

Arvid Lindh
Handledare: Josef Berger och Tina D´Hertefeldt
Lunds universitet, BLOK01, VT16

Effekter på nyttoinsekter: Finns det en skillnad i diversitet hos parasitoida steklar mellan GMO och konventionell majs, i Borgeby, Skåne?

Arvid Lindh

Lunds universitet, Biologiska institutionen, Sölvegatan 35A, 223 62 Lund

nat13a11@student.lu.se

Abstract

Genetically modified plants (GM-plants) have been controversial since they began being cultivated, especially within the European Union (EU). It is not well known how their unique properties affect both humans' health and natural ecosystems and therefore lawmaking in EU has been very restrictive around cultivation of the plants. The AMIGA-project (Assessing and Monitoring the Impacts of Genetically modified plants on Agro-ecosystems) is a project within the union with the goal to decrease the uncertainty concerning these potential risks. In this project insect samples from AMIGA have been studied, focusing on parasitoid insects from the order Hymenoptera. The insects have been collected from plots with maize of two different kinds, one conventional kind and one genetically modified. The samples came from the months of June and August and a total of 649 individuals were categorized into 44 different taxa. Parasitoid Hymenoptera parasitize on other insects, eventually killing them, and therefore function as a biological pest control. The projects goal was to determine if the diversity of these insects was affected by the kind of maize that was grown in the plot where they were collected. Hymenoptera were sorted out from other insects in the samples and then the genera were determined using an assemblage of literary works. No difference in either species richness, Shannon-index or abundance, could be found between GM and non-GM plots. Time of the year, in this case the month, was a more important variable than plant variant as both species richness and abundance differed between June and August.

Nyckelord Hymenoptera · Diversitet · Shannon-index · *Bacillus thuringiensis* · Majs

Introduktion och frågeställning

Genetiskt modifierade organismer (GMO) är organismer som med människans hjälp fått sin arvs massa ändrad för att ge organismen någon typ av ny egenskap (Svobodová et al. 2013). De första genetiskt modifierade växterna började odlas i världen 1995 (Arpaia et al. 2014). Odling av genmodifierade växter har varit och är fortfarande kontroversiellt, speciellt inom europeiska unionen, EU (Arpaia et al. 2014). Försiktighetsprincipen är central i lagstiftning och kontroll kring GMO-grödor eftersom det inte är känt hur grödorna kan påverka människors och djurs hälsa och naturliga ekosystem (Jordbruksverket 2007). I Sverige odlades 2015 majs på 17 000 ha (Jordbruksverket 2016). Inget av detta var GMO-majs (D´Hertefeldt, T. pers, komm; tina.dhertefeldt@biol.lu.se).

Den variant av genmodifierad majs som använts i detta arbete är "*YieldGard*[®]" eller MON810 (Monsanto Company 2002). Denna GMO-gröda har fått gener från *Bacillus thuringiensis* (Bt) inkorporerade i sitt DNA (Monsanto Company 2002). Generna kodar för proteinet CryIAB som är toxiskt för vissa insekter och alltså fungerar som ett biologiskt skydd för majsen (Monsanto Company 2002). Proteinet binder in till receptorer i magen hos mottagliga insekter. Det binder inte in hos till exempel ryggradsdjur eller insekter som saknar receptorerna (Monsanto Company 2002). Bt-majs är den enda GMO-gröda som får odlas kommersiellt inom EU (Jordbruksverket 2007). Bt-gifter beskrivs ofta som väldigt specifika i vilka receptorer de binder till vilket gör att de kan skräddarsys för specifika insektsgrupper (Resende et al. 2015). Vissa menar dock på att det är svårt att avgöra hur en enskild art eller grupp kommer reagera på giftet och detta måste ofta utredas genom toxicitetstester för varje enskild grupp (van Wyk A et al. 2008). Många laboratoriska studier pekar på att Bt-gifterna kan påverka även organismer som inte är målorganismen (de la Poza et al. 2005) men detta har varit svårare att bevisa i fältstudier, där resultatet ofta istället blivit att Bt-gifterna inte har någon effekt på icke-målgruppsorganismer (van Wyk et al. 2008, Truter et al. 2014, Resende et al. 2015). En annan risk med Bt-grödor är att pollen, innehållande CryIAB, sprider sig utanför odlingslandskapet och in i andra habitat där det kan orsaka skada genom att påverka organismer närbesläktade med målorganismen (Losey et al. 1999, Lang et al. 2015).

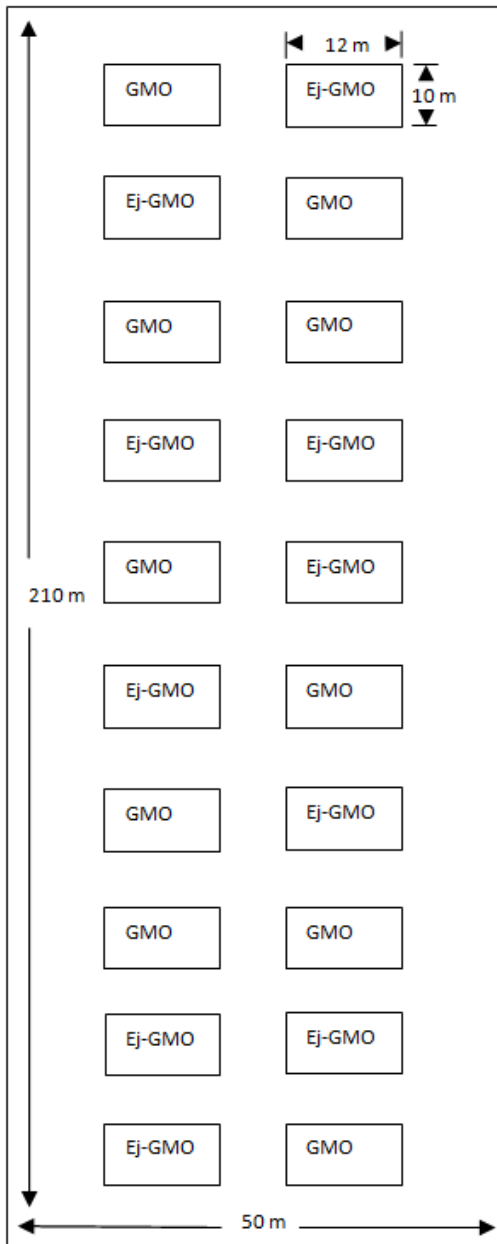
Skadegörare utgör alltid en risk vid kommersiell odling och så är också vid majsodling (Jordbruksverket 2015).

Ett sätt att bekämpa skadegörandeinsekter är att ta hjälp av andra insekter som på något sätt försvårar skadegörarnas förökning (Goulet, Huber 1993). Ett sådant exempel är parasitoida insekter. Parasitoidism skiljs från parasitism i det att parasitoiden dödar sitt värdjur istället för att snylta på det (Mittelbach 2012).

Parasitoiden spenderar inte heller hela sin livscykel i sitt värdjur (Huber 2009). Parasitoider fungerar därför ungefär som predatorer ur ett ekologiskt perspektiv (Mittelbach 2012). Parasitoider finns inom flera insektsstaxa men är särskilt utbredd inom ordningen Hymenoptera, steklar (Goulet, Huber 1993). Hymenoptera är en gigantisk taxa, kanske den mest artrika insektsgruppen på vår planet (Huber 2009). Då många arter i gruppen är parasitoida och vanliga i terrestra ekosystem (Goulet, Huber 1993) så bidrar parasitoida steklar till en högre artdiversitet i ett ekosystem. Dessutom finns det hyperparasitoider som parasiterar andra på parasitoider (Hawkins 1994) och därmed skapar ytterligare en trofisk nivå och större artdiversitet (Mittelbach 2012).

Under EU-projektet Assessing and Monitoring the Impacts of Genetically modified plants on Agro-ecosystems (AMIGA) (Arpaia et al. 2014), har insekter samlats in under flera år på majsält i Borgeby, Skåne, där konventionell majs och GMO-majs har odlats på samma fält men skilt från varandra, separerade med obevuxen åkermark (D´Hertefeldt pers, komm). Projektets mål är att minska osäkerheten kring riskerna med GMO-grödor (Arpaia et al. 2014).

Då MON810 majs via sin genetiska modifikation tillverkar ämnen toxiska för insekter vill jag undersöka om detta i sin tur påverkar diversiteten hos parasitoida steklar. Steklarna livnär sig på andra insekter och kan därmed indirekt tänkas påverkas av GMO-grödans unika egenskaper. Detta är intressant eftersom det saknas kunskap om just hur insekter som utför ekosystemtjänster via parasitoidism påverkas av Bt-plantor. Projektets mål var alltså att utreda om det finns någon skillnad i diversitet hos parasitoidiska steklar, på GMO och konventionella majsodlingar i Borgeby, Skåne.



Figur 1. Skiss över försöksdesignen.

Metod

Insamling

Insekterna samlades in under juni och augusti år 2014 från majsfälten utanför Borgeby, Skåne, GPS: N=55.75284 E=13.0489, under ett pågående AMIGA-projekt. På fälten odlades två olika sorters majs, en konventionell variant med beteckningen DKC 3871 samt en genmodifierad variant med beteckningen DKC 3872 YG. Majsen odlades på 20 rutor med måtten 12 x 10 meter (120 m²) (Figur 1). Mellan rutorna växte ingenting utan det var bar åkermark. Tio rutor innehöll genmodifierad majs och tio innehöll konventionell majs. Vilka rutor som innehöll vad var slumpmässigt bestämt och jag fick inte veta vilka prover som innehöll vilken majsvariant förrän efter all sortering skett.

Majsen planterades 23 maj 2014 och gödslades vid detta tillfälle med kväve, fosfor och kalium med följande fördelning: 11-5-18, 100kg/ha. Den 30 maj utfördes ytterligare gödsling med 350kg/ha kväve och 150kg/ha av en blandning av fosfor och kalium, med en fördelning på 11-21. Utöver gödningen fick plantorna ingen hjälp, vare sig i form av besprutning eller annan behandling. Grödorna skördades 27 oktober.

Insamlingen av steklarna skedde via fallfällor, utplacerade i par om två med en 1-meters metallbarriär emellan.

Fällorna var aktiva en vecka per månad under juni, juli, augusti och september. Fällorna fylldes med 75 procentig propylenglykol och var täckta med ett metallock för att undvika predation eller andra störningar.

Fällorna tömdes en gång per månad och de fångade organismerna placerades i provrör tillsammans med etanol och märktes med datum, ort, vilken ruta fällorna var placerade i, samt vilken av de två fallfällorna som materialet

kom ifrån. Fallfällor användes på grund av att de kan stå längre tider utan någon övervakning och tömmas efter längre intervall (Noyes 1982). Eftersom fällorna är placerade i markhöjd fångar de framförallt marklevande insekter (Noyes 1982).

Sortering, hantering och bestämning

Eftersom proverna från majsfälten innehöll inte bara steklar utan även många andra sorter insekter så behövdes först steklar sorteras ut i separata prov. Detta gjordes genom att placera ut materialet på en plastbricka och under stereolupp identifiera alla steklar och lägga över dem på en separat platta. En bricka med längsgående åsar, med ungefär en centimeters mellanrum, användes för att göra det möjligt att dela upp proven i rader som kunde behandlas en i taget och därmed minimera risken att missa enskilda steklar. En mjuk aluminiumpincett och en fin pensel var de två viktigaste redskapen när steklarna hanterades (Noyes 1982). Dessa är att föredra över en standard stålpincett eftersom det är lätt att med en sådan skada små och ömtåliga djur, vilka är vanliga i proven. Steklarna räknades slutligen och antalet antecknades. Därefter fördes steklarna över till eppendorfrör fyllda med 70 % etanol. Varje rör märktes på locket med ett nummer för att underlätta sorteringen. En etikett med samma information som det ursprungliga provröret; datum, lokal, etc, lades ned i provröret tillsammans med djuren. Steklar identifierades med hjälp av generella stekelkaraktärer så som stekelmidja, vingarnas form, venstruktur och antennernas utseende (Landin 1971, Goulet, Huber 1993, Huber 2009).

När steklar sorterats ut från samtliga provrör återstod bestämningen. För varje individ var målet att komma till släkte men i vissa fall var detta inte möjligt och då antecknades istället underfamilj eller annan taxon som gick att bestämma. I speciella fall där släkten innehöll väldigt få antal arter bestämdes djuren hela vägen ner till art. Det finns inom Hymenoptera inget verk som pålitligt fungerar för alla släkten. Karaktärer för släkterna varierar mellan olika verk och likaså formuleringar och tillgång till illustrationer. Därför behövdes en mängd olika bestämningsverk kombineras (Tabell 1) och ofta användas parallellt för att ge så säkra taxonomiska bestämningar som möjligt. Förutom litteraturen användes Svenska lantbruks universitets, SLU, databas Dyntaxa (SLU 2016) för att kontrollera att de taxa som bestämts faktiskt förekommer i Sverige. Detta var nödvändigt eftersom majoriteten av litteraturen inte är specifik till Sverige.

Tabell 1. Vilka litteraturverk och publiceringar som använts vid bestämning av olika taxa.

<i>Hymenoptera taxa</i>	Litteratur
Bestämning till familj	Landin 1971 Goulet, Huber 1993
Braconidae (familj)	van Achterberg 1990 Wharton et al. 1997
Chalcidoidea (överfamilj)	Peck et al. 1964
Ceraphronoidea (överfamilj)	Alekseev, Radchenko 2000
Diapriidae (familj)	Nixon 1980
Ichneumonidae (familj)	Broad 2011 Magnusson 2013
Ichneumonoidea (överfamilj)	Quicke 2015
Ichneumonorum nearcticae (släkte)	Wahl 2015
Mymaridae (familj)	Huber et al. 2009 Pricop 2013
Platygastridae (familj)	Kozlov 1987
Pteromalidae (familj)	Graham 1969 Boucek, Rasplus 1991
Scelionidae (familj)	Masner 1980

För att bestämma släktena undersöktes steklarna i etanol, på plastbrickor, precis som under sorteringen.

Stereoluppen som användes hade en kapacitet på 50 gånger förstoring och i majoriteten av alla fall räckte detta. I andra fall fanns en lupp med 80 gånger förstoring tillgänglig. Då det i bestämmingslitteraturen kom ett steg där det krävdes att djuren var torkade, till exempel om man skulle undersöka fåror på djurens ryggparti, torkades, och i vissa fall, monterades djuren. Torkningen skedde genom att djuret placerades tillsammans med en droppe etanol på en torr bit papper. Med hjälp av pincetter och nålar justerades djurets position så att de relevanta karaktärerna kunde ses. Här var ofta hårda stålpinetter att föredra på grund av deras bättre precision (Berger pers, komm; josef.berger@biol.lu.se). Efter att djuret bestämts lades det åter i det eppendorfrör det kom ifrån. Vid montering skedde samma procedurer som under torkningen, med tillägget att djuren limmades fast på ett fyrkantigt kartongkort (11x4mm), monterat på en nål. Detta gjordes för att under luppen enkelt kunna vrida och

vända på djuret utan att skada det. Vid limning placerades en väldigt liten klick lim ut på monteringskortet (Noyes 1982, Krogmann, Holstein 2010). Sedan placerades insekten på limfläcken med ena lateralsidan mot kortet. Vingar och ben placerade så att de tydligt kunde ses under lupp (Noyes 1982, Krogmann, Holstein 2010, Berger pers. komm). Ofta krävdes det att man med pincetten utsatte djuret för lite tryck mot kortet för att garantera att själva kroppen, och inte bara benen eller en vinge, kom i kontakt med limmet. Annars fanns risk att insekten skulle sitta fast bara i ett bihang och då ha lätta att ramla av (Berger pers. komm).

Alla exemplar av varje släkte monterades inte. Exemplar med särskilt tydliga karaktärer monterades som referens att jämföra med om en likande stekel hittades. Då kunde dessa jämföras och stämde karaktärerna överens behövdes den nya inte monteras.

Statistisk analys

Vid analysen slogs data från de två olika fallfällorna ihop för att få fram datavärden för varje provruta. Varje ruta behandlades som ett prov eftersom varje djur inte fångats in för sig och därför inte kunde analyseras som individuella provtagningar. För att uppskatta diversiteten i varje prov beräknades artrikedomen, alltså det totala antalet taxa, samt Shannon-index. Abundansen och artrikedomen i varje prov räknades ut i Excel (2007).

EstimateSWin 9.1.0 (Colwell 2013) användes för att räkna ut ett medelvärde på biodiversitetsmättet Shannon-index, uträknat med naturliga logaritmer, för varje månad och majsvariants kombination. För att få ett Shannon-indexvärde på varje enskilt prov användes istället BioDiversity Pro 2.0 (McAleece, Gage et al. 1997). Shannon-index beräknas enligt följande formel (Waite 2000):

$$H = - \sum_{i=1}^s p_i * \ln p_i$$

H = Shannon-index

s = antalet taxa

p_i = proportionen (antal av individen / totala antalet djur) för varje taxa.

ln = naturliga logaritmen

Ett av proven i juni behövdes utlämnas eftersom detta endast innehöll en individ och det inte går att räkna ut Shannon-index på sådana prover eftersom det är baserat på proportionen mellan totalantalet individer och hur abundant varje taxa är (Berger pers. komm). Finns endast en individ finns det ingen proportion.

Metoden som de två programmen använder skiljer sig åt. EstimatesS beräknar indexet baserat på varje "datasats", alltså varje månad plus majsvariant variation, och använder därmed data från flera olika prov i samma beräkning. BioDiversity Pro räknar istället ut indexet på varje enskilt prov. Utgången blir att EstimateSs index blir säkrare och mer pålitligt på grund av en större provstorlek, men inga statistiska tester har utförts på denna data på grund av att programvaran endast ger fyra värden. Att utföra statistiska tester en så liten provstorlek är opålitligt.

Skulle man rita ut hur antalet taxa hade ökat med varje prov så hade detta resulterat i en ojämn kurva som det är svårt att dra vidare slutsatser om (Gotelli, Colwell 2001). Detta eftersom kurvan endast är en produkt av i vilken ordning proven kommer i. Hade det första bestämda provet innehållit en stor eller liten mängd olika taxa hade kurvorna sett helt olika ut, även om de tillslut båda slutar i samma antal taxa. För att kringgå detta problem utfördes en rarefaction med 100 randomiseringar (Gotelli, Colwell 2001). Detta innebär att vid första provet drar mjukvaran ett prov från den samlade poolen av provtagningar. Detta repeteras sedan 99 gånger och ett medelvärde för alla dragningar beräknas. Detta görs sedan med två provtagningar, med tre provtagningar, också vidare, tills det totala antalet provtagningar har uppnåtts (Gotelli, Colwell 2001, Colwell 2013). Resultatet blir en kurva som är mycket jämnare än om det hade ritats hur antalet taxa faktiskt ökade med antal provtagningar. Kurvan är mer allmän och representerar statistiskt hur kurvan hade sett ut om undersökningen genomförts fler gånger.

Utöver rarefaction-beräkningen genomfördes en extrapolation för att uppskatta hur antalet arter hade fortsatt öka om fler prover hade behandlats. En faktor två användes vilket innebär att extrapoleringen uppskattade kurvans utveckling om dubbelt så många prov som ursprungligen fanns hade behandlats. Om man till exempel hade gjort 25 provtagningar så extrapoleras det fram till 50 stycken. Extrapolation är viktigt då det möjliggör en uppskattning om huruvida antalet provtagningar var tillräckligt eller inte. För att jämföra till exempel artrikedom i två habitat krävs det i teorin nämligen att alla arter som finns i båda habitaterna har hittats (Gotelli, Colwell 2001). I praktiken är detta dock ofta svårt att uppnå. Det behöver inte bero på att studien är för liten eller "dålig" utan kan helt enkelt vara för att det är orealistiskt svårt att hitta alla arter som finns i ett habitat (Gotelli, Colwell 2011). En inventering av myrpopulationer i Costa Rica har till exempel pågått i 30 år och man hittar fortfarande nya arter (Gotelli, Colwell 2011). Genom att extrapolera kan man se om fortsatt provtagning kunde förväntas resultera i att ytterligare taxa hade hittats eller ej.

Rarefaction och extrapolering utfördes i EstimateS för antal taxa. För Shannon-index utfördes endast rarefaction. I dessa beräkningar, då endast rarefaction genomförs, minskar standardavvikelsen med fler antal prover. Detta beror på att mjukvaran utgår ifrån det slutgiltiga värdet i alla samlade prov och interpolerar bakåt hur Shannon-värdet kunde statistiskt förväntas vara vid mindre provstorlekar (Gotelli, Colwell 2011). Man kallar det konditionell standardavvikelse. Standardavvikelsen kommer från att man omarrangerar samma prov massvis med gånger (Gotelli, Colwell 2011). Shannon-index som tagits fram via rarefaction har inte extrapolerats eftersom detta inte är möjligt i EstimateS.

Slutligen användes SPSS 22.0 för att genomföra en Tvåvägs-ANOVA på medelvärdena på antalet individer, antalet taxa samt Shannon-index från varje prov. Som fixerade variabler sattes månad och majsvariant. För varje faktor fanns två alternativ (juni och augusti och GMO eller konventionell) vilket gav en frihetsgrad. För varje ANOVA utfördes Levene's Test of Equality of Error för att se om variansen var tillräckligt låg för att en 2-vägs-ANOVA skulle vara applicerbar. Dessutom togs P-P-plots fram för att möjliggöra en mer visuell analys av variansen.

Resultat

Sammanlagt bestämdes 524 individer från 16 prov från augusti. Hälften av proven kom från GMO-rutor och andra hälften från provrutor med den konventionella majsvarianten. Totalt fanns insekter från 26 olika taxa.

Ursprungligen skulle 20 prov ingått i augusti men fyra prov kunde inte användas. Detta på grund av att det skett misstag så att provrör från två fallfallor fattades och det fanns dubletter av två andra fallfallor. Dessa prover bedömdes inte kunna användas i resultatet eftersom de antingen innehöll för många eller för få replikat och därmed inte var jämförbara med de resterande proven.

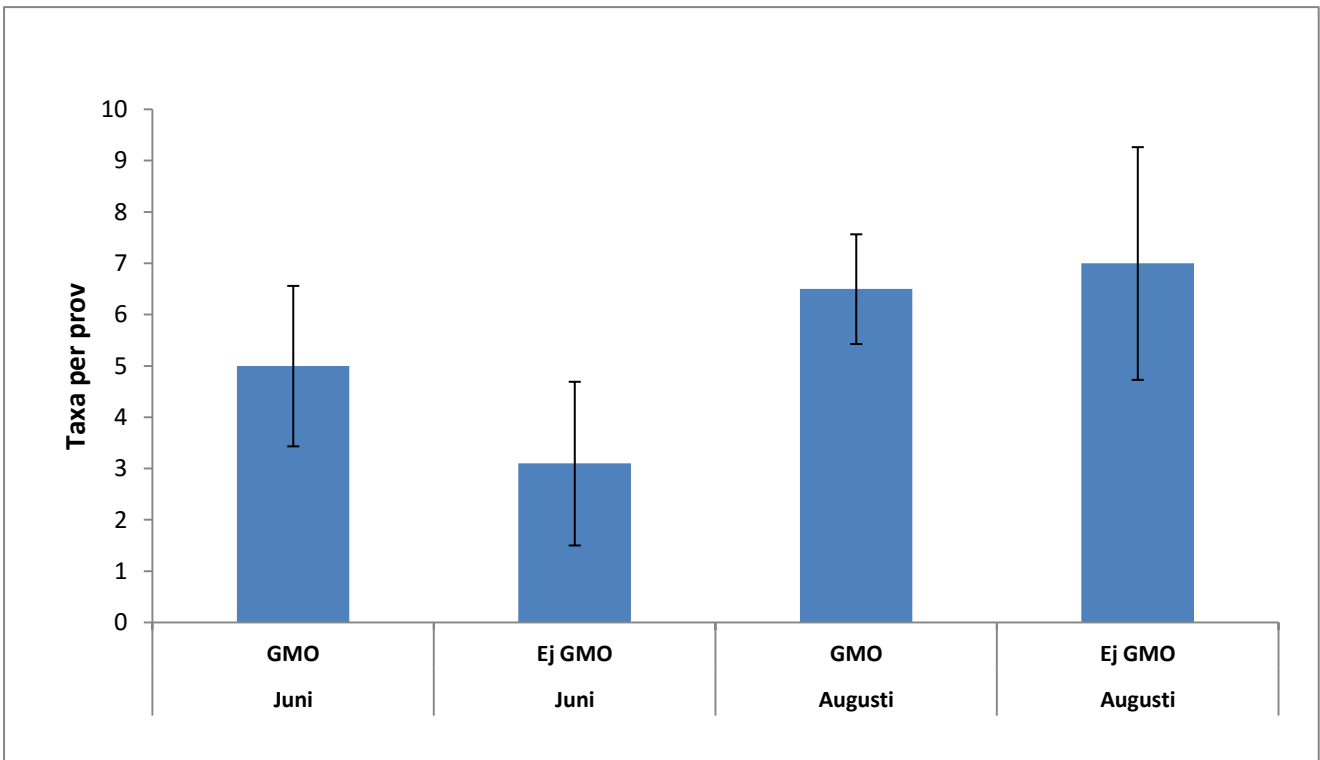
Data från augusti kompletterades med data från juni, behandlat av Berger enligt samma metod. Med dessa data inräknade steg antalet individer till 649 och antalet taxa till 44. Juni månad innehöll 20 prov.

Släktet *Trimorus* (Scelionidae) utgjorde 58 % av totala antalet individer med 378 räknade exemplar och fanns i nästan varje prov. Abundansen hos *Trimorus* var särskilt hög i proven från augusti. Släktena *Codrus* (Proctotrupidae), *Aphaereta* (Braconidae), *Basalys* (Diapriidae), *Conostigmus* (Megaspilidae) och *Ceraphron*

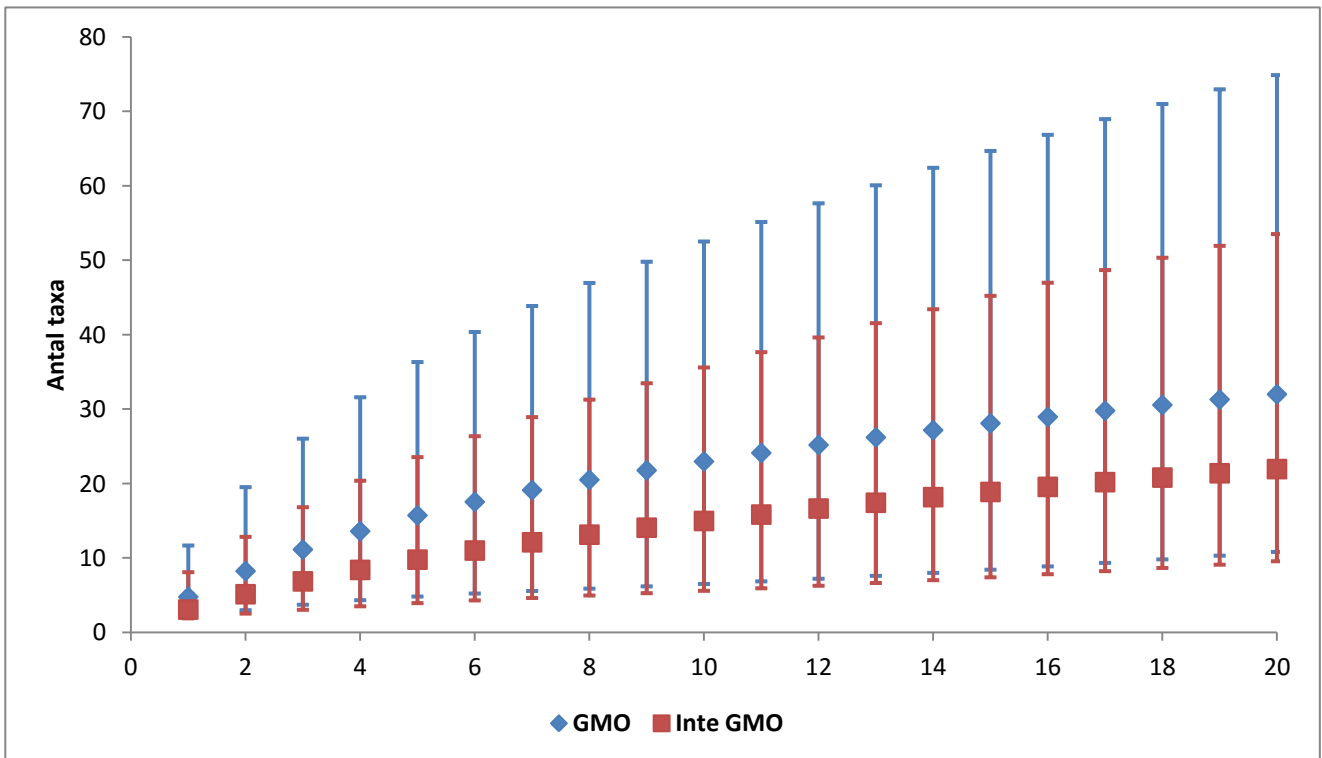
(Ceraphronidae) förekom också i större abundans än övriga taxa med 42, 23, 28, 39 och 36 individer vardera. Ett exemplar av Sandjägerstekel, *Methocha articulata*, bestämdes också.

Diversitet

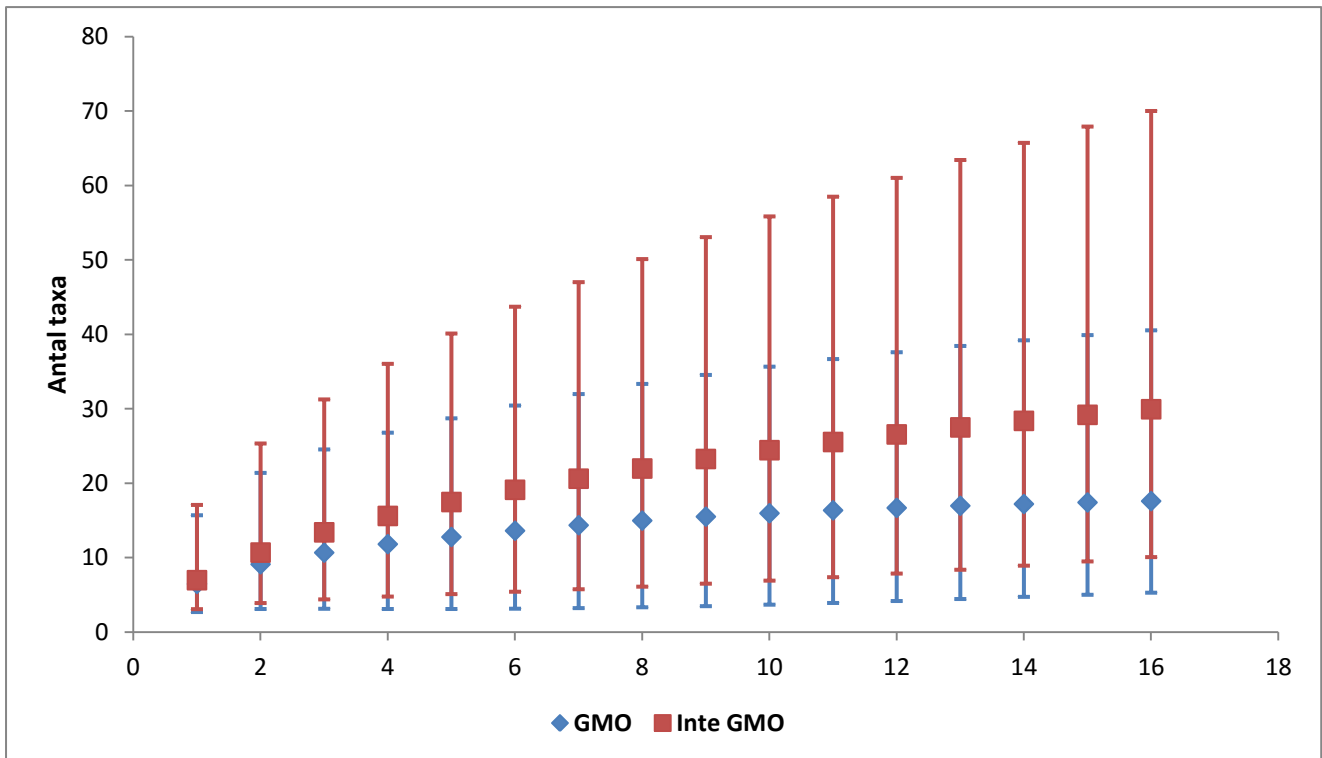
Antalet taxa skiljde sig mellan juni och augusti (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=23.325$, $p=0.000$) (Figur 2), artrikedomen var högre i augusti än i juni. Ingen skillnad fanns mellan majsvarianterna (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=1.568$, $p=0.22$). Mellan de två variablerna fanns däremot en signifikant interaktion (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=4.607$, $p=0.04$). Mellan månaderna fanns det en skillnad i hur majssorten påverkade antalet taxa. I juni är antalet taxa högre i GMO-majsen än i icke-GMO-varianten, medan sambandet i augusti är omvänt. Genom rarefaction och extrapolation uppskattades hur antalet taxa kunde förväntas öka om det hade funnits möjlighet att behandla ett större antal prover (Figur 3 & 4).



Figur 2. Medelvärde på antalet bestämda taxa per prov. Felstaplarna anger standard avvikelser. Antalet prov per tidpunkt är 10 för juni och 8 för augusti.



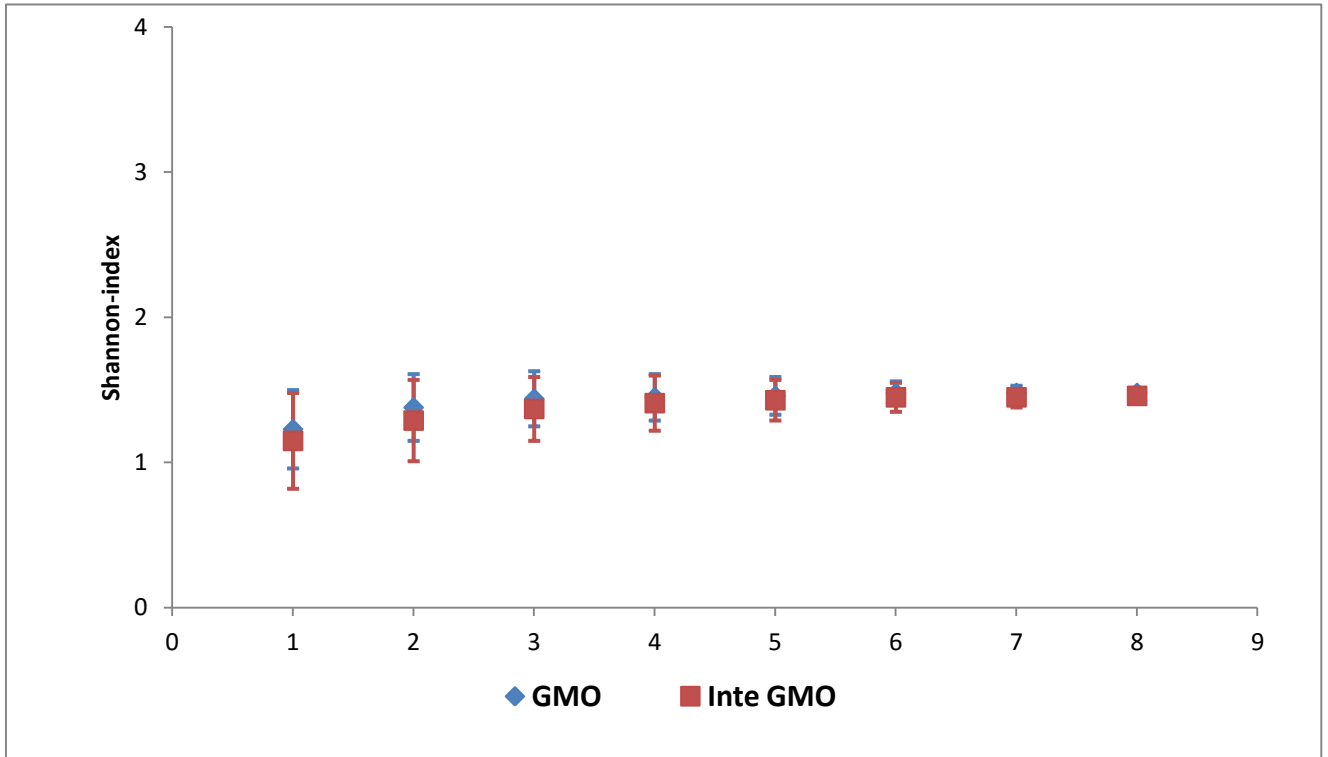
Figur 3. Hur antalet taxa kunde förväntas öka med fler prover under juni månad. Kurvan är en rarefaction-kurva, med 100 randomiseringar, där de tio sista värdena uppskattades via extrapolering. Felstaplarna anger det estimerade 95 %-konfidensintervallet.



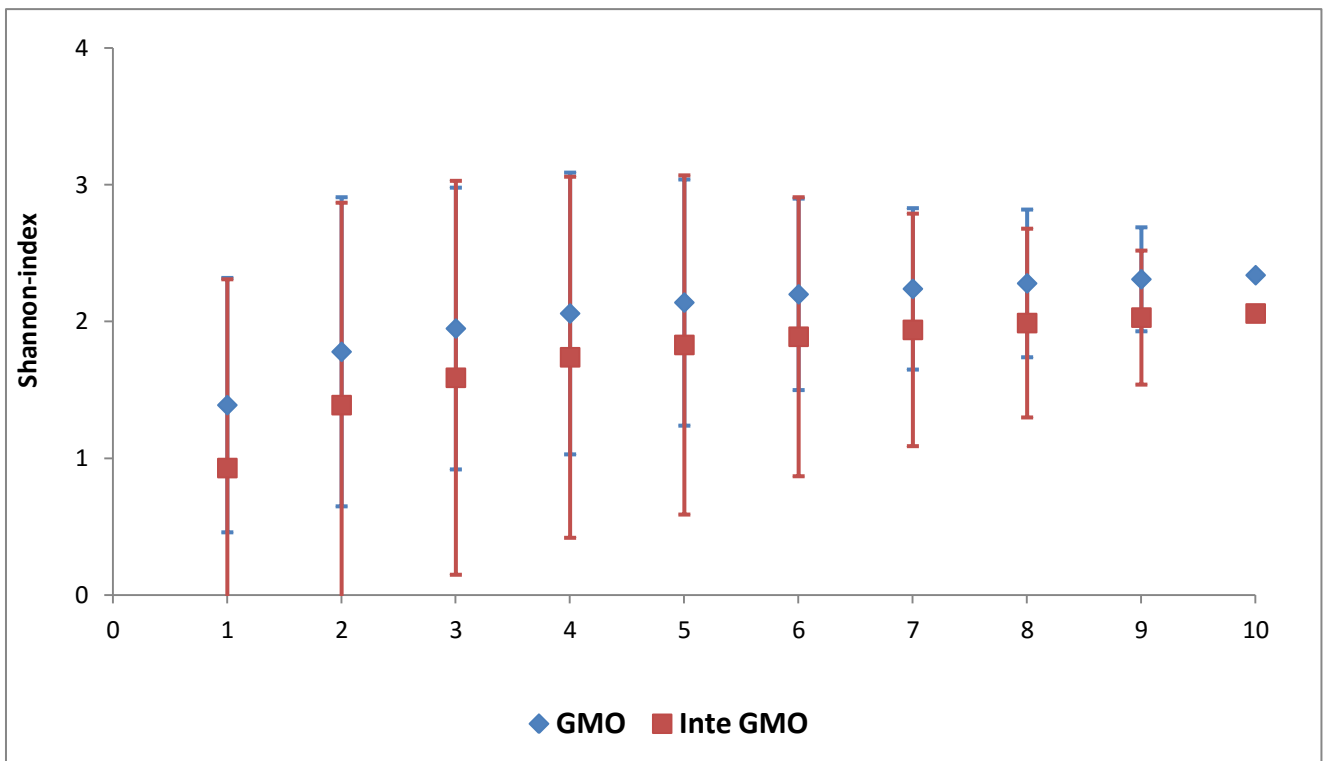
Figur 4. Hur antalet taxa kunde förväntas öka med fler prover under augusti månad. Kurvan är en rarefaction-kurva, med 100 randomiseringar, där de åtta sista värdena uppskattades via extrapolering. Felstaplarna anger det estimerade 95 %-konfidsintervallet.

För Shannon värden beräknade i EstimateS, baserade på de fyra provsatserna, hade juni månad högre värden vid sista provtagningen (2.34 för GMO och 2.06 vid inte GMO, jämfört med 1.48 och 1.46 i augusti) (Figur 5 & 6).

Juni hade också större konditional standardavvikelse. Juni hade alltså enligt denna provuppdelning högre diversitet än augusti.

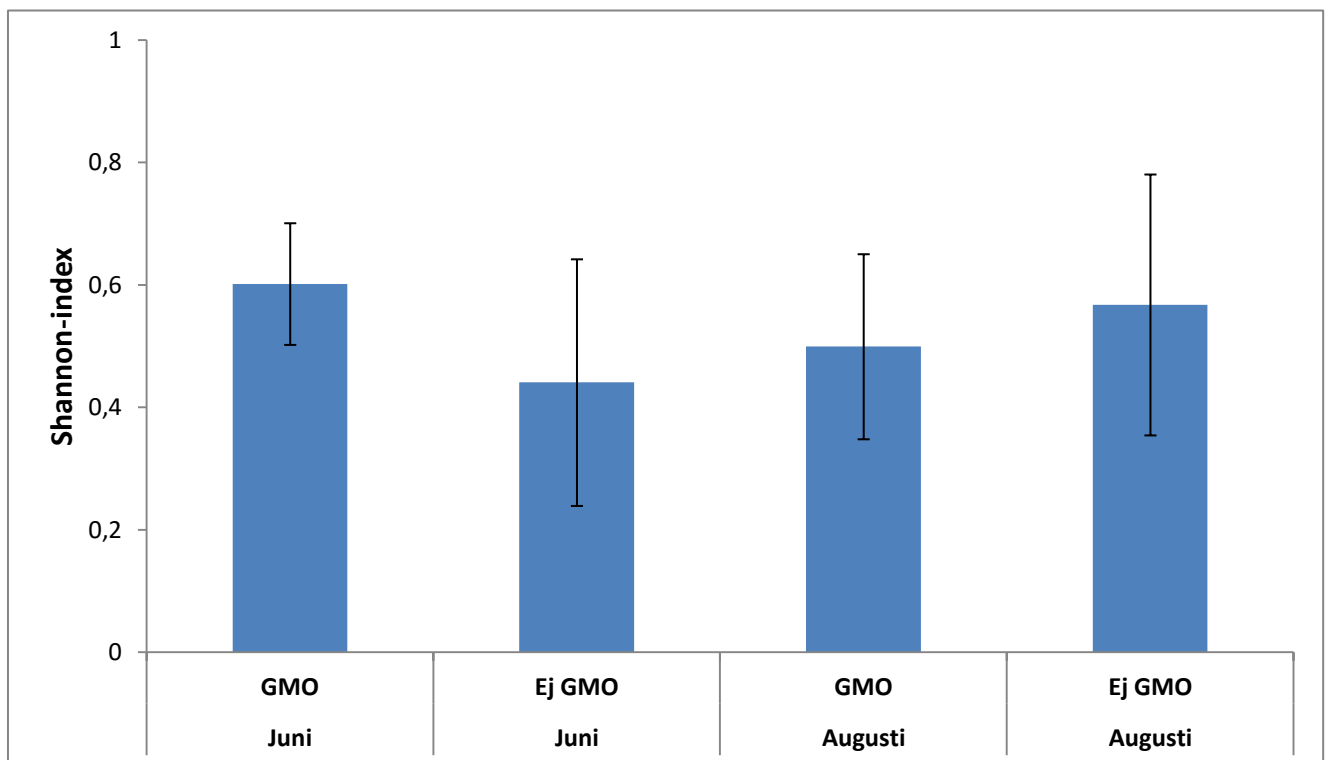


Figur 5. Samlat Shannon index för augusti månad framtagna med rarefaction, 100 randomiseringar. Proven har av EstimateS klumpats ihop beroende på sina oberoende variabler och Shannon-index har tagits fram med alla provens samlade taxa. Felstaplarna anger den konditionala standardavvikelsen.



Figur 6. Samlat Shannon index för juni månad framtagna med rarefaction, 100 randomiseringar. Proven har av EstimateS klumpats ihop beroende på sina oberoende variabler och Shannon-index har tagits fram med alla provens samlade taxa. Felstaplarna anger den konditionala standardavvikelsen.

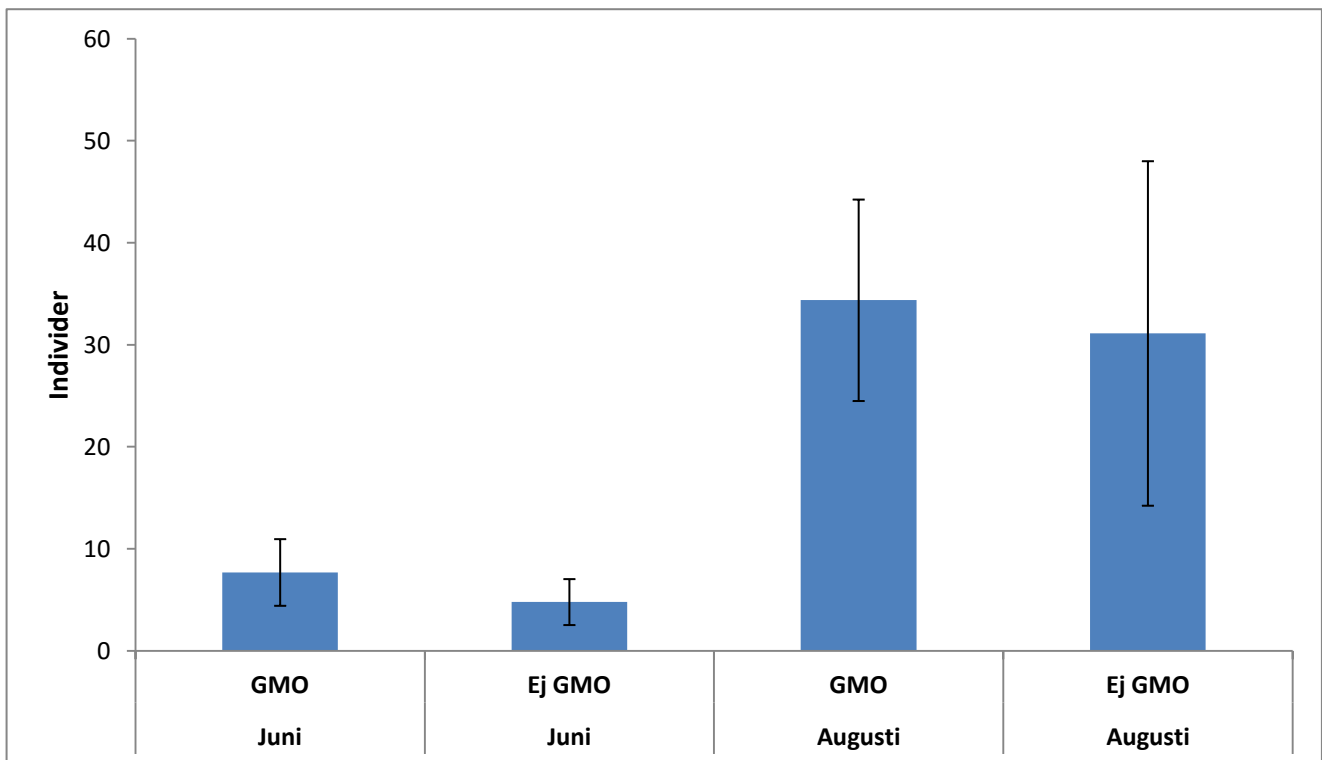
Shannon-index värdena baserade på varje enskilt prov visade inga skillnader, varken mellan månaderna, majsvarianterna eller interaktioner däremellan (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=0.648$, $p=0.427$) (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=0.045$, $p=0.833$) (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=3.964$, $p=0.055$) (Figur 7). Indexvärdena var också mycket lägre än i figur 5 och 6.



Figur 7. Medelvärdet på varje provs Shannon-index. Felstaplarna anger standardavvikelsen. Antalet prov per tidpunkt är 10 för juni och 8 för augusti.

Abundans

I abundansdatan visade Levenes test (Levene's Test of Equality of Error, $df_1=3$, $df_2=32$, $F=5.423$, $p=0.004$) att variansen var för heterogen för att datan skulle kunna sägas vara parametriskt. Detta resultat stämde bra överens med P-P-ploten som tagits fram där variansen inte var lika stor för alla prov (Appendix figur 1). Abundansdatan log10-transformerades för att minska variansen (Appendix figur 2). Efter transformationen klarade dataprovet Levenes test (Levene's Test of Equality of Error, $df_1=3$, $df_2=32$, $F=1.341$, $p=0.278$) och kraven för att använda tvåvägs-ANOVA var uppfyllda. Det fanns en skillnad mellan månaderna (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=92.041$, $p=0.000$) (Figur 8). I augusti låg medelvärdet per prov alltid över 30 medan det i juni inte översteg 10. Det fanns också en skillnad mellan majssorterna, GMO proven hade högre medelantal djur än proven från den konventionella majsen (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=4.248$, $p=0.047$). Mellan månaderna och majssorterna fanns ingen interaktion (Tvåvägs-ANOVA, $df=1$, $F=0.804$, $p=0.377$).



Figur 8. Medelvärdet individer per prov för de olika behandlingarna. Felstaplarna anger standardavvikelsen. Antalet prov per tidpunkt är 10 för juni och 8 för augusti.

Diskussion

Sammantaget visar resultaten att det är större skillnad mellan de olika månaderna än vad det är mellan majssorterna. Abundansen var tydligt högre i augusti och det starkaste samband som undersökningen kan peka på. Även artrikedomen var högre i augusti. Shannon-index visade dock inga skillnader på någon av variablerna. Det kan fortfarande vara så att vissa enskilda arter påverkas negativt om deras optimala värddjur minskar i abundans på grund av GMO-majsen, men över populationen som helhet syns inga skillnader i diversiteten mellan GMO och icke-GMO fälten. Detta är intressant då det betyder att proteinerna som GMO-majsen producerar inte påverkar parasitoida steklar negativt, iallafall inte i en tillräckligt stor utsträckning för att påverka diversiteten. Faktiskt visade abundansdatan att antalet steklar per prov var något högre i GMO-rutorna än i de konventionella vilket tyder på att Bt-majsen istället har positiva effekter på stekelabundansen. Detta är ett oväntat resultat som är svårt att förklara. Det skulle kunna bero på ekologiska fenomen som till exempel att Bt-majsen på något vis ändrar populationssammansättningen. Det kan också bero på att majssorterna skiljer sig lite i hur de utvecklas under odlingen, vilket kan medföra skillnader i antalet steklar (D´Hertefeldt pers. komm). Detta resultat var dock väldigt nära signifikansgränsen ($p=0.047$). Resultatet finns där och ska inte förbises men ska tolkas väldigt försiktigt. För att kunna dra mer långgående slutsatser behövs data om artsammansättningen på de parasitoida steklarna så att information om deras värddjur kan försöka sammanställas.

Fördelningen mellan de taxa som bestämts är väldigt långt från jämt fördelad. *Trimorus* dominerar särskilt augustiproven och utgjorde majoriteten av alla djur. Enligt D´Hertefeldt (pers. komm) stämmer detta bra överens med tidigare studier på skalbaggar från samma projekt. I dessa prover dominerade också några få arter proverna. Eventuellt finns det en korrelation mellan till exempel de skalbaggsarter som dominerade och *Trimorus* men det kräver vidare studier. En möjlighet skulle vara att *Trimorus* parasiterar på de abundanta skalbaggar. Sandjägerstekeln som hittades är starkt hotad i Sverige men utbredningsområdet inkluderar även Europa och norra Afrika (SLU 2015).

Skillnaden mellan de två månaderna har visat sig vara väldigt tydlig i detta arbete. Skillnaden mellan månaderna beror troligtvis på steklarnas livscyklar och generella årstidsvariationer så som temperatur och nederbörd. Dessutom planterades inte majsen förrän 23 maj vilket innebär att plantorna i juni fortfarande är väldigt liten, endast några få decimeter hög (D´Hertefeldt pers. komm). Arbetet hade inte som mål att undersöka denna

skillnad men det är viktigt att ta med andra variabler än majsvarianten både för att kunna jämföra i vilken grad de olika variablerna påverkar steklarna, och för att undersöka eventuella interaktioner. En interaktion hittades faktiskt mellan majsvarianten och månaderna. Dock så var interaktionen väldigt nära signifikansgränsen ($p=0.04$) och det faktum att det inte var någon signifikant skillnad mellan majsvarianterna, utan bara månaderna, betyder att resultatet är väldigt skakigt.

Resultaten stämmer bra överens med andra fältförsök som gjorts (de la Poza et al. 2005, Torres, Rubersson 2006, Li et al. 2007, Svobodová et al. 2013, Truter et al. 2014, Resende et al. 2015, Pálinkás 2016) där inga samband mellan Bt-grödor och insekts eller spindelpopulationer, kunnat ses. Andra faktorer, såsom vädrets variation, har visat sig ha större inverkan på leddjurspopulationerna än GMO-grödornas egenskaper. Även om dessa studier skiljer sig mycket i vilka grödor och djur som undersökts så är resultaten liknande. Ofta påpekas att laborativa studier har visat på negativa effekter hos icke-målorganismer (van Wyk et al. 2008, Truter et al. 2014, Resende et al. 2015) men i fält har detta hittills inte gått att replikera. Orsakerna tros vara bland annat vara att dessa laborativa försök är för endimensionella i sin metod och inte tar hänsyn till ekologiska fenomen, så som att djuren kan välja mellan flera olika sorters mat i fält (Resende et al. 2015). Resende et al. (2015) påpekar också att gifterna inte ackumuleras högre upp i näringskedjan vilket minskar effekterna på rovdjur. Van Wyk et al. (2008) menar dock att riskanalyser är svåra att utvärdera då deras resultat visar på att Bt-gifternas effektivitet skiljer sig mycket inom olika släkten.

Resultaten från denna studie visar att det inte är någon negativ effekt av Bt-majsen på antalet arter eller abundansen av parasitoida steklar på ett experimentfält i Skåne. Effekterna av Bt-majs kan dock påverka andra organismer än skadedjuret. Losey et al. (1999) kommer i sin studie fram till att pollen från Bt-grödor kan vara skadligt för andra fjärilsarter än skadegörare, till exempel Monarkfjärilen, *Danaus plexippus*. Pollen har potential att sprida sig utanför odlingslandskapet och kan därmed påverka andra organismer än vad som var menat (Lang et al. 2015).

Ett problem i många studier är att provstorleken ofta inte är tillräcklig för att hitta alla arter som finns inom ett habitat (Gotelli, Colwell 2011, Chao et al. 2014). På grund av detta utfördes rarefaction och extrapolationen av artrikedomen för att uppskatta hur resultatet hade påverkats av en större provstorlek. Augustirutorna med GMO-

Arvid Lindh

Handledare: Josef Berger och Tina D´Hertefeldt

Lunds universitet, BLOK01, VT16

majs (Figur 4) var den enda kurvan som inom extrapoleringens gränser planade ut. Detta betyder att efter de 16 prover som behandlats i detta arbete verkar vara tillräckligt för att hitta alla taxa som kan förväntas i habitatet.

De tre resterande proverna (Figur 3 & 4) planar inte ut inom extrapoleringens gränser. Allt som säkert går att härleda från dessa kurvor är att antalet taxa hade förväntas vara högre om fler prover hade behandlats.

Konfidensintervallet är väldigt stort på samtliga provsatser så för stor vikt ska inte läggas på extrapoleringen, men kurvorna pekar trots det mot att en större provtagningsstorlek kunde tänkas leda till ett annorlunda resultat.

Tillskillnad från artikedomskurvorna så planar alla fyra Shannon-index kurvor ut vilket indikerar att

indexvärdena inte hade ökat med fortsatt provtagning och att antalet provtagningar därmed var tillräckliga.

Denna trend kunde ses till och med utan extrapolation. Det är inte förvånande då Shannon i allmänhet planar ut snabbare än antalet arter på grund av logaritmkomponenten i indexets formel (Colwell 2013). Viktigt att poängtera är att arbetet inte berör om det är "mycket eller lite" diversitet i majsfälten, det är helt enkelt bara en jämförelse för att se om det var mer eller mindre diversitet i något av proverna.

Överlag är Shannon-index ett robust diversitetsindex som, även om det inte är optimalt, står emot små provstorlekar bättre än många andra prover (Waite 2000). Shannon valdes att användas över Simpsons-index på grund av Simpsons egenskap att väga vanliga arter högre än ovanliga (Smith, Smith 2003). Frågeställningen och ämnet var av sådan karaktär att jag valde att lägga stor vikt på ovanliga arter med låg abundans. Detta står dock i kontrast med att insekterna endast bestämdes ner till släktnivå. Denna begränsning är dock grundad i andra anledningar, framförallt brist på tid och expertis från mitt håll, men inom vissa släkten också brist på användbar litteratur.

Det här arbetets resultat pekar i samma riktning som andra arbeten inom fältet, att Bt-grödor inte har så stor inverkan på insektsdelen i ekosystemen som man först trott. Arbetet innebär ett steg närmare till att Bt-plantor kan bli mer accepterade och i framtiden användas som alternativ eller komplement till besprutningsmedel och underlätta för biologiska bekämpningsalternativ, så som parasitoida insekter. Datamängden är dock liten och begränsad till endast två månader vid en lokal så resultatet måste tolkas med försiktighet. Istället för att se arbetet som ett självständigt projekt bör det ses som en del i ett större sammanhang. Inom Sverige och resten av Europa behöver det fortsätta undersökas vilka effekter GMO-grödor har på naturliga ekosystem, i vilket AMIGA-

Arvid Lindh
Handledare: Josef Berger och Tina D´Hertefeldt
Lunds universitet, BLOK01, VT16

projektet kommer spela en viktig roll. Men resultatet tyder på att iallafall en av riskerna med GMO-grödor inte verkar vara ett problem för parasitoida steklar.

Tacksägelser

Jag vill först tacka Ika Österblad för hennes expertis och hjälp med artbestämningarna mina *Gelis*-exemplar. Sedan vill jag självklart även tacka mina två handledare, Tina D´Hertefeldt och Josef Berger för all hjälp. Särskilt Josef ska ha tack för sitt stora tålamod och engagemang vid sorteringen och bestämningen av alla steklar, samt för att jag fick använda hans dataset från juni. Tillsist vill jag tacka EU-projektet AMIGA som är grunden till hela arbetet. Utan detta projekt hade det inte blivit något arbete över huvudet taget.

Referenser

- Alekseev VN & Radchenko TD (2000) Ceraphronoid wasps (Hymenoptera, Ceraphronoidea) of the fauna of the Ukraine. *Vestn Zool.* 35(3); 3-16.
- Arpaia S. et al. (2014). *Assessing and monitoring impacts of genetically modified plants on agro-ecosystems: the approach of AMIGA project.* *Entomologia.* 2(154); 79-86.
doi:10.4081/entomologia.2014.154.
- Boucek Z, Rasplus JY (1991) Illustrated key to west-palaearctic genera of Pteromalidae (Hymenoptera: Chalcidoidea). Department of Entomology, Natural history museum, London. 140 pp.
- Broad G (2011) Identification key to the subfamilies of Ichneumonidae (Hymenoptera). Dept. of Entomology, The Natural History Museum, London. 40 pp.
- Chao A et. al. (2014) Rarefaction and extrapolation with Hill numbers. a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr.* 84(1). pp. 45-67.
- Colwell RK (2013) EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9.1.0. Användarguide och programvara. Tillgänglig via: <http://purl.oclc.org/estimates>.
- de la Poza M, Pons X, Farinós GP, López C, Ortego F, Eizaguirre M, Castanera P, Albajes R (2005) Impact of farm-scale Bt maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protection* 24; 677-684
- Gotelli NJ, Colwell RK (2011) Estimating species richness. In: Magurran AE, McGill BJ (eds.). *Frontiers in measuring biodiversity.* Oxford and New York: Oxford University Press. pp. 39-54
- Gotelli NJ, Colwell RK (2001) Quantifying biodiversity: procedures and pitfalls in the measurement and comparison of species richness. *Ecol Lett* 4; 379-391
- Goulet H, Huber JT (1993) Hymenoptera of the world: an identification guide to families. Research Branch, Agricultural Canada Publication. Canada Communication Group-Publishing, Ottawa. 680 pp.
- Graham MWRdeV (1969) The Pteromalidae of north-western Europe (Hymenoptera: Chalcidoidea). *Bulletin of the British Museum (natural history) Entomology, Supplement* 16. 909 pp.
- Hawkins, B. (1994). *Pattern & progress in host-parasitoid interactions.* Cambridge: Press syndicate of the university of Cambridge.
- Huber JT, Viggiani G, Jesu R (2009) Order Hymenoptera, family Mymaridae. *Arthropod fauna of the UAE.* 2; 270-297.
- Huber JT (2009) Biodiversity of Hymenoptera. In: Foottit, R. G och Adler, P. H (eds.). *Insect biodiversity: Science and society.* Blackwell, Oxford. pp. 303-323.
- IBM (2015) IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. IBM corporation, Armonk
- Jordbruksverket (2007) *GMO på världsmarknaden.* Tillgänglig via:
http://www2.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/trycksaker/Pdf_rapporter/ra0_7_18kort.pdf.
Hämtad 1 april 2016
- Jordbruksverket (2015) *Skadegörare i majsodling.* Tillgänglig via:
<http://www.jordbruksverket.se/amnesomraden/odling/jordbruksgrodor/majs/ska>

Arvid Lindh

Handledare: Josef Berger och Tina D´Hertefeldt

Lunds universitet, BLOK01, VT16

- degore.4.4d699a812c3c7b925d80002510.html. Hämtad 1 april 2016
- Jordbruksverket (2016) *Jordbruksmarkens användning 2015*. Tillgänglig via:
<http://www.jordbruksverket.se/webdav/files/SJV/Amnesomraden/Statistik,%20fakta/Arealer/JO10/JO10SM1601/JO10SM1601.pdf> . Hämtad 1 april 2016
- Kozlov MA (1987) Family platygastriidae. In: Medvedev, G. S (ed.). Keys to the insects of the European part of the USSR. 3(2). Amerind Publishing, New Delhi.
- Krogmann L, Holstein J (2010) Preserving and specimen handling: insects and other invertebrates. ABC taxa. 8(2). pp. 463-481.
- Landin BO (1971) Insekter. 2:2. Victor Pettersons Bokindustri AB, Stockholm. 1053 pp.
- Lang A, Oehen B, Ross J-H, Bieri K, Steinbrich A (2015) Potential exposure of butterflies in protected habitats by Bt maize cultivation: A case study in Switzerland. *Biol conserv* 192; 369-377
- Li FF, Ye GY, Wu Q, Peng YF, Chen XX (2007) Arthropod Abundance and Diversity in *Bt* and Non-*Bt* Rice Fields. *Environ. Entomol.* 36(3): 646-654
- Losey JE, Rayor LS, Carter ME (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399; 214
- Magnusson P (2013) Nyckel till de svenska ichneumonidunderfamiljerna. Station Linné, Swedish malaise trap project. 38 pp.
- Masner, L (1980) Key to genera of Scelionidae of the holarctic region, with descriptions of new genera and species (Hymenoptera: Proctotrupoidea). The entomological society of Canada, Ottawa. 54 pp.
- McAleece N, Gage JDG, Lamshead PJD, Paterson GLJ (1997) BioDiversity Professional statistics analysis software. Version 2.0. <http://www.sams.ac.uk/peter-lamont/biodiversity-pro#sthash.kfBrTdjM.dpuf>
- Microsoft (2007) Office Excel (12.0.6747.5000) SP3 MSO (12.0.6743.5000). Microsoft Corporation, Redmond.
- Mittelbach G. (2012) *Community ecology*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Monsanto Company (2002) *Safety Assessment of YieldGard[®] Insect-Protected Corn Event MON 810*. Tillgänglig via: <http://www.cera-gmc.org/files/cera/GmCropDatabase/docs/decdocs/02-269-010.pdf> [Hämtad 1 april, 2016].
- Nixon GEJ (1980) Diapriidae (Diapriinae): Hymenoptera, Proctotrupoidea. handbooks for the identification of British insects. 8(3). Royal Entomological Society, London. 55 pp.
- Noyes JS (1982) Collecting and preserving chalcid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea). *J. Nat. Hist.* 16. pp. 315-334.
- Pálinkás Z, Zalai M, Szénási Á, Kásár, Dorner Z & Balog A (2016) Rove beetles (Coleoptera Staphylinidae) - Their abundance and competition with other predatory groups in Bt maize expressing Cry34Ab1, Cry35Ab1, Cry1F and CP4 EPSPS proteins. *Crop Protection* 80; 87-93
- Peck, O. Boucek, Z. Hoffer, A. 1964. Keys to the Chalcidoidea of Czechoslovakia (Insecta: Hymenoptera). *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, okänd ort. 34. 118 pp.
- Pricop E (2013) Identification key to European genera of the Mymaridae (Hymenoptera: Chalcidoidea), with additional notes. *ELBA Bioflux.* 5(1). pp. 69-81.
- Quicke DLJ (2015) *The Braconid and Ichneumonid Parasitoid Wasps: Biology, Systematics, Evolution and Ecology*. Wiley Blackwell, New York. 704 pp.
- Resende DC, Mendes SM, Marucci RC, Silva AdeC, Campanha MM, Waquil JM (2015) Does Bt maize cultivation affect the non-target insect community in the agro ecosystem?. *Revista Brasileira de Entomologia* 60. pp 82-93.
- Smith R, Smith T (2003) *Elements of ecology*. 5th ed. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Svenska lantbruksuniversitetet, SLU (2015) *Methoca articulata*, Sandjägerstekel. Artfakta; artdatabanken. Internetpublikation. <http://artfakta.artdatabanken.se/taxon/101314>. Hämtad 19 Maj 2016
- Svenska lantbruksuniversitetet (2016) *Dyntaxa*; Svensk taxonomisk databas. Version: 1.1.5941.23182. Internetpublikation. www.dyntaxa.se. Hämtad 12 Maj 2016
- Svobodová Z, Habustová O, Sehnal F, Holec M, Hussein H M (2013) Epigeic spiders are not affected by the genetically modified maize MON 88017. *J. Appl. Entomol.* 137; 56-67. doi: 10.1111/j.1439-0418.2012.01727.x
- Torres JB, Rubersson JR (2006) Abundance and diversity of ground-dwelling arthropods of pest management importance in commercial Bt and non-Bt cotton fields. *Ann Appl Biol* 150; 27-39.
- Truter J, Van Hamburg H, Van Den Berg J (2014) *Environ. Entomol.* 43(1): 197-208. doi: <http://dx.doi.org/10.1603/EN12177>

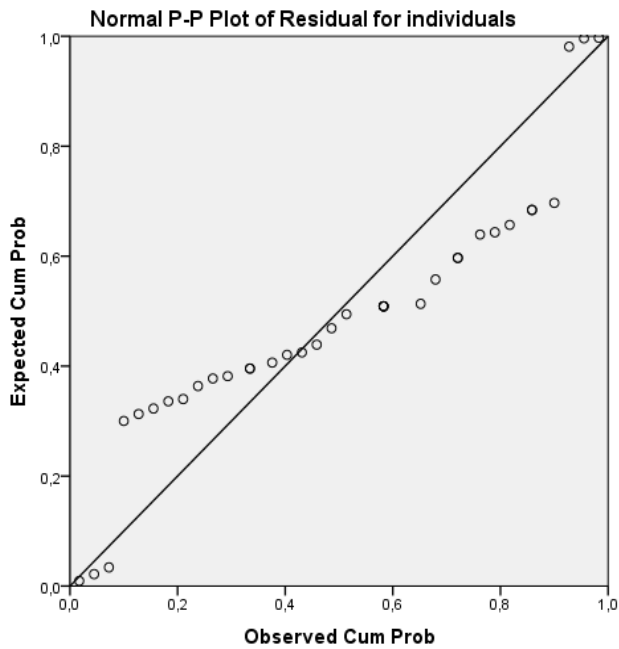
Arvid Lindh

Handledare: Josef Berger och Tina D´Hertefeldt

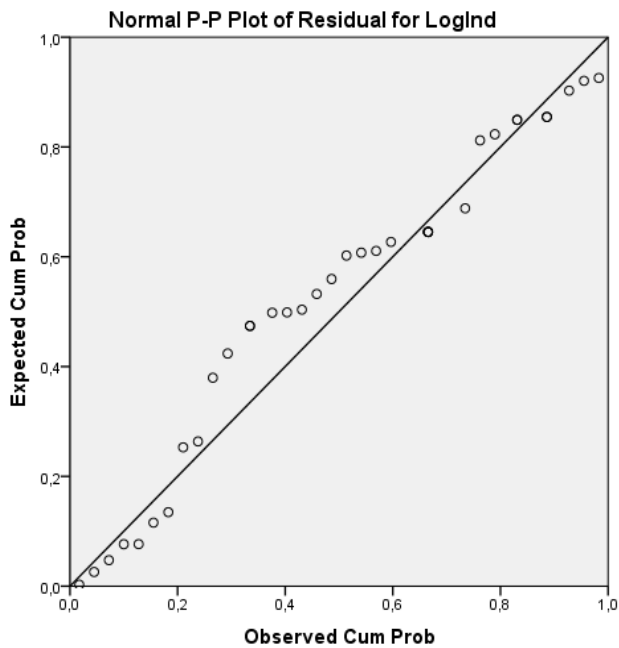
Lunds universitet, BLOK01, VT16

- van Achterberg C (1990) Illustrated key to the subfamilies of the Holarctic Braconidae (Hymenoptera: Ichneumonoidea). *Zool. Med. Leiden*. 64(1). pp. 1-20.
- van Wyk A, van den Berg J, van Hamburg H (2008) Diversity and comparative phenology of Lepidoptera on Bt and non-Bt maize in South Africa. *Int J Pest Manag* 54(1): 77 – 87
- Wahl DB (2015) Key to the Subfamilies of North and Central American Ichneumonidae. Internetpublikation http://www.amentinst.org/Subfamily_Key.php. Hämtad 5 april 2016
- Waite S (2000) *Statistical ecology in practice: a guide to analysing environmental and ecological field data*. Pearson education, Essex. 414 pp.
- Wharton RA, Mason WRM, Marsh PM, Sharkey MJ (1997) *Manual of the New World genera of the family Braconidae (Hymenoptera)*. International Society of Hymenopterists, Washington, DC. 439 pp.

Appendix:



Figur 1. P-P plot över antalet individer. Visar hur proverna avviker från deras förväntade värden, alltså hur stor variansen är.



Figur 2. P-P plot över antalet individer efter att det har genomgått en log10 transformation. Visar hur proverna avviker från deras förväntade värden, alltså hur stor variansen är.