

ارزیابی احتمال خطر یونجه‌های تراریخته

مسعود توحیدفر

پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

gtohifar@abrii.ac.ir

چکیده

تا پایان سال ۲۰۱۲ سطح زیر کشت محصولات تراریخته به بیش از ۱۷۰/۳ میلیون هکتار رسید که از این میان بیش از ۱۰۰ میلیون هکتار به پنبه، ذرت، سویا و یونجه تراریخته اختصاص داشت. آمریکا با تولید یونجه‌های تراریخته مقاوم به علف‌کش بیش‌ترین سطح زیر کشت را دارا است. در ایران و خاورمیانه هم برای اولین مرتبه یونجه تراریخته متحمل به آفات حشره‌ای (Bt) تولید شد، اگرچه تولید تجاری آن هنوز انجام نشده است. به منظور تجزیه و تحلیل احتمال خطر محصولات تراریخته، قوانین و استانداردهایی وجود دارد تا بتوان به‌وسیله آن‌ها ایمنی آن را تضمین کرد. تولید یونجه Bt، تعداد دفعات سم‌پاشی و هزینه کاربرد حشره‌کش‌های مورد نیاز جهت کنترل آفت‌ها را کاهش می‌دهد. پروتئین Cry3 موجود در یونجه تراریخته با پروتئین‌های Cry که به‌صورت سالم برای ۴۰ سال مورد استفاده قرار گرفته‌اند، قابل مقایسه است. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که پروتئین Cry، برای موجودات زنده غیرهدف و محیط زیست فاقد خطر است. بر اساس داده‌ها و اطلاعات قابل دسترس و تجربیات گردآوری شده، یونجه Bt، تاثیری مشابه با یونجه‌های تیمار شده با حشره‌کش را دارد. هدف از این مقاله بررسی جنبه‌های علمی ارزیابی احتمال خطر کشت یونجه تراریخته Bt است. مطالعه این مقاله و آشنایی با نحوه ارزیابی یونجه تراریخته می‌تواند برای اهل فن و به‌ویژه مسئولین نظارتی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: یونجه Bt، ایمنی زیستی، ملاحظات، آفت، مهندسی ژنتیک.

مقدمه

امروزه به دلیل استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی و اثر سو آن‌ها بر محیط زیست و سلامتی انسان، توجه دانشمندان و پژوهشگران به روش‌های کنترل بیولوژیک معطوف شده است. یکی از میکروارگانیسم‌های کاربردی در این زمینه *Bacillus thuringiensis* است که از لحاظ مقدار و وسعت کاربرد، در مقام اول قرار دارد. این باکتری یک باکتری میله‌ای شکل، گرم مثبت و اسپورزا است. این باکتری دارای ژن‌هایی با نام *cry* است که پروتئین‌های کریستالی تولید می‌کند. این پروتئین‌ها برای بعضی از گونه‌های حشرات سمی است. این فعالیت سمی شامل لارو حشرات مختلفی از جمله فلس بالان، دوبالان، سخت بال‌پوشان و هم‌چنین موجوداتی از جمله کرم‌های پهن، نماتدها و تک‌یاخته‌ها می‌شود. مزیت عمده‌ی این باکتری، اختصاصی بودن برای میزبان‌های مختلف است، به‌طوری که برای حشرات و گیاهان دیگر، حالت سمی ندارد. نحوه عملکرد این باکتری بدین صورت است که کریستال‌های پروتئینی^۱ پس از هضم توسط پروتئازهای موجود در قسمت میانی مجرای

هاضمه حشره به جاهای ویژه‌ای در راس ریز پرزهای سلول‌های مخاطی مجرای هاضمه لاروها می‌چسبد و پس از چسبیدن، وارد فضای پلاسمایی سلول و باعث ایجاد جراحت و زخم شده که این زخم موجب ورود یون‌ها و آب و در نهایت منجر به آماس و تخریب سلول می‌شود. بدین ترتیب، دیواره روده، پاره شده و موجب عفونت خون در حشره می‌شود (۲).

تا کنون گیاهان تراریخته Bt زیادی مانند ذرت، پنبه و سویا تجاری شده‌اند (۱۵) و برای اولین مرتبه در ایران و در منطقه خاورمیانه یونجه تراریخته مقاوم به آفات حشره‌ای تولید شد که کلیه مراحل کشت بافت، بهینه سازی مراحل انتقال ژن، انتخاب سلول‌های تراریخته و در نهایت انتقال موفق ژن به یونجه در ایران انجام شد. انجام پژوهش‌های گسترده زیست‌سنجی و بررسی مقاومت گیاهان حاصل در آزمایشگاه و گلخانه تحت نظارت کامل نسبت به آفت سرخرطومی یونجه انجام شد (۱). آفت سرخرطومی برگ یونجه که از مهم‌ترین آفت‌های یونجه محسوب می‌شود، در ایران باعث انهدام چین اول و خسارت ۳۳ درصد کل محصول می‌شود. به‌منظور کنترل آن

1- Crystal Protein

هر سال در سطح وسیعی علیه آن مبارزه می‌شود. با توجه به چرخه زندگی آفت استفاده از سموم نه تنها موثر نیست، بلکه باعث آلودگی زیست‌محیطی و به خطر انداختن سلامتی جامعه و نسل‌های آینده خواهد شد. از آنجایی که منبع مقاومتی در ژرم‌پلاس‌های گیاهی وجود ندارد (۲۶)، مهندسی ژنتیک راه حل بسیار مناسبی برای کاهش مصرف سموم و مبارزه با این آفت است. با استفاده از این فناوری ژن *cry3* از باکتری *Bacillus thuringiensis tenebrionis* جدا و به یونجه منتقل شده است. گیاهان تولید شده همگی بارور بودند (۲۸). آزمایش زیست‌سنجی که توسط لارو سرخرطومی روی یونجه تراریخته نسل اول صورت گرفت نشان داد که این یونجه دارای مقاومت بالایی در مقابل این آفت بوده است. اما با توجه به ملاحظات ابراز شده لازم است قبل از رهاسازی، ارزیابی احتمال خطر، به‌منظور تایید ایمنی آنها انجام شود.

جنبه‌های ایمنی زیستی یونجه تراریخته

۱- آلرژی‌زا بودن

تنها یونجه دست‌ورزی شده تجاری در

حال حاضر یونجه Round up Ready (RR) است که متحمل به علف‌کش گلیفوسات است (۱۵). علوفه یونجه برای ۳ گروه بزرگ گاوهای شیری پروری و اسب‌ها و در مقدار کمتر برای بزها و گوسفندان و خرگوش‌ها و جانوران خانگی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در حدود ۷۵ درصد علوفه یونجه برای تولید لبنیات استفاده می‌شود. ایمنی استفاده از یونجه به‌عنوان یک گیاه زراعی در طی سالیان سال امری مسلم و مشهود است. یونجه کمتر به‌عنوان غذای انسان مصرف می‌شود گاهی یونجه در قالب برگ‌های فشرده به‌عنوان مکمل غذایی و چای مصرف می‌شود. معمولاً مصرف برگ‌های یونجه در حجم زیاد و به‌صورت تازه به‌علت حضور ساپونین و مواد ضد تغذیه‌ای مضر است. در یونجه گرده‌افشانی و انتقال دانه گرده با توجه به ساختمان ویژه گل در گیاهان خانواده بقولات به‌وسیله حشرات از جمله زنبورعسل انجام می‌شود که این زنبورها در هنگام گرده افشانی یک مسیر مستقیم را از کندو به سمت مزرعه و برعکس طی می‌کنند (۲۰)، بنابراین پتانسیل یونجه به‌عنوان یک عامل آلرژی‌زا از طریق هوا، بسیار کم و ناچیز است. به‌علاوه استفاده

از یونجه به عنوان غذای انسان چه در قبل و چه در حال حاضر خیلی محدود است. گزارش های تایید شده برای آلرژی های انسانی به محصولات غذایی مشتق شده از یونجه بسیار نادر است، ولی انسان می تواند از طریق غیرمستقیم و مصرف مواد گوشتی در معرض یونجه تراریخته قرار گیرد که احتمال وجود چنین خطری در زیر مورد بحث و بررسی قرار خواهد گرفت.

احتمال قرار گرفتن افراد در معرض یونجه تراریخته می تواند از طریق زیر باشد.

- هنگام برداشت علوفه (در مزارع یونجه، در مراحل فرآوری یونجه).
- زندگی کردن در مناطق نزدیک ناحیه کشت یونجه تراریخته.

افرادی که با یونجه کار می کنند به طور معمول با لایه کوتیکول خارجی یونجه در سطح گیاه سر و کار دارند که عاری از پروتئین هستند. تماس با پروتئین ها (شامل پروتئین های جدید بیان شده در یونجه تراریخته) و سایر اجزای سلولی گیاه یونجه تنها هنگامی اتفاق می افتد که سلول های یونجه پاره شوند و یا آسیب ببینند. حتی اگر سلول ها آسیب ببینند، تماس با پروتئین های موجود در

یونجه تراریخته به علت بیان پایین این پروتئین ها بسیار کم خواهد بود.

یکی از راه های کاهش ملاحظه های زیست محیطی محصولات تراریخته تولید گیاهان تراریخته کلیستوگام است. یونجه گیاهی است با گل های کلیستوگام یا بسته که امکان مهاجرت دانه گرده بدون عمل ترپینگ حشرات وجود ندارد و بنابراین دانه های گرده به آسانی توسط باد حمل نمی شوند (۴)، بنابراین احتمال تماس با دانه گرده و آلرژی زا بودن آنها بسیار محدود است و این در حالی است که پروتئین های بیان شده در یونجه تراریخته در سطوح پایین در دانه گرده بیان می شوند. تماس پوستی کارگران با گرده امکان پذیر است، که البته احتمال این تماس بسیار پایین و دور از انتظار است.

عامل دیگری که به عامل آلرژنی پروتئین های غذایی کمک می کند، تجمع بالای آنها در غذاها است (۱۲). برعکس پروتئین Cry با سطوح پایین در یونجه Bt وجود دارند و در اجزای تشکیل دهنده یونجه قابل تشخیص نیستند.

به نظر می رسد که احتمال سمی بودن و آلرژی زا بودن یونجه Bt برای انسان به دلایل

زیر بسیار کم است.

محصولات یونجه تراریخته به‌طور مستقیم به‌عنوان غذای انسان استفاده نمی‌شوند و احتمال این‌که انسان در معرض پروتئین‌های Cry موجود در یونجه تراریخته قرار بگیرد بسیار پایین و کم است. گرده یونجه به‌طور معمول در هوا توسط باد پخش نمی‌شود بنابراین نمی‌تواند به‌عنوان یک عامل آلرژی‌زا هوایی محسوب شود پروتئین‌های Cry در حال حاضر به‌طور وسیعی در طبیعت و محیط زیست پراکنده‌اند، پروتئین‌های Cry سمیت گوارشی بسیار پایینی دارند پروتئین‌های Cry به‌عنوان یک آلرژی‌زا شناخته نمی‌شوند زیرا خصوصیات پروتئین‌های آلرژی‌زای شناخته شده را ندارند.

۲- احتمال خطر سمی بودن یونجه Bt

یونجه به‌صورت خشک و تازه در تغذیه دام مصرف می‌شود و استفاده از آن سابقه مصرف ایمن دارد. علاوه بر یونجه‌های مقاوم به علف‌کش، یونجه‌های Bt هم تولید شده‌اند که مقاوم به آفات از جمله سرخرطومی یونجه هستند (۲۸) و ارزیابی آلرژی آن‌ها نیز از اهمیت بسزایی برخوردار است. تجزیه‌های

ترکیبی یونجه‌های تراریخته شامل پروتئین، چربی، خاکستر، رطوبت، لیگنین، آمینواسیدها، K, Zn, N, P, Mn, Mg, Fe, Cu, Ca, Na و کربوهیدرات‌ها تفاوت آماری نسبت به یونجه‌های غیرتراریخته مشاهده نشد و یونجه‌های تراریخته مشابه یونجه‌های غیرتراریخته که در شمال آمریکا رشد می‌کنند بودند (۱۲).

پروتئین‌های Cry به‌طور وسیعی در محیط پراکنده هستند. فرمولاسیون‌های تجاری میکروبی Bt نیز دارای این پروتئین‌ها هستند و در طی ۳۰ سال استفاده شده‌اند (۳). سازمان حفاظت محیط زیست آمریکا (EPA)^۲ در بررسی‌های خود نتیجه گرفته است که اثرهای سو جانبی محصولات Bt برای پرندگان، آبزیان وحشرات مفید مانند شکارچی‌ها و زنبور عسل بسیار پایین است.

تغذیه از یونجه توسط حیوانات به‌طور معمول در سطح محدود انجام می‌شود و در بیشتر موارد از تغذیه یونجه به علت نفخ در سطح زیاد جلوگیری می‌شود. برای ایجاد اثر سمی در ابتدا باید پروتئین‌های Cry که به‌صورت پروتوکسین بیان می‌شوند به‌وسیله

2- Environmental Protection Agency

پروتئین‌های اختصاصی در روده میانی حشره هضم و تجزیه شوند و به گیرنده‌های اختصاصی موجود در سطح اپیتلیوم روده میانی اتصال یابند. پستانداران، پرندگان و ماهی‌ها این گیرنده‌ها را ندارند و بنابراین پروتئین‌های Cry نمی‌توانند روی آن‌ها اثر بگذارند (۲۲، ۲۳، ۲۴).

۳- احتمال تبدیل شدن به علف هرز

در ارزیابی احتمال تبدیل یونجه تراریخته به علف هرز، عوامل به ارث رسیدن صفت علف هرزی برای یونجه غیرتراریخته توانایی مزایای انتخابی که توسط پروتئین‌ها اعطا می‌شود و توانایی تبدیل یونجه تراریخته به علف‌هرز باید مورد بررسی قرار گیرد. یونجه قرن‌ها است که در سراسر جهان بدون هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر علف‌هرز بودن آن کشت و کار شده است. هیچ تلاقی شناخته شده‌ای میان یونجه‌های کشت شده با گیاهان وحشی یا علف‌هرز یا یونجه‌های وحشی دیگر در آمریکا مشخص نشده است (۱۳). یونجه‌های وحشی کنار جاده‌ها می‌توانند به‌عنوان یک پل بین گرده‌افشان‌ها و یونجه‌های تراریخته محسوب شوند و برای کاهش جریان

ژنی باید کنترل شوند. شواهدی مبنی بر اینکه یونجه، خصوصیات علف‌هرز یا ویژگی آفت دارد، وجود ندارد و یونجه‌های تراریخته تفاوتی با یونجه‌های معمولی در این مورد ندارند. یکی از خویشاوندان وحشی یونجه گیاه *M. lupulina* است که دو رگ بین *M. lupulina* و *M. sativa* به‌طور طبیعی ناممکن یا ناموفق است. بنابراین احتمال انتقال ژن از یونجه‌های تراریخته به خویشاوندان وحشی بسیار کم است. پس بنابراین امکان ایجاد خطر برای موجودات غیرهدف خیلی ناچیز است زیرا که امکان انتقال ژن پایین است. مشاهده و بررسی مزارع کشت یونجه تراریخته هیچ بیماری یا آفت تغییر ژنتیک یافته را نشان نداده است. پروتئین‌های Cry خصوصیت مقاومت به حشرات خانواده بال‌پولکداران را به یونجه می‌دهند. بررسی‌های انجام شده توسط سازمان‌های مدیریت آفات در استرالیا روی گیاهان Bt نشان داده است که هیچ‌گونه پتانسیل تبدیل شدن به علف‌هرز در پروتئین‌های Cry وجود ندارد (۱۰، ۱۶).

۴- انتقال ژن‌های *cry3* به دیگر موجودات

جریان ژنی عبارت از تلفیق ژن‌ها به داخل

خزانه ژنی یک جمعیت یا جمعیت‌های دیگر است. جریان ژنی بین گیاهان زراعی و جمعیت‌های وحشی در طول تاریخ همیشه اتفاق افتاده است (۸). از جمله عواملی که بر جریان ژن در جوامع گیاهی اثر می‌گذارند، انتشار بذر از طریق عوامل طبیعی یا انسان، انتقال افقی ژن و دانه گرده است. عوامل موثر در میزان و سرنوشت جریان ژنی شامل انتشار دانه، تعداد کشت گیاه در هر فصل زراعی و شایستگی ژن‌های خارجی در جمعیت پذیرنده است. مدیریت جریان ژنی از جمله رعایت فاصله و از بین بردن بقایای گیاه تراریخته اثرهای سو احتمالی جریان ژنی را کاهش می‌دهد.

به‌طور معمول در گیاهان برای انتقال ژن از طریق جنسی از یک گونه دیگر محدودیت‌هایی وجود دارد. احتمال انتقال ژن از یونجه تراریخته به چند عامل بستگی دارد که شامل موارد زیر هستند.

فرصت انتقال ژن در صورتی بدست می‌آید که والد پذیرنده در معرض مواد ژنتیک والد بخشنده قرار گیرد که به‌عنوان مثال می‌توان گرده سلول‌های گیاهی و یا دی.ان.ا را نام برد. قرارگرفتن مواد ژنتیک گیاه بخشنده و پذیرنده

در یک مکان و اجازه دادن برای شروع بیان و عمل آن ژن مواد ژنتیک منتقل شده در والد پذیرنده باقی بماند و دوباره بوجود آید و والد پذیرنده تغییرات ژنتیک را حفظ کند اطمینان از بی‌خطر بودن مواد ژنتیک منتقل شده به‌طوری که برای سلامتی انسان خطری نداشته باشند و تولید بذر آن انجام می‌شود. بنابراین نیازمند اقداماتی برای کنترل ایمنی و اطمینان از خلوص صفت منتقل‌شده توسط مهندسی ژنتیک و جلوگیری از صفت منتقل‌شده به سایر موجودات است (۹).

پژوهش‌های میدانی که در مناطق تولید بذر یونجه در ایالت آیداهو توسط زنبورهای برگ‌خوار انجام شده میزان فاصله مزرعه یونجه از سایر مزارع در حدود ۴ کیلومتر برآورد شد (۲۷). همچنین با پژوهش‌های انجام شده روی زنبورهای عسل در ایالت کالیفرنیا میزان انتشار دانه گرده یونجه اندازه‌گیری شد. بر پایه این پژوهش‌ها حداقل فاصله لازم برای جلوگیری از انتشار دانه گرده یونجه مقاوم به علف کش گلیفوسات ۱/۹ کیلومتر اندازه‌گیری شد (۱۱). بر اساس پژوهش‌های انجام شده روی یونجه‌های تراریخته و بررسی آن‌ها توسط نشانگر

مولکولی RAPD حداقل فاصله مورد نیاز برای جداسازی مزارع یونجه ۱۵۵۷ متر گزارش شده است (۲۰).

با رعایت کردن قوانین مربوط به ایمنی زیستی و با کشت یونجه تراریخته با فاصله حدود ۱۰۰۰ متر از انتقال این ژن‌ها به سایر گیاهان می‌توان جلوگیری کرد (۱۷).

تلاقی دو طرفه به‌طور معمول برای تولید بذر مورد نیاز است و نه برای تولید علوفه، بنابراین پتانسیل شارژ ژن برای یونجه علوفه‌ای مانند یونجه‌ای که برای بذرگیری پرورش داده می‌شود نیست. برای شارژ ژن از مزارع تولید یونجه علوفه‌ای به مزارع همسایه موارد زیر موثر هستند.

- ۱- باید زمان گلدهی و ساختار گل شبیه باشد.
- ۲- گرده‌افشان‌ها بین مزارع حرکت کنند. ۳-
- گرده توانایی بارور کردن گیاه را داشته باشد.
- ۴- جنین باید بتواند رشد کرده و به بذر تبدیل شود. ۵- بذر باید توانایی رشد و جوانه‌زنی را داشته باشد. ۶- برای شارژ ژن همه موارد بالا باید فراهم باشد.

استفاده از گیاهان تراریخته مقاوم به آفات در کشورهای توسعه‌یافته باعث کاهش مصرف سموم شیمیایی و هزینه‌های تولید شده است.

ولی با افزایش سطح زیر کشت این محصولات ملاحظات ملاحظاتی در خصوص تکامل جمعیت حشرات مقاوم وجود دارد. اگرچه تکامل آفات مقاوم در طول تاریخ ادامه داشته، اما این مشکل بعد از جنگ جهانی دوم بواسطه توسعه فناوری‌های نو و کشاورزی جدید با شدت بیشتری نمایان شد، با این حال تا سال ۲۰۰۱، نژاد مقاومی از حشرات آفت در مزارع کشت محصولات تراریخته گزارش نشده است (۲۵).

متخصصین روش‌های زیادی برای مدیریت مقاومت آفات ارایه داده‌اند که مهم‌ترین آن روش دوز بالا/ پناهگاه است. که نقش بسیار مهمی در به تاخیر انداختن مقاومت حشرات دارد. درمورد انتقال ژن به جمعیت‌های باکتریایی، گونه‌های باکتریایی، از لحاظ توانایی‌شان در پذیرش دی.ان.ای از محیط متفاوتند و فراوانی تراریزش، حتی تحت شرایط مناسب و مساعد، بسیار پایین است. ژن *cry3* که جهت ایجاد یونجه Bt استفاده می‌شود، در دی.ان.ای ژنومی گیاه تلفیق می‌شود و بخش کوچکی از ژنوم یونجه را شامل می‌شود. احتمال اینکه یک باکتری، ژن‌های هدف را از طریق تراریزش دریافت

موجود در ترکیبات خاک متصل شوند (۶) و (۲۱).

نتیجه‌گیری

کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی با استفاده از سم‌های شیمیایی، خسارات جبران ناپذیری بر سلامت مردم و محیط زیست وارد می‌کند. علاوه بر این با توجه به هزینه بالای سم‌های شیمیایی، استفاده از آفت‌کش‌های زیستی و تولید محصولات تراریخته Bt نیز یکی از راه کارهای مهمی است که در کشورهای مختلف دنیا دنبال می‌شود. باکتری Bt به دلیل اهمیت بالا در کنترل آفات‌های خاص و عدم اثر سو بر محیط زیست و سلامت انسان، به یک عامل بیولوژیک منحصر به فرد در کنترل آفات حشره‌ای تبدیل شده است. از طرفی تولید گیاهان Bt از لحاظ اقتصادی، بسیار مقرون به صرفه است (۲).

هیچ فناوری جدید یا قدیمی، بدون ریسک نبوده و بیوتکنولوژی هم به‌عنوان سومین تحول بزرگ در فناوری دنیا از این قاعده مستثنی نیست. اگر چه از زمان ظهور این فناوری تا به حال چالش‌ها و بحث‌های جنجال‌برانگیزی بر علیه آن مطرح شده است

کند، برابر با حالتی است که به‌صورت تصادفی، یک قطعه دی.ان.ای را از گیاه دریافت کند. انتقال افقی ژن تنها تحت شرایط ایده‌آل طراحی شده در آزمایش‌ها امکان‌پذیر است. علاوه بر این ژن Bt از باکتری خاکزی جدا شده است، بنابراین به نظر نمی‌رسد که دارای ارزش انتخابی برای میگروارگان‌های خاک باشند. بر اساس پژوهش‌های انجام شده اثرهای جانبی پروتئین Cry بر خاک به‌طور معمول ناچیز یا بی‌اثر بوده است (۱۸).

۵- سرنوشت پروتئین Cry3 در محیط

آزمایش‌های مربوط به ارزیابی سرنوشت پروتئین‌های Cry بیان شده در گیاهان تراریخته نشان داده است که این پروتئین‌ها نیز همانند بیشتر پروتئین‌های خوراکی در طول فرایندهای فرآوری گرمایی (پختن، اکستروژن، سرخ کردن و میکرو ویو) و تیمار با اسید یا باز قوی تجزیه و واسرشته می‌شوند (۵، ۷ و ۱۸).

بلورهای پروتئین Cry، در برابر دما و نور خورشید، تجزیه می‌شوند. پژوهش‌های انجام شده نشان داد که پروتئین‌های Cry می‌توانند به قطعات خاک رس و هیومیک اسیدها

ولی هر روز سطح زیر کشت محصولات ناشی
از این فناوری در حال افزایش است. به نظر
می‌رسد جامعه باید با نگرش منطقی، علمی و
بدون هیچ ادعای اغراق‌آمیز نسبت به این
فناوری قضاوت کند. تا کنون هیچ مدرکی دال
بر مضر بودن گیاهان Bt برای انسان،
موجودات دیگر و محیط زیست گزارش نشده
است.

References

منابع مورد استفاده

۱. توحیدفر م.، زارع ن. و افتخاری م. (۱۳۹۰). مهندسی ژنتیک یونجه برای افزایش مقاومت به آفت سرخرطومی یونجه. هفتمین کنگره بیوتکنولوژی. تهران شهریور.
۲. ریاضی ا.، زرگری ک. و کشاورزی م. (۱۳۸۸). شناسایی انواع ژن‌های *cry1* در نمونه‌های باسیلوس تورنچینسیس (*Bacillus thuringiensis*) جمع‌آوری شده از استان‌های خراسان و همدان. دانش زیستی ایران، ۲: ۱۲۳-۱۳۳.
3. Anzfa A. (1999). Full assessment report and regulatory impact statement, A341: Oil and linters derived from insect resistant cotton. Report No. A341, Australia new Zealand Food Authority, Canberra, Australia. pp 123.
4. Barnes D.K. Bingham E.T. Axtell J.D. and Davis W.H. (1972). The flower, sterility mechanisms, and pollination control. In: Hanson CH (ed) Alfalfa science and technology. Am Soc Agron, Madison, Wisconsin, pp 137.
5. Betz F. Hammond B.G. and Fuchs R.L. (2000). Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharmacol. 32: 156-173.
6. Crecchio C. and Stotzky G. (1998). Insecticidal activity and biodegradation of the toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki bound to humic acids from soil. Soil Bio. Biochem. 30:463-470.
7. Delaney B. Astwood J.D. Cunney H. Conn. R.E. Herouet-Guicheney. C. MacIntosh. S. Meyer. Li. S. Privalle. L. Gao. Y. Mattsson J. and Levine M. (2008). Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. Food and Chemical Toxicology, 46: S71-S97.
8. Ellstrand N.C. Prentice. H.C. and Hancock J.F. (1999). Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. Annu. Rev. Ecol. Syst. 30: 539-563.

9. EPA (1998). EPA registration eligibility decision *Bacillus thuringiensis*. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. Science. 293: 857-860.
10. Farrell T. and Roberts G. (2002). Survey of cotton volunteers north of latitude 22 south. Australian Cotton CRC and CSIRO Plant Industry. 34: 22-32.
11. Fitzpatrick S. Reisen P. and McCaslin M. (2003). Pollen-mediated Gene Flow in Alfalfa: A three-year summary of field research. Proceedings of the 2003 Central Alfalfa Improvement Conference, Virtual Meeting July 21–25.
12. Fuchs R.L. and Astwood J.D. (1996). Allergenicity assessment to foods derived from genetically modified plants. Food Technology. 50: 83-88.
13. Groves R.H. Hosking J.R. Cooke D.A. Johnson R.W. Lepschi B.J. Mitchell A.A. and Waterhouse B.M. (2002). The naturalised non-native flora of Australia: its categorisation and threat to agricultural ecosystems. Unpublished report to Agriculture, Fisheries and Forestry Australia. CRC for Weed Management Systems.
14. Huesing J. English. L. (2004). The impact of Bt crops on the developing world. AgBioForum. 7: 84-95.
15. James C. (2011). Global status of commercialized biotech/GM crops: brief 43, International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications ISAAA, pp 1-16.
16. Lidia S. Watrud S.M. Leshitew G.T. Shiroyama S.M. and George D.G. (2006). Ecological Risk Assessment of Alfalfa (*Medicago Varia* L.) Genetically engineered to Express A Human Metallothionein (*Hmt*) Gene . Water Air, and Soil Pollution. 176: 329–349.
17. Liewellyn D.L. Cousins Y.L. Lyon B.R. Dennis E.S. and Peacock W.J. (1990). Prospects for the genetic engineering of *Heliothis* resistant cotton varieties. Fifth Australian Cotton Conference. Pp. 23-26.
18. Mendelsohn M. Kough J. Vatuzis Z. and Matthews K. (2003). Are Bt crops safe. Nature Biotech. 21: 1003-1009.
19. Metcalfe D.D. Astwood J.D. Townsend R. Sampson H.A. (1996). Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 36: 165-186.
20. Pioneer C. Amand D.Z. and Skinner R.N. (2000). Risk of alfalfa transgene dissemination and scale-dependent effects. Theor Appl Genet 101:107-114.

21. Palm C.J. Seidler R.J. Donegan K.K. and Harris D. (1993). Transgenic plant pesticides: Fate and Persistence in soil. *Plant Physiol.* 45:102: 166.
22. Ranjekar P.K. Patankar A. Gupta V. Bhatnagar R. Benture J. and Kumar P.A. (2003). Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Current Sci.*, 84: 321-329.
23. Schnepf E. Crickmore N. Van Rie J. Lereclus D. Baum J. and Dean D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775.806.
24. Takkashi Y. and Powell G.K. (1993). *Baccillus thuringiensis* crystal proteins: recent advance in understanding its insecticidal activity. In: L. Kim (ed.). *Advanced Engineered Pesticides*. Marcel Dekker, Inc. pp 243.
25. Tang J.D. Collings H.L. Metz T.D. Earle E.D. Zhao J.Z. Roush R.T. and Shelton A.M. (2001). Green tests on resistance management of Bt transgenic plants using refuge strategies. *Journal of Economical Entomology*.1: 240-247.
26. Tesfaye M. Samac D. A. and Lamb J.F.S. (2009). Alfalfa. In: Chittaranjan K, Timotry CH, *Compendium of transgenic crop*. Wiley, New York, pp 435.
27. Teuber L.R. Van Deynze A. Mueller S. McCaslin M. Fitzpatrick S. and Rogan G. (2004). Gene flow in alfalfa under honey bee (*Apis mellifera*) pollination Joint Conference of the 39th North American Alfalfa Improvement Conference and the 18th Trifolium Conference Quebec City, Quebec, Canada, July 18 – 21.
28. Tohidfar M. Zare N. Salehi Jozani Gh. And Eftekhari S.M. (2012). Agrobacterium-mediated transformation of alfalfa (*Medicago sativa*) using a synthetic *cry3* a gene to enhance resistance against alfalfa weevil. *Journal of Plant Biotechnology*. Published online: 25 November 2012.