat inaktiváló enzimek expressziója és a „normál” fehérjebontó enzimek túltermelése.

2.2.6. A burgonyabogár elleni védekezés proteáz inhibitorokkal

Az eddigiekből kitűnik, hogy a burgonyabogár elleni PI-ra épülő hatékony védekezési eljárás kidolgozása igen nehéz feladat, alapvetően a burgonyabogár rendkívüli adaptációs képességei miatt. Az első ilyen próbálkozások egyike WOLFSON és MURDOCK (1987) nevéhez fűződik, akik egy E-64 nevű, *Aspergillus japonicus* SAITO TRP-64-es törzséből kivont kis peptidet használtak. Az E-64 egy specifikus cisztein proteáz inhibitor, ami a papain család összes cisztein proteázát irreverzibilisen gátolja. A kutatók az inhibitort nagy mennyiségben egyszerűen a levekre kenték, és azt tapasztalták, hogy a kb. egy hétig E-64-et fogyasztó lárvák testtömege nagymértékben elmaradt a kontroll lárvákéhoz képest. Konklúziójukban úgy fogalmaztak, hogy a burgonyabogár növekedési rátáját nagymértékben csökkenteni lehet egyedül a cisztein proteázok gátlásával. Tíz évvel később BOLTER és LATOSZEK-GREEN (1997) szintén a levekre felkent E-64 hatását vizsgálta. Azt találták, hogy a lárvák növekedését az E-64 csak akkor képes jelentősen csökkenteni, ha elég nagy koncentrációban jut be a rovar közepbelébe, ahol szignifikánsan csökkentenie kell a proteáz szintet. Fontos kérdés, hogy milyen koncentrációban kell alkalmazni egy PI-t a megfelelő hatás eléréséhez. JONGSMA és BOLTER (1997) mérései és számításai alapján, a burgonyabogárban a teljes cisztein proteáz aktivitás 30 μM -nak felel meg. Elméletileg ahhoz, hogy az emésztőenzimek teljes gátlását elérjük, a PI-ok minimum ekvimoláris koncentrációja a 10-30 μM tartományban kell, hogy legyen. Ez a levelek összes oldható proteín tartalmának 0,5-1,5%-a.

Könnyen belátható, hogy a PI-ok növényvédelmi célú felhasználásának egyedüli hatékony módszere a PI gének kultúrnövényekbe való beültetése. A hagyományos eljárás, a PI-ok

levelekre történő kipermetezése úgy, hogy védelmet is nyújtson, nehezen kivitelezhető. Számos technológiai problémával kellene megküzdeni, nem beszélve az előállítási költségekről. Tehát, miután a biotechnológia fejlődése lehetővé tette, a kutatók többsége PI-t kifejező transzgenikus növény kifejlesztésén kezdett dolgozni. A burgonyabogár ellen (is) hatékony PI-t kifejező transzgenikus burgonyanövényt ez ideig nem sikerült létrehozni a nagyszámú próbálkozások ellenére sem. Növényi eredetű cisztein proteáz inhibitor (oryzacystatin I) kifejező burgonyanövény – a már fentebb kifejtett burgonyabogár adaptációs mechanizmusok (pl.: érzéketlen proteázok termelése) miatt – nem volt hatékony (CLOUTIER és mtsai, 2000). Miután hamar kiderült, hogy a burgonyabogár könnyen elbánik a növényi eredetű PI-okkal, ezért a kutatók az állatokban kezdtek PI-okat keresni. CHRISTELLER és munkatársai (2002) emlősből kivont PI-t (szarvasmarha-lép tripszin inhibitor = BPTI) kifejező transzgenikus dohánynövényt állítottak elő gyapottok bagolylepke (*Helicoverpa armigera* HÜBNER) ellen. Egyébként más kutatások alapján úgy tűnik, hogy Lepidopterák ellen növényi eredetű szerin proteázokkal jó hatékonysággal lehetne védekezni (JOHNSON és mtsai, 1989; BELL és mtsai, 2001). A burgonyabogár ellen OUTCHKOUROV és munkatársai (2003) állítottak elő equistatin-t kifejező burgonyanövényeket. Az equistatin egy állati eredetű (*Actinia equina* LINNAEUS nevű virágállatból származik) többfunkciós proteáz inhibitor, ami két fejének (domain) köszönhetően egyszerre tudja gátolni a cisztein és aszparaginsav proteázokat. A burgonyabogár adaptációs mechanizmusait kikerülő, kitűnő tulajdonságokkal rendelkező equistatin mégsem volt eredményes, mivel a burgonyanövény saját proteázai képesek lebontani.

Az általunk tesztelt *Schistocerca gregaria* trypsin chymotrypsin inhibitor (SGTCI) még talán az equistatin-nál is kedvezőbb tulajdonságokkal rendelkezik. Egyrészt állati eredetű (sivatagi sáskából származik), másrészt többfunkciós (tripszin és kimotripszin gátló), sőt részben mesterséges is, mivel a két inhibitor (SGCI és SGTI) egy -Lys-Arg- híd segítségével kapcsolják egymáshoz. Harmadrészt pedig rendkívüli mértékben phylum szelektív (ez talán a legnagyobb erénye), ami azt jelenti, hogy sokkal (öt nagyságrenddel!) jobban gátolja az ízeltlábúak fehérjebontó enzimeit, mint az emlősökét (PATTHY és mtsai, 2002). Phylum szelektivitásának köszönhetően az SGTCI egy olyan állati eredetű PI, amely növényvédelemben történő felhasználása esetén (ember által fogyasztott kultúrnövényben), a humán-egészségügyi vonatkozásokat tekintve is kedvező lehet (gondoljunk ellenben a szarvasmarhából kivont PI-ra, aminek esetleges emberi fogyasztása méltán vált ki egészségügyi aggályokat).

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Tesztállatok

A növényi kivonatok táplálkozásgátló hatását a következő öt rovarfajon vizsgáltuk: burgonyabogár (*Leptinotarsa decemlineata* SAY) imágók és lárvák (fiatal L₄), lucernacsipkézőbarkó (*Sitona humeralis* STEPHENS) imágók, repcedarázs (*Athalia rosae* LINNAEUS) L₄ álhernyók, káposztalepke (*Pieris brassicae* LINNAEUS) L₃ hernyók és gyapjaslepke (*Lymantria dispar* LINNAEUS) L₃ hernyók. A kísérletek során felhasznált rovarokat – a káposztalepke és gyapjaslepke kivételével, amelyeket saját magunk neveltünk – Keszthely környékén gyűjtöttük és felhasználásukig laboratóriumi tenyészedényekben tartottuk őket. A burgonyabogár és csipkézőbarkó imágókat a kísérlet beállítása előtti napon gyűjtöttük. A burgonyabogár és repcedarázs lárvákat (a kísérletezés ideje alatt) hetente egyszer, a hét első napjaiban (hétfő, kedd) nagyobb mennyiségben gyűjtöttük úgy, hogy az összegyűjtött egyedek között a kísérletben felhasznált stádiumokon kívül mindig voltak azoknál fiatalabbak is, melyeket a megfelelő stádium eléréséig (általában a hét végéig) tovább neveltünk. A laboratóriumban tartott nagyszámú lárvából így általában a hét minden hétköznapjára jutott a kísérlet beállításához elegendő mennyiségű (egy napra 20 egyed elég), közel azonos méretű és kondíciójú egyed. Egy lárvát csak egy kísérletben használtunk fel. A káposztalepke tenyészetet az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetétől kaptuk tojások formájában. A lárvákat rovarketrecekben neveltük a laboratóriumban a megfelelő stádium eléréséig. A 2005-ben végzett kísérletek során felhasznált gyapjaslepke hernyók (is) saját nevelésből származtak. 2004-ben gyűjtött kifejlett hernyókat rovarketrecekben tartottuk, majd a bábokból kikelt imágók párosodása után a nőtények által a ketrec falára rakott petecsomókat inszektáriumban átteleltettük. A hernyókat felhasználásukig rovarketrecekben neveltük az inszektáriumban.

3.2. Tápnövények

A rovaroknak a nevelésük során, illetve a kísérletek alatt (levélkorongok) a következő növények leveleit biztosítottuk: a burgonyabogár imágóknak burgonya (Kondor), lucernacsipkézőbarkóknak lucerna (Viktória), repcedarázs álhernyóknak tarlórépa (Horpácsi lila), a káposztalepke hernyóknak kelkáposzta (Szentesi korai) és a gyapjaslepke hernyóknak kislevelű hárs. A növényeket – a hárs kivételével – a tanszék üvegházában cserépedényekben termesztettük, lehetővé téve ezzel a rovarok folyamatosan friss táplálékhoz jutását.

3.3. Növényi kivonatok

3.3.1. Vizes kivonatok

A növényekből vizes kivonatokat mindig frissen, a kísérletek beállítása előtt készítettük el a következőképpen: 25 g levelet mérlegesen lemértünk, majd feldaraboltuk és dörzscsészébe helyeztük. 10 percnyi dörzsölés után 10 ml desztillált vizet adtunk a péphez és az egészet tüll anyagon átnyomtuk. Az így kapott növényi kivonatokhoz még 10 ml desztillált vizet adtunk és a kezelendő levélkorongokat ebbe az oldatba mártottuk bele, majd a száradásuk után felhasználtuk azokat az adott kísérletben. Vizes kivonatokat ilyen eljárással hat különböző növényfajból készítettünk: nagy útifű (*Plantago major* LINNAEUS), pásztortáska (*Capsella bursa-pastoris* /L./ MEDIC.), kislevelű hárs (*Tilia cordata* MILL.), borostyán (*Hedera helix* LINNAEUS), közönséges cickafark (*Achillea millefolium* LINNAEUS) és káposztarepce (*Brassica napus* LINNAEUS).

3.3.2. Metanolos kivonatok

Metanolos kivonat 11, általunk Keszthely és Zalaegerszeg környékén 2003 és 2004 nyarán gyűjtött és árnyékos helyen kiszárított növényfaj egyedeinek bizonyos részeiből készült. Ezek a következők: orvosi székfű (*Matricaria chamomilla* LINNAEUS), kaporlevelű ebszékfű (*Matricaria maritima* LINNAEUS subsp. *inodora* /L./ Soó, syn: *Matricaria inodora* LINNAEUS), gilisztaűző varádics (*Tanacetum vulgare* LINNAEUS) virágzat; gyalogakác (*Amorpha fruticosa* LINNAEUS), selyemmályva (*Abutilon theophrasti* MEDIC.), pásztortáska (*Capsella bursa-pastoris* /L./ MEDIC.) termés; kislevelű hárs (*Tilia cordata* MILL.), borostyán (*Hedera helix* LINNAEUS), páfrányfenyő (*Ginkgo biloba* LINNAEUS), közönséges cickafark (*Achillea millefolium* LINNAEUS) levél; citrom (*Citrus limon* /L./ BURM.) mag. A 12. – kalinca ínfüből (*Ajuga chamaepitys* /L./ SCHREB.) FEKETE GÁBOR által 1999-ban teljes növényből készített – kivonatot (AC-BS3), amely ismertén erős táplálkozásgátló hatású, standard kontrollként használtuk kísérleteinkben. Az extrakciós eljárás, ami FEKETE és munkatársai (2004) módszerén alapul, az összes növényfaj esetében azonos volt. 10 g ledarált növényi anyaghoz 190 ml metanolt (98%) adtunk, majd 20 percnyi rázás után hagytuk leülepedni. Az oldatot szűrőpapíron átszűrve, a fennmaradó növényi anyagot újra 190 ml metanolban rázattuk. Az ismételt szűréssel kapott metanolos oldatot 50°C-on beszárítottuk. A metanol elpárolgása után, az üvegedény alján maradt száraz anyagot 10 ml metanolban visszaoldottuk. Az így kapott növényi kivonatok 1 g/ml töménységűek (1 ml 1 g száraz növényi anyag extraktumát tartalmazza), amelyeket felhasználásukig -18°C-on tároltunk. A kivonatok hatását 0,5 és 5% (V/V) dózisban vizsgáltuk. A hígításhoz desztillált

vizet használtunk, amelyhez Tween-20 detergenst adagoltunk (2%), elősegítve ezzel az oldatok levélkorongok felületén történő egyenletes eloszlását. A kontroll levélkorongokat ún. kontroll oldattal kezeltük, ami desztillált vízben oldott 0,5 vagy 5% metanolt és 2% Tween-20 detergenst tartalmazott. A kezelések során, a levélkorongokat a fent említett módon elkészített oldatokba mártottuk.

3.3.3. *NeemAzal T/S*

A NeemAzal T/S a Trifolio-M GmbH által gyártott formált készítmény 1% azadirachtin A hatóanyaggal, ami tulajdonképpen a trópusi neem fa (*Azadirachta indica* A. JUSS) magjából készült kivonat. A kivonat hatását 0,5 és 5% (V/V) dózisban vizsgáltuk. (A NeemAzal T/S gyártója 0,5%-os dózisban ajánlja felhasználásra a készítményt.) Az oldatokat mindig közvetlenül a kísérletezés előtt desztillált vízzel készítettük.

3.4. Levélkorongos tesztek

3.4.1. *Kettős választású levélkorongos tesztek (I.)*

Az ilyen típusú (dual choice) teszt lényege, hogy a kísérleti rovar választhat a számára felkínált táplálkozást gátló anyaggal kezelt és kezeletlen tápnövény-levélkorong között. Az általunk használt kísérleti beállítás a következő volt: levélkorongvágóval kimetszett négy kezelt és négy kezeletlen levélkorongot (d=15 mm) rovartű segítségével körkörös elrendezésben, de a kezelt és kezeletlen korongokat felváltva a tesztarénába helyeztük. A tesztaréna egy üvegből készült 12 cm átmérőjű (eredeti funkcióját tekintve) vajtartó edény volt, aminek az aljára 0,5-1 cm vastagon viaszt rétegeztünk (ami a rovartű megtartását szolgálta). A viaszréteg tetejére benedvesített szűrőpapír korongot helyeztünk, ami a nedves mikroklimát biztosította. A levélkorongok (a kezelt korongok esetén a száradás után) behelyezése után minden arénába egy, előzőleg négy órán keresztül éheztetett rovart raktunk, majd az arénát egy üveglappal fedtük. A rovarok 24 óráig táplálkozhattak állandó és egyenletesen felülről érkező megvilágítás mellett klímakamrában 23°C-on. A kísérleteket négy (vizes kivonatok tesztelése során), illetve 10 ismétlésben végeztük (kivéve a káposztalepke esetében, ahol az ismétlésszám négy volt a kevés hernyó miatt). A 24 óra elteltével történő kiértékelés a levélkorongok (maradékok) felületének mérését jelentette.

A vizes kivonatok tesztelése során a csipkézőbarkókkal és a repcedarázs álhernyókkal végzett kísérletek kiértékelésekor milliméterpapírt használtunk a következőképpen: Egy A4-es

méretű milliméterpapírt lapolvasóval digitalizáltunk, majd a fekete-fehér kép file-t kinyomtattuk egy átlátszó írásvetítő fóliára. Az így kapott milliméteres beosztású fóliával mértük a levélkorong maradékok felületét a következő módon: a rovartűről lehúzott, ürüléktől megtisztított levélkorong darabkákat egy A4-es méretű, fehér szűrőpapíron sorba rendeztük, majd az egészet leborítottuk egy teljesen átlátszó fóliával, melyet gemkapcsok segítségével rögzítettünk a szűrőpapírhoz. A milliméteres beosztású fóliát a rögzített fólia felületére helyezve az könnyedén mozgatható marad (minden egyes lemérendő felület határaihoz pontosan illeszthetőek a millimétervonalak) és nem is koszolódik be, nagyban megkönnyítve ezzel a levélmaradékok felületének meghatározását.

A levélkorong maradékok felületét a burgonyabogár imágókkal végzett (szintén vizes kivonatos) tesztben LI-COR LI-300-as típusú levélfelületmérő berendezéssel (ami a Herbológiai és Növényvédő-szer Kémiai Tanszék tulajdona) mértük. Ez a módszer szintén gyors, de pontossága megkérdőjelezhető, mivel a műszer a $0,5 \text{ cm}^2$ -nél kisebb levéldarabokat nem tudja egzakt módon mérni. További hátrány még az is, hogy a nem kellően tisztított levélkorongoktól a műszer elég hamar „bedugul”, ami után szét kell szerelni és meg kell tisztítani.

Az *Ajuga chamaepitys* és *Azadirachta indica* kivonatok táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása céljából elvégzett kísérletsorozat kiértékeléséhez egy rendkívül pontos ($0,08 \text{ mm}^2$), de meglehetősen időigényes módszert választottuk. A levélkorong-maradékok felületét számítógép segítségével mértük a következő módon: A rovartűről lehúzott, ürüléktől megtisztított levélkorong darabkákat egy A4-es méretű, fehér szűrőpapíron sorba rendeztük, majd az egészet leborítottuk egy azonos méretű szűrőpapír lappal és 24 óráig préseltük. Préselés után a felső szűrőpapír lapot óvatosan eltávolítottuk. Az alsó szűrőpapír egyik oldalsó és felső széléhez egy-egy cm széles, a szűrőpapír szélességének, valamint hosszúságának megfelelő hosszú milliméterpapír-csíkot raktunk (amit a mérés során referencia vonalzóként tudunk használni), és az egészet lefedtük egy teljesen átlátszó fóliával, melyet gemkapcsok segítségével rögzítettünk a szűrőpapírhoz. Ezután a levélkorongokat (illetve az egész szűrőpapírt) lapolvasóval digitalizáltuk és a felületüket számítógép segítségével határoztuk meg. A számítógépes felületmérés során Adobe Photoshop 6.0 és Microsoft Excel 97 programokat használtunk. A módszer GRÓSZ (2003) munkáján alapul, aki személyesen is közreműködött a mérésben. A felületmérés a következőképpen történt: a Photoshop-ban megnyitottuk a képet, és a levélkorongokat a lehető legpontosabban körbevágtuk, majd egy új ablakban megnyitva őket Median szűrőt alkalmaztunk. A Median szűrő csökkenti a pontszerű zajokat, melyek befolyásolhatják a mérési eredményeket. Ezt követően elmentettük a képeket és azokkal dolgoztunk tovább. Kiválasztottuk a Treshold funkciót, amely segítségével a képet két szintre

vágtuk, így a kép csak fekete és fehér képpontokból állt (fehér színű a levélkorong, fekete a háttér). Ismételt mentés után, a Histogram menüpont segítségével megmértük a fehér képpontok számát. Ezek után a vonalzóként használt milliméterpapír-csíkokat egyenként kijelöltük és megmértük a hozzájuk tartozó pixelek számát. Ezek alapján osztással kiszámítottuk, hogy egy pixel hány mm-nek felel meg vízszintesen és függőlegesen, mely értékeket összeszorozva megkaptuk egy pixel területét mm²-ben. A Photoshop megadja a levélkorong maradékok pixelszámát, amit Excel-ben egyszerűen átszámoltathatunk mm²-re.

Az eredményeket táplálkozásgátló hatás százalékban (A.F. = antifeedant activity) adtuk meg, amely a következőképpen számítandó mm²-ben: (1 - kezelt korongok átlagfogyása / kontroll korongok átlagfogyása) x 100 (KRISHNAKUMARI és mtsai, 2001). Ezzel a módszerrel végeztük a vizes kivonatok tesztelését, valamint az *Ajuga chamaepitys* és az *Azadirachta indica* kivonatok táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása céljából elvégzett kísérletsorozatot a csipkézőbarkó imágók kivételével (lásd 3.4.2.).

3.4.2. Választás nélküli teszt (I.)

Az ilyen (no-choice) teszt során, az egy tesztarénában lévő rovar számára csak egyfajta (vagy táplálkozásgátló anyaggal kezelt vagy kezeletlen) táplálékot kínálunk fel. Az *Ajuga chamaepitys* és az *Azadirachta indica* kivonatok táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása céljából elvégzett kísérletsorozatban csak a csipkézőbarkó imágókkal végeztünk választás nélküli tesztet. A tesztaréna felépítése megegyezik a kettős választású tesztnél leírtakkal, azonban a módszerben lényeges különbség volt az, hogy nem levélfelületet mértünk, hanem a várható kis fogyasztás miatt a pontosabb tömegmérési módszert választottuk. A lucerna levelét félbevágtuk (a főeret eltávolítva), majd mindkét féllevél (kezelt féllevél esetében a száradás után) tömegét lemértük analitikai mérlegen. Ezt követően a levél egyik felét az arénába helyeztük, ahol egy csipkézőbarkó fogyaszthatott belőle (négy órás időtartalmú éheztetés után) 24 órán keresztül, míg a levél másik felét száraztömeg-meghatározás céljából szárítószekrényben kiszárítottuk (105°C, 24 óra). 24 óra elteltével újra mértük a kiszárított féllevél tömegét, majd újabb 24 óra elteltével a táplálékul kínált szintén kiszárított féllevél tömegét is. Az így kapott adatokból meghatározható a csipkézőbarkók által elfogyasztott lucernalevél száraz tömege. A kísérletet öt ismétlésben végeztük. Az eredményeket táplálkozásgátló hatás százalékban (I.P. = inhibition percentage) adtuk meg, amely a következőképpen számítandó mg-ban: {(kontroll féllevelek átlagfogyása – kezelt féllevelek átlagfogyása) / kontroll féllevelek átlagfogyása} x 100 (BENTLEY és mtsai, 1984).

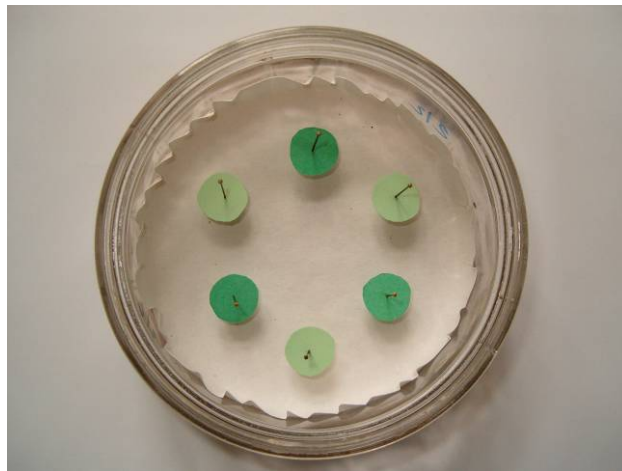
3.4.3. Kettős választású levélkorongos tesztek (II.)

Ezek a tesztek GOLS és munkatársai (1996) módszerén alapulnak. A tesztaréna felépítése és elrendezése (4. ábra) megegyezik a 3.4.1. fejezetben leírt I. típussal, azzal a lényeges különbséggel, hogy itt nem nyolc (négy kontroll és négy kezelt) levélkorong van egy arénában, hanem hat (három kontroll és három kezelt). Ezt a fajta kísérleti beállítást a metanolos növényi kivonatok tesztelése során alkalmaztuk burgonyabogár lárvákkal, imágókkal és gyapjaslepke hernyókkal. A levélkorongok átmérője burgonyabogár esetében 15 mm, míg gyapjaslepke esetében 17 mm volt. Egy tesztarénában mindig egy rovar táplálkozhatott 24 óráig, de a burgonyabogár lárvák esetében rövidebb, háromórás teszteket is beállítottunk. A háromórás, valamint a gyapjaslepkével végzett 24 órás tesztek során a kontroll korongokat ún. kontroll oldattal kezeltük (lásd 3.3.2.). A mind a három, mind a 24 órás kísérleteket 10 ismétlésben végeztük állandó és egyenletesen felülről érkező megvilágítás mellett klímakamrában, 23°C-on. A metanolos növényi kivonatok fagoinhibitor hatását 0,5 és 5% dózisban vizsgáltuk.

A kiértékelés során a levélkorongok felületét mértük videokamerával összekapcsolt számítógép segítségével a következő módon: Az általunk használt képelemző rendszer (ami az Agrárműszaki Tanszék tulajdona) a következő modulokból épült fel: SONY CCD monocrom videokamera Tevidon 1,4/25-ös objektívvel, Fidelity 200-as grabberkártya (kommunikáció a kamera és a program között), GLOBAL LAB Image képelemző szoftver. A képelemző berendezés alkalmas a minták alapján rögzített képjelöltek felismerésére, mintegy 40 jellemző tulajdonságuk (terület, kerület, hosszúság, szélesség, legkisebb-, legnagyobb rádiusz, fedettségi index stb.) meghatározására, a méretek kalibrálására, osztályozására. A képpontokkal elvégezhető matematikai és logikai műveletek, valamint a különböző konvolúciós és morfológiai (kiemelő és alaki) szűrők segítségével a bizonytalan határvonalú vagy összefolyt levéldarabkák elkülöníthetők, szétválaszthatók. A gyors, feldolgozás nélküli kiértékelést statisztikai adatsorok, hisztogramok támogatják. A levélkorong maradékok felületének mérését TAKÁCS ZSOLT tanszéki mérnökkel közösen végeztük a következő módon: a levélkorongok előkészítése megegyezik a 3.4.1. fejezetben a számítógépes felületmérés ismertetése során leírtakkal, azzal a különbséggel, hogy a lepréselt levélkorongokat nem lapolvasóval digitalizáltuk, hanem fénymásoló segítségével méretarányos (fekete-fehér) másolatot készítettünk róluk.

Tulajdonképpen a levélkorongok fénymásolt képének felületét mértük a képelemző berendezés segítségével. Erre azért volt szükség, mert a képelemző rendszer (Agrárműszaki Tanszék) és az Entomológiai Laboratórium (Növényvédelmi Állattani Tanszék), ahol a levélkorongos tesztekét végeztük, egymástól térben távol (kb. 2 km) vannak. Az optimális megoldás az lett volna, ha a levélkorong maradékok felületét közvetlenül a tesztek befejezésekor még a tesztarénában – ahogy ESCOUBAS és munkatársai (1993) javasolják – lemérhettük volna, ami végeredményben ennek a felületmérési eljárásnak a legnagyobb előnye a másik hárommal szemben, hiszen ezáltal a mérés egyszerűbb, gyorsabb és pontosabb (nincs például préselés közbeni zsugorodás stb.).

Az eredményeket táplálkozásgátló hatás százalékban (A.I. = antifeedant index) adtuk meg, amely a következőképpen számítandó mm^2 -ben: $\{(\text{kontroll korongok átlagfogyása} - \text{kezelt korongok átlagfogyása}) / (\text{kontroll korongok átlagfogyása} + \text{kezelt korongok átlagfogyása})\} \times 100$ (SIMMONDS és mtsai, 1989).



4. ábra. Kettős választású levélkorongos teszt. Kezelt és kezeletlen különböző színekkel jelölve.

3.4.4. Választás nélküli levélkorongos teszt (II.)

Ez a teszt MESSCHENDORP és munkatársai (2000) által kifejlesztett módszeren alapul. Ilyen kísérleti beállítást alkalmaztunk a metanolos kivonatok tesztelése során burgonyabogár lárvákkal. A tesztaréna felépítése és a kísérlet kivitelezése megegyezik a kettős választású tesztnél (II. típus) leírtakkal. A fő különbség az, hogy egy arénában egy lárva egyetlen levélkorongból (kezelt vagy kezeletlen, 21 mm átmérőjű) táplálkozhatott három órán keresztül (5. ábra). Kezelésként 10 ismétlés volt (a kontroll esetében 20) és a növényi kivonatok hatását csak a magasabb (5%) dózisban vizsgáltuk. A kiértékelés ugyanazzal a felületmérési módszerrel történt, mint a kettős választású tesztben (II. típus). Az eredményeket az I. típusú választás nélküli tesztnél leírt táplálózásgátló hatás százalékban (I.P. = inhibition percentage) adtuk meg (BENTLEY és mtsai, 1984). A burgonyabogár lárvákkal végzett háromórás, kettős választású teszt eredményeinek (elfogyasztott levélfelület mm²-ben) ismeretében szuppressziós indexet (suppression index = S.I.) is számoltunk a következő módon: $\{(C-T^*)/C\} \times 100$, ahol T* a kettős választású arénában történt összfogyasztást (kezelt + kontroll) jelenti, míg C a választás nélküli teszt során a kontroll levélkorongokból történt fogyasztások átlagával egyenlő (RAFFA és FRAZIER, 1988).



5. ábra. Választás nélküli levélkorongos teszt. Kezelt és kezeletlen különböző színekkel jelölve.

3.4.5. A magatartás megfigyelése

A különböző (metanolos) növényi kivonatok burgonyabogár lárvák magatartására gyakorolt hatásának vizsgálata céljából 3-5-10 perces időközönként megfigyeltük a lárvák viselkedését a választás nélküli tesztek (II. típus) során. A háromórás tesztek alatt egyszerre 20 lárva (egy kontroll és egy kezelt sorozat) tudtunk megfigyelni. Az első 45 perc során hárompercenként, a 45. és 90. perc között ötpercenként, míg a 90. és 180. perc között 10 percenként figyeltük a lárvákat. Három magatartásformát különböztettünk meg: evés, pihenés, keresés. Keresésnek vettük mind a levélkorongon, mind a szűrőpapíron történő mozgást. A háromórás megfigyelést felbontottuk három időintervallumra (0-15 perc, 16-90 perc és 91-180 perc), azért hogy a lárvák viselkedésében bekövetkező változásokat könnyebben nyomon tudjuk követni, és később ábrázolni.

3.5. Statisztikai értékelés

A kettős választású teszteknel (I.) a kontroll és a kezelt levélkorongokból elfogyasztott felületek közötti különbséget páros t-próbával vizsgáltuk SZENTESI és JERMY (1999) ajánlása alapján. A választás nélküli teszt (I.) eredményeinek értékelésekor kétmintás t-próbát használtunk a kontroll és a kezelt közötti szignifikáns különbség kimutatásához (PRÉCSÉNYI, 1995). Mindkét típusú teszt esetében (kivétel a vizes kivonatokkal végzettek) a kezelések közötti különbségek kimutatásához ANOVA-t és többszörös összehasonlítást (multiple comparison) választottunk (KRISHNAKUMARI és mtsai, 2001).

A metanolos kivonatokkal végzett kettős választású teszteknel (II.) a kontroll és a kezelt levélkorongokból elfogyasztott felületek közötti különbséget Wilcoxon páros előjelteszttel vizsgáltuk, míg a kezelések közötti különbségek kimutatásához Kruskal-Wallis tesztet és többszörös összehasonlítást használtunk (CONOVER, 1971; GOLS és mtsai, 1996). A metanolos kivonatokkal végzett választás nélküli teszt (II.) és a viselkedéselemzés eredményeinek értékelésekor Mann-Whitney tesztet használtunk a kontroll és a kezelt közötti szignifikáns különbség kimutatásához (MESSCHENDORP és mtsai, 2000). A statisztikai elemzéseket SPSS 9.0 for Windows szoftverrel végeztük.

3.6. Laboratóriumi etetési vizsgálatok SGTCI-t kifejező transzgénikus burgonyával

A sivatagi sáskából (*Schistocerca gregaria* FORSKAL) származó SGTCI és a transzgénikus burgonyanövények előállításában az ELTE Biokémia Tanszékének munkatársai (SZENTHE BORBÁLA, GRÁF LÁSZLÓ), valamint a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont munkatársai (KONDRÁK MIHÁLY, ASBÓTH BENCE ÉS BÁNFALVI ZSÓFIA) vettek részt. (A klónozásról és az egyéb felhasznált biotechnológiai módszerekről részletesen beszámol SZENTHE és munkatársai /2004/, valamint KONDRÁK és munkatársai /2005/ a megfelelő publikációkban.)

A hét, sikeresen előállított transzgénikus vonalból azt a hármat választottuk ki az etetési vizsgálatokhoz, melyek a legnagyobb mennyiségben termelték az SGTCI-t (6. ábra).



6. ábra. SGTCI peptidet kifejező transzgénikus burgonyanövények.

Keszthely környéki burgonyatáblákról burgonyabogár imágókat gyűjtöttünk, melyeket a tanszék üvegházában neveltünk tovább. A vizsgálatsorozat során kísérleteként mindig egy nőstény által lerakott petecsomóból nevelt fiatal L₃-as, illetve egy esetben L₂-es stádiumú lárvákat használtunk. Az etetési kísérleteket SÁRINGER (1967) módszerére alapozva állítottuk be a Veszprémi Egyetem, Georgikon Mezőgazdaságtudományi Kar, Növényvédelmi Állattani Tanszékének Entomológiai Laboratóriumában 2003 nyarán. A lárvákat bábozódásukig neveltük ún. higrosztátokban (7. ábra). A higrosztát alapja egy kb. 12 cm átmérőjű üveg vajtartó, melyet félig megtöltöttünk vízzel. A vajtartó nyílását pamut szövetdarabbal fedtük, amit egy vastag gumigyűrű segítségével rögzítettünk. A szövetdarab felületére naponta tiszta szűrőpapír korongot helyeztünk, és az egészet egy megfelelő méretű Petri-csészével fedtük. A lárvák a papírkorong és a ráborított Petri-csésze közötti magas páratartalmú térben éltek (egy

higrosztátban egy lárva). A lárva tápláléka naponta egy friss féllevél volt, melynek a tömegét analitikai mérlegen lemértük. A levél másik felének (a levelek félbevágása során a főeret minden esetben eltávolítottuk) is mértük a nedves tömegét, azután 105°C-os szárítószekrénybe helyeztük. 24 óra elteltével újra megmértük a kiszáritott féllevelek, valamint újabb 24 óra elteltével a lárva által meghagyott szintén kiszáritott féllevél maradékok tömegét. A levelek mérésével egy időben végeztük a lárva tömegének meghatározását is. Ezzel a módszerrel nagy pontossággal nyomon tudtuk követni a lárva napi tömeggyarapodása mellett az általuk elfogyasztott táplálék mennyiségének változását is. A „kezelt” lárva SGTCI peptidet kifejező transzgénikus burgonyalevelekkel etettük, míg a „kontroll” lárva olyan, szintén Gödöllőn készült kontroll növényekkel, melyek ugyanazon a mesterséges előállítási folyamaton mentek keresztül, mint GMO társaik. A kísérleteket mindig 10 ismétlésben állítottuk be 23°C-os klímakamrában hosszúnappal (20:4; L:D). A kezelt és kontroll lárva tömegek közötti különbséget független minták t-próbájával vizsgáltuk az SPSS 9.0 szoftver segítségével.



7. ábra. Higrosztátok

4. EREDMÉNYEK

4.1. Vizes kivonatokkal végzett levélkorongos kísérletek eredményei

A friss növényekből készített vizes kivonatok táplálkozásgátló hatásának megállapítása céljából elvégzett levélkorongos kísérleteket a Növényvédelmi Állattani Tanszék Entomológiai Laboratóriumában állítottuk be 2002 nyarán, őszén.

4.1.1. Kísérletek burgonyabogár imágókkal

A burgonyabogár imágókkal végzett 24 órás, kettős választású teszt eredményeit az 1. táblázatban foglaltuk össze. A vizsgált öt különböző növényfaj vizes kivonatai közül nagyon erős táplálkozásgátló hatásúnak (A.F.>90%) bizonyult a *Hedera helix*-ből és az *Achillea millefolium*-ból készült kivonat. A *Tilia cordata* kivonat hatása közepes, de meggyőző (erős szignifikáns különbség a kezelt és a kontroll fogyasztások között), míg a *Capsella bursa-pastoris* vizes kivonatának fagoinhibitor hatása gyenge. A *Plantago major* kivonat nem gátolta (A.F.<50%) a burgonyabogár imágók táplálkozását.

1. táblázat. Burgonyabogár (*L. decemlineata*) imágókkal végzett kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei vizes kivonatokkal

Kezelés	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		A.F.(%) ^b
	Kontroll	Kezelt	
<i>Plantago major</i>	89,7±22,6	59,0±26,0	35
<i>Capsella bursa-p.</i>	252,5±191,9	104,8±101,2	58*
<i>Tilia cordata</i>	179,8±82,4	51,3±54,9	71***
<i>Hedera helix</i>	408,3±84,2	2,5±5,0	99***
<i>Achillea millef.</i>	354,5±56,5	0,0±0,0	100***

^a 4 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=4

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant activity): (1-Kezelt/Kontroll)x100

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, * p=0,1; *** p=0,01; páros t-teszt

4.1.2. Kísérletek repcedarázs álhernyókkal

A 2. táblázat tartalmazza a repcedarázs álhernyókkal végzett 24 órás, kettős választású levélkorongos tesztek eredményeit. A három tesztelt vizes kivonat közül a *Capsella bursa-pastoris* és az *Achillea millefolium* kivonatok nem gátolták a repcedarázs álhernyók táplálkozását, viszont a *Hedera helix* kivonat kimagaslóan erős hatású volt.

2. táblázat. Repecedarázs (*A. rosae*) álhernyókkal végzett kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei vizes kivonatokkal

Kezelés	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		
	Kontroll	Kezelt	A.F.(%) ^b
<i>Capsella bursa-p.</i>	252,5±112,3	352,4±181,2	-40
<i>Achillea millef.</i>	313,8±249,3	265,0±214,2	15
<i>Hedera helix</i>	624,3±109,9	0,0±0,0	100***

^a 4 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=4

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant activity): (1-Kezelt/Kontroll)x100

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, *** p=0,01; páros t-teszt

4.1.3. Kísérletek csipkézőbarkó imágókkal

A csipkézőbarkó imágókkal (*Sitona humeralis* STEPHENS, *S. sulcifrons* THUNBERG, *S. hispidula* FABRICIUS) végzett 24 órás, kettős választású kísérlet eredményeit a 3. táblázatban tüntettük fel. A vizsgált két vizes kivonat (*Brassica napus* és *Tilia cordata*) táplálkozásgátló hatása erősnek mondható (90%-hoz közeli A.F. értékek), de az *Ajuga chamaepitys* (hígítás nélküli) metanolos kivonatának hatása még erősebbnek bizonyult. Az *Ajuga* kivonat oldószereként használt metanol hatása elhanyagolható.

3. táblázat. Csipkézőbarkó (*Sitona* spp.) imágókkal végzett kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei vizes kivonatokkal

Kezelés	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		
	Kontroll	Kezelt	A.F.(%) ^b
<i>Brassica napus</i>	10,8±2,1	1,6±2,7	86**
<i>Tilia cordata</i>	8,6±4,7	0,5±0,2	94**
metanol ^c	7,4±2,9	5,4±3,3	27
<i>Ajuga cham.</i> ^c	10,6±3,8	0,0±0,0	100**

^a 4 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=4

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant activity): (1-Kezelt/Kontroll)x100

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, ** p=0,05; páros t-teszt

^c Az *Ajuga chamaepitys* kivonat nem vizes, hanem metanolos, dózisa: 100%

4.2. Az *Ajuga chamaepitys* és *Azadirachta indica* kivonatok táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása céljából elvégzett kísérletsorozat eredményei

A kísérleteket a Növényvédelmi Állattani Tanszék Entomológiai Laboratóriumában állítottuk be 2003 nyarán, őszén. Az *Ajuga chamaepitys*-ből készült metanolos kivonat (lásd 3.3.2. fejezet) és a formált növényvédő szerként forgalmazott *Azadirachta indica* kivonat (NeemAzal T/S, lásd 3.3.3. fejezet) táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása céljából elvégzett kísérletsorozat metodikája (a kiértékelés kivételével) megegyezik a vizes kivonatok tesztelése során alkalmazott módszerrel.

4.2.1. Kísérletek burgonyabogár imágókkal

A burgonyabogár imágókkal végzett kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményeit a 4. táblázat tartalmazza. Mindkét táplálkozásgátló anyag kisebb dózisa (0,5%) közel 60%-os (A.F.) hatást ért el, míg a nagyobb dózisban (5%) mindkét anyag 90% feletti értéket produkált. Burgonyabogár imágók esetén az *Ajuga* kivonat hatékonysága megegyezett a NeemAzal készítmény hatékonyságával mindkét dózisban.

4. táblázat. Burgonyabogár (*L. decemlineata*) imágókkal végzett kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei

Kezelés	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		
	Kontroll	Kezelt	A.F. (%) ^b
NeemAzal (0,5%)	215,3±203,8	90,1±104,3	58,2**a
<i>Ajuga cham.</i> (0,5%)	325,3±205,2	135,0±103,7	58,5**a
NeemAzal (5%)	432,6±175,2	33,5±74,0	92,3****b
<i>Ajuga cham.</i> (5%)	455,4±122,6	27,9±58,3	93,9****b

^a 4 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=10

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant activity): (1-Kezelt/Kontroll)×100

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, ** p=0,05; **** p=0,001; páros t-teszt

Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól α=0,05 szinten, ANOVA és többszörös összehasonlítás

4.2.2. Kísérletek repcedarázs álhernyókkal

A repcedarázs álhernyókkal végzett kettős választású levélkorongos tesztek eredményeit a 5. táblázatban tüntettük fel. A kisebbik dózisban egyik fagoinhibitor hatású anyag sem ért el számottevő eredményt (A.F.<50%). A nagyobb dózisban a NeemAzal táplálkozást gátló hatása elérte a 60%-ot, de az *Ajuga* kivonat nem gátolta a repcedarázs álhernyók táplálkozását.

5. táblázat. Repcedarázs (*A. rosae*) álhernyókkal végzett kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei

Kezelés	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		
	Kontroll	Kezelt	A.F. (%) ^b
NeemAzal (0,5%)	255,0±95,0	211,5±81,6	17,1*a
<i>Ajuga cham.</i> (0,5%)	270,4±67,5	249,9±102,2	7,6 a
NeemAzal (5%)	271,5±57,0	98,9±87,8	63,6****b
<i>Ajuga cham.</i> (5%)	285,5±80,9	267,2±100,4	6,4*a

^a 4 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=10

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant activity): (1-Kezelt/Kontroll)x100

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, * p=0,1; **** p=0,001; páros t-teszt

Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól α=0,05 szinten, ANOVA és többszörös összehasonlítás

4.2.3. Kísérletek káposztalepke hernyókkal

A 6. táblázatban a káposztalepke hernyókkal végzett kettős választású tesztek eredményei láthatók. A kisebbik dózisban 50% alatt maradt mindkét anyag táplálkozást gátló hatása, viszont a magasabb dózisban kitűnő eredmények (A.F.>99%) születtek. Az *Ajuga* kivonat hasonló erősséggel gátolta a káposztalepke hernyók táplálkozását, mint a neem kivonat.

6. táblázat. Káposztalepke (*P. brassicae*) hernyókkal végzett kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei

Kezelés	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		
	Kontroll	Kezelt	A.F. (%) ^b
NeemAzal (0,5%)	537,5±125,0	355,0±230,0	34,0*a
<i>Ajuga cham.</i> (0,5%)	556,8±44,0	407,8±155,5	26,8 a
NeemAzal (5%)	597,5±5,0	3,8±7,5	99,4****b
<i>Ajuga cham.</i> (5%)	574,5±11,3	0,0±0,0	100****b

^a 4 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=4

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant activity): (1-Kezelt/Kontroll)x100

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, * p=0,1; **** p=0,001; páros t-teszt

Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól α=0,05 szinten, ANOVA és többszörös összehasonlítás

4.2.4. Kísérletek lucerna-csipkézőbarkó imágókkal

A lucerna-csipkézőbarkó imágókkal végzett választás nélküli teszt eredményeit a 7. táblázat mutatja be. Alacsony dózisban mindkét anyag negatív eredményt (I.P.) produkált (több fogyott a kezeltből, mint a kontrollból). Nagyobb koncentrációban viszont mindkét kivonat hatása 90% feletti volt. Az *Ajuga chamaepitys* kivonat 5%-os dózisban képes olyan erősséggel gátolni a csipkézőbarkók táplálkozását, mint a NeemAzal T/S készítmény.

7. táblázat. Lucerna-csipkézőbarkó (*S. humeralis*) imágókkal végzett választás nélküli táplálkozásgátlási kísérlet eredményei

Kezelés	Elfogyasztott levéltömeg (mg) ^a		
	Kontroll	Kezelt	I.P. (%) ^b
NeemAzal (0,5%)	0,37±0,29	0,95±0,35	-156,7**a
<i>Ajuga cham.</i> (0,5%)	0,37±0,29	0,67±0,33	-81,0 a
NeemAzal (5%)	0,33±0,20	0,01±0,01	96,9**b
<i>Ajuga cham.</i> (5%)	0,33±0,20	0,02±0,04	93,9**b

^a száraz levéltömegek átlagai ± szórás, n=5

^b Táplálkozásgátló hatás (inhibition percentage): {(Kontroll-Kezelt)/Kontroll}x100
Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, ** p=0,05; kétmintás t-teszt
Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól α=0,05 szinten, ANOVA és többszörös összehasonlítás

4.3. Metanolos kivonatokkal végzett kísérletek eredményei

A metanolos növényi kivonatokkal végzett táplálkozásgátlási kísérleteket a Növényvédelmi Állattani Tanszék Entomológiai Laboratóriumában állítottuk be 2004 és 2005 nyarán.

4.3.1. Kísérletek burgonyabogár lárvákkal

4.3.1.1. Kettős választású tesztek

0,5%-os dózisban egyik növényi kivonat sem gátolta szignifikánsan (p=0,05) a burgonyabogár lárvák táplálkozását sem a háromórás, sem a 24 órás teszt során.

Az 5%-os koncentrációjú növényi kivonatokkal végzett háromórás teszt eredményeit a 8. táblázat foglalja össze. A táblázatban feltüntettük a három kontroll és a három kezelt levélkorongból elfogyasztott levélfelületek átlagértékeit (egy tesztarénán belül a három kontroll és a három kezelt levélkorongból elfogyasztott felületeket összeadtuk és a 10 ismétlés összfelületeit átlagoltuk), a táplálkozásgátló hatás százalékos értékét (antifeedant index) és a

Kruskal-Wallis teszt eredményét. Azon növényi kivonatok közül, amelyek esetében a lárvák a kezelt levélkorongokból szignifikánsan kevesebbet fogyasztottak a kontrollhoz képest, négy (*T. vulgare*: 54,9%, *A. millefolium*: 70,2%, *M. inodora*: 71,4% és *A. chamaepitys*: 100%) ért el 50%-nál (A.I.%) nagyobb hatást. (50%-nál alacsonyabb A.I. értékek esetében a táplálkozásgátló hatás elhanyagolható). Ismét megjegyezzük, hogy az *Ajuga chamaepitys* kivonatot standard kontrollként alkalmaztuk az összes teszt során.

8. táblázat. Burgonyabogár (*L. decemlineata*) lárvákkal végzett háromórás, kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei metanolos növényi kivonatokkal

Kezelés	Dózis	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a			Krus. ^c
		Kontroll	Kezelt	A.I. % ^b	
<i>Abutilon theophrasti</i>	5 %	17,1±41,0	20,2±43,1	-8,3	a
<i>Hedera helix</i>	5 %	55,6±59,2	43,5±58,9	12,2	a
<i>Citrus limon</i>	5 %	60,9±52,9	38,6±52,1	22,4	a
<i>Tilia cordata</i>	5 %	89,6±56,5	44,0±61,3	34,1	a
<i>Matricaria chamom.</i>	5 %	11,6±17,3	5,7±18,0	34,1	a
<i>Amorpha fruticosa</i>	5 %	41,2±47,7	18,6±22,0	37,8	a
<i>Capsella bursa-past.</i>	5 %	35,3±57,1	15,9±30,9	37,9	a
<i>Ginkgo biloba</i>	5 %	30,0±53,5	8,8±15,7	54,6	a
<i>Tanacetum vulgare</i>	5 %	24,7±40,9	7,2±18,7	54,9*	a
<i>Achillea millefolium</i>	5 %	74,9±58,2	13,1±31,6	70,2**	a
<i>Matricaria inodora</i>	5 %	15,1±23,6	0,5±1,6	71,4*	a
<i>Ajuga chamaepitys</i>	5 %	4,0±9,2	0,0±0,0	100,0*	a

^a 3 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=10

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant index): $\{(Kontroll-Kezelt)/(Kontroll+Kezelt)\} \times 100$

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, * p=0,1; ** p=0,05; Wilcoxon páros előjelteszt

^c Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól $\alpha=0,05$ szinten, Kruskal-Wallis teszt és többszörös összehasonlítás

A 9. táblázat tartalmazza (a 8. táblázathoz hasonló formában) az 5%-os dózisban végzett 24 órás teszt eredményeit. Négy növényi kivonat A.I. értéke lépte át az 50%-os határt (*A. fruticosa*: 56,6%, *A. theophrasti*: 61,3%, *A. chamaepitys*: 71,8% és *M. inodora*: 85,4%), erősen szignifikáns (p=0,05 és p=0,01) különbséggel a kontroll és kezelt fogyasztások között.

9. táblázat. Burgonyabogár (*L. decemlineata*) lárvákkal végzett 24 órás, kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei metanolos növényi kivonatokkal

Kezelés	Dózis	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		A.I. % ^b	Krus. ^c
		Kontroll	Kezelt		
<i>Citrus limon</i>	5 %	104,4±114,6	149,5±149,5	-17,8	a
<i>Achillea millefolium</i>	5 %	108,4±91,9	130,5±110,0	-9,3	a
<i>Hedera helix</i>	5 %	165,5±80,0	179,7±119,5	-4,1	a
<i>Tanacetum vulgare</i>	5 %	111,9±115,4	118,0±100,0	-2,7	a
<i>Ginkgo biloba</i>	5 %	169,5±134,1	139,0±78,3	9,9	ab
<i>Capsella bursa-past.</i>	5 %	128,6±104,8	132,9±127,3	-1,6	abc
<i>Matricaria chamom.</i>	5 %	71,9±107,5	31,2±47,9	39,5	abc
<i>Tilia cordata</i>	5 %	91,1±81,9	32,5±46,7	47,4**	abc
<i>Amorpha fruticosa</i>	5 %	68,6±80,0	19,0±46,8	56,6**	abc
<i>Abutilon theophrasti</i>	5 %	115,4±79,9	27,7±50,9	61,3***	bc
<i>Ajuga chamaepitys</i>	5 %	142,7±23,4	23,4±67,8	71,8***	bc
<i>Matricaria inodora</i>	5 %	239,0±122,3	18,8±40,4	85,4***	c

^a 3 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=10

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant index): $\{(Kontroll-Kezelt)/(Kontroll+Kezelt)\} \times 100$

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, ** p=0,05; *** p=0,01; Wilcoxon páros előjelteszt

^c Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól $\alpha=0,05$ szinten, Kruskal-Wallis teszt és többszörös összehasonlítás

4.3.1.2. Választás nélküli teszt

Az 5%-os koncentrációjú kivonatokkal végzett háromórás, választás nélküli bioteszt eredményeit a 10. táblázat mutatja be. A táblázatban feltüntettük a különböző kezelésekhez tartozó elfogyasztott levélfelületek átlagos értékeit, a táplálkozásgátló hatást százalékosan kifejező I.P. értékeket, valamint a szuppressziós index (S.I.) számított értékeit. A kezeletlen kontroll levélkorongok semmivel nem voltak kezelve, míg a kezelt kontroll korongokat kontroll oldattal (5% metanol és 2% Tween) kezeltük. A kettőből történt fogyasztásokat összehasonlítva látható, hogy a kontroll oldat nem gátolja a burgonyabogár lárvák táplálkozását. Négy növényi kivonat I.P. értéke haladta meg az 50%-ot (*A. fruticosa*: 65,9%, *A. millefolium*: 71,2%, *A. chamaepitys*: 74,6% és *M. inodora*: 96,4%) és ezek mindegyikénél a statisztika szignifikáns különbséget (p=0,05 és p=0,01) jelzett a kontroll fogyáshoz képest. (Az S.I. értékeket a következtetések részben tárgyaljuk).

10. táblázat. Burgonyabogár (*L. decemlineata*) lárvákkal végzett háromórás, választás nélküli táplálkozásgátlási kísérlet eredményei metanolos növényi kivonatokkal.

Kezelés	Dózis	Fogyás (mm ²) ^a	I.P. % ^b	S.I. % ^c
Kezeletlen kontroll	-	105,1±74,9	-	-
Kezelt kontroll	5 %	106,9±65,4	-	-
<i>Citrus limon</i>	5 %	175,5±43,9	-64,2	6,9
<i>Tilia cordata</i>	5 %	130,8±64,0	-22,4	-24,9
<i>Capsella bursa-past.</i>	5 %	122,0±88,4	-14,1	52,1
<i>Hedera helix</i>	5 %	104,9±63,1	1,9	7,2
<i>Ginkgo biloba</i>	5 %	88,5±76,5	17,2	63,7
<i>Tanacetum vulgare</i>	5 %	67,1±71,1	37,2	70,2
<i>Abutilon theophrasti</i>	5 %	61,6±59,4	42,4	65,1
<i>Matricaria chamom.</i>	5 %	55,2±77,4	48,4*	83,8
<i>Amorpha fruticosa</i>	5 %	36,5±39,2	65,9***	44,1
<i>Achillea millefolium</i>	5 %	30,8±62,6	71,2**	17,7
<i>Ajuga chamaepitys</i>	5 %	27,1±64,9	74,6***	96,3
<i>Matricaria inodora</i>	5 %	3,9±6,3	96,4***	85,4

^a elfogyasztott levélfelületek átlagai ± szórás, n=10, kivéve kezelt kontroll, ahol n=20

^b Táplálkozásgátló hatás (inhibition percentage): {(Kezelt kontroll fogyás-Kezelt fogyás)/Kezelt kontroll fogyás}x100

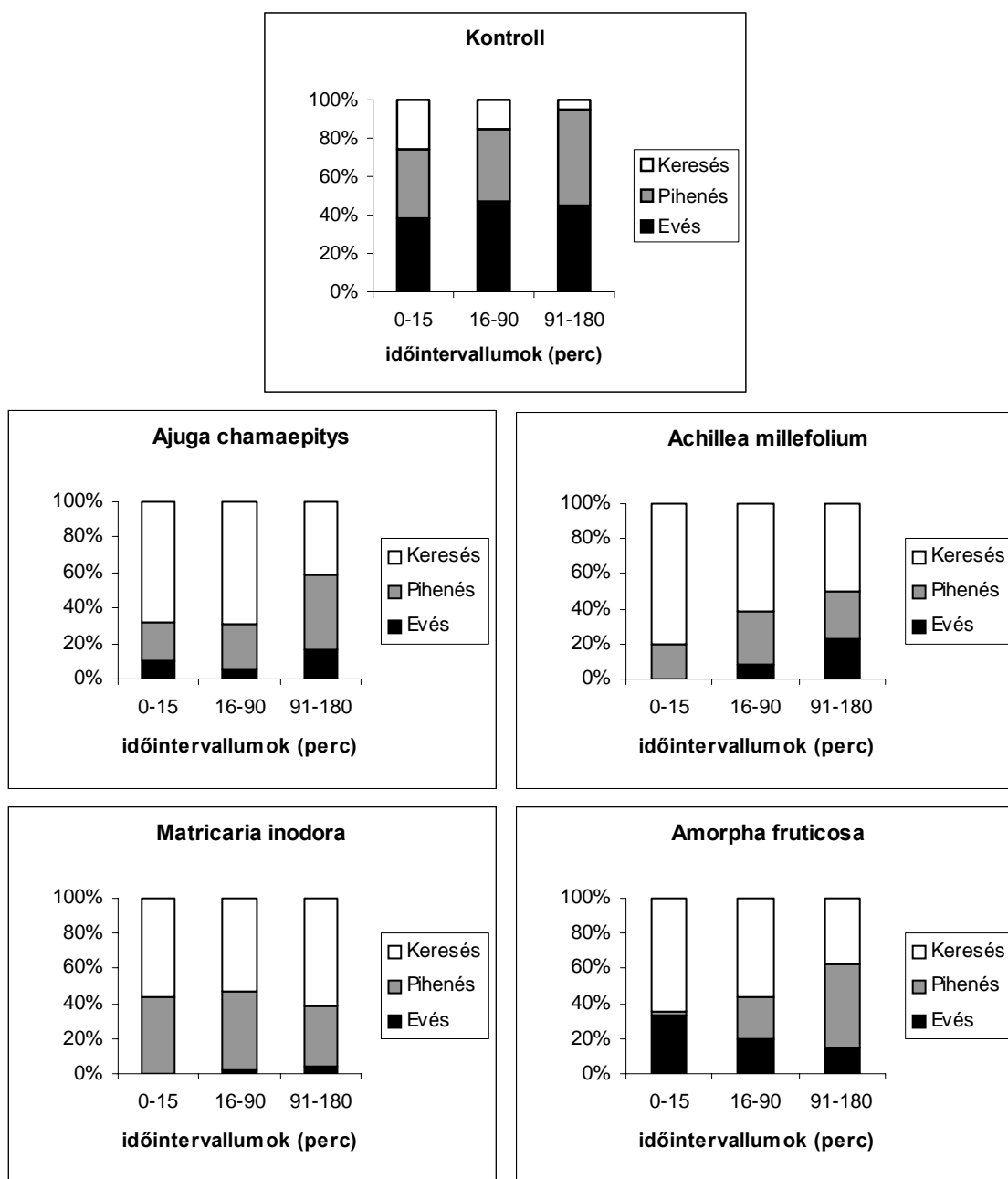
Szignifikáns különbség kezelt kontroll és kezelt között, * p=0,1; ** p=0,05; *** p=0,01; Mann-Whitney teszt

^c Szuppressziós index: {(Kezelt kontroll fogyás-Kontroll és kezelt fogások összege a kettős választás során)/Kezelt kontroll fogyás}x100

A három kísérlet eredményei (8-10. táblázat) alapján kijelenthetjük, hogy a vizsgált növényi kivonatok közül a *Matricaria inodora*-ból készített kivonat fagoinhibitor hatása volt a legerősebb. Hatása még a *Ajuga chamaepitys*-ét is felülmúlta a 24 órás kettős választású és a választás nélküli tesztek során. Az *Achillea millefolium* kivonat táplálkozásgátló hatása is számottevő (kivéve a 24 órás, kettős választású tesztet), míg az *Amorpha fruticosa* hatása közepes (kivéve a háromórás, kettős választású tesztet). Az *Abutilon theophrasti* és a *Tanacetum vulgare* kivonatok eredményei nem meggyőzőek, mivel csak egyetlen teszt során mutattak jelentősebb deterrens hatást. Lárvamortalitást nem tapasztaltunk a biotesztek alatt, sem után.

4.3.1.3. A magatartás megfigyelése

A háromórás, választás nélküli teszt során lehetőségünk volt a lárvák viselkedését is megfigyelni (8. ábra). A választás nélküli tesztben 50%-nál (I.P.%) jobb eredményt elérő négy kivonat (*A. chamaepitys*, *A. millefolium*, *M. inodora* és *A. fruticosa*) és a kontroll eredményei láthatók az oszlopdiaagrammokon, amelyek az evésre, pihenésre és keresésre fordított idő százalékos arányait reprezentálják. A diagrammokat összehasonlítva látható, hogy a kontroll korongokat fogyasztó lárvák viselkedésmintázata eltér a kezelt korongokat fogyasztó lárvákétól. A kontroll levélkoronggal kínált burgonyabogár lárvák a három óra alatt idejük nagy részét evéssel és pihenéssel töltötték és csak nagyon kevés ideig keresgéltek. Az evésre fordított idő aránya egyik időintervallumban sem volt 40% alatt. Ezzel szemben a *M. inodora* kivonattal kezelt levélkorongból a lárvák nagyon keveset fogyasztottak (átlagosan 3,9 mm²) a három óra alatt (amit értelmezhetünk úgy, hogy hozzászokás nem történt), és már a teszt elején megmutatkozott a kivonat deterrens hatása (az első időintervallumban egyáltalán nem történt táplálkozás annak ellenére, hogy lárvák az arénában többször megtalálták a levélkorongot). Az *A. fruticosa* kivonattal kezelt levélkorongok esetében is sok időt töltöttek a lárvák keresgéssel az első negyedórában, viszont az evésre fordított idő nagysága majdnem eléri a kontroll lárváknál tapasztalt 40%-ot. Jól látható továbbá, hogy az evés és a keresés aránya csökkenő tendenciát mutat az idő múlásával. Ennek ellenkezője figyelhető meg az *A. chamaepitys* és az *A. millefolium* kezeléseknél, ahol az evésre fordított idő aránya nő a teszt előrehaladtával, ami habituációra utaló jel lehet. Az utóbbi két kivonat esetében töltötték a leghosszabb időt kereséssel a lárvák az első 90 percben.



8. ábra. Kontroll oldattal, valamint négy növényfajból (*Ajuga chamaepitys*, *Achillea millefolium*, *Matricaria inodora*, *Amorpha fruticosa*) készült 5%-os metanolos kivonatokkal kezelt levélkoronggal kínált burgonyabogár lárvák viselkedése a háromórás, választás nélküli táplálkozásgátlási kísérlet során. A kontrollhoz viszonyítva nincs szignifikáns különbség, Mann-Whitney teszt, $p=0,05$

4.3.2. Kísérletek burgonyabogár imágókkal

A burgonyabogár imágókkal végzett kettős választású, 24 órás teszt eredményeit a 11. táblázat (a 8. táblázattal megegyező formában) foglalja össze. Az 5%-os dózisban alkalmazott 12 kivonat közül mindössze kettő ért el említésre méltó eredményt (A.I.>50%). A burgonyabogár imágók táplálkozását leghatásosabban az *A. fruticosa* (72,5%) kivonat gátolta, míg az *A. chamaepitys* (67,2%) csak a második legaktívabb fagoihinhibitornak bizonyult.

11. táblázat. Burgonyabogár (*L. decemlineata*) imágókkal végzett 24 órás, kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei metanolos növényi kivonatokkal

Kezelés	Dózis	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a			A.I. % ^b	Krus. ^c
		Kontroll	Kezelt			
<i>Ginkgo biloba</i>	5 %	305,9±85,2	310,8±54,2	-0,8	a	
<i>Capsella bursa-past.</i>	5 %	382,1±11,1	384,0±9,3	-0,2	a	
<i>Hedera helix</i>	5 %	313,2±97,4	297,2±108,8	2,6	a	
<i>Abutilon theophrasti</i>	5 %	228,9±159,2	212,9±147,3	3,6	a	
<i>Tilia cordata</i>	5 %	174,9±160,5	161,5±157,6	4,0	a	
<i>Citrus limon</i>	5 %	297,2±135,5	263,7±135,9	6,0	a	
<i>Achillea millefolium</i>	5 %	308,5±143,9	247,1±180,9	11,1	ab	
<i>Matricaria chamom.</i>	5 %	218,5±159,1	161,9±142,6	14,9*	abc	
<i>Matricaria inodora</i>	5 %	191,2±171,3	130,7±174,8	18,8*	abcd	
<i>Tanacetum vulgare</i>	5 %	235,6±147,2	81,0±143,1	48,8**	bcd	
<i>Ajuga chamaepitys</i>	5 %	223,4±186,7	43,8±64,2	67,2**	cd	
<i>Amorpha fruticosa</i>	5 %	194,1±168,5	30,9±51,6	72,5**	d	

^a 3 levélkorong összfelületeinek ± átlagai szórás, n=10

^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant index): $\{(Kontroll-Kezelt)/(Kontroll+Kezelt)\} \times 100$

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, * p=0,1; ** p=0,05; Wilcoxon páros előjelteszt

^c Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól $\alpha=0,05$ szinten, Kruskal-Wallis teszt és többszörös összehasonlítás

4.3.3. Kísérletek gyapjaslepke hernyókkal

A gyapjaslepke hernyókkal végzett kettős választású, 24 órás teszt eredményei a 12. táblázatban láthatók. Nyolc, 5%-os koncentrációjú kivonat hatását vizsgáltuk, melyek közül a legerősebb deterrens hatással az *A. fruticosa* (71,8%) kivonat rendelkezett, de az *A. chamaepitys* (61,9%) hatása is számottevő volt.

12. táblázat. Gyapjaslepke (*Lymantria dispar*) hernyókkal végzett 24 órás, kettős választású táplálkozásgátlási kísérlet eredményei metanolos növényi kivonatokkal

Kezelés	Dózis	Elfogyasztott levélfelület (mm ²) ^a		A.I. % ^b	Krus. ^c
		Kontroll	Kezelt		
<i>Achillea millefolium</i>	5 %	213,8±154,1	275,7±194,6	-12,6	a
<i>Capsella bursa-past.</i>	5 %	263,3±243,1	250,2±200,2	2,6	ab
<i>Matricaria inodora</i>	5 %	185,1±205,1	161,1±147,8	6,9	abc
<i>Citrus limon</i>	5 %	216,0±256,4	164,4±225,6	13,6	abc
<i>Ginkgo biloba</i>	5 %	166,0±188,8	108,9±177,7	20,8**	abc
<i>Hedera helix</i>	5 %	203,0±202,9	93,1±155,1	37,1*	bc
<i>Amorpha fruticosa</i>	5 %	203,8±196,3	33,5±55,1	71,8**	bc
<i>Ajuga chamaepitys</i>	5 %	350,1±132,0	82,4±85,1	61,9***	c

^a 3 levélkorong összfelületeinek átlagai ± szórás, n=10

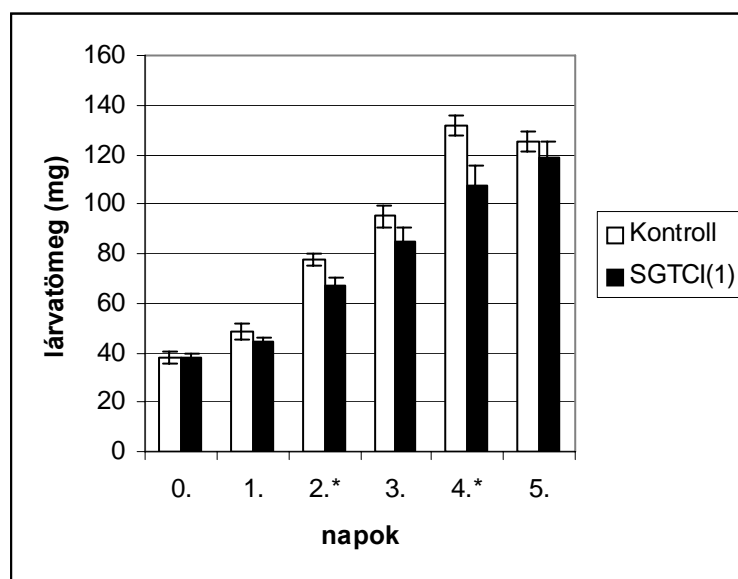
^b Táplálkozásgátló hatás (antifeedant index): $\{(Kontroll-Kezelt)/(Kontroll+Kezelt)\} \times 100$

Szignifikáns különbség kontroll és kezelt között, * p=0,1; ** p=0,05; *** p=0,01; Wilcoxon páros előjelteszt

^c Szignifikáns különbség a kezelések között, az azonos betűvel jelölt értékek nem különböznek egymástól $\alpha=0,05$ szinten, Kruskal-Wallis teszt és többszörös összehasonlítás

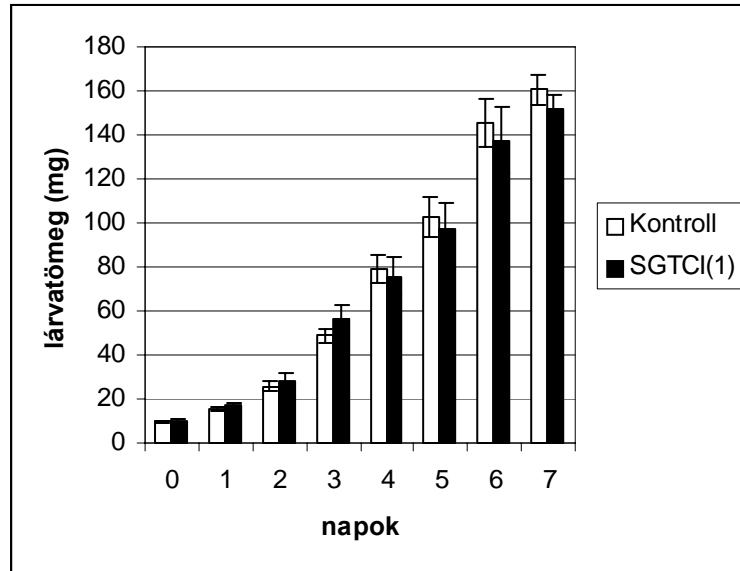
4.4. Az SGTCI peptidet kifejező transzgénikus burgonyanövényekkel végzett etetési vizsgálatok eredményei

A laboratóriumi etetési vizsgálat sorozatban ugyanaz a három transzgénikus vonal szerepelt, melyek a HPLC analízis során bizonyítottan a legnagyobb mennyiségben termelték az inhibitor peptidet. Az első kísérlet eredményeit a 9. ábra mutatja.



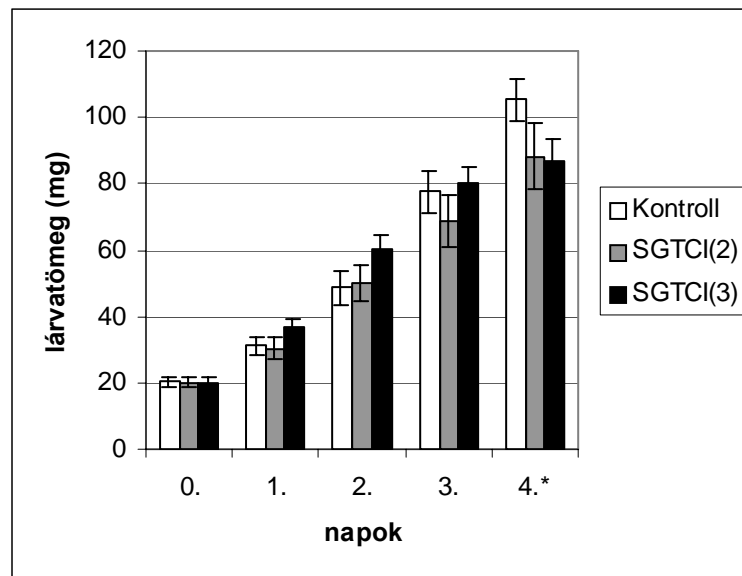
9. ábra. SGTCI-t kifejező transzgénikus (1. vonal) és kontroll burgonyanövények leveleivel etetett burgonyabogár lárvák testtömegeinek változása. Az oszlopok átlagértékeket (n=10) jelentenek, míg a hibasávok a standard hiba nagyságát mutatják. A napok számán szereplő csillagok szignifikáns különbséget jeleznek $p=0,05$ szinten.

A 9. ábrán bemutatott eredmények alapján azt mondhatjuk, hogy az SGTCI kismértékben gátolta a burgonyabogár lárvák táplálkozását. A kontroll burgonyalevelekkel etetett lárvák tömegeinek átlagértékei (az első oszlopok) magasabbak az SGTCI-t kifejező burgonyalevelekkel etetett lárvák tömegeinek átlagainál (a második oszlopok) a kísérlet első napjától a bebábozódásig (5. nap). A kontroll lárvák az ötödik napon bekövetkezett tömegvesztésének oka az, hogy a többség a negyedik napon elérte a bábozódáshoz szükséges tömeget, (de a higrosztátok nem engedték őket bábozódni), így az ötödik napon már nem táplálkoztak. A kontroll és az SGTCI-t fogyasztó lárvák második és negyedik napon mért tömegei közötti különbség szignifikáns ($p=0,05$). A kísérlet folyamán az SGTCI-t fogyasztó lárvák közül három elpusztult (az első a harmadik napon, a második a negyedik napon, míg a harmadik az utolsó napon).



10. ábra. SGTCI-t kifejező transzgénikus (1. vonal) és kontroll burgonyanövények leveleivel etetett burgonyabogár lárvák testtömegeinek változása. Az oszlopok átlagértékeket (n=10) jelentenek, míg a hibasávok a standard hiba nagyságát mutatják.

A második kísérletet (10. ábra) – ami az első kísérlet ismétlése – kisebb méretű (átlagosan 10 mg tömegű L_2 -es) lárvákkal kezdtük (a 0. nap jelenti a lárvák átlagos tömegét a kísérlet kezdetén). A negyedik naptól ebben a kísérletben is megfigyelhető, hogy az SGTCI-t fogyasztó lárvák tömege elmarad a kontroll lárvák tömegétől, habár a különbség egyik napon sem szignifikáns. A kísérlet folyamán mind a kontroll, mind az SGTCI-t fogyasztó lárvák közül három-három elpusztult.

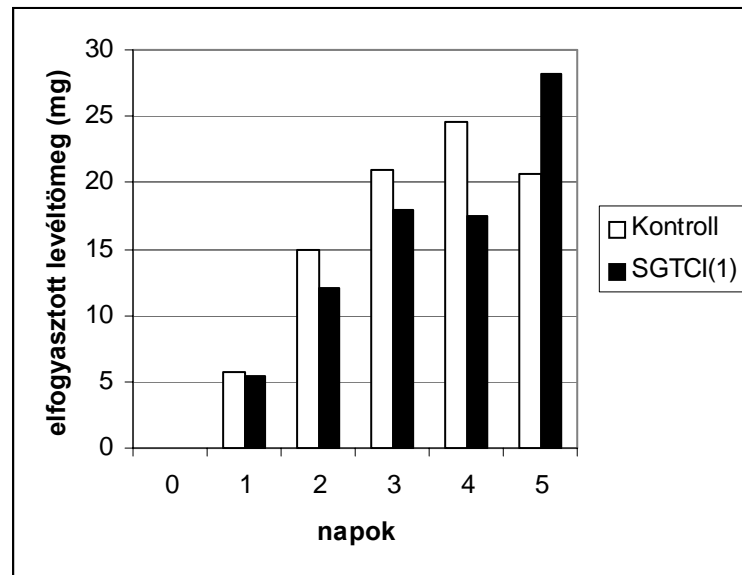


11. ábra. SGTCI-t kifejező transzgénikus (2. és 3. vonal) és kontroll burgonyanövények leveleivel etetett burgonyabogár lárvák testtömegeinek változása. Az oszlopok átlagértékeket (n=10) jelentenek, míg a hibasávok a standard hiba nagyságát mutatják. A csillag szignifikáns különbséget jelez $p=0,1$ szinten.

A harmadik kísérlet (11. ábra) során a másik kettő transzgénikus vonal hatását vizsgáltuk. Hasonlóan a második kísérletben megfigyelt jelenséghez, itt is csak a negyedik napon mutatkozik meg az SGTCI táplálkozást gátló hatása, mivel ezen a napon már a kontroll növények leveleit fogyasztó lárvák tömegeinek átlagértéke szignifikáns mértékben meghaladja ($p=0,1$) mindkét, SGTCI-t kifejező transzgénikus burgonyanövény leveleivel etetett lárvacsoport átlagos testtömegét. Sajnos ez a kísérlet nem tartott egészen a lárvák bábozódásáig, mivel a táplálékul szolgáló transzgénikus növények idő előtt elfogytak. A három egymástól független kísérlet eredményeit összefoglalva kimondhatjuk, hogy a három különböző, SGTCI peptidet kifejező transzgénikus vonal tesztelése során bizonyítást nyert, hogy az SGTCI-t fogyasztó lárvák tömeggyarapodása a kontroll lárvákéhoz képest néhány nap után elmarad, és ezért a hatásért a genetikailag módosított növényekben kifejeződő transzgén tehető felelőssé.

Az etetési kísérletek során a lárvák által elfogyasztott levelek száraztömegét is folyamatosan mértük. Ezek az adatok azt mutatták, hogy a lárvák növekedésével arányosan nőtt az elfogyasztott táplálék mennyisége. Az SGTCI-t fogyasztó lárvák táplálkozási viselkedése nem mutatott eltérést a kontrollhoz képest, viszont az elfogyasztott táplálék mennyiségét tekintve minden nap elmaradtak a kontroll lárváktól, amit az első kísérlet során mért adatokból készített 12. ábra is jól szemléltet. (A tendenciát megszakító ötödik nap magyarázata szintén a szabad bábozódást megakadályozó kísérleti elrendezésben keresendő. Lásd még az első kísérletnél

leírtakat!) A transzgénikus és a kontroll növényekkel etetett lárvák táplálékfogyasztásában mutatkozó különbségek egyrészt magyarázzák a SGTCI-t fogyasztó lárvák tömeggyarapodásának lassulását, másrészt azt is sugallják, hogy az SGTCI hatásának hátterében fiziológiai toxicitás állhat.



12. ábra. Burgonyabogár lárvák által SGTCI-t kifejező transzgénikus (1. vonal) és kontroll burgonyanövények leveleiből elfogyasztott mennyiségek száraztömegének változása. Az oszlopok átlagértékeket (n=10) jelentenek. Az adatok az első kísérletből (9. ábra) származnak.

Az etetési kísérletek végeztével az összes lárva bebábozódott három napon belül. A föld alól előbújt imágókat laboratóriumban tovább neveltük, és megfigyeltük két héten keresztül. Az összes föld alá bújt lárva imágóvá fejlődött, és egyiken sem figyeltünk meg (az SGTCI esetleges emésztésen kívüli fiziológiai folyamatokba /pl.: szövetreorganizáció/ történő beavatkozására utaló) morfológiai elváltozást.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

5.1. Növényi kivonatok

5.1.1. Vizes kivonatok

Hat különböző növényfaj föld feletti részeiből készítettünk vizes kivonatokot, melyek táplálkozásgátló hatását három rovarfajon teszteltük. Burgonyabogár imágók esetében a borostyán és a cickafark vizes kivonatának táplálkozásgátló hatása volt a legerősebb. (A későbbi vizsgálatok során sikerült kimutatnunk a cickafark metanolos kivonatának deterrens hatását burgonyabogár lárvákon.) VILLANI és munkatársai (1985) a borostyán leveleiből préselt kivonatot szintén deterrensnek találta *Diabrotica undecimpunctata howardi*-val, valamint *Melanotus communis*-szal szemben (VILLANI és GOULD, 1985). MUCKENSTURM és munkatársai (1981) a cickafark acetonos kivonatát találta hatékonynak *Mythimna unipuncta* lárvákon. A repcedarázs álhernyókkal végzett kísérletben szintén a borostyán fagoinhibitor hatása bizonyult a legerősebbnek. A csipkézőbarkó imágók esetében pedig a kislevelű hárs kivonatát találtuk erősen deterrensnek. A mi egyszerű extrakciós eljárásunk során kapott vizes kivonatról, pontosabban a benne lévő hatóanyagokról, azok mennyiségéről nem sokat tudunk mondani. Éppen ezért, további kísérletek elvégzését javasoljuk a kislevelű hárssal, amely során egyéb extrakciós eljárással készült kivonatok hatását lehetne tanulmányozni újabb tesztrovar-fajok bevonásával. A későbbiekben négy növényfajból (*Capsella bursa-pastoris*, *Tilia cordata*, *Hedera helix* és *Achillea millefolium*) metanolos kivonatot is készítettünk, és hatásukat így tanulmányoztuk tovább. Vizes kivonatok készítését csak gyors, ún. screening vizsgálatok elvégzéséhez javasoljuk.

5.1.2. *Ajuga chamaepitys* kivonat és a *NeemAzal T/S* összehasonlítása

A négy kártevő fajjal elvégzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a vizsgált két táplálkozásgátló anyag hatása dózisfüggő, továbbá azt, hogy 0,5%-os dózisban egyedül a burgonyabogár imágókkal szemben van számottevő (50% feletti) hatásuk. Viszont mindkét anyag 5%-os dózisban három kártevő fajjal szemben is (a repcedarázs kivételével) hatásosnak bizonyult, amit a gyakorlati növényvédelem számára is jelentős 90% feletti (A.F. és I.P.) értékek mutatnak. Úgy tűnik, hogy a repcedarázs álhernyók táplálkozását az *Ajuga* kivonat egyáltalán nem képes gátolni, igaz, hogy ezzel a kártevővel szemben a *NeemAzal T/S* hatása is gyenge. A másik három kártevő (burgonyabogár, káposztalepke, csipkézőbarkó) esetében az *Ajuga* kivonat hatékonysága nem marad el a *NeemAzal T/S*-étől.

Az összehasonlítás azonban nem teljes anélkül, hogy meg ne vizsgálánánk a két, eltérő eljárással készült kivonat hatóanyagtartalmát. A neem kivonatról tudjuk, hogy 1%-ban tartalmaz azadirachtin A-t, ami 10 mg/ml töménységű oldatnak felel meg. Ha a kísérletek során alkalmazott 5%-os dózist vesszük alapul, akkor abban az azadirachtin kb. 500 ppm koncentrációban volt jelen. Az *A. chamaepitys* kivonat esetében nem ilyen egyértelmű a helyzet. Annyit tudunk biztosan, hogy 1 ml kivonat 1 g metanolban oldódó száraz növényi anyag extraktumát tartalmazza. Nem tudjuk azonban, hogy ez a kivonat hány %-ban tartalmazza a hatásért felelős neoklerodánokat (beleértve az ajugapitineket, ajugachinokat és chamaepitint). (Abban az esetben, ha az általunk használt *A. chamaepitys* kivonat a neem-mel megegyező arányban, tehát 1%-ban tartalmazná hatóanyagait (10 mg/ml), akkor az 5%-os hígítás esetén szintén hozzávetőlegesen 500 ppm koncentrációt kapunk.) CAMPS és munkatársai (1984), valamint BONEVA és munkatársai (1990) által közölt adatok alapján elvégzett durva számítások azt mutatják, hogy az *A. chamaepitys* számunkra fontos hatóanyagtartalma 0,1% körül lehet. Az eltérő extrakciós eljárással készült kivonatok hatóanyagtartalmára vonatkozó kalkulációnk alapján tehát feltételezhető, hogy a deterrens hatású neoklerodánok még az azadirachtinoknál is erősebb hatással bírhatnak. Ezt a feltevést a tiszta hatóanyagokkal (ajugapitin és azadirachtin) végzett (sajnos nem közvetlen, hanem irodalmi adatokon alapuló) összehasonlítás is alátámasztja. A releváns irodalom áttanulmányozásakor találunk olyan kísérleteket, amelyekben tiszta hatóanyagok hatását vizsgálták (véletlenül) azonos testállaton, viszont eltérő kísérleti beállítások mellett. BLANEY és munkatársai (1990) az azadirachtin hatását vizsgálták *Spodoptera littoralis* hernyókon és nagyon erős (A.I. = 99%) deterrens hatást tapasztaltak már 1 ppm koncentrációban is. BELLÉS és munkatársai (1985) viszont az ajugapitint tesztelték szintén *S. littoralis*-on és jelentős (FR₅₀ = 0,41) táplálkozásgátló hatást figyeltek meg már 0,3 ppm koncentrációban. Bár a két kísérlet módszerének alapja megegyezik (levélkorongos tesztek), de az eltérő beállítás (az egyik esetben üveggyapot korongokat, míg a másikban valódi levélkorongokat használtak, az egy tesztarénán belüli lárvák száma is különbözött) és főleg az eltérő értékelés (más volt a befejezési szabály, valamint a táplálkozásgátló hatást kifejező index) miatt ezek az eredmények nehezen összevethetőek egymással. Mindenesetre megerősítik azt a feltevést, hogy az *A. chamaepitys* fagoinhibitor allelokemikáliáinak aktivitása nem marad el az azadirachtinétől.

A NeemAzal T/S készítmény felhasználását a gyártó 0,3-0,5%-os dózisban ajánlja mindenféle rágó és szívó kártevő ellen, viszont az ajánlott dózisban kísérleteink alapján a készítmény táplálkozásgátló hatása nem elég erős. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a neem kivonat legfontosabb összetevői, az azadirachtinok jelentős rovarfejlődést gátló hatással is

rendelkeznek (hasonlóan az *A. chamaepitys* metanolos kivonatához), mely hatást a vizsgálataink során (szándékosan) nem vettük figyelembe. Úgy gondoljuk, és hogy az *Ajuga chamaepitys* erős deterrens, valamint IGR hatása miatt – az *Azadirachta indica*-hoz hasonlóan – megfelelő alapanyagként szolgálhat egy új botanikai inszekticid kifejlesztéséhez.

5.1.3. Metanolos kivonatok

A burgonyabogár lárvákon tesztelt metanolos növényi kivonatok közül a *Matricaria inodora*-ból készített kivonat fagoinhibitor hatása volt a legerősebb, többször felülmúlva az *Ajuga chamaepitys* hatását is. Az *Achillea millefolium* kivonat táplálkozásgátló hatása is számottevő volt, míg az *Amorpha fruticosa* hatása közepes.

Fontos kérdés, hogy a növényi kivonatok hogyan fejtik ki a hatásukat? Pusztán a kemoreceptorokon keresztül érvényesülő deterrens hatásról van szó, vagy a táplálékfelvétel után jelentkező fiziológiai toxicitás (esetleg mindkettő) eredményezi a táplálkozási viselkedés gátlását? A lárvák magatartásának megfigyelése, valamint a különböző táplálkozásgátlási indexek (A.I., I.P., S.I.) összehasonlítása segíthet a kérdés megválaszolásában.

Általánosan elfogadott, hogy egy deterrens hatású anyag magas A.I. (kettős választású) és alacsony I.P. (választás nélküli) értékekkel rendelkezik, miközben nem fogja vissza az összfogyasztást, ami az alacsony S.I. (kettős választású/választás nélküli) értékben mutatkozik meg. Egy tisztán toxikus tulajdonságú anyagnak viszont általában alacsony az A.I. értéke, míg az I.P. magasabb, miközben mindig visszafogja a rovar táplálékfelvételét (a kontroll levélkorongokból történő fogyasztást is!), amit a magas S.I. érték jelez. Most ne vegyük figyelembe a mi háromórás S.I. értékeinket (10. táblázat), mivel azok jelen esetben félrevezetők lehetnek (lásd később). A fogyasztás elfojtása („szuppressziója”) szerintünk egy hosszabb távú folyamatként fogható fel, ezért érdemesebb inkább a 24 órás kettős választású teszt (9. táblázat) fogyasztási értékeit vizsgálni (a háromórás S.I. index helyett) az esetleges toxikus hatás nyomon követéséhez.

Korábbi vizsgálatok (CABALLERO és mtsai, 2001; LAUBER és mtsai, 2004) eredményei arra engednek következtetni, hogy az *Ajuga chamaepitys* hatóanyagai érzékelő rendszeren keresztül ható deterrensek enyhén toxikus tulajdonságokkal. A mi eredményeink (magas három- és 24 órás A.I. értékek: 100% és 71,8%; alacsonyabb I.P. érték: 74,6% és egy közepes fogyasztást visszafogó hatás: kontroll + kezelt fogyasztás a 9. táblázatban: $142,7 \text{ mm}^2 + 23,4 \text{ mm}^2 = 166,1 \text{ mm}^2$) alátámasztják ezt a feltevést. Megfigyelhető továbbá, hogy idővel csökkent a kivonat

táplálkozásgátló hatása (a 24 órás A.I. érték alacsonyabb a háromórásnál, a 24 órás kezelt fogyaszt magasabb a háromórásnál), amit a habituáció jeleként is felfoghatunk.

Az *Amorpha fruticosa* hatóanyagait már régóta ismerjük (FUKAMI, 1962). Jól tudjuk, hogy alapvetően toxikusak, de néhány rovar esetében közepes mértékű fagoinhibitor hatásról is beszámoltak (GOMBOS és GASKÓ, 1977). A mi eredményeink sem mondanak ennek ellen, hiszen az A.I. értékek alacsonyak (37,8% és 56,6%), az I.P. magasabb (65,9%) és a kivonat 24 órás időtartamban vizsgálva visszafogja a burgonyabogár lárvák táplálkozását, amit a kontroll és kezelt levélkorongokból elfogyasztott levélfelület nagysága jelez (9. táblázat: $68,6 \text{ mm}^2 + 19,0 \text{ mm}^2 = 87,6 \text{ mm}^2$). A lárvák viselkedésmintázata (8. ábra) is fogyasztás elfojtást és toxicitást sugall, mivel az evésre és keresésre fordított idő nagysága csökkenő tendenciát mutat az idő múlásával (három óra).

Az *M. inodora* kivonat hatásmechanizmusát vizsgálva csak a saját eredményeinkre támaszkodhatunk. A fent említett logika alapján, a *M. inodora* egy erős, kemoreceptorokon keresztül ható deterrens (magas A.I. értékek: 71,4% és 85,4%), meglepően magas I.P. értékkel (96,4%). Nem fogja vissza a lárvák táplálékfelvételét 24 óra alatt (a kontrollból és kezeltből történő átlagos fogyasztás: $239,0 \text{ mm}^2 + 18,8 \text{ mm}^2 = 257,8 \text{ mm}^2$), ami alacsony toxicitásra utal. A kivonat táplálkozásgátló hatása 24 óra elteltével sem csökken (magasabb a 24 órás A.I. érték a háromórásnál).

Az eredmények alapján, a 12 kivonat közül egyértelműen a *M. inodora* gátolta leghatásosabban a burgonyabogár lárvák táplálkozását. Kár, hogy az ebszékfü ezt a kimagasló hatását csak elég magas koncentrációban (5%) tudja produkálni, összehasonlítva a NeemAzal T/S-sel (hatóanyaga: 1% azadirachtin), melynek ajánlott dózisa 0,3-0,5%. Az egyik vizsgálatunk (KUTAS és NÁDASY, 2005; illetve jelen dolgozat 4.2. fejezete) azonban két fontos dolgot fedett fel. Az egyik az, hogy ilyen alacsony dózisban a NeemAzal sem képes gátolni hatékonyan a kártevők táplálkozását, a másik pedig az, hogy az *Ajuga chamaepitys* fagoinhibitor hatása ugyanolyan erős lehet, mint a neem kivonaté. Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a *M. inodora* rendelkezhet olyan másodlagos kémiai anyagokkal, melyek a neem kivonattal megegyező mértékben képesek gátolni bizonyos rovarok táplálkozását. Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy a *M. inodora* kivonat olyan, alig ismert másodlagos növényi anyagok keveréke, melyek egymástól eltérő hatásmechanizmussal is rendelkezhetnek. Ez az egyik oka annak, hogy miért nem lehetünk biztosak a *M. inodora* kivonat általunk feltételezett hatásmechanizmusában, a másik ok pedig az, hogy a kísérleteink metodikája nem alkalmas arra, hogy biztos választ nyújtson arra a kérdésre, hogy melyik hatásmód (deterrens vagy toxikus) felelős a lárvák táplálkozásának gátlásáért. Mentségünkre szóljon, hogy a célzottan

táplálkozásgátló hatást vizsgáló tesztekkel nagyon nehéz megkülönböztetni ezt a két hatasmódot (SZENTESI és BERNAYS, 1984; BERNAYS és CHAPMAN, 1987; BERNAYS, 1991). A fent említett nehézségek ellenére biztató, hogy eredményeink megerősítik az *Ajuga chamaepitys* (ORTEGO és mtsai, 1995; CABALLERO és mtsai, 2001) és az *Amorpha fruticosa* (GOMBOS és GASKÓ, 1977; WHEELER és mtsai, 2001) hatásmechanizmusával kapcsolatos vizsgálatokból levonható következtetéseket.

Miért volt az S.I. érték félrevezető a mi esetünkben? (Az S.I. értékeket nem vettük figyelembe a kivonatok toxicitásának vizsgálatakor.) A magas S.I. érték azt jelenti, hogy a kontroll és a kezelt levélkorongokból történő fogyasztás mértéke alacsony a kettős választású tesztarénában (a lárvák elfogyasztanak egy keveset a kezelt korongokból, miután a táplálékfelvétel aktivitása lecsökken, mivel a kontroll korongokból sem történik fogyasztás). Ez a jelenség két különböző okra vezethető vissza: (1) a kezelés toxikus hatású (postingestive). (A toxikus *A. fruticosa* esetében az S.I. alacsony (44,1%) volt. Úgy gondoljuk, hogy a három óra nem volt elég ahhoz, hogy a toxicitás kifejeződhessen az S.I. értékben. Szerintünk a táplálkozási viselkedésben bekövetkező változások mellett egyéb toxicitásra utaló tüneteket is vizsgálni kellene. Ilyen lehet például a lokomotoros aktivitás csökkenése). (2) A kezelésnek erős (kemoreceptorokon keresztül érvényesülő) deterrens hatása van, ami nemcsak a táplálékfelvétel megszakítását eredményezi, hanem magasabb lokomotoros aktivitást is okoz (JERMY, 1971; EL-BASSIOUNY, 1991). JERMY (1971) szerint a deterrens blokkolja a táplálékfelvételt a központi idegrendszerben, ami a lárvák megnövekedett mozgását eredményezi (a lárvák keresgélnek, ahelyett hogy a kezeletlen táplálékot fogyasztanák). A megfigyeléseink alátámasztják ennek a hipotézisnek a helyességét, ami magyarázatot ad arra is, hogy a két deterrens hatású kivonatnak (*A. chamaepitys*, *M. inodora*) miért volt olyan magas az S.I. értéke. Ebből következik az is, hogy rövid ideig tartó biotesztekben a magas S.I. érték nemcsak toxikus hatást jelezhet, hanem erős deterrenciát is.

Elgondolkoztató továbbá, hogy a *Matricaria inodora*-val közeli rokonságban álló *Matricaria chamomilla* miért nem gátolja (eredményeink alapján csak a választás nélküli tesztben produkált szignifikáns eredményt, de az is 50% alatti) a burgonyabogár lárvák táplálkozását.

A burgonyabogár imágókkal és gyapjaslepke hernyókkal végzett kísérletek eredményei azt mutatják, hogy meglepő módon mindkét faj esetében a *A. fruticosa* kivonat (ami inkább toxikus tulajdonságairól híres) a leghatásosabb fagoinhibitor, megelőzve a mindkétszer második helyre szorult *A. chamaepitys*-t.

Meglepő eredmény, hogy a citrommag metanolos kivonata ennyire hatástalannak bizonyult az összes tesztben. Ennek magyarázata talán abban rejlik, hogy az erős deterrens hatásról beszámoló kutatók (MENDEL és mtsai, 1991; MURRAY és mtsai, 1996; MURRAY és mtsai, 1999) főleg grapefruit magokból acetonos kivonatokat készítettek.

A páfrányfenyő kivonatot sem találtuk hatásosnak, de DOSKOTCH és munkatársaival (1977) szemben mi nem tapasztaltunk táplálkozásserkentő hatást gyapjaslepke hernyók esetében.

Vizsgálataink végső következtetéseként levonható az, hogy a *Matricaria inodora* metanolos kivonata tartalmaz olyan másodlagos anyagcseretermékeket, melyek erősen deterrens hatásúak burgonyabogár lárvákra. További kutatásokat javasolunk annak érdekében, hogy a növényben fellelhető aktív vegyületeket izolálni lehessen, hogy a pontos hatásmechanizmusuk megállapításra kerüljön, és hogy ezek az anyagok a gyakorlati növényvédelem számára is hasznosíthatók legyenek.

5.2. Állati eredetű proteáz inhibitor (SGTCI)

Proteáz inhibitorokkal a burgonyabogár ellen eddig még nem sikerült hatékony védekezési eljárást kidolgozni. Ennek legfőbb oka a burgonyabogár rendkívüli alkalmazkodóképességében keresendő, hiszen nemcsak a burgonyában önvédelem céljából indukált proteáz inhibitorokat képes inaktiválni (GRUDEN és mtsai, 2003) hanem több, a burgonyába bevitt idegen PI-t is. Kissé ironikus, hogy a bogár PI-ok elleni védekezőrendszerét megkerülni képes, nagyon jó tulajdonságokkal (többfunkciós, állati eredetű) rendelkező (transzgén által termelt) equistatin-t, ami mesterséges táplálékba keverve hatásosnak bizonyult, éppen a burgonyanövény saját proteázai inaktiválják (OUTCHKOUROV és mtsai, 2003).

Az általunk vizsgált sáska-hemolimfából kivont, tripszint és kimotripszint egyaránt gátolni képes SGTCI az equistatinnal szemben azzal a kedvező tulajdonsággal is rendelkezik, hogy kompakt, kisméretű – SIMONET és munkatársai (2002) szerint ezzel egyedülálló a kanonikus inhibitorok között –, ezért a különböző proteázok nehezebben bontják le. Ennek ellenére nem zárható ki, hogy a burgonya arginin-lizin-aszparaginsav specifikus proteázai nem tesznek kárt benne (OUTCHKOUROV és mtsai, 2003).

Habár az SGTCI a burgonyabogár ellen bevetett PI-ok közül az egyik „legmodernebb”, számos tulajdonságát tekintve az egyik legbiztosabb jelölt, etetési kísérleteinkben csak kis mértékben tudta gátolni a burgonyabogarak táplálkozását, növekedését. Ez az eredménytelenség legalább kettő ismert okra vezethető vissza. Az egyik az, hogy az általunk tesztelt transzgenikus burgonyanövényekben az SGTCI mennyisége a levelekben található összes oldható fehérjének

mindössze a 0,1%-át tette ki, szemben a JONGSMA és BOLTER (1997) által javasolt (általában a PI-okra vonatkozó) minimum 0,5-1,5%-os értékkel, ami az emésztőenzimek teljes gátlását eredményezné. A másik ok pedig az, hogy a tripszin és kimotripszin (amiket az SGTCI gátol) a burgonyabogár fehérjeemésztésében nem játszik döntő szerepet (NOVILLO és mtsai, 1997). Ennek tudatában annál figyelemreméltóbb az SGTCI által elért nem elhanyagolható ($p=0,05$ szinten szignifikáns) gátló hatás, aminek hátterében nem biztos, hogy csak a tápcsatorna fehérjebontó enzimeinek inaktiválása áll. Azt biztosan tudjuk, hogy az SGTCI képes a szarvasmarha kimotripszinhez nagyon erősen kötődni (PATTY és mtsai, 2002), amiből egyenesen következik az a feltételezés, hogy a burgonyabogár lárvákban is ilyen módon fejtené ki a hatását. De ahogy azt már előbb említettük, nem zárható ki más hatásmechanizmus sem, például az, hogy az SGTCI – a pacifastin család tagjaként (SIMONET és mtsai, 2002) – a burgonyabogár immunrendszerét (vagy más fiziológiai folyamatait) zavarná meg, így befolyásolva a lárvák fejlődését, amit az általunk felvetett toxikus hatás (az SGTCI-t fogyasztó lárvák csökkent táplálékfelvétele) is alátámaszthat.

Figyelembe véve az alacsony inhibitor szintet a növényben, még az SGTCI által produkált gyenge hatás is alátámasztja annak a stratégiának a helyességét, amely többfunkciós, állati eredetű PI-okkal kívánja egyes kultúrnövények rovarrezisztenciáját növelni. Belátjuk azonban, hogy az SGTCI burgonyabogárral szembeni hatása nem lenne elegendő a hatékony védekezéshez, ezért nem is javasoljuk az ilyen irányba történő további kutatómunka végzését. Javasoljuk viszont az SGTCI kipróbálását olyan rovarkártevőkkel szemben (pl.: Lepidoptera), melyek fehérjeemésztő enzimrendszerében a szerin proteázok dominálnak.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Tágabb értelmezésben táplálkozásgátló anyagok közé sorolandó minden olyan anyag, amely a fitofág rovar táplálékfelvételét, a tápcsatornába jutott táplálék megemésztését, felszívódását vagy beépülését, esetleg raktározását bármi módon gátolni vagy csökkenteni képes. A szűken értelmezett táplálkozást (és petézést) gátló anyagok (deterrensek, fagoinhibitorok, „antifidánsok”) mindig kontakt kemorecepció útján (ízérzékelés) fejtik ki hatásukat és negatív kemoorientációt okoznak. A növényi kivonatok az utóbbi kategóriába tartoznak, míg az általunk vizsgált állati eredetű proteináz inhibitor peptid a táplálkozásgátló anyagok tágabb értelmezési körébe fér bele. (Disszertációmnak így két része van, amire már a címe is utal.)

A növények zavarba ejtően sokféle másodlagos növényi anyagot szintetizálnak. Az azonosított vegyületek száma már meghaladja a 100 ezret és ez a szám napról napra bővül. A deterrens hatású anyagok fő forrása mind a mai napig a növényvilág. Az egyik legjobban dokumentált példa az Indiában őshonos neem-fa (*Azadirachta indica*, *Meliaceae*). Több ezer éve használatos az indiai növénytermesztésben különféle káros rovarok ellen. A modern fitokémiai eljárások hatékony vegyületek egész arzenálját mutatták ki a fajból. A neem-magolajban az inszekticid hatásért felelős fő összetevők a C-seco-meliacinok (a kivonható több mint 70 triterpén közül), azok közül is a legfontosabb és leghatásosabb az azadirachtin A. Bár a neem-olaj egyéb célokra is alkalmas, mégis a kártevők elleni felhasználás a domináló. Ilyen a növényeket károsító fonálférgek, atkák és rovarok elleni alkalmazás. Jelenleg (bizonyos szelektivitás ellenére) kb. 200 rovarfaj ellen ismeretes hatása a Coleoptera, Diptera, Heteroptera, Homoptera, Hymenoptera, Thysanoptera, Lepidoptera és Orthoptera rendekben. Sok tekintetben teljesíti egy ideális táplálkozásgátló anyaggal szemben támasztott követelményeket, például ártalmatlan a hasznos szervezetekre, az emlősökre nem mérgező és szisztémikus hatású, ami biztosítja a szívó kártevőkkel szembeni védelmet is. A fagoinhibitor hatású botanikai eredetű anyagok közül ez ideig csak a neem-fa kivonatából készült formált növényvédő szer, amit számos országban forgalmaznak. A neem sikere jogosít fel bennünket arra, hogy higgyünk a táplálkozásgátló anyagok jövőjében, az integrált növényvédelmi gyakorlatban történő hasznosíthatóságuk lehetőségében. Célkitűzéseink között szerepel a neemhez hasonló tulajdonságú növényfajok keresése. Hogy ez a keresés ne legyen teljesen véletlenszerű, egyrészt a szakirodalom áttanulmányozása segít bennünket a kivonatok alapanyagául szolgáló növényfajok kiválasztásában, másrészt pedig az általunk végzett gyorstesztek eredményeire is támaszkodhatunk. Gyorstesztek alatt alacsony ismétlésszámú, 24 órás kettős választású

levélkorongos kísérleteket értünk, melyek során az illető növényből készült vizes kivonat táplálkozásgátló hatását vizsgáltuk. (A vizes kivonat elkészítése gyors és egyszerű, de végeredményben kevés információval szolgál.) Összesen hat növényfajból készítettünk vizes kivonatot (nagy útifű, pásztortáska, kislevelű hárs, borostyán, közönséges cickafark és káposztarepce), melyek hatását három rovarkártevővel (burgonyabogár és csipkézőbarkó imágók, repcedarázs álhernyók) szemben vizsgáltuk. Erősen deterrens hatásúnak bizonyult a borostyán és a közönséges cickafark a burgonyabogárral, a borostyán a repcedarázs álhernyókkal, valamint a kislevelű hárs a csipkézőbarkókkal szemben. A hatból négy növényfajt (hárs, borostyán, cickafark és pásztortáska) választottunk ki további vizsgálatok elvégzéséhez. A továbbiakban 11 növényfaj (orvosi székfű, kaporlevelű ebszékfű, gilisztaűző varádics, gyalogakác, selyemmályva, citrom, páfrányfenyő, kislevelű hárs, borostyán, pásztortáska és közönséges cickafark) kiszáritott részeiből készítettünk metanolos kivonatot (melynek 1 ml-e 1 g száraz növényi anyag extraktumát tartalmazta), melyek táplálkozásgátló hatását alaposabb vizsgálatoknak vetettük alá. A 12. növényfaj, a kalinca ínfű (*Ajuga chamaepitys*), mely már sokat tanulmányozott és ismertén erős fagoihinhibitor hatású másodlagos kémiai anyagokat tartalmaz, metanolos kivonatát standard kontrollként használtuk.

Eközben elvégeztünk egy kísérletsorozatot, mely során arra a kérdésre kerestük a választ, hogy az *Ajuga chamaepitys* metanolos kivonatának (1 g szárazanyag/ml) táplálkozást gátló hatékonysága eléri-e az *Azadirachta indica* kivonatét (1% azadirachtin A hatóanyagú NeemAzal T/S készítmény formájában). A kivonatok hatását 0,5 és 5%-os dózisban vizsgáltuk laboratóriumban elvégzett 24 órás választás nélküli, valamint kettős választású levélkorongos tesztekkel a következő kártevő fajokon: burgonyabogár imágók és lucerna-csipkézőbarkó imágók, repcedarázs és káposztalepke lárvák. A kettős választású tesztek (burgonyabogár, repcedarázs és káposztalepke esetében) módszertana megegyezett a vizes kivonatokkal végzett gyorsesztekével, csak az ismétlésszám volt nagyobb. A csipkézőbarkók várható kis fogyasztása miatt számukra a választás nélküli „félleves módszer”-t választottuk, amihez egy pontosabb tömegméréses kiértékelési eljárás tartozik. Eredményeink azt mutatják, hogy az *A. chamaepitys* kivonat a repcedarázs kivételével az összes vizsgált kártevő táplálkozását az azadirachtin hatásával azonos mértékben képes gátolni. Ennek ismeretében lehetőségünk van a metanolos növényi kivonataink fagoihinhibitor hatását közvetlenül a neem kivonathoz viszonyítani.

A 12 metanolos növényi kivonat hatását fiatal, 4. stádiumú burgonyabogár lárvákon vizsgáltuk 0,5 és 5%-os (v/v) dózisban. Az entomológiai laboratórium klímakamráiban három és 24 órás kettős választású, valamint háromórás választás nélküli levélkorongos tesztekkel állítottunk be. A levélkorongos kísérletek kiértékelése különböző felületmérési eljárással

(a levélkorongokból elfogyasztott levélfelület meghatározása) történt. Az eredmények könnyebb összehasonlíthatósága érdekében, a kezelt és a kontroll levélkorongokból elfogyasztott mennyiségek alapján különböző, a táplálkozásgátló hatást százalékosan kifejező indexeket (A.I., I.P., S.I.%) számoltunk. Az aktivitással rendelkező kivonatok hatásmechanizmusának felderítése érdekében a választás nélküli teszt során folyamatosan figyeltük és dokumentáltuk a lárvák viselkedését. Az általunk megfigyelt három viselkedési forma (evés, pihenés, keresés) százalékos megoszlását – a különböző kezelések esetében – összehasonlítva próbáltunk következtetni a kivonatok deterrens vagy toxikus tulajdonságaira. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy 0,5%-os dózisban a vizsgált növényi kivonatok egyike sem képes gátolni a burgonyabogár lárvák táplálkozását. Öt %-os dózisban a kaporlevelű ebszékfű (*Matricaria inodora*) deterrens hatása volt a legerősebb (mindhárom teszt alapján), többször felülmúlva a standard kontroll (*Ajuga chamaepitys*) hatását is. A lárvák viselkedésmintázatának elemzéséből, valamint a különböző indexek értékeiből valószínűsíthető, hogy az ebszékfűben jelen lévő allelokemikáliák hatásukat pusztán a kemoreceptorokon keresztül érvényesülő gátlás útján fejtik ki. Vizsgálataink végső következtetéseként levonható az, hogy a *Matricaria inodora* metanolos kivonata tartalmaz olyan másodlagos anyagcseretermékeket, melyek erősen deterrens hatásúak burgonyabogár lárvákra. További kutatásokat javasolunk annak érdekében, hogy a növényben fellelhető aktív vegyületeket izolálni lehessen, hogy a pontos hatásmechanizmusuk megállapításra kerüljön, és hogy ezek az anyagok a gyakorlati növényvédelem számára is hasznosíthatók legyenek.

A metanolos növényi kivonatok hatását kipróbáltuk burgonyabogár imágókon és a polifág gyapjaslepke hernyókon is. (Gyapjaslepkén csak nyolc kivonat hatását tudtuk tesztelni. Hiányzott a hárs, a selyemmályva, a varádics és a kamilla.) A 24 órás kettős választású biotesztek eredményei azt mutatják, hogy mindkét rovar esetében a legerősebb fagoinhibitor a (inkább toxikus tulajdonságairól híres) gyalogakác (*Amorpha fruticosa*) közvetlenül megelőzve a kalinca ífű (*Ajuga chamaepitys*) kivonatát.

Dolgozatunkban az állati eredetű táplálkozásgátlót egy, a sivatagi sáskából izolált proteáz inhibitor képviseli, amelyet burgonyabogár lárvákon teszteltünk. Miután nyilvánvalóvá vált, hogy a növények proteáz inhibitorokkal (PI-okkal) is védekeznek a növényevő rovarok ellen (a burgonyanövények is termelnek PI-okat a kártevők fehérjeemésztésének megzavarása céljából), a kutatók elkezdtek vizsgálni ezen inhibitoroknak a rovarok fitness paramétereire gyakorolt hatását. Könnyen belátható, hogy a PI-ok növényvédelmi célú felhasználásának egyedüli hatékony módszere a PI gének kultúrnövényekbe való beültetése. (A hagyományos eljárás, a PI-ok levelekre történő kipermetezése úgy, hogy védelmet is nyújtson, nehezen kivitelezhető). A

burgonyabogár ellen (is) hatékony PI-t kifejező transzgénikus burgonyanövényt ez idáig nem sikerült létrehozni a nagyszámú próbálkozások ellenére sem, aminek fő oka az, hogy a burgonyabogár olyan kivételes képességekkel rendelkezik, melyek lehetővé teszik számára, hogy a fehérjeemésztő rendszerét mindenkor az elfogyasztott táplálék „tulajdonságaihoz” igazítsa (miáltal proteolitikus aktivitását minőségileg és mennyiségileg is módosítani tudja). Miután hamar kiderült, hogy a burgonyabogár könnyen elbánik a növényi eredetű PI-okkal, ezért a kutatók az állatokban kezdtek PI-okat keresni. Az általunk tesztelt *Schistocerca gregaria* trypsin chymotrypsin inhibitor (SGTCI) a következő kedvező tulajdonságokkal rendelkezik: egyrészt állati eredetű (sivatagi sáskából származik), másrészt többfunkciós (tripszin és kimotripszin gátló), sőt részben mesterséges is mivel a két inhibítort (SGTI és SGCI) egy -Lys-Arg- híd segítségével kapcsolják egymáshoz. Harmadrészt pedig rendkívüli mértékben phylum szelektív (ez talán a legnagyobb erénye), ami azt jelenti, hogy sokkal (öt nagyságrenddel!) jobban gátolja az ízeltlábúak fehérjebontó enzimeit, mint az emlősökét. Phylum szelektivitásának köszönhetően az SGTCI egy olyan állati eredetű PI, amely növényvédelemben történő felhasználása esetén (ember által fogyasztott kultúrnövényben) a humán-egészségügyi vonatkozásokat tekintve is kedvező lehet.

Az SGTCI peptidet kifejező transzgénikus burgonyanövényeket a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont munkatársai állították elő. Tanszékünk entomológiai laboratóriumában elvégzett etetési vizsgálatok során a burgonyabogár lárvákat bábozódásig higrosztátokban neveltük, és naponta friss leveleket biztosítottunk számukra. A lárvák napi tömeggyarapodása mellett mértük az általuk elfogyasztott táplálék szárazanyag-tartalmának változását is (a kiszárított féllelél módszer segítségével). A „kezelt” lárvákat SGTCI peptidet kifejező transzgénikus burgonyalevelekkel etettük, míg a „kontroll” lárvákat olyan, szintén Gödöllőn készült kontroll növényekkel, melyek ugyanazon a mesterséges előállítási folyamaton mentek keresztül, mint GMO társaik. Összesen három kísérletet végeztünk három különböző transzgénikus vonallal. A három kísérlet eredményeit összefoglalva kimondhatjuk, hogy a három különböző, SGTCI peptidet kifejező transzgénikus vonal tesztelése során bizonyítást nyert, hogy az SGTCI-t fogyasztó lárvák tömeggyarapodása a kontroll lárvákéhoz képest néhány nap után elmarad, és ezért az enyhe (de egyes esetekben statisztikailag szignifikáns) hatásért a genetikailag módosított növényekben kifejeződő transzgén tehető felelőssé. A lárvák által elfogyasztott levelek száraz-tömegének mérési adatai azt mutatták, hogy az SGTCI-t fogyasztó lárvák az elfogyasztott táplálék mennyiségét tekintve minden nap elmaradtak a kontroll lárváktól, ami azt sugallja, hogy az SGTCI hatásának hátterében fiziológiai toxicitás állhat. Etetési kísérleteinkben az SGTCI csak kismértékben volt képes gátolni a burgonyabogarak

táplálkozását, növekedését. Ez az eredménytelenség legalább kettő ismert okra vezethető vissza. Az egyik az, hogy az általunk tesztelt transzgenikus burgonyanövényekben az SGTCI mennyisége a levelekben található összes oldható fehérjének mindössze a 0,1%-át tette ki, szemben a szakértők által javasolt minimum 0,5-1,5%-os értékkel. A másik ok pedig az, hogy a tripszin és kimotripszin a burgonyabogár fehérjeemésztésében nem játszik döntő szerepet. Az újdonságnak számító SGTCI burgonyabogárra kifejtett gyenge hatása megkérdőjelezi (a vizsgált kártevővel szembeni) gyakorlati alkalmazásának lehetőségét.

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, dr. habil. Nádasy Miklós egyetemi docensnek, aki tanszékvezetőként is végig önzetlenül segített mind tanulmányaim, mind munkám végzése során.

Köszönettel tartozom Fekete Gábor tudományos munkatársnak (MTA NKI) az *Ajuga chamaepitys* kivonat rendelkezésünkre bocsátásáért, hasonló okokból dr. Bürgés György egyetemi magántanárnak (VE GMK) a NeemAzal T/S-ért.

Köszönöm Takács Zsolt tanszéki mérnök és Grósz Gergely PhD hallgató (mindketten VE GMK) számítógépes felületmérés során nyújtott segítségét.

Köszönet illeti dr. Szentesi Árpád egyetemi docent (ELTE) és dr. Sáringer Gyula (VE GMK) professor emeritus akadémiust, akik számos hasznos tanáccsal láttak el munkám során.

Végül hálásan köszönöm a Növényvédelmi Állattani Tanszék munkatársainak (Keresztes Balázs, Marczali Zsolt, Vipler Józsefné és Zalányiné Duduk Judit) mindenre kiterjedő segítségét.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- ALFORD, A. R., CULLEN, J. A., STORCH, R. H. and BENTLEY, M. D. (1987): Antifeedant activity of limonin against the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 575-578.
- ALLAN, E. J., EESWARA, J. P., JOHNSON, S., MORDUE (LUNTZ), A. J., MORGAN, E. D. and SUCKBURY, T. (1994): The production of azadirachtin by in vitro tissue cultures of neem, *Azadirachta indica*. *Pestic. Sci.* 42: 147-152.
- ALMQUIST, H. J. and MERITT, J. B. (1951): Effect of soybean antitrypsin on experimental amino acid deficiency in the chick. *Arch. Biochem. Biophys.* 31: 450-453.
- APPLEBAUM, S. W. (1985): Biochemistry of digestion. In: KERKOT, G. A. and GILBERT, L. I. (eds): *Comprehensive insect physiology; Biochemistry and Pharmacology*. New York, Pergamon Press 4: 279-311.
- ARPAIA, S. and van LOON, J. J. A. (1993): Effects of azadirachtin after systemic uptake into *Brassica oleracea* on larvae of *Pieris brassicae*. *Entomol. Exp. Appl.* 66: 39-45.
- BAKER, J. E., WOO, S. M. and MULLEN, M. A. (1984): Distribution of proteinases and carbohydrates in the midgut of the larvae of the sweet potato weevil *Cyclas formicarius* and response of proteinase to inhibitors from sweet potato. *Entomol. Exp. Appl.* 36: 97-105.
- BARRETT, A. J. (1986): An introduction to the proteinases. In: BARRETT, A. J. and SALVESEN, G. (eds): *Proteinase Inhibitors*. Elsevier, Amsterdam pp. 3-22.
- BARRETT, A. J. (1994): Classification of peptidases. In: BARRETT, A. J. (ed): *Methods in Enzymology*, New York, Academic Press 244: 1-15.
- BATRA, S.W.T. (1982): Biological control in agroecosystems. *Science* 8: 134-139.
- BELL, H. A., FITCHES, E. C., DOWN, R. E., FORD, L., MARRIS, G. C., EDWARDS, J. P., GATEHOUSE, J. A. and GATEHOUSE, A. M. (2001): Effect of dietary cowpea trypsin inhibitor (CpTI) on the growth and development of the tomato moth *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) and on the success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Pest Manag. Sci.* 57: 57-65.
- BELLÉS, X., CAMPS, F., COLL, J. and PIULACHA, D. M. (1985): Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids against larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera). *J. Chem. Ecol.* 11: 1439-1445.

- BENTLEY, M. D., LEONARD, D. E., STODDARD, W. F., and ZALKOW, L. H. (1984): Pyrrolizidine alkaloids as larval feeding deterrents for spruce budworm, *Choristoneura fumiferana* (Lepidoptera: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 77: 393-397.
- BENTLEY, M. D., RAJAB, M. S., ALFORD, A. R., MENDEL, M. J. and HASSANALI, A. (1988): Structure-activity studies of modified citrus limonoids as antifeedants for Colorado potato beetle larvae, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol. Exp. Appl.* 49: 189-193.
- BERNAYS, E. A. (1991): Relationship between deterrence and toxicity of plant secondary compounds for the grasshopper *Schistocerca americana*. *J. Chem. Ecol.* 17: 2519-2526.
- BERNAYS, E. A. and CHAPMAN, R. F. (1987): The evolution of deterrent responses in plant-feeding insects. In: CHAPMAN, R. F., BERNAYS, E. A. and Stoffolano, J. G. Jr. (eds): *Perspectives in chemoreception and behavior*. Springer Verlag, New York pp.159-173.
- BERNAYS, E. A. and CHAPMAN, R. F. (1994): *Host-plant selection behaviour of phytophagous insects*. Chapman & Hall, New York.
- BLANEY, W. M., SIMMONDS, M. S. J., LEY, S. V., ANDERSON, J. C. and TOOGOOD, P. L. (1990): Antifeedant effects of azadirachtin and structurally related compounds on lepidopterous larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 55: 149-160.
- BOLTER, C. J. and JONGSMA, M. A. (1995): Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Insect Physiol.* 41: 1071-1078.
- BOLTER, C. J. and LATOSZEK-GREEN, M. (1997): Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entomol. Exp. Appl.* 83: 295-303.
- BONEVA, I. M., MIKHOVA, B. P., MALAKOV, P. Y., PAPANOV, G. Y., DUDDECK, H. and SPASSOV, S. L. (1990): Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga chamaepitys*. *Phytochemistry* 29: 2931-2933.
- BOWN, D. P., WILKINSON, H. S. and GATEHOUSE, J. A. (1997): Differentially regulated inhibitor sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27: 625-638.
- BREWER, G. J. and BALL, H. J. (1981): A feeding deterrent effect of a water extract of tansy (*Tanacetum vulgare* L., Compositae) on three lepidopterous larvae. *J. Kansas Entomol. Soc.* 54: 733-738.

- BROADWAY, R. M. and DUFFEY, S. S. (1986): Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 32: 673-680.
- BROVOSKY, D. (1986): Proteolytic enzymes and blood digestion in the mosquito *Culex nigripalpus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 3: 147-160.
- BRUNKE, K. J., DELUCA-FLAHERTY, C. R. and SCARAFIA, L. E. C. (1995): International Patent Application, WO 95/24479.
- BRZIN, J., POPOVIC, T., DROBNIC-KOSOROK, M., KOTNIK, M. and TURK, V. (1988): Inhibitors of cysteine proteinases from potato. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 369: 233-238.
- CABALLERO, C., CASTANERA, P., ORTEGO, F., FONTANA, G., PIERRO, P., SAVONA, G. and RODRIGUEZ, B. (2001): Effects of ajugarins and related neoclerodane diterpenoids on feeding behaviour of *Leptinotarsa decemlineata* and *Spodoptera exigua* larvae. *Phytochemistry* 58: 249-256.
- CAMPS, F., COLL, J. and DARGALLO, O. (1984): Neo-clerodane diterpenoids from *Ajuga chamaepitys*. *Phytochemistry* 23: 2577-2579.
- CHAPMAN, R. F. (1982): Chemoreception: the significance of receptor numbers. *Adv. Insect Physiol.* 16: 247-356.
- CHEW, F. S. and RENWICK, J. J. A. (1995): Chemical ecology of hostplant choice in Pieris butterflies. In: CARDÉ, R. T. and BELL, W. J. (eds): *Chemical ecology of insects*, 2nd edn, Chapman & Hall, New York pp. 214-238.
- CHRISTELLER, J. T., BURGESS, E. P. J., METT, V., GATEHOUSE, H. S., MARKWICK, N. P., MURRAY, C., MALONE, L. A., WRIGHT, M. A., PHILIP, B. A., WATT, D., GATEHOUSE, L. N., LÖVEL, G. L., SHANNON, A. P., PHUNG, M. M., WATSON, L. M. and LAING, W. A. (2002): The expression of mammalian proteinase inhibitor, bovine spleen trypsin inhibitor in tobacco and its effects on *Helicoverpa armigera* larvae. *Transgenic Res.* 11: 161-173.
- CLOUTIER, C., JEAN, C., FOURNIER, M., YELLE, S. and MICHAUD, D. (2000): Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behaviour and over-production of insensitive proteases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 44: 69-81.
- CONOVER, W. J. (1971): *Practical Nonparametric Statistics*. Wiley, New York.

- CYMOREK, C. (1984): Über Hausbock *Hylotrupes bajulus* (L.) (Col., Cerambycidae), in Laubholz: Versuche mit Laugholzarten, Prüfung der Wirkung von Ligninstoffen und von *Ginkgo biloba*, Beobachtungen an *Hesperophanes*. Mitt. Deutschen Ges. Allg. Angew. Ent. 3: 90-96.
- DABROWSKI, Z. (1973): Studies on the relationships of *Tetranychus urticae* Koch and host plants. II. Gustatory effect of some plant extracts. Polskie Pismo Entomologiczne 43: 127-138.
- DARVAS B. (1991): Ajuga fajok fitoekdiszteroidjai mint rovarfejlődés-szabályozó hatású botanikai inszekticidek. Növényvédelem 27: 481-498.
- DARVAS, B., POLGÁR, L. A., BREM, A. S., CSATLÓS, I., FARAG., A. I., TORMA-GAZDAG., M., ILOVAI, Z., CALCAGNO, M. P. and COLL, J. T. (1996): Effectivity of *Ajuga* (*A. chamaepitys*, *A. reptans* var. *reptans*, and var. *atropurpurea*) extracts on a wide variety of non-adapted insect species. In: SINGH, R. P., CHARI, M. S., RAHEJA, A. K. and KRAUS, W. (eds): Proc. World Neem Conference, Neem and Environment Vol. 2., Oxford and IHB Publ., New Delhi, India pp. 1108-1118.
- DENHOLM, A. A., JENNENS, L., LEY, S. V. and WOOD, A. (1995): Chemistry of insect antifeedants from *Azadirachta indica*. Part 19: A potential relay route for the synthesis of azadirachtin. Tetrahedon, 51: 6591-6604.
- DETHIER, V. G. (1982): Mechanisms of host plant recognition. Entomol. Exp. Appl. 31: 49-56.
- DOSKOTCH, R. W., ODELL, T. M. and GODWIN, P. A. (1977): Feeding responses of gypsy moth larvae, *Lymantria dispar*, to extracts of plant leaves. Environ. Entomol. 6: 563-568.
- DUAN, X. L., LI, X. G., XUE, Q. Z., ABO-EL-SAAD, M., XU, D. P. and WU, R. (1996): Transgenic rice plants harbouring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. Nat. Biotechnol. 14: 494-498.
- DUKE, J. A. (1985): CRC handbook of medicinal herbs. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- EDIZ, S. H. and DAVIS, G. R. F. (1980): Repellency of rapeseed extracts to adults of *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Can. Entomol. 112: 971-976.
- EGUCHI, M., IWAMOTO, A. and YAMAGUCHI, K. (1982): Interaction of proteases from the midgut lumen, epithelial and peritrophic membrane of the silkworm *Bombyx mori* L. Comp. Biochem. Physiol., Part A, Physiol. 72: 359-363.
- EL-BASSIOUNY, S. A. (1991): Changes in food-related behavioural patterns of some phytophagous insect species following exposures to an antifeedant. Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 26: 483-496.

- ESCOUBAS, P., LAJIDE, L. and MITZUTANI, J. (1993): An improved leaf-disk antifeedant bioassay and its application for the screening of Hokkaido plants. *Entomol. Exp. Appl.* 66: 99-107.
- FEKETE, G., POLGÁR, L. A., BÁTHORY, M., COLL, J. and DARVAS, B. (2004): *Per os* efficacy of *Ajuga* extracts against sucking insects. *Pest Manag. Sci.* 60: 1099-1104.
- FRAZIER, J. L. (1992): How animals perceive secondary plant compounds. In: ROSENTHAL, G. A. and BERENBAUM, M. R. (eds): *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. 2nd edn, vol. 2, Academic Press, New York pp. 89-133.
- FRAZIER, J. L. and CHYB, S. (1995): Use of feeding inhibitors in insect control. In: CHAPMAN, R.F. and de BOER, G. (eds): *Regulatory mechanisms in Insect Feeding*. Chapman & Hall, New York pp. 364-381.
- FUKAMI, J. (1962): Effect of rotenone on the respiratory enzyme system of insect muscle. *Bull. Nat. Inst. Agr. Sci. Japan, Ser. C* 13: 33-45.
- FU-SHUN, Y., EVANS, K. A., STEVENS, L. H., VAN BEEK, T. A. and SCHOONHOVEN, L. M. (1990): Deterrents extracted from the leaves of *Ginkgo biloba*: effects on feeding and contact chemoreceptors. *Entomol. Exp. Appl.* 54: 57-64.
- GOLS, G. J. Z., VAN LOON, J. J. A. and MESSCHENDORP, L. (1996): Antifeedant and toxic effects of drimanes on Colorado potato beetle larvae. *Entomol. Exp. Appl.* 79: 69-76.
- GOMBOS, M. A. and GASKÓ, K. (1977): Extraction of natural antifeedants from the fruits of *Amorpha fruticosa* L. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 12: 349-357.
- GRAYSON, J. McD. (1958): Digestive tract pH of six species of Coleoptera. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 51: 403-405.
- GRAZZI, G. and ROVESTI, L. (1996): Possible uses of Neem in agriculture. In: KLEEBERG, H. and MICHELETTI, V. (eds): *Practice oriented results on use and production of neem ingredients and pheromones IV*. Trifolio-M GmbH.
- GREEN, T. R. and RYAN, C. A. (1972): Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defence mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.
- GRÓSZ G. (2003): A tápanyag-ellátás hatásainak vizsgálata digitális módszerekkel. TDK dolgozat, Keszthely
- GRUDEN, K., STRUKELJ, B., POPOVIC, T., LENARCIC, B., BEVEC, T., BRZIN, J., KREGAR, I., HERZOG-VELIKONJA, J., STIEKEMA, W. J., BOSCH, D. and JONGSMA, M. A. (1998): The cysteine protease activity of colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 549-560.

- GRUDEN, K., POPOVIC, T., CIMERMAN, N., KRIZAJ, I. and STRUKELJ, B. (2003): Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, 'intestains', enable Colorado potato beetle larvae to counteract the potato defence mechanism. *Biol. Chem.* 384: 305-310.
- HALEY SPERLING, J. L. and MITCHELL, B. K. (1991): A comparative study of host recognition and the sense of taste in *Leptinotarsa*. *J. Exp. Biol.* 157: 439-459.
- HAM, W. E. and SANDSTEDT, R. M. (1945): A proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soy bean meal. *J. Biol. Chem.* 154: 505-506.
- HARBORNE, J. B. and BAXTER, H. (eds) (1993): *Phytochemical dictionary. A handbook of bioactive compounds from plants.* Taylor & Francis pp. 1-791.
- HARE, J. D. (1990): Ecology and management of the Colorado potato beetle. *Annu. Rev. Entomol.* 35: 81-100.
- HASSANALI, A., BENTLEY, M. D., OLE SITAGO, E. N., NJOROGI, P. E. and YATAGAI, M. (1986): Studies on limonoid insect antifeedants. *Insect Sci. Appl.* 7: 495-499.
- HOFFMANN, M. P., ZALOM, F. G., WILSON, L. T., SMILANICK, J. M., MALYJ, L. D., KISER, J., HILDER, V. A. and BARNES, W. M. (1992): Field-evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor efficiency against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera, Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 85: 2516-2522.
- HORTON, D. R. (1995): Statistical considerations in the design and analysis of paired-choice assays. *Environ. Entomol.* 24: 179-192.
- HOUGHGOLDSTEIN, J. A. (1990): Antifeedant effects of common herbs on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* 19: 234-238.
- HOUGHGOLDSTEIN, J. and HAHN, S. P. (1992): Antifeedant and oviposition deterrent activity of an aqueous extract of *Tanacetum vulgare* L. on two cabbage pests. *Environ. Entomol.* 21: 837-844.
- JACOBSON, M. (ed.) (1988): *Focus on phytochemical pesticides: the neem tree.* Vol1. CRC Press, Boca Raton.
- JACOBSON, M. (1990): *Glossary of Plant-Derived Insect Deterrents.* CRC Press, Boca Raton, Florida.
- JERMY, T. (1958): Untersuchungen über Auffinden und Wahl der Nahrung beim Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Entomol. Exp. Appl.* 1: 179-208.
- JERMY, T. (1961): On the nature of the oligophagy in *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). *Acta Zool. Acad. Sci. Hung.* 7: 119-132.

- JERMY, T. (1966): Feeding inhibitors and food preference in chewing phytophagous insects. *Entomol. Exp. Appl.* 9: 1-12.
- JERMY, T. (1971): Biological background and outlook of the antifeedants approach to insect control. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* 6: 253-260.
- JERMY, T. (1990): Prospects of antifeedant approach to pest control – a critical review. *J. Chem. Ecol.* 16: 3151-3166.
- JOHNSON, R., NARVAEZ, J., AN, G. and RYAN, C. (1989): Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects of natural defence against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9871-9875.
- JONES, C. G. and COLEMAN, J. S. (1988): Leaf disc size and insect feeding preference: implications for assays and studies on induction of plant defense. *Entomol. Exp. Appl.* 47: 167-172.
- JONGSMA, M. A., BAKKER, P. L., PETERS, J., BOSCH, D. and STIEKEMA, W. J. (1995): Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity insensitive of inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8041-8045.
- JONGSMA, M. A., STIEKEMA, W. J. and BOSCH, H. J. (1996): Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. *Trends Biotechnol.* 14: 331-333.
- JONGSMA, M. A. and BOLTER, C. (1997): The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43: 885-895.
- KLOCKE, J. A. and KUBO, I. (1982): Citrus limonoid by-products as insect control agents. *Entomol. Exp. Appl.* 32: 299-301.
- KLOSE, A. A., HILL, B. and FEVOLD, H. L. (1946): Presence of a growth inhibiting substance in raw soybeans. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 62: 10-12.
- KONDRÁK, M., KUTAS, J., SZENTHE, B., PATTHY, A., BÁNFALVI, Zs., NÁDASY, M., GRÁF, L. and ASBÓTH, B. (2005): Inhibition of Colorado potato beetle larvae by a locust proteinase inhibitor peptide expressed in potato. *Biotechnol. Lett.* 27: 829-834.
- KRISHNAKUMARI, G. N., BHUVANESWARI, B. and SWAPNA, I. R. (2001): Antifeedant activity of quinones from *Ventilago madaraspatana*. *Fitoterapia* 72: 671-675.
- KUTAS, J., NÁDASY, M., GRÁF, L. and ASBÓTH, B. (2003): Antifeedant effects of several natural substances on some phytophagous insect species. Lectures and Papers presented at the 6th Slovenian Conference on Plant Protection, Zrece, 4-6. March 2003. pp. 239-241.
- KUTAS J. and NÁDASY M. (2005): *Ajuga chamaepitys*- és *Azadirachta indica*- kivonatok táplálkozásgátló hatásának összehasonlítása. *Növényvédelem* 41: 129-136.

- LANE, G. A., BIGGS, D. R., RUSSEL, G. B., SUTHERLAND, O. R. W., WILLIAMS, E. M., MAINDONALD, J. H. and DONNEL, D. J. (1985): Isoflavonoid feeding deterrents for *Costelytra zealandica*. *J. Chem. Ecol.* 11: 1713-1735.
- LAUBER É., GHARIB, A., KINCSES J., VAJDICS Gy., FEKETE G. and DARVAS B. (2004): Ínfű fajok (*Ajuga* spp.) örleményeinek hatása aszalványmolyon (*Plodia interpunctella* Hübner). *Növényvédelem* 40: 559-569.
- LAWRENCE, P. K. and KOUNDAL, K. R. (2002): Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electron. J. Biotechnol.* 5: 93-109.
- LIU, Y. B., ALFORD, A. L., RAJAB, M. S. and BENTLEY, M. D. (1990): Effects and modes of action of citrus limonoids against *Leptinotarsa decemlineata*. *Physiol. Entomol.* 15: 37-45.
- LOCKWOOD, Jr., III. (1998): On the statistical analysis of multiple choice preference experiments. *Oecologia* 116: 475-481.
- LÓPEZ-OLGUÍN, J., de la TORRE, M. C., ORTEGO, F., CASTANERA, P. and RODRIGUEZ, B. (1999): Structure-activity relationships of natural and synthetic neo-clerodane diterpenes from *Teucrium* against Colorado potato beetle larvae. *Phytochemistry* 50: 749-753.
- LUO, L. E., van LOON, J. J. A. and SCHOONHOVEN, L. M. (1995): Behavioural and sensory responses to some neem compounds by *Pieris brassicae* larvae. *Physiol. Entomol.* 20: 134-140.
- LYMAN, R. L. and LEPKOVSKY, S. (1957): The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. *J. Nutr.* 62: 269-284.
- MA, W. C. (1972): Dynamics of feeding responses in *Pieris brassicae* Linn. as a function of chemosensory input, a behavioural, ultrastructural and electrophysiological study. *Meded. Landbouwhogeschool Wageningen, 72-11*: 1-162.
- MAJOR, R. T. (1967): The ginkgo, the most ancient living tree. *Science* 157: 1270-1273.
- MARQUIS, R. J. and BRAKER, H. E. (1987): Influence of method of presentation on results on plant-host preference tests with two species of grasshopper. *Entomol. Exp. Appl.* 44: 59-63.
- MATSUMOTO, T. and SEI, T. (1987): Antifeedant activities of *Ginkgo biloba* L. components against the larva of *Pieris rapae crucivora*. *Agric. Biol. Chem.* 51: 249-250.
- MENDEL, M. J., ALFORD, A. R. and BENTLEY, M. D. (1991): A comparison of the effects of limonin on Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, and fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, larval feeding. *Entomol. Exp. Appl.* 58: 191-194.

- MESSCHENDORP, L., GOLS, G. J. Z. and VAN LOON, J. J. A. (2000): Behavioural observations of *Pieris brassicae* larvae indicate multiple mechanisms of action of analogous drimane antifeedants. *Entomol. Exp. Appl.* 95: 217-227.
- METZGER, F. W. and GRANT, D. H. (1932): Repellency to the Japanese beetle of extracts made from plants immune to attack. *USDA Tech. Bull.* 299. p. 21.
- MICHAUD, D., NGUYEN-QUOC, B., VRAIN, T. C., FONG, D. and YELLE, S. (1996): Response of digestive proteinases from the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) and the black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) to a recombinant form of human stefin A. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 451-464.
- MITCHELL, B. K. (1994): The chemosensory basis of host-plant recognition in Chrysomelidae. In: JOLIVET, P. H., COX, M. L. and PETITPIERRE, E. (eds): *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*. Kluwer Academic Publishers pp. 141-151.
- MITCHELL, B. K. and GREGORY, P. (1979): Physiology of the maxillary sugar sensitive cell in the red turnip beetle (*Entomoscelis americana*). *J. Comp. Physiol.* 132: 167-178.
- MITCHELL, B. K. and GREGORY, P. (1981): Physiology of the lateral galeal sensillum in red turnip beetle larvae (*Entomoscelis americana* Brown): Responses to NaCl, Glucosinolates and other Glucosides. *J. Comp. Physiol.* 144: 495-501.
- MITCHELL, B. K., ROLSETH, B. M. and MCCASHIN, B. G. (1990): Differential responses of galeal gustatory sensilla of the adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say), to leaf saps from host and non-host plants. *Physiol. Entomol.* 15: 61-72.
- MITCHELL, B. K. and MCCASHIN, B. G. (1994): Tasting green leaf volatiles by larvae and adults of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Chem. Ecol.* 20: 753-769.
- MUCKENSTURM, B., DUPLAY, D., MOHAMNADI, F. and MORADI, A. (1981): The role of natural phenylpropanoids as insect feeding deterrents. *Proc. Chem. Colloq., Versailles, France, Nov. 16-20.* p.131. (in French)
- MURDOCK, L. L., BROOKHART, G., DUNN, P. E., FOARD, P. E. and KELLEY, S. (1987): Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comp. Biochem. Physiol., Part, B. Biochem. Mol. Biol.* 87: 783-787.
- MURRAY, K. D., GRODEN, E., DRUMMOND, F. A., ALFORD, A. R., STORCH, R. H. and BENTLEY, M. D. (1996): Citrus limonoid effects on Colorado potato beetle larval survival and development. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 503-510.
- MURRAY, K. D., HASEGAWA, S. and ALFORD, A. R. (1999): Antifeedant activity of citrus limonoids against Colorado potato beetle: comparison of aglycones and glucosides. *Entomol. Exp. Appl.* 92: 331-334.

- NÁDASY, M. and GÁL, Cs. (1995): Nutrition inhibition by *Ajuga* sp. plants studied with two major insect pests (*Sitona humeralis* Steph., *Pieris brassicae* L.). *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 30: 283-289.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1992): *Neem, a tree for solving global problems*. National Academy Press, Washington DC.
- NAWROT, J., KOUL, O., ISMAN, M. B. and HARMATHA, J. (1991): Naturally occurring antifeedants: Effects on two polyphagous lepidopterans. *J. Appl. Entomol.* 112: 194-201.
- NELSON, C. E., WALKER-SIMMONS, M., MAKUS, D., ZUROSKE, G., GRAHAM, J. and RYAN, C. A. (1983): Regulation of synthesis and accumulation of proteinase inhibitors in leaves of wounded tomato plants. In: HEDIN, P. A. (ed): *Plant Resistance to Insects*. American Chemical Society, Washington pp. 103-122.
- NOVILLO, C., CASTANERA, P. and ORTEGO, F. (1997): Characterisation and distribution of chymotrypsin and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 36: 181-201.
- OROZCO-CARDENAS, M., MCGURL, B. and RYAN, C. A. (1993): Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8273-8276.
- ORTEGO, F., RODRIGUEZ, B. and CASTANERA, P. (1995): Effects of neo-clerodane diterpenes from *Teucrium* on feeding behaviour of Colorado potato beetle larvae. *J. Chem. Ecol.* 21: 1375-1386.
- ORTEGO, F., NOVILLO, C., SANCHEZ-SERRANO, J. J. and CASTANERA, P. (2001): Physiological response of Colorado potato beetle and beet armyworm larvae to depletion of wound-inducible proteinase inhibitors in transgenic potato plants. *J. Insect Physiol.* 47: 1291-1300.
- OUTCHKOUROV, N. S., ROGELJ, B., STRUKELJ, B. and JONGSMA, M. A. (2003): Expression of sea anemone equistatin in potato. Effects of plant proteases on heterologous protein production. *Plant Physiol.* 133: 379-390.
- OVERNEY, S., FAWE, A., YELLE, S. and MICHAUD, D. (1997): Diet-related plasticity of the digestive proteolytic system in larvae of the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 36: 241-250.
- PANASIUK, O. (1984): Response of Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* (Say) to volatile components of tansy, *Tanacetum vulgare*. *J. Chem. Ecol.* 10: 1325.

- PATTHY, A., AMIR, S., MALIK, Z., BÓDI, Á., KARDOS, J., ASBÓTH, B. and GRÁF, L. (2002): Remarkable phylum selectivity of a *Schistocerca gregaria* trypsin inhibitor: the possible role of enzyme-inhibitor flexibility. Arch. Biochem. Biophys. 398: 179-187.
- PEARCE, G., STRYDOM, D., JOHNSON, S. and RYAN, C. A. (1991): A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. Science 253: 895-898.
- PENA-CORTES, H., SANCHEZ-SERRANO, J. J. and WILLMITZER, L. (1988): Systemic induction of proteinase inhibitor II gene expression in potato plants by wounding. Planta 174: 84-89.
- PRÉCSÉNYI I. (1995): Alapvető kutatástervezési, statisztikai és projectértékelési módszerek a szupraindividuális biológiában. KLTE Egyetemi Könyvkiadó, Debrecen.
- RAFFA, K. F. and FRAZIER, J. L. (1988): A generalized model for quantifying behavioural desensitization to antifeedants. Entomol. Exp. Appl. 46: 93-100.
- RAY, D. E. (1991): Pesticides derived from plants and other organisms. In: HAYES, W. J. Jr. and LAWS, E. R. Jr. (eds): Handbook of Pesticide Toxicology. Vol.2, Classes of Pesticides, Academic Press, San Diego, CA. pp. 585-636.
- READ, J. W. and HAAS, L. W. (1938): The baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. Cereal Chem. 15: 59-68.
- RICHARDSON, M. J. (1991): Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: DEY, P. M. and HARBORNE, J. B. (eds): Methods in Plant Biochemistry, New York, Academic Press 5: 259-305
- RISCH, S. J. (1985): Effects of induced chemical changes on interpretation of feeding preference tests. Entomol. Exp. Appl. 39: 812-884.
- ROWAN, D. D. and TAPPER, B. A. (1989): An efficient method for the isolation of peramine, an insect feeding deterrent produced by the fungus *Acremonium lolii*. J. Nat. Prod. (Lloydia) 52: 193-195.
- RYAN, C. A. (1990): Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 425-449.
- RYAN, C. A., HASS, G. M. and KUHN, R. W. (1974): Purification and properties of a carboxipeptidase inhibitor from potatoes. J. Biol. Chem. 249: 5495-5499.
- SANCHEZ-SERRANO, J. J., SCHMIDT, R., SCHELL, J. and WILMITZER, L. (1986): Nucleotide sequence of proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato (*Solanum tuberosum*) and its mode of expression. Mol. Gen. Genet. 203: 15-20.

- SÁRINGER, G. (1967): Nutrient consumption of the alfalfa weevil (*Hypera (Phytonomus) variabilis* HRBST. (Coleoptera, Curculionidae)). Acta Agronomica Acad. Scient. Hung. 16: 113-120.
- SAXENA, R. C. (1987): Antifeedants in tropical pest management. Insect Sci. Applic. 8: 731-736.
- SCHMUTTERER, H. (ed) (1995): Neem tree – source of unique natural products for integrated pest management, medicine industry and other purposes. VCH, Weinheim.
- SCHMUTTERER, H. and TERVOOREN, G. (1980): Die Wirkung von Rohpresssaften und Rohextrakten aus Ajuga-arten auf Frassaktivität und Metamorphose von *Epilancha varivestis*. Z. angew. Ent. 89: 470-478.
- SCHOONHOVEN, L. M. (1967): Chemoreception of mustard oil glucosides in larvae of *Pieris brassicae*. Proc. K. Ned. Akad. Wet. C, 70: 556-568.
- SCHOONHOVEN, L. M. (1982): Biological aspects of antifeedants. Entomol. Exp. Appl. 31: 57-69.
- SCHOONHOVEN, L. M. (1987): What makes a caterpillar eat? The sensory code underlying feeding behaviour. In: CHAPMAN, R. F., BERNAYS, E. A. and STOFFOLANO, J. G. (eds): Advances in chemoreception and behaviour. Springer-Verlag, New York pp. 69-97.
- SCHOONHOVEN, L. M., BLANEY, W. M. and SIMMONDS, M. S. J. (1992): Sensory coding of feeding deterrents in phytophagous insects. In: BERNAYS, E. A. (ed): Insect-plant interactions. CRC Press, Boca Raton, Florida pp. 59-79.
- SCHOONHOVEN, L. M., JERMY, T. and van LOON, J. J. A. (1998): Insect-Plant Biology, from Physiology to Evolution. Chapman & Hall, London pp. 1-409.
- SCHULER, T. H., POPPY, G. M., KERRY, B. R. and DENHOLM, I. (1998): Insect-resistant transgenic plants. Trends Biotechnol. 16: 168-174.
- SEPRŐS I. szerk. (1999): Növényorvoslás a kertben. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest pp. 1-299.
- SHEARER, W. R. (1984): Components of oil of tansy (*Tanacetum vulgare*) that repel Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*). J. Nat. Prod. 47: 964-969.
- SHIELDS, V. D. C. and MITCHELL, B. K. (1995): The effect of phagostimulant mixtures on deterrent receptor(s) in two crucifer-feeding lepidopterous species. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 347: 459-464.
- SIMMONDS, M. S. and BLANEY, W. M. (1991): Gustatory codes in lepidopterous larvae. Symp. Biol. Hung. 39: 17-27.
- SIMMONDS, M. S. J., BLANEY, W. M., LEY, S. V., SAVONA, G., BRUNO, M. and RODRIGUEZ, B. (1989): The antifeedant activity of clerodane diterpenoids from *Teucrium*. Phytochemistry 28: 1069-1071.

- SIMONET, G., CLAEYS, I. and VANDEN BROECK, J. (2002): Structural and functional properties of a novel serine protease inhibiting peptide family in arthropods. *Comp. Biochem. Physiol., Part B, Biochem. Mol. Biol.* 132: 247-255.
- STÄDLER, E. (1992): Behavioural responses of insects to plant secondary compounds. In: ROSENTHAL, G. A. and BERENBAUM, M. R. (eds): *Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites*. 2nd edn, vol. 2, Academic Press, New York pp. 45-88.
- STRUKELJ, B. (1992): Characterization of aspartic proteinase inhibitors from potato at the gene, cDNA and protein levels. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373: 477-482.
- SUTCLIFFE, J. F. and MITCHELL, B. K. (1980): Structure of galeal sensory complex in adults of the red turnip beetle, *Entomoscelis americana* Brown (Coleoptera, Chrysomelidae). *Zoomorphology*, 96: 63-76.
- SZENTESI Á. (1990): Táplálkozást és petézést gátló anyagok. In: DARVAS B. (szerk.) *Növényvédelmi rovarélettan és toxikológia*. DATE Nyomda, Debrecen pp. 141-144.
- SZENTESI, Á., GREANY, P. D. and CHAMBERS, D. L. (1979): Oviposition behavior of laboratory-reared and wild Caribbean fruit flies (*Anastrepha suspensa*; Diptera: Tephritidae): I. Selected chemical influences. *Entomol. Exp. Appl.* 26: 227-238.
- SZENTESI, A. and BERNAYS, A. (1984): A study of behavioural habituation to a feeding deterrent in nymphs of *Schistocerca gregaria*. *Physiol. Entomol.* 9: 329-340.
- SZENTESI Á. és JERMY T. (1999): A preferencia értékelésének problémái. *Állattani Közlemények* 84: 3-19.
- SZENTESI Á. és JERMY T. (2002): Újabb adatok a burgonyabogár biológiájának ismeretéhez. 7. Tiszántúli Növényvédelmi Fórum, Előadások-Proceedings. 2002.10.16-17., Debrecen pp. 3-11.
- SZENTHE, B., GÁSPÁR, Z., NAGY, A., PERCZEL, A. and GRÁF, L. (2004): Same fold with different mobility: backbone dynamics of small protease inhibitors from the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry* 43: 3376-3384.
- USHER, B. F., BERNAYS, E. A. and BARBEHENN, R. V. (1988): Antifeedant tests with larvae of *Pseudoletia unipuncta*: Variability of behavioral response. *Entomol. Exp. Appl.* 48: 203-212.
- VAILLANT, J. and DERRIDJ, S. (1992): Statistical analysis of insect preference in two-choice experiments. *J. Insect Behav.* 5: 773-781.
- VAN LOON, J. J. A. (1990): Chemoreception of phenolic acids and flavonoids in larvae of two species of *Pieris*. *J. Comp. Physiol. A.* 166: 889-899.

- VAN LOON, J. J. A. (1996): Chemosensory basis of feeding and oviposition behaviour in herbivorous insects: a glance at the periphery. *Entomol. Exp. Appl.* 80: 7-13.
- VAN LOON, J. J. A. and SCHOONHOVEN, L. M. (1999): Specialist deterrent chemoreceptors enable *Pieris* caterpillars to discriminate between chemically different deterrents. *Entomol. Exp. Appl.* 91: 29-35.
- VÁRNAGY L. és BUDAI P. (1995): Agrárkémiai higiénia. Mezőgazda Kiadó, Budapest pp. 1-271
- VERSCHAFFELT, E. (1910): The causes determining the selection of food in some herbivorous insects. *Proc. K. Ned. Akad. Wet.* 13: 536-542.
- VILLANI, M. G. and GOULD, F. (1985): Screening of crude plant extracts as feeding deterrents of the wireworm, *Melanotus communis*. *Entomol. Exp. Appl.* 37: 69-74.
- VILLANI, M. G., MEINKE, M. G. and GOULD, F. (1985): Laboratory bioassay of crude extracts as antifeedants for the southern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environ. Entomol.* 14: 617-622.
- VISSER, J. H. (1986): Host odor perception in phytophagous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 31: 121-144.
- VOLKONSKY, M. (1937): Sur l'action acridifuge des extraits de feuilles de *Melia azedarach*. *Arch. Inst. Pasteur Algér.* 15: 427-432.
- WALKER, A. J., FORD, L., MAJERUS, M. E. N., GEOGHEGAN, I. E., BIRCH, A. N. E., GATEHOUSE, J. A. and GATEHOUSE, A. M. R. (1998): Characterisation of the midgut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 173-180.
- WESTFALL, R. J. and HAUGE, S. M. (1948): The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. *J. Nutr.* 35: 374-389.
- WHEELER, G. S., SLANSKY, F. Jr. and YU, S. J. (2001): Food consumption, utilization and detoxification enzyme activity of larvae of three polyphagous noctuid species when fed the botanical insecticide rotenone. *Entomol. Exp. Appl.* 98: 225-239.
- WOLFSON, J. L. (1988): Bioassay techniques: an ecological perspective. *J. Chem. Ecol.* 14: 1951-1963.
- WOLFSON, J. L. and MURDOCK, L. L. (1987): Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. *Entomol. Exp. Appl.* 44: 235-240.
- WOLFSON, J. L. and MURDOCK, L. L. (1990): Diversity in digestive proteinase activity among insects. *J. Chem. Ecol.* 16: 1089-1102.

ZEHNDER, G. and WARTHEN, J. D. (1988): Feeding inhibition and mortality effects of neem-seed extract on the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 81: 1040-1044.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Elsőként vizsgáltuk a sivatagi sáskából izolált *Schistocerca gregaria* trypsin chymotrypsin inhibitor (SGTCI) peptid táplálkozást gátló hatását burgonyabogár lárvákon transzgénikus burgonyanövények segítségével.
2. Újdonságnak számít az a kísérletsorozatunk, amelyben az *Ajuga chamaepitys* és az *Azadirachta indica* kivonatok táplálkozásgátló hatását hasonlítottuk össze két dózisban négy kártevőfajjal szemben. Ezzel először nekünk sikerült bizonyítani azt, hogy az *A. chamaepitys* metanolos kivonatának fagoinhibitor hatékonysága eléri a formált növényvédő szerként forgalmazott neem kivonatót.
3. A kaporlevelű ebszékfű (*Matricaria inodora*) metanolos kivonatának burgonyabogár lárvákon vizsgált deterrens hatásáról először sikerült kimutatni, hogy erősebb, mint az *Ajuga chamaepitys* hasonló módszerrel készült kivonatának hatása. Ennek alapján további kutatások elvégzését javasoljuk az ebszékfűvel, mely szerintünk megfelelő alapanyagként szolgálhat egy új botanikai inszekticid kifejlesztéséhez.
4. Mi számoltunk be arról először, hogy a kislevelű hárs (*Tilia cordata*) vizes kivonata erősen gátolja lucerna-csipkézőbarkó (*Sitona humeralis*) imágók táplálkozását.
5. Metanolos kivonatot készítettünk selyemmályva (*Abutilon theophrasti*) terméséből, és elsőként vizsgáltuk deterrens hatását burgonyabogár lárvákon.

NEW SCIENTIFIC RESULTS

1. We were the first to examine the feeding inhibitory effect of *Schistocerca gregaria* trypsin chymotrypsin inhibitor, a peptid isolated from the desert locust on Colorado potato beetle larvae with the help of transgenic plants.
2. Our series of bioassays, in which we compared the insect antifeedant activities of *Ajuga chamaepitys* and *Azadirachta indica* extracts at two rates against four pest species, can be considered new. Our results proved that the *A. chamaepitys* methanolic extract can inhibit the feeding of several pest species as strongly as the neem extract (NeemAzal T/S).
3. The feeding deterrent effect of *Matricaria inodora* methanolic extract against Colorado potato beetle larvae was first demonstrated stronger than that of *Ajuga chamaepitys*. We recommend further research with *M. inodora*, which can be an adequate base for developing a new botanical insecticide.
4. We reported first that the aqueous extract of *Tilia cordata* could strongly inhibit the feeding of *Sitona humeralis* adults.
5. Methanolic extract was made from *Abutilon theophrasti* and its deterrent effect was first examined on Colorado potato beetle larvae.