

Martin Felke, Gustav-Adolf Langenbruch

Auswirkungen des Pollens von transgenem Bt-Mais auf ausgewählte Schmetterlingslarven



BfN-Skripten 157

2005

Titelfotos: Martin Felke

Adressen der Autoren: Dr. Martin Felke (Projektbearbeitung)
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
Institut für biologischen Pflanzenschutz
Heinrichstrasse 243
64287 Darmstadt
Email: m.felke@bba.de

Dr. Gustav-Adolf Langenbruch (Projektleitung)
s.o.
Email: g.-a.langenbruch@bba.de

Fachbetreuung durch das UBA/BfN: Dr. Mathias Otto; Fachgebiet II 2.3 „Bewertung gentechnisch veränderter Organismen, Vollzug GenTG“

Das Projekt wurde gefördert durch das Umweltbundesamt und das Bundesamt für Naturschutz mit Mitteln des Ministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit; Laufzeit: 01.06.2001 bis 31.12.2003 (Förderkennzeichen FKZ 201 67 430/05).

Die Beiträge der Skripten werden aufgenommen in die Literaturdatenbank „DNL-online“ (www.dnl-online.de).

Die Publikation kann im Internet unter: www.bfn.de abgerufen werden.

Die BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich.

Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz
Konstantinstr. 110
53179 Bonn
Telefon: 0228/8491-0
Fax: 0228/8491-200
URL: www.bfn.de

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter.

Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck, auch in Auszügen, nur mit Genehmigung des BfN.

Druck: BMU-Druckerei

Gedruckt auf 100% Altpapier

Bonn - Bad Godesberg 2005

Kurzfassung

Ziel der durchgeführten Studie war es, das Ausmaß der Gefährdung von Nicht-Ziel-Schmetterlingen durch den Anbau von transgenem Bt-Mais mit Hilfe von Labor- und Freilanduntersuchungen näher zu untersuchen. Hierfür wurden die beiden Bt-Transformanten Bt-176 (Sorte: PACTOL CB) der Firma SYNGENTA-SEEDS, sowie MON810 (Sorte: NOVELIS) der Firma MONSANTO verwendet. Da Bt-Maislinien das lepidopteren-spezifische Cry1Ab-Toxin in unterschiedlichen Mengen auch im Pollen exprimieren, stellt der Anbau dieser gentechnisch veränderten Pflanzen ein potenzielles Risiko für Nicht-Ziel-Schmetterlinge dar.

Nach Etablierung einer geeigneten Biotest-Methode konnten die Auswirkung des Pollens getestet und LD₅₀-Werte für Larven von 7 einheimischen Schmetterlingsarten ermittelt werden. LD₅₀-Werte für Pollen der transgenen Maislinie Bt-176 lagen zwischen rund 8 Pollenkörnern (Kohlmotte – L₄) und etwa 61 Pollenkörnern (Tagpfauenauge – L₂). Die Versuche zeigen, dass die Empfindlichkeit der Larven gegenüber dem BT-Pollen zwischen den verschiedenen Arten sehr stark variiert. Innerhalb einer Art sind neonate Raupen wesentlich empfindlicher als ältere Larven. Untersuchungen zur Pollenalterung ergaben, dass die Toxizität von Maispollen der Linie Bt-176 innerhalb von drei Wochen nicht abnahm.

Neben akuten toxischen Wirkungen wurden Tests zu subletalen Wirkungen an Larven der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) und des Tagpfauenauges (*Inachis io*) durchgeführt. Die Aufnahme geringer Bt-176 Pollenmengen kann zu Verzögerungen in der Larvalentwicklung führen. Nur wenn die Schädigung der Larve in einem sehr frühen Entwicklungsstadium erfolgt, ist das Individuum in der Lage eine zunächst geringere Gewichtszunahme bis zur Verpuppung wieder auszugleichen. Auswirkungen sublethaler Effekte auf die Populationsdynamik werden diskutiert.

Mais der Linie MON810 enthält vergleichsweise wenig Bt-Toxin im Pollen. Im Laborversuch wurden Larven der Kohlmotte, die sich als besonders Bt-empfindlich erwiesen hatten, selbst durch eine vergleichsweise hohe Dosis von 80 Pollenkörnern nicht signifikant geschädigt. Allerdings führte die Aufnahme von Staubgefäß-Bruchstücken der Linie MON810 bei diesen Tieren zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate. Aus Sicht des Schmetterlingsschutzes erscheint der Anbau der Linie MON810 aufgrund der geringeren Toxin-Expression im Pollen weniger problematisch als die Verwendung der Linie Bt-176. Allerdings muss noch geklärt werden, wie stark die Toxin-Expression im Pollen der Linie MON810 schwanken kann. Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass es zwischen verschiedenen Sorten bzw. aufgrund differierender abiotischer Faktoren deutliche Variationen hinsichtlich der Toxin-Expression geben kann. Auch muss noch untersucht werden inwieweit die hohe Toxin-Konzentration in den Antheren ein Risiko darstellt.

Eine die Untersuchungen begleitende Kartierung von Schmetterlingsarten der Agrarlandschaft in Unterfranken weisen aufgrund von Phänologie und Habitatpräferenzen auf eine hohe Expositionswahrscheinlichkeit für die Larven von 26 tag- und 53 nachtaktiven Schmetterlingsarten hin.

Um die Gefahr für Nicht-Ziel-Schmetterlinge durch den Anbau von Bt-Mais zu minimieren wird vorgeschlagen nur Linien mit äußerst geringer Toxin-Expression im Pollen zuzulassen. Darüber hinaus sollte eine Mantelsaat mit konventionellem Mais angelegt werden und Mindestabstände zu Naturschutzgebieten festgelegt werden.

Schlagwörter: *Bacillus thuringiensis*, transgener Mais, Nicht-Ziel-Schmetterlinge, Risikoabschätzung, Bt-Mais, subletale Effekte.

Summary

Report title: Impact of transgenic Bt-maize pollen on larvae of selected butterflies

Aim of the study presented here was to assess potential side effects on non-target-butterflies due to cultivation of transgenic BT-maize in a number of laboratory and field experiments. Experiments were conducted with the two transgenic events Bt-176 (variety: PACTOL CB) of SYNGENTA-SEEDS and MON810 (variety NOVELIS) of MONSANTO. BT-maize expresses the lepidopteranspecific Cry1Ab toxin in various amounts also in pollen, so cultivation of these genetically modified plants must be considered as a potential threat for non-target-butterflies.

After a suitable bioassay-method was established the impact of pollen could be determined. LD₅₀-values for larvae of 7 indigenous butterfly-species, regarding to the amount of applied pollen grains (Bt-176-maize), could be calculated. LD₅₀-values regarding to pollen of Bt-176-maize ranged between 8 pollen grains for the diamond back moth (4th instar) and 61 pollen grains for the peacock butterfly (2nd instar). Larval susceptibility to Bt-pollen varies considerable between different species. Within the same species neonate larvae are much more susceptible than older caterpillars. Toxicity of Bt-176-maize pollen does not decrease within the first three weeks after pollen shed.

Bioassays for assessing sublethal effects were conducted with larvae of the diamond back moth and the peacock butterfly. Ingestion of low Bt-176-pollen numbers can lead to a delay in larval development. Only if individuals are harmed in an early larval stage caterpillars are able to compensate an initial decrease in weight gain before they pupate. Impacts of sublethal effects on population dynamics are discussed.

MON810 maize contains comparable low amount of Bt-toxin in pollen. Larvae of the diamond back moth, which had been proved to be highly Bt-susceptible were not harmed after consumption of 80 MON810 pollen grains. On the other hand ingestion of MON810 anther fragments caused a significant increase in mortality. From the aspect of butterfly conservation cultivation of the event MON810 seems to be less problematic than cultivation of the event Bt-176, because of lower Cry1Ab-toxin expression in pollen. Nevertheless it has to be proved if there is variation in pollen toxin expression between different transgenic

cultivars or due to different abiotic factors. Also it has to be cleared to which extent high toxin concentration in anthers can pose a risk for non-target-butterflies.

During 2 years of field collections in a part of Bavaria (Germany) butterfly-species inhabiting agricultural areas were recorded. Because of their life cycle and preferences of habitat, larvae of 26 diurnal and 53 nocturnal species will be exposed to maize pollen with high probability.

Summarizing the results of the presented study we recommend only to permit cultivation of Bt-maize with negligible toxin expression in pollen to minimize potential risks for nontarget butterflies. Despite this, transgenic maize fields should be surrounded by at least 10 rows of a non-transgenic maize hybrid to prevent dispersion of Bt-toxin containing pollen. Also cultivation of genetically modified maize should be prohibited near nature reserves.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, transgenic maize, non-target-butterflies, risk assessment, Bt-maize, sublethal effects.

Ausführliche Zusammenfassung

Transgener Bt-Mais ist gegenüber den Larven des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) resistent, da die Pflanze u. a. in den Blättern das lepidopterenpezifische Cry1Ab-Toxin bildet. Da dieses Toxin in unterschiedlichen Mengen auch im Pollen exprimiert wird, stellt der Anbau dieser gentechnisch veränderten Pflanzen ein potentiell Problem für Nicht-Ziel-Schmetterlinge dar. Voraussetzung hierfür ist, dass die Raupen der Nicht-Ziel-Art ähnlich empfindlich gegenüber dem Cry1Ab-Toxin reagieren wie die Maiszünslarve und dass eine hinreichende Expositionswahrscheinlichkeit für Maispollen besteht. Im Rahmen der hier vorgelegten Studie wurde das Ausmaß der Gefährdung von Nicht-Ziel-Schmetterlingen durch den Anbau von transgenem Bt-Mais unter mitteleuropäischen Verhältnissen mit Hilfe von Labor- und Freilandstudien untersucht. Es wurden die beiden Bt-Maislinien Bt-176 (Sorte: PACTOL CB) der Firma SYNGENTA-SEEDS, sowie MON810 (Sorte: NOVELIS) der Firma MONSANTO verwendet. Die beiden Linien unterscheiden sich hinsichtlich der verwendeten Promotorsequenzen und gewebeabhängigen Expressionsraten. So ist z. B. die Toxinexpression im Pollen in der Linie Bt-176 wesentlich höher als in der Linie MON810. Zuerst wurde eine geeignete Biotest-Methode etabliert. Maispollen wurde zunächst in Wasser gelöst und dann auf Raupenfutterpflanzen appliziert. Nach dem Trocknen dieser definierten Suspension wurden die zu testenden Larven auf die Blattstücke gesetzt. Auf diese Weise konnte untersucht werden wie sensibel die Raupen von 7 verschiedenen Schmetterlingsarten auf das in Pollen von Bt-176-Mais enthaltene Toxin reagieren. Für 6 der untersuchten Arten konnten LD₅₀-Werte bestimmt werden, die sich auf die Anzahl der applizierten Pollenkörner beziehen. Am empfindlichsten erwiesen sich die Raupen (L₄) der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) für die ein LD₅₀-Wert von 8 Pollenkörnern ermittelt wurde. Ähnlich sensibel wie L₂-Raupen des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* – 32 Pollenkörner) reagierten L₂-Raupen des Kleinen Kohlweißlings (*Pieris rapae* – 39 Pollenkörner), sowie neonate Larven von Kleinem Fuchs (*Aglais urticae* – 32 Pollenkörner) und Tagpfauenauge (*Inachis io* – 37 Pollenkörner). Für L₂-Raupen des Tagpfauenauges wurde ein LD₅₀-Wert von 61 Pollenkörnern festgestellt. Für Tagpfauenaugenraupen des vierten Larvalstadiums liegt der LD₅₀-Wert bei >> 80, der höchsten getesteten Pollenmenge. Noch unempfindlicher waren L₂-Raupen des Großen Kohlweißlings (*Pieris brassicae* – 139 Pollenkörner). Der LD₅₀-Wert für L₁ und L₂-Raupen der Wintersaateule (*Agrotis segetum*) muss mit >> 500 Pollenkörnern angegeben werden.

Fütterungsversuche ohne Auswahlmöglichkeit wurden auch mit Pollen und Staubgefäß-Bruchstücken der Linie MON810 durchgeführt. Im Laborversuch wurden Kohlmottenlarven selbst durch eine Dosis von 80 Pollenkörnern nicht signifikant geschädigt. Die Aufnahme von Staubgefäß-Bruchstücken der Linie MON810 führte bei diesen Tieren zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate. Aus Hinsicht des Schmetterlingsschutzes erscheint der Anbau der Linie MON810 aufgrund dieser Daten weniger problematisch als die Verwendung der Linie Bt-176. Allerdings ist bekannt, dass die Toxin-Expression im Pollen von MON810 Mais stark schwankt. Dies könnte sowohl auf abiotische Faktoren, als auch auf Unterschiede zwischen verschiedenen Maissorten zurückzuführen sein. Auch muss noch genauer untersucht werden, ob die hohe Toxin-Konzentration in den Antheren ein Risiko darstellt.

Da die Pollendichte mit zunehmender Entfernung vom Maisfeld rasch abnimmt, dürften subletale Effekte unter Freilandbedingungen wesentlich häufiger auftreten als direkte, toxische Auswirkungen durch Bt-Pollen. Bislang fehlten Berichte zu diesem Thema allerdings weitgehend. In der hier veröffentlichten Studie wurden Untersuchungen zu subletalen Effekten mit Kohlmotten (L_4) - und Tagpfauenaugenlarven (L_1 sowie L_2) durchgeführt. Stets führte die Aufnahme geringer Bt-176 Pollenmengen zu Verzögerungen in der weiteren Entwicklung der betroffenen Individuen. Die einmalige Verfütterung von 5 Pollenkörnern verlangsamte die Entwicklung von Kohlmottenlarven im Vergleich zu einer Variante, die mit Pollen von konventionellem Mais gefüttert worden war, signifikant. Verpuppung und Falterschlupf setzten in der Bt-Pollen-Gruppe nicht nur später ein als in der nicht-transgenen Variante, auch benötigten die Individuen der Bt-Variante bis zum Erreichen des Puppen- bzw. Imaginalstadiums deutlich mehr Zeit als die Tiere der konventionellen Variante. Noch deutlicher waren die Unterschiede zwischen den beiden Varianten bei wiederholter Pollenaufnahme. Mit einer ähnlichen Methodik wurde überprüft, welche Auswirkungen die Verfütterung einer Dosis von 10 Bt-176-Pollen auf die Entwicklung von Tagpfauenaugenraupen des ersten und zweiten Larvalstadiums hat. Diese Langzeituntersuchungen belegen, dass die Aufnahme einer sehr geringen Menge Bt-Toxin-haltiger Maispollen die Larvalentwicklung zunächst deutlich verlangsamen kann, was sich eine (L_1 und L_2) bzw. zwei Wochen (L_1) nach Beginn des Biotests anhand des signifikant verringerten Durchschnittsgewichts äußerte. Kurz vor der Verpuppung hatten sich die Durchschnittsgewichte der Larven allerdings weitgehend angeglichen.

In Kombination mit den Daten zur Pollenexposition am Rand von Maisfeldern belegen diese Laboruntersuchungen, dass Bt-empfindliche Schmetterlingslarven nicht nur in direkter Nachbarschaft von Bt-176-Maisfeldern geschädigt werden können, sondern das subletale Effekte, ausgelöst durch sehr geringe Pollenmengen, auch noch in Entfernungen von mehr als 10 Metern auftreten können. So fanden sich während der Maisblüte in 8 Meter Entfernung vom Feldrand bis zu 94 Pollenkörner pro Quadratzentimeter, in 16 Meter Entfernung bis zu 43 und in 32 Meter Entfernung immerhin noch bis zu 34 Pollenkörner pro Quadratzentimeter. Larven, deren Organismus durch die Aufnahme von geringen Bt-Pollendosen gestresst ist, sind in höherem Maße durch Prädatoren oder Krankheiten gefährdet. Raupen, die in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (L_1 oder L_2) subletal durch Pollen von Bt-Mais geschädigt wurden, können den daraus resultierenden Entwicklungsrückstand im weiteren Verlauf der Ontogenese weitaus besser ausgleichen als bereits ältere Raupen (z. B. L_4).

Laboruntersuchungen ergaben, dass die Toxizität von frischem und drei Wochen altem Maispollen der Linie Bt-176 auf Kohlmottenlarven des vierten Stadiums identisch war. Dies bedeutet, dass der Pollen dieser Linie für Larven von Nicht-Ziel-Lepidopteren eine Gefahr darstellt, solange er auf deren Futterpflanzen verfügbar ist. Wahlversuche mit Kohlmottenfaltern erbrachten keine Hinweise darauf, dass die Tiere Kohlblätter, die mit Bt-176-Pollen bedeckt waren, bei der Eiablage mieden. Auch die Raupen zeigten bei der Nahrungsaufnahme keine Vermeidungsreaktion, wenn ihr Futter mit dem für sie toxischen Pollen bedeckt war. Dies bedeutet, dass es zwangsläufig zu einer Pollenaufnahme durch Raupen kommt, falls deren Futterpflanzen mit Pollen kontaminiert sind.

In Unterfranken wurden im Rahmen von Kartierungsmaßnahmen Lepidopterenarten der Agrarlandschaft erfasst. Für die Larven von 26 tag- und 53 nachtaktiven Schmetterlingsarten besteht aufgrund von Phänologie und Habitatpräferenzen eine hohe Expositionswahrscheinlichkeit für Maispollen. Eine eventuelle Gefährdung der betroffenen Arten durch den Anbau von Bt-Mais wird diskutiert.

Um die Gefahr für Nicht-Ziel-Schmetterlinge durch den Anbau von Bt-Mais zu minimieren wird vorgeschlagen nur Linien mit äußerst geringer Toxin-Expression im Pollen zuzulassen. Darüber hinaus sollte eine Mantelsaat mit konventionellem Mais angelegt werden und Mindestabstände zu Naturschutzgebieten festgelegt werden.

Summary (extended version)

Transgenic Bt maize is resistant against larvae of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) because leaves and other tissues are expressing the Cry1Ab toxin which acts specifically against butterflies. Cultivation of these genetically modified plants may pose a risk to non target butterflies, because toxin is expressed also in pollen. Caterpillars of non target species showing the same level of toxin susceptibility as the ECB larva can be harmed, if the probability for maize pollen ingestion is high. Here a risk assessment for European non target butterflies due to cultivation of transgenic Bt maize was done by combining laboratory and field experiments. Bt-176 maize (variety: PACTOL CB) of SYNGENTA-SEEDS company as well as MON810 maize (variety: NOVELIS) of MONSANTO company was used for this study. Both events differ from the inserted toxin promoters as well as the toxin expression of different tissues. Because of this reason Bt-176 pollen contains much more toxin as MON810 pollen.

First of all a suitable bioassay method was established. Maize pollen was solved in water and than applied on the caterpillar's food plants. After the defined solution was dried the test organisms were placed on the leaf disks. By using this method the susceptibility of larvae from 7 butterfly species to Bt-176 maize pollen could be examined. LD₅₀-values regarding to the number of applied pollen grains could be determined for 6 of those species. 4th instar larvae of the diamond back moth (*Plutella xylostella*) showed the highest susceptibility as an LD₅₀-value of 8 pollen grains indicates. More or less the same sensitivity was reported for 2nd instar larvae of the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis* – 32 pollen grains), 2nd instar larvae of the imported cabbage worm (*Pieris rapae* – 39 pollen grains), neonate larvae of the Small tortoiseshell (*Aglais urticae* – 32 pollen grains) and neonate larvae of the Peacock butterfly (*Inachis io* – 37 pollen grains). LD₅₀-values for 2nd and 4th instar larvae of the Peacock butterfly were calculated with 61 and >> 80 pollen grains respectively. 2nd instar larvae of *Pieris brassicae* were even less susceptible as an LD₅₀-value of 139 pollen grains indicates. LD₅₀-values for 1st and 2nd instar larvae of the noctuid species *Agrotis segetum* must be given with >> 500 pollen grains – the highest dose that was tested.

No choice feeding tests were also done with pollen and anthers of the maize event MON810. In a laboratory experiment Diamond back larvae were not even harmed significantly due to an amount of 80 pollen grains applied on cabbage leaf disks. On the other hand ingestion of fragments from anthers caused a significant increase in mortality. Due to these observations cultivation of MON810 maize seems to be less problematic than cultivation of Bt-176 maize from the aspect of butterfly conservation. However, it is known that toxin expression can differ widely in pollen of MON810 maize. Different amounts of toxin could be caused by abiotic factors. Also differences between various cultivars seem to be possible. Further studies have to focus on the question if high toxin concentrations in anthers can pose a risk for caterpillars of non target butterflies.

It can be assumed that sub-lethal effects of Bt pollen will be more frequent under field conditions than toxic effects, because pollen density declines rapidly with increasing distance to the edge of the maize field. Up to now detailed results for this important topic were not available. Here we studied sub-lethal effects on 4th instar larvae of the diamond back moth, as well as on 1st and 2nd instar larvae of the Peacock butterfly. Ingestion of few pollen grains (Bt-176 maize) always caused a delay in development of affected larvae. The development of diamond back moth larvae which were fed only once with 5 pollen grains was reduced significantly compared to a variant that received pollen from an isogenic conventional maize cultivar. Individuals of the Bt pollen group started to pupate and hatch later as individuals of the non transgenic variant. Also there was a significant difference for mean developmental time between those two groups. If pollen application was repeated four times the observed differences between the two variants were even more evident. The impact of 10 Bt-176 pollen grains on the development of 1st and 2nd instar larvae of the Peacock butterfly was assessed by using a similar bioassay method. These long term experiments revealed, that the ingestion of a small number of Bt-176 pollen grains initially reduced the speed of larval development. One week after the bioassay was started 1st and 2nd instar larvae showed a significant reduction for average weight compared to individuals which received pollen from non transgenic maize. The same result was obtained for 1st instar larvae two weeks after the start of the bioassay. However, average weight for the two pollen variants did not differ significantly directly before pupation.

In combination with data for pollen drift these laboratory results suggest, that caterpillars which are susceptible to Cry1Ab toxin could be harmed due to Bt-176 pollen uptake not only in close vicinity to maize fields. It seems possible that sub-lethal effects, caused by very small pollen numbers can be observed also in a distance of more than 10 metres from the edge of the field. During the time of pollen shed up to 94 pollen grains per square centimetre could be found 8 metres from the field's edge. 16 metres from the edge the maximum number was 43 and 32 metres from the edge the maximum number was 34 pollen grains per square centimetre. Larvae, which had been stressed from the ingestion of a small Bt pollen dose, are more threatened because of predators and diseases. Caterpillars experiencing developmental delays early in life (1st or 2nd instar) are able to compensate if they subsequently consume uncontaminated foliage. For older larvae (for example 4th instar) this is not possible.

Toxicity of Bt-176 pollen either fresh or 3 weeks old was tested on larvae of the diamond back moth in a laboratory assay. Differences in toxicity could not be observed. This means, that pollen from this transgenic event can pose a risk for larvae of non target butterflies as long as it is available on their host plants. Choice tests with adult diamond back moths did not indicate, that egg laying individuals avoid cabbage leafs dusted with Bt-176 pollen. Also caterpillars feeding from cabbage leafs did not show any sign of avoidance if their food was contaminated with pollen grains from this event. This means, that pollen will be automatically ingested by larvae if it exists on their host plant.

During 2 years of field collections in Unterfranken (Bavaria, Germany) butterfly-species inhabiting agricultural areas were recorded. Because of their life cycle and preferences of habitat, larvae of 26 diurnal and 53 nocturnal species will be exposed to maize pollen with high probability. Potential risks resulting from this exposition probability are discussed. Summarizing the results of the presented study we recommend to permit only cultivation of Bt-maize with negligible toxin expression in pollen to minimize potential risks for non-target butterflies. Despite this, transgenic maize fields should be surrounded by at least 10 rows of a non-transgenic maize hybrid to prevent dispersion of Bt-toxin containing pollen. Also cultivation of genetically modified maize should be prohibited near nature reserves.

Abkürzungen

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Bt-11	transgener Mais-Event der Firma SYNGENTA SEEDS
Bt-176	transgener Mais-Event der Firma SYNGENTA SEEDS
Cry1Ab	lepidopteren-spezifisches <i>Bt</i> -Toxin, dass von Maispflanzen der Events Bt-11, Bt-176 und MON810 exprimiert wird
L ₁	Raupen des ersten Larvalstadiums
LD ₅₀	Dosis einer Aktivsubstanz, die im Biotest auf 50 % der Versuchsorganismen letal wirkt
MON810	transgener Mais-Event der Firma MONSANTO
PACTOL	isogene, konventionelle Maissorte zu PACTOL CB (Bt-)
PACTOL CB	transgene Maissorte (event Bt-176) (Bt+)
NOBILIS	isogene, konventionelle Maissorte zu NOVELIS (Bt-)
NOVELIS	transgene Maissorte (event MON810) (Bt+)

Tabellarische Übersicht der durchgeführten Versuche

Versuch	Bt-Maislinie	Testorganismus	Ziel
Pollenfütterungsversuch ohne Auswahlmöglichkeit. Biotestdauer: 1 Woche	Bt-176	Larven von Maiszünsler (L ₂), Kohlmotte (L ₄), Wintersaateule (L ₁ und L ₂), Tagpfauenauge (L ₁ , L ₂ , L ₄) und Kleiner Fuchs (L ₁)	Quantifizierung von letalen und subletalen Pollendosen, sowie Bestimmung von LD ₅₀ -Werten.
Pollenfütterungsversuch ohne Auswahlmöglichkeit. Biotestdauer: bis zu 5 Wochen (Schlupf des letzten Falters).	Bt-176	Larven von Kohlmotte (L ₄) und Tagpfauenauge (L ₁ und L ₂).	Beobachtung der Auswirkungen subletaler Pollendosen auf verschiedene Parameter des Entwicklungszyklus
Pollenfütterungsversuch ohne Auswahlmöglichkeit. Biotestdauer: 1 Woche	Bt-176 Vergleichsuntersuchung mit frischem, 2- und 3 Wochen altem Pollen	Larven der Kohlmotte (L ₄).	Toxizitätsbestimmung von unterschiedlich altem Maispollen der Linie Bt-176
Pollenfütterungsversuch mit Auswahlmöglichkeit.	Bt-176	Larven von Kohlmotte (L ₄) und Kleiner Kohlweißling (L ₂).	Es wurde getestet, ob Raupen Futterpflanzen meiden, die mit Maispollen der Linie Bt-176 bedeckt sind
Wahlversuche zur Eiablage	Bt-176	Falter der Kohlmotte	Es wurde getestet, ob Falter bei der Eiablage Pflanzen meiden, die mit Pollen der Linie Bt-176 bedeckt sind

Versuch	Bt-Maislinie	Testorganismus	Ziel
Fütterungsversuch mit Pollen und Staubgefäßen ohne Auswahlmöglichkeit. Biotestdauer: 1 Woche	MON810	Larven der Kohlmotte (L ₄)	Quantifizierung von letaler und subletaler Pollen- und Antherendosis
Freilandbiotests	Bt-176	Larven von Tagpfauenauge (L ₁) und Kleiner Kohlweißling (L ₂)	Untersuchung der Pollentoxizität unter Freilandbedingungen
Erfassung der Pollendrift		Es wurde untersucht wie stark Maispollen mit dem Wind verdriftet wird und die Pollendichte in Abhängigkeit zur Entfernung vom Maisfeld bestimmt	
Schmetterlingskartierung in der Agrarlandschaft – Kreis Miltenberg (Unterfranken)		Es wurden für die deutsche Agrarlandschaft typische Schmetterlingsarten erfasst und jeweils die Expositionswahrscheinlichkeit der Larven für Maispollen abgeschätzt	

Inhaltsverzeichnis:

Kurzfassung.....	3
Ausführliche Zusammenfassung	6
Inhaltsverzeichnis:.....	12
1. Einleitung und Zielsetzung.....	13
2. Laborversuche mit Maispollen der Linie Bt-176	16
2.1. No choice-Tests zur Quantifizierung von letalen und subletalen Pollendosen	16
2.1.1. Allgemeine Methodik der Biotests.....	16
2.1.2. Biotests mit <i>Ostrinia nubilalis</i> -Raupen (L ₂)	18
2.1.3. Biotests mit <i>Plutella xylostella</i> -Raupen (L ₄).....	21
2.1.4. Biotests mit <i>Agrotis segetum</i> -Raupen (L ₁ und L ₂).....	26
2.1.5. Biotests mit <i>Inachis io</i> -Raupen (verschiedene Stadien).....	32
2.1.6. Biotests mit <i>Aglais urticae</i> -Raupen (L ₁)	41
2.1.7. Bestimmung von LD ₅₀ -Werten für alle untersuchten Schmetterlingsarten bzw. Larvalstadien, bezogen auf Maispollen der Linie Bt-176	44
2.1.8. Langzeituntersuchungen mit <i>Plutella xylostella</i> -Raupen (L ₄) zu Auswirkungen geringer Pollenmengen	48
2.1.9. Langzeituntersuchungen mit <i>Inachis io</i> -Raupen (L ₁ und L ₂) zu Auswirkungen geringer Pollenmengen	65
2.2. Wahlversuche mit Maispollen der Linie Bt-176	83
2.2.1. Wahlversuche zum Fraßverhalten von <i>Plutella xylostella</i> -Raupen (L ₄).....	83
2.2.2. Wahlversuche zum Fraßverhalten von <i>Pieris rapae</i> -Raupen (L ₂).....	88
2.2.3. Wahlversuche zum Eiablageverhalten von <i>Plutella xylostella</i> -Faltern.....	90
3. Laborversuche mit Pollen und Antheren der Linie MON810.....	94
3.1. Wirkung von Pollen auf <i>Plutella xylostella</i> -Raupen (L ₄).....	95
3.2. Wirkung von Antheren auf <i>Plutella xylostella</i> -Raupen (L ₄).....	97
4. Freilanduntersuchungen	100
4.1. Untersuchungen zur Verdriftung von Maispollen.....	100
4.2. Biotests unter freilandnahen Bedingungen	104
4.3. Kartierung zur Erfassung der in der Agrarlandschaft vorkommenden heimischen Lepidopterenfauna.....	112
5. Diskussion	125
5.1. Allgemeine Diskussion	125
5.2. Laborversuche mit Maispollen der Linien Bt-176 und MON810.....	126
5.3. Freilandversuche	134
6. Abschließende Empfehlungen.....	139
8. Literatur	141

1. Einleitung und Zielsetzung

Schon seit Jahren werden Vor- und Nachteile der sog. Grünen Gentechnik in der deutschen Öffentlichkeit kontrovers diskutiert, wobei die meisten Menschen dieser recht neuen Technologie bislang eher skeptisch gegenüber stehen. Transgene Pflanzen können u. a. Resistenzen gegen Insekten, Pilze, Nematoden, Viren, Bakterien oder Herbizide zeigen. Andere gentechnisch veränderte Pflanzen weisen einen veränderten Stoffwechsel auf, sind durch männliche Sterilität charakterisiert und/oder enthalten Markergene, die z. B. für eine Antibiotikaresistenz verantwortlich sind. Als Hauptgründe gegen den Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen werden noch nicht absehbare gesundheitliche Risiken für den Verbraucher, sowie mögliche Auswirkungen auf Natur und Umwelt genannt. Die hier vorgestellte Studie geht auf den Aspekt „Umweltwirkungen“ ein und beschäftigt sich mit den Auswirkungen von insektenresistentem Bt-Mais auf Nicht-Ziel-Organismen.

Der untersuchte Bt-Mais enthält in seinem Genom eine DNA-Sequenz des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* und ist somit in der Lage, das selektiv gegen Lepidopteren wirkende kristalline Endotoxin Cry1Ab zu bilden (KOZIEL et al. 1993). Somit ist dieser transgene Mais vor den Larven des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) geschützt, einer Art, die sowohl in Nordamerika, als auch in Europa als ökonomisch bedeutender Maisschädling auftritt. Pro Jahr verursachen die Bekämpfung des Maiszünslers, bzw. die von ihm angerichteten Schäden allein in der US-Landwirtschaft Kosten in Höhe von 1 Mrd. US \$ (ZANGERL et al. 2001). Es wurde zunächst nicht angenommen, dass der Anbau von Bt-Mais einen negativen Einfluss auf Nicht-Ziel-Organismen haben könnte (PILCHER & RICE 1998). Später jedoch stellten LOSEY et al. (1999) in einer Laborstudie fest, dass die Raupen des in Nordamerika weit verbreiteten Monarchfalters (*Danaus plexippus*) geschädigt werden, wenn sie von Futterpflanzen fraßen, die mit Pollen der transgenen Maishybride N4640 (Linie Bt-11) bedeckt waren. Nachfolgende Labor- und Freilanduntersuchungen bestätigten, dass der Pollen von Bt-Mais für die Raupen verschiedener Schmetterlingsarten eine Gefahr darstellen kann (HANSEN & OBRYCKI 2000, FELKE & LANGENBRUCH 2001). Diese Erkenntnis ist allerdings nicht weiter überraschend wenn man bedenkt, dass die Larven vieler Schmetterlingsarten aus verschiedenen Familien empfindlich gegenüber *Bacillus thuringiensis*-Endotoxinen reagieren (KRIEG, 1986 und KRIEG & LANGENBRUCH, 1981). Zudem war relativ früh bekannt, dass transgene Bt-Maissorten das Cry1Ab-Toxin in unterschiedlicher Ausprägung auch im Pollen exprimieren (FEARING et al. 1997). Ziel des Forschungsvorhabens war es, zu dem Thema „Effekte auf Nicht-Ziel-Schmetterlinge“ mehr Daten zu liefern und eine Übertragbarkeit von Laborergebnissen auf die Situation im Freiland zu ermöglichen.

Zwar liegen aus Nordamerika zur Gefährdung von Schmetterlingen durch Bt-Mais mittlerweile eine ganze Reihe von Untersuchungen vor, diese konzentrieren sich allerdings fast ausschließlich auf den dort sehr populären Monarchfalter (*Danaus plexippus*). Ziel der hier vorgelegten Studie war es zu überprüfen ob und in welchem Ausmaß einheimische Schmetterlingsarten durch das im Maispollen enthaltene Cry1Ab-Toxin geschädigt werden.

Um festzustellen, ob bezüglich der Raupen-Empfindlichkeit gegenüber Bt-Pollen interspezifische Unterschiede bestehen, wurden Larven möglichst vieler Schmetterlingsarten aus verschiedenen Familien untersucht. Für drei Arten wurde auch die Empfindlichkeit verschiedener Larvalstadien ermittelt um zu überprüfen, ob Junglarven durch die Aufnahme von Bt-Pollen stärker gefährdet sind als ältere Raupen. Die für die Tests ausgewählten Arten sind alle in Mitteleuropa heimisch und können somit als Stellvertreter für die deutsche Lepidopterenfauna gelten. Da sich die meisten einheimischen Arten unter Laborverhältnissen nicht, oder nicht in ausreichendem Maße nachzuchten lassen, wurden die verwendeten Arten auch unter dem Aspekt der Züchtbarkeit ausgewählt. Der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) wurde mit aufgenommen, um die Empfindlichkeit zwischen Ziel- und Nichtzielorganismen gegenüber dem Pollen von Bt-176-Mais vergleichen zu können. Wahlversuche unter Laborbedingungen sollten Aufschluss darüber bringen, ob Falter bzw. Raupen bei Eiablage bzw. Nahrungsaufnahme solche Pflanzen meiden, die mit Maispollen bedeckt waren. Falls bei Lepidopteren generell ein solches Vermeidungsverhalten existiert, hätte dies für die Risikoeinschätzung weit reichende Konsequenzen.

Ein weiterer Schwerpunkt der Laborarbeiten lag auf der Untersuchung von subletalen Effekten geringer Pollenmengen (event Bt-176) auf Raupen. Hierbei wurde getestet, wie sich die ein- bzw. mehrmalige Verfütterung einer subletalen Pollendosis auf die Entwicklung von Raupen verschiedener Arten auswirkt. Unter Freilandbedingungen dürften Raupen überwiegend subletalen Pollenmengen ausgesetzt sein, so dass derartigen Untersuchungen eine besondere Relevanz zukommt. Daten zu dieser Thematik fehlten allerdings bislang völlig. In weiteren Laborstudien wurde überprüft, ob und wenn ja in welchem Ausmaß die Toxizität von Bt-176-Pollen mit zunehmendem Alter abnimmt. Unter der Annahme, dass Maispollen u. U. 2 bis 3 Wochen auf Futterpflanzen von Nicht-Ziel-Schmetterlingen verfügbar sein könnte, ist es bezüglich einer Risikoabschätzung wichtig zu wissen, ob sich die Toxizität des Pollens in diesem Zeitraum verändert. Ebenfalls unter Laborbedingungen fanden Fütterungsversuche mit Pollen und Staubgefäßen des transgenen Mais-events MON810 statt. Während bekannt war, dass im Pollen von MON810-Mais im Vergleich zum event Bt-176 deutlich weniger Toxin exprimiert wird, deuteten US-amerikanische Forschungsergebnisse darauf hin, dass Staubgefäße des events MON810 eine toxische Wirkung auf Schmetterlingslarven haben könnten.

Im Rahmen von Freilandversuchen wurden Effekte von Bt-176-Pollen auf Larven verschiedener Schmetterlingsarten unter möglichst praxisnahen Bedingungen untersucht. Hiermit sollte überprüft werden, ob die im Labor zu beobachtenden Effekte auch unter Freilandbedingungen auftreten. Zeitgleich wurden Untersuchungen zur Pollen-Verdriftung durchgeführt und die Pollenmengen ermittelt, die in bestimmten Entfernungen vom Rand eines blühenden Maisfeldes nieder gehen. In Kombination mit den in Laborversuchen ermittelten Empfindlichkeiten für verschiedene Arten (LD₅₀-Werte) lässt sich die Gefährdungswahrscheinlichkeit für diese Spezies abschätzen. Im Rahmen einer weiteren Freilanduntersuchung wurden zwischen Anfang Juni und Mitte August in der Nähe des Versuchsstandortes Imagines von tag- und nachtaktiven Lepidopteren erfasst. Später wurde anhand von Literaturdaten für die Larven jeder Art die Pollen-Expositions-

Wahrscheinlichkeit ermittelt. Hiermit sollten die Schmetterlingsarten aufgelistet werden, deren Larven aufgrund von Habitatpräferenzen und Phänologie mit hoher Wahrscheinlichkeit mit Maispollen in Kontakt kommen können und für die somit genauer untersucht werden müsste, ob eine Gefährdung durch den Anbau von Bt-Mais möglich ist.

Die Mehrzahl der Untersuchungen wurde mit Pollen der Linie Bt-176 durchgeführt, da hier die Toxinexpression deutlich höher ist als in den Linien Bt-11 und MON810. Durch die vergleichende Betrachtung von Ergebnissen der verschiedenen Labor- und Freilandstudien war letztlich eine umfassende Beurteilung der Fragestellung „Bedrohung der einheimischen Lepidopterenfauna durch den Anbau von transgenem Bt-Mais“ möglich. Teilergebnisse dieser Untersuchung wurden bereits publiziert (FELKE, 2000; FELKE & LANGENBRUCH, 2001; FELKE & LANGENBRUCH, 2002; FELKE & LANGENBRUCH, 2003; FELKE et al., 2002).

2. Laborversuche mit Maispollen der Linie Bt-176

2.1. No choice-Tests zur Quantifizierung von letalen und subletalen Pollendosen

2.1.1. Allgemeine Methodik der Biotests

Um die Wirkung des *Bt*-Pollens quantifizieren zu können, wurden Fütterungsversuche ohne Auswahlmöglichkeit durchgeführt, wie sie auch zum Testen von *Bt*-Pflanzenschutzmitteln üblich sind (RIETHMÜLLER & LANGENBRUCH, 1989). Die Larven wurden mit Blattstücken ihrer üblichen Futterpflanze gefüttert, auf die Pollen von Bt-Mais bzw. einer isogenen, konventionellen Sorte appliziert worden war (i. d. R. mehrere Konzentrationen). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten unbehandelte Blattstücke. Um frischen Maispollen für die Laboruntersuchungen zur Verfügung zu haben, wurde regelmäßig Mais im Gewächshaus angezogen. Jede Woche wurden jeweils 10 Pflanzen der Sorten PACTOL CB (Bt+), PACTOL (Bt-), NOVELIS (Bt+) und NOBILIS (Bt-) ausgesät. Die Pflanzen verblieben bis zur Blüte im Gewächshaus und wurden entsorgt, sobald sie keinen Pollen mehr lieferten. Bei gelegentlichem Befall mit Blattläusen wurden Larven der Florfliege (*Chrysoperla carnea*) eingesetzt. Spinnmilben wurden durch das Ausbringen von Raubmilben (*Phytoseiulus persimilis*) bekämpft. Chemische Pflanzenschutzmittel fanden keine Verwendung. Zur Vorbereitung der Pollensuspension wurde zunächst frischer Pollen von den im Gewächshaus gezogenen Maispflanzen geerntet. Hierzu wurde die Fahne einer blühenden Maispflanze leicht angetippt und der herabfallende Pollen in einer Plastikschaale aufgefangen. Um reinen Pollen zu erhalten, wurden etwaige Verunreinigungen wie abgefallene Staubgefäße oder Insekten (z. B. Thripse) sofort ausgesiebt. Der Pollen wurde dann entweder direkt verwendet, oder aber bei -30°C in der Gefriertruhe gelagert. Die Applikation des Pollens auf die entsprechende Raupen-Futterpflanze erfolgte in Form einer wässrigen Suspension. Hierzu wurde Pollen mit Hilfe einer Feinwaage abgewogen und in einem halben Milliliter Leitungswasser suspendiert. Die verschiedenen Pollen-Konzentrationen wurden in einem Zentrifugenröhrchen (Fassungsvermögen: 12 ml) angesetzt, und die Suspension mit Hilfe eines Magnetrührers (300 Umdrehungen pro Minute) für 5 bis 10 Minuten gerührt. Stets wurden $0,5\ \mu\text{l}$ Pollensuspension appliziert. Während der Pollenentnahme wurde die Suspension ständig gerührt, um eine gleichmäßige Verteilung des Pollens in der Lösung zu gewährleisten.

Die Pipettenspitze wurde vor jedem Applikationsvorgang vorsichtig an einem Papiertuch abgewischt um zu verhindern, dass außen an der Pipettenspitze anhaftende Pollenkörner mit aufgebracht wurden. Bevor die Larven auf die mit Pollen versehenen Blattstücke gesetzt werden konnten, wurden diese bei Raumtemperatur solange stehen gelassen, bis das Wasser komplett verdunstet war. Diese Applikationsform gewährleistete, dass der Pollen relativ gut auf der Blattoberfläche haften blieb. Durch Abzählen der Maispollen unter dem Binokular ($n = 20$) wurde festgestellt, dass $0,5\ \mu\text{l}$ einer Pollen-Konzentration von $5\ \text{mg/ml}$ im Durchschnitt $10\ (9,8 \pm 0,3)$, $0,5\ \mu\text{l}$ einer Konzentration von $10\ \text{mg/ml}$ im Durchschnitt $20\ (20,2 \pm 0,5)$, $0,5\ \mu\text{l}$ einer Konzentration von $20\ \text{mg/ml}$ durchschnittlich $40\ (40,5 \pm 1,5)$ und $0,5\ \mu\text{l}$ einer

Konzentration von 40 mg/ml im Durchschnitt 80 ($79,2 \pm 2,3$) Pollenkörner enthalten (jeweils Mittelwert \pm SF).

Die Larven der verschiedenen Schmetterlingsarten tolerierten die Haltungsbedingungen während des Biotests unterschiedlich gut. Während Raupen von Wintersaateule, Maiszünsler und Kohlmotte einzeln in kleinen Kunststoffwürfeln gehalten werden konnten, mussten die Larven von Tagpfauenauge und Kleinem Fuchs in Gruppen von 10 Tieren durchgeführt werden, die in etwas größeren Petrischalen untergebracht wurden.

Die Versuche mit Wintersaateule, Maiszünsler, Tagpfauenauge (L_4) und Kohlmotte wurden in $2 \times 2 \times 2$ cm großen Kunststoffwürfeln angesetzt, die mit je 1,5 ml einer 2%igen Agarlösung gefüllt wurden (**Einzeldosen-Methode**). Nach dem Auskühlen des Agars wurde in jeden Behälter ein Kohl-, Brennnessel- bzw. Mais-Blattstück mit einem Durchmesser von 3 mm gelegt (Blattfläche: $0,14 \text{ cm}^2$). Hierbei wurden die Blattstückchen stets so platziert, dass die Blattoberseite nach oben zeigte. Anschließend wurde die Blattscheibe leicht auf die Unterlage gedrückt und die vorbereitete Pollensuspension appliziert. Nachdem das Wasser komplett verdunstet war, wurde in jeden Würfel eine einzelne Larve gesetzt. Die Kontrolltiere erhielten eine Blattscheibe derselben Größe, allerdings ohne Pollen. Nach 24 Stunden erfolgte die erste Bonitur und die bis dahin verzehrte Blattfläche wurde festgehalten. Falls die Larven das Blattstückchen bis zu diesem Zeitpunkt komplett verzehrt hatten, erhielten sie unbehandeltes Futter in Form eines ca. 2 cm^2 -großen Blattstücks. Spätestens nach 48 Stunden wurden alle Tiere mit unbehandeltem Futter nachgefüttert, unabhängig davon, ob sie die erste Blattscheibe inzwischen aufgefressen hatten oder nicht. Insgesamt wurde der Versuch fünfmal bonitiert, wobei die Anzahl der noch lebenden Tiere festgehalten wurde. Außerdem erhielten die Larven bei dieser Gelegenheit frische Blattstücke.

Bei den Untersuchungen mit Tagpfauenauge und Kleiner Fuchs wurden in der unbehandelten Kontrolle pro Versuch 50 (5 Pflanzen mit je 10 Larven) und für die restlichen Varianten jeweils 10 Tiere verwendet (**Petrischalen-Methode**). Bei den übrigen Varianten wurden unterschiedliche Pollenmengen auf die Raupenfutterpflanzen appliziert. In der ersten Variante wurden 50, in der zweiten 100, in der dritten 200, in der vierten 400 und in der fünften Variante 800 Pollenkörner aufgetragen. Es wurden somit durchschnittlich 5, 10, 20, 40 bzw. 80 Pollenkörner pro Larve appliziert. Die Pollensuspension wurde auf die Mittelrippe eines mittelgroßen Blattes einer jungen, frischen Brennnesselpflanze aufgetragen. Nach dem Trocknen der Pollenlösung wurde das Blatt abgeschnitten und in eine, mit 3 ml 2%igem Agar gefüllte Petrischale (Durchmesser: 3 cm), gelegt. Anschließend konnten die Raupen unter Verwendung eines feinen Pinsels auf das Blättchen übertragen werden. Um ein Entweichen der Tiere zu verhindern, wurde ein Stück Handtuchpapier (SCOTT HOSTESS Natura, Fa. Kimberly-Clark) unter den Deckel der Petrischale geklemmt. Sobald das mit Pollen versehene erste Blättchen komplett verzehrt und damit auch der anhaftende Pollen gefressen war, wurden die Tiere bis zum Versuchsende mit unbehandelten Brennnesselblättern nachgefüttert. Larven der Kontrollgruppe erhielten von Beginn an unbehandeltes Futter.

Sowohl die Polystyrolwürfel, als auch die Petrischalen verblieben für die gesamte Biotest-Dauer in einem Klimaschrank mit Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h hell/ 8 h dunkel). Während

der „Nacht“ sank die Temperatur auf 15°C, während sie am „Tag“ auf 25°C stieg. Nach einer Woche wurde der Versuch beendet und das Gewicht jeder einzelnen Larve bestimmt.

Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate, Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme von Raupen der verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Tukey-, Waller- oder Student-Newman-Keuls-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

2.1.2. Biotests mit *Ostrinia nubilalis*-Raupen (L₂)

Material & Methoden

Um die Empfindlichkeit von Zielorganismus und Nichtziel-Arten gegenüber dem Pollen von Bt-176-Mais vergleichen zu können, sollte festgestellt werden welchen Einfluss die Verfütterung des Pollens von konventionellem und transgenem Bt-Mais auf Mortalitätsrate und Gewichtszunahme von Maiszünslerlarven des zweiten Stadiums hat. Es wurden stets solche Larven verwendet, die sich gerade zum ersten Mal gehäutet hatten. Da die Larven hinsichtlich ihres Gewichts nicht einheitlich waren, mussten sie zu Beginn des Biotests einzeln gewogen werden. Pro Versuch wurden insgesamt 150 Tiere verwendet. Die Larven für die Versuche stammten aus einer am Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt etablierten Laborzucht. Um Tiere verwenden zu können, die an die Aufnahme von Maisblättern gewöhnt waren, erfolgte der Schlupf der Raupen direkt an jungen, ca. 50 – 60 cm hohen Maispflanzen der konventionellen Sorte PACTOL (Bt-).

Jeder Biotest enthielt 11 Varianten: unbehandelte Kontrolle, 5 verschiedene Konzentrationen mit Pollen von konventionellem Mais (Sorte: PACTOL) und 5 verschiedene Konzentrationen mit Pollen von Bt-176-Mais (Sorte: PACTOL CB). Für die unbehandelte Kontrolle wurden pro Versuch 50 und für die restlichen Varianten jeweils 10 Tiere verwendet. In den Pollen-Biotests wurden unterschiedliche Pollenmengen an die Raupen verfüttert. Die erste Variante erhielt im Schnitt 10 Pollenkörner pro Individuum, in der zweiten Variante wurden im Durchschnitt 20, in der dritten 40, in der vierten 80 und in der fünften Variante 160 Pollenkörner pro Larve appliziert. Die Versuche wurden in 2 × 2 × 2 cm großen Kunststoffwürfeln angesetzt, die mit je 1,5 ml einer 2%igen Agarlösung gefüllt wurden. Nach dem Auskühlen des Agars wurde in jeden Behälter ein Mais-Blattstück der Sorte PACTOL (Bt-) mit einem Durchmesser von 3 mm gelegt, auf das der Pollen appliziert wurde. Da die Larven zu Versuchsbeginn unterschiedlich schwer waren, wurde die Gewichtszunahme in Prozentwerten berechnet. Die Verdopplung des Ausgangsgewichts entspricht einer Gewichtszunahme von 100 Prozent.

Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Gewichtszunahme von *Ostrinia nubilalis*-Raupen (L₂) der 11 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

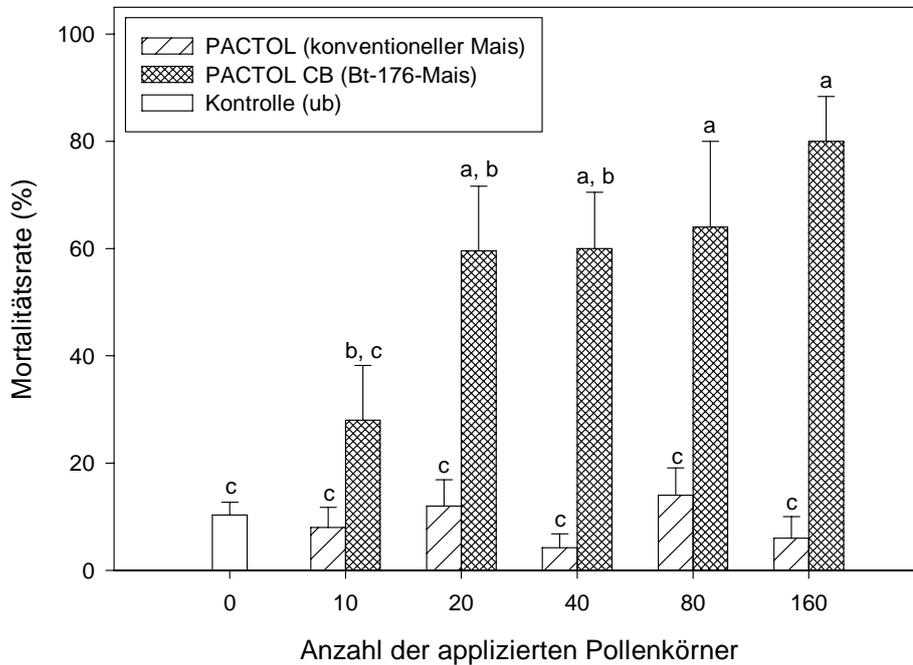


Abbildung 1: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Ostrinia nubilalis*-Raupen (L2) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(10 \text{ FG}) = 12,23$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Abbildung 1 ist zu entnehmen, dass sich die Sterblichkeit der getesteten Maiszünslerlarven mit zunehmender Anzahl der applizierten Pollenkörner von PACTOL CB-Mais (Bt+) erhöhte, so dass sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung eindeutig nachweisen ließ. Ab einer Zahl von 20 Pollen war der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle signifikant. Bis zu einer Menge von 80 Pollenkörnern stieg die Mortalitätsrate dann aber nur noch leicht auf 64 % an. Bei der höchsten getesteten Pollendosis (160 Pollenkörner) lag die Sterblichkeit nach einer Woche bei 80 %. Bei Verfütterung von Pollen der isogenen Sorte PACTOL (Bt-) ließ sich in keiner Variante ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nachweisen. Bei Applikation von 160 Pollenkörnern war die Mortalitätsrate sogar niedriger als in der unbehandelten Kontrolle.

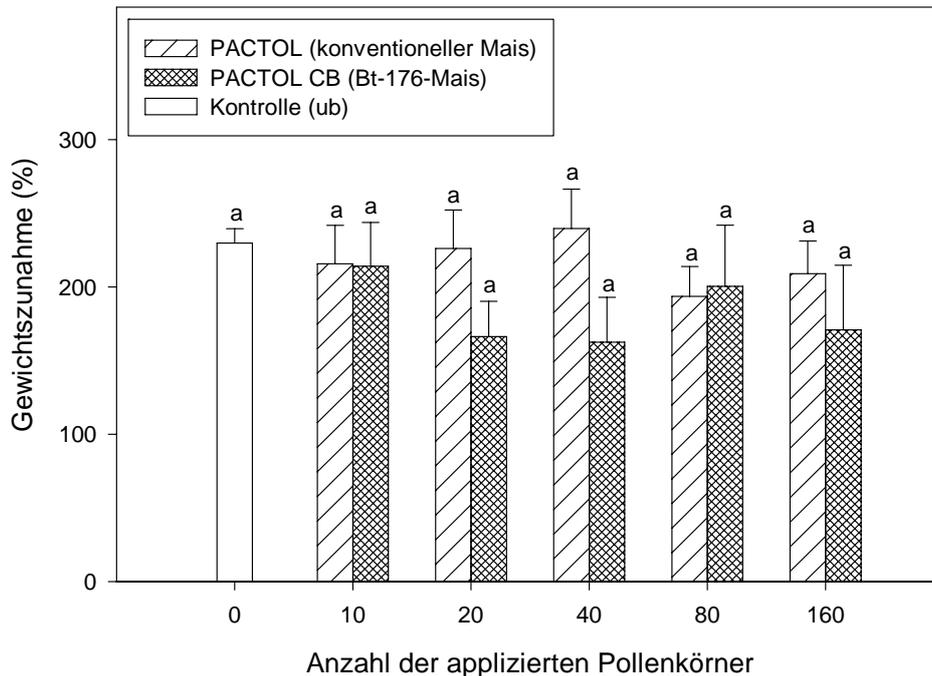


Abbildung 2: Gewichtszunahme (% \pm SF) von *Ostrinia nubilalis*-Raupen (L_2) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Eine Gewichtszunahme von 100 % entspricht einer Verdopplung des Ausgangsgewichts. Zwischen den einzelnen Varianten ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen ($F(10 \text{ FG}) = 0,95$; $p = 0,4896$; Tukey-Test).

Wie Abbildung 2 zeigt, ließen sich zwischen den einzelnen Varianten keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen. Mögliche Ursachen hierfür werden weiter unten diskutiert.

Diskussion

Ein Vergleich der Mortalitätsraten nach einer Woche belegt eindeutig, dass Maiszünsler-Raupen (L_2) durch die Aufnahme von Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) massiv geschädigt werden, wobei die Schädigung dosisabhängig ist. Wie Abbildung 1 zeigt, trat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mortalitätsrate: 10,3 %) bereits bei Applikation von 10 Pollenkörnern der Sorte PACTOL CB (Bt+) eine höhere Mortalitätsrate auf. Allerdings ließ sich dieser Unterschied statistisch nicht absichern. Dies war erst ab einer Dosis von 20 Pollenkörnern möglich. Hier konnte eine Steigerung der Larvalsterblichkeit auf fast 60 % registriert werden. Bis zu einer Erhöhung der Dosis auf 80 Pollenkörner stieg die Mortalitätsrate nur noch leicht auf 64 % an. Eine Applikation von 160 Pollenkörnern pro Raupe hatte eine Larvalsterblichkeit von durchschnittlich 80 % zur Folge. Die prozentuale Gewichtszunahme der überlebenden Larven lag in der PACTOL-CB-Gruppe (Bt+) generell etwas niedriger als in der Kontrollgruppe, wobei die Werte zwischen 71 % und 93 % vom

Vergleichswert der Kontrolltiere lagen. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung war nicht auszumachen. Es ist anzunehmen, dass die Larven der PACTOL CB-Varianten (Bt+), die den Versuch überlebt haben, nur einen Teil des applizierten Pollens verzehrt hatten und bis zur Aufnahme von unbehandeltem Futter hungerten.

Die Larven, die mit Pollen der isogenen Linie PACTOL (Bt-) gefüttert worden waren, zeigten ähnlich niedrige Mortalitätsraten wie die Kontroll-Raupen. Die geringen Abweichungen stellten sich als statistisch nicht signifikant heraus. Auch hinsichtlich der prozentualen Gewichtszunahme gab es keinen signifikanten Unterschied zum Vergleichswert der Kontrollgruppe. Die Verfütterung von Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) führte bei Maiszünsler-Raupen also weder zu positiven, noch zu negativen Effekten.

2.1.3. Biotests mit *Plutella xylostella*-Raupen (L₄)

Material und Methoden

Im Rahmen einer 1999 durchgeführten Studie wurde die Empfindlichkeit von Kohlmottenlarven gegenüber dem Pollen von Bt-176-Mais bereits schon einmal untersucht und auf der Basis der hierbei gewonnenen Mortalitätsraten ein LD₅₀-Wert berechnet. Da damals nur wenig Pollen zur Verfügung stand, musste überwiegend tiefgefrorener Pollen verwendet werden. Im Rahmen der hier durchgeführten Studie sollte überprüft werden, ob die Lagerung bei – 30°C die Toxizität des Pollens beeinflusst. Daher wurden die Versuche mit frischem PACTOL CB-Pollen (Bt-176-Mais) wiederholt. Für die Biotests wurden stets solche Larven verwendet, die sich gerade zum dritten Mal gehäutet hatten. Raupen des vierten Larvalstadiums sind gut an der hellen und verhältnismäßig großen Kopfkapsel zu erkennen. Es wurden 2 verschiedene Versuchsreihen angesetzt, die sich in der Methodik der Pollenapplikation (Einzelapplikation unter Binokularkontrolle, bzw. Aufbringung einer Pollensuspension) unterschieden. Aufgrund der unterschiedlichen Applikations-Methoden wurden die Versuchsreihen für die Berechnung von Mortalitätsraten und Nahrungsaufnahme nicht zusammengefasst.

Bei der Einzelapplikation bestand jeder Biotest aus den 6 Varianten unbehandelte Kontrolle sowie 1 Pollenkorn, 2, 4, 8 und 16 Pollenkörner von PACTOL CB-Mais (Bt+). Pro Biotest und Variante wurden 10 Larven getestet. Die Versuche wurden neunmal wiederholt. Die Larven für die Versuche stammten aus einer am Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt etablierten Laborzucht. Die Versuche wurden in 2 × 2 × 2 cm großen Kunststoffwürfeln angesetzt, die mit je 1,5 ml einer 2%igen Agarlösung gefüllt wurden. Nach dem Auskühlen des Agars wurde in jeden Behälter eine Kohlblattscheibe (Markstammkohl) mit einem Durchmesser von 3 mm gelegt. Die Blattstückchen wurden stets so platziert, dass die Blattoberseite nach oben zeigte. Anschließend wurde die Blattscheibe leicht auf die Unterlage gedrückt und etwas angefeuchtet. Der Pollen wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze trocken auf das Blattstück aufgetragen. Anschließend wurden überzählige Pollenkörner unter dem Binokular unter Verwendung eines feinen Haarpinsels entfernt.

In einem zweiten Versuchsansatz erfolgte die Applikation in Form einer wässrigen Pollensuspension. Im Durchschnitt wurden 5, 10, 20 und 40 Pollenkörner der Sorte PACTOL

CB (Bt+) auf Kohlblattstückchen appliziert. Es handelt sich bei diesen Angaben um empirisch ermittelte Durchschnittswerte. Außerdem gab es eine Kontrollvariante, die mit unbehandelten Kohlblattscheiben gefüttert wurde. Pro Biotest und Variante wurden 10 Larven getestet. Die Versuche wurden viermal wiederholt. Wie für die oben geschilderten Biotests wurden auch hier die Nahrungsaufnahme in den ersten 24 Stunden, sowie die Mortalitätsrate nach einer Woche festgehalten. Der für *Plutella xylostella*-Raupen berechnete LD₅₀-Wert bezieht sich auf die Mortalitätsraten, die im ersten Versuchsansatz (trockene Pollenapplikation) beobachtet wurden.

Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Nahrungsaufnahme von *Plutella xylostella*-Raupen (L₄) der 6 (trockene Pollenapplikation), bzw. 5 (Applikation einer Pollensuspension) verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Student-Newman-Keuls- und Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

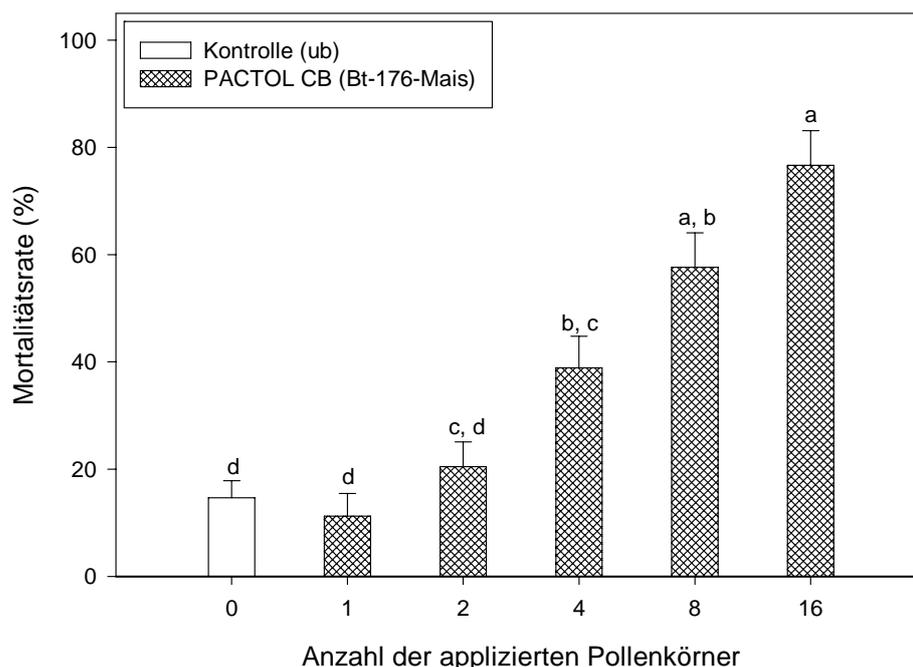


Abbildung 3: Durchschnittliche Mortalitätsrate nach einer Woche (% ± SF) für *Plutella xylostella*-Raupen (L₄) im Bezug zu der pro Larve applizierten Pollenmenge (unter Binokular-Kontrolle abgezählt). Für alle Wiederholungen wurde frischer Pollen verwendet. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant (F (5 FG) = 21,36; p < 0,0001; Tukey-Test).

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich wird, erhöhte sich die Mortalitätsrate für die getesteten Kohlmottenlarven mit zunehmender Anzahl der applizierten Pollenkörner (PACTOL CB-Mais (Bt+)) deutlich. Ab einer Zahl von 4 Pollen war der Unterschied zur unbehandelten

Kontrolle signifikant. Bei der höchsten hier getesteten Menge (16 Pollenkörner) lag die Sterblichkeit nach einer Woche bei fast 80 %.

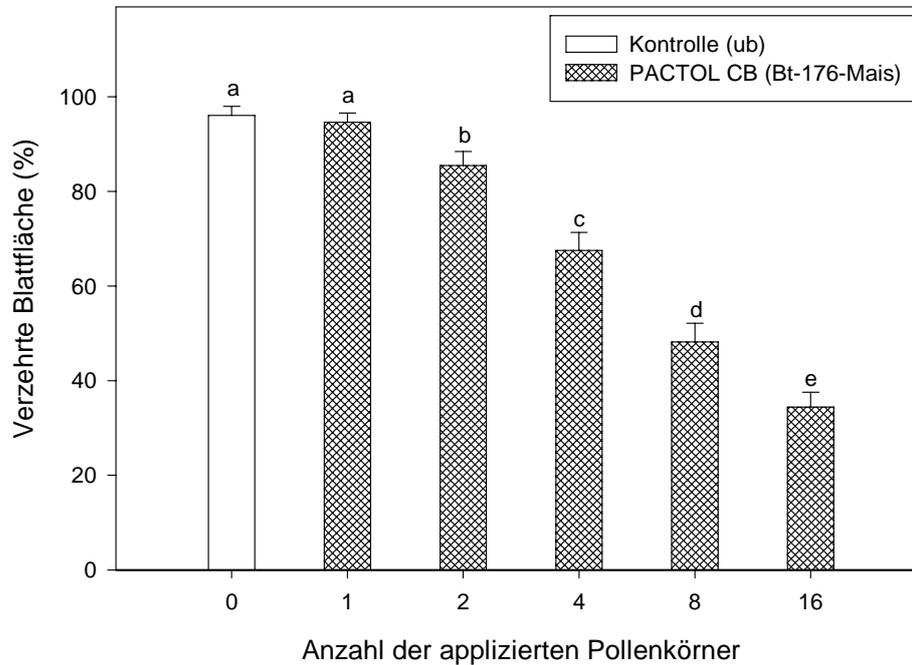


Abbildung 4: Durchschnittlich verzehrte Blattfläche nach 24 Stunden ($\% \pm SF$) für *Plutella xylostella* - Raupen (L_4) im Bezug zu der pro Larve applizierten Pollenmenge (unter Binokular-Kontrolle abgezählt). Für alle Wiederholungen wurde frischer Pollen verwendet. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(5, FG) = 69,03$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test).

Abbildung 4 zeigt, dass die von den Larven innerhalb von 24 Stunden verzehrte Blattfläche immer weiter abnahm, je mehr Pollen (PACTOL CB-Mais (Bt+)) auf das Kohlblattstückchen appliziert worden war. Bereits ab einer Zahl von 2 Pollenkörnern erwies sich der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle als signifikant. Bei der höchsten hier getesteten Menge (16 Pollenkörner) lag die durchschnittlich verzehrte Blattfläche nur noch bei 34 % und somit bei rund einem Drittel des Wertes für die unbehandelte Kontrolle.

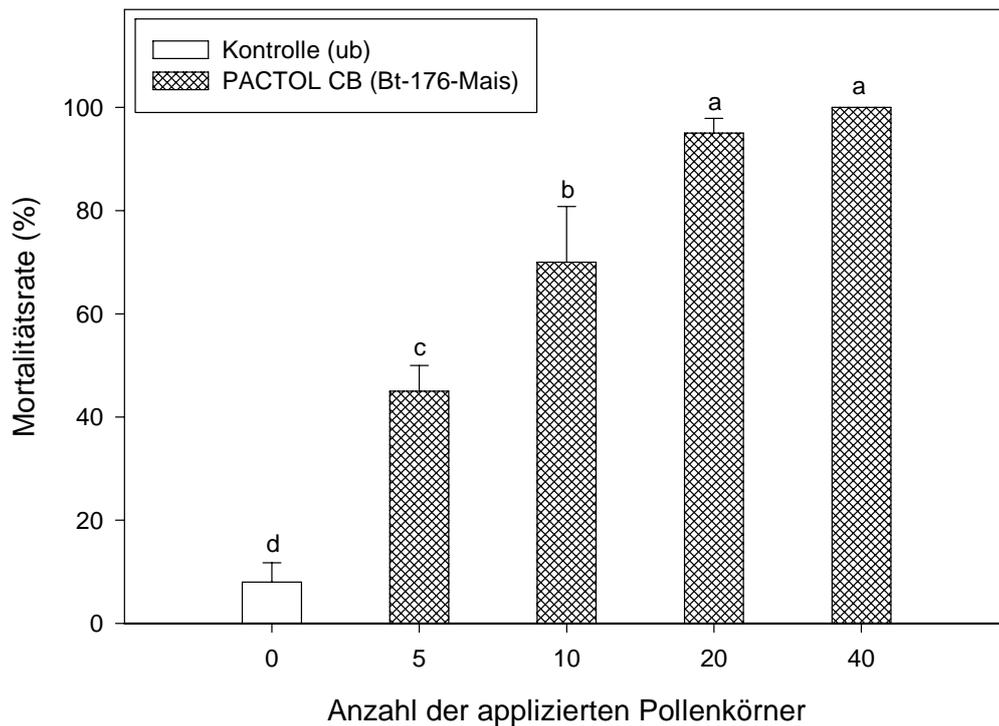


Abbildung 5: Durchschnittliche Mortalitätsrate nach einer Woche ($\% \pm \text{SF}$) für *Plutella xylostella* - Raupen (L_4) im Bezug zu der pro Larve applizierten Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Für alle Wiederholungen wurde frischer Pollen verwendet. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(4 \text{ FG}) = 32,68$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test).

Abbildung 5 verdeutlicht, dass sich die Mortalitätsrate für die getesteten Kohlmottenlarven mit zunehmender Anzahl der applizierten Pollenkörner (PACTOL CB-Mais (Bt+)) deutlich erhöhte. Bereits bei einer Zahl von 5 Pollen war der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle signifikant. Während die Variante mit der zweithöchsten Pollenkonzentration (20 Pollenkörner) nach einer Woche schon eine Mortalitätsrate von 95 % zeigte, überlebte in der Variante mit der höchsten getesteten Menge (40 Pollenkörner) keine einzige Larve den Biotest.

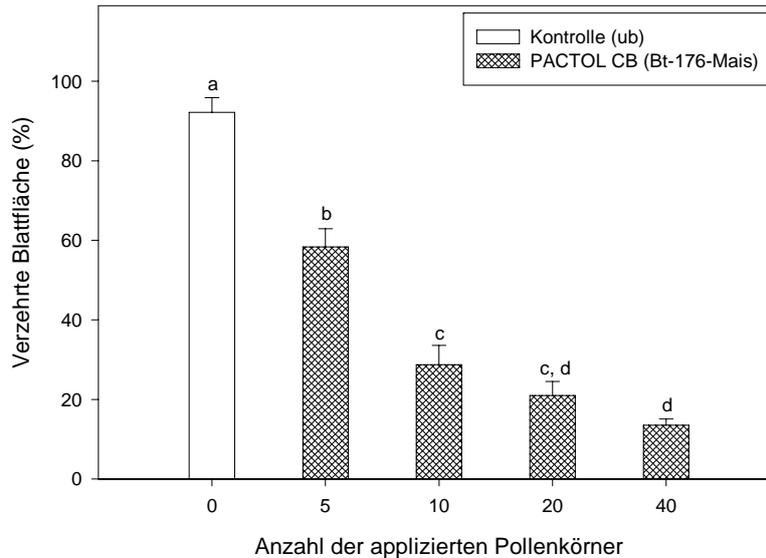


Abbildung 6: Durchschnittlich verzehrte Blattfläche nach 24 Stunden (% \pm SF) für *Plutella xylostella* - Raupen (L_4) im Bezug zu der pro Larve applizierten Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Für alle Wiederholungen wurde frischer Pollen verwendet. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant (F (4 FG) = 53,39; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test).

Abbildung 6 macht den Einfluss von BT-Pollen (PACTOL CB-Mais) auf die Nahrungsaufnahme von Kohlmottenlarven deutlich. Es zeigte sich, dass die von den Larven innerhalb von 24 Stunden verzehrte Blattfläche immer weiter abnahm, je mehr Pollen auf das Kohlblattstückchen appliziert worden war. Während die unbehandelten Kontrolltiere 92 % der Kohlblattscheibe verzehrten, lag dieser Wert bei 5 applizierten Pollenkörnern nur noch bei 58 %. Dieser Unterschied erwies sich als statistisch signifikant. Bei der höchsten hier getesteten Menge (40 Pollenkörner) lag die durchschnittlich verzehrte Blattfläche nur noch bei 13,5 % und somit bei rund einem Siebtel des Wertes der unbehandelten Kontrolle.

Diskussion

Prinzipiell führten beide Versuchsreihen zu den gleichen Ergebnissen. Bei steigender Bedeckung des Raupenfutters mit Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt-176-Mais) nahm die Mortalitätsrate der getesteten Kohlmottenlarven (L_4) zu, während die durchschnittlich verzehrte Blattfläche zurückging. Der Vergleich beider Applikationsmethoden zeigt, dass die in dieser Studie üblicherweise durchgeführte Applikation einer Pollensuspension zu vergleichbaren Ergebnissen führt wie das exaktere, aber weitaus arbeitsintensivere Aufbringen einzelner Pollenkörner.

Bereits ab einer Zahl von 2 applizierten Pollenkörnern fraßen die Raupen signifikant weniger als die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe. Hinsichtlich der Mortalitätsrate zeigten sich signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle ab einer Dosis von 4 Pollenkörnern. Eine Erhöhung der applizierten Pollenmenge von 20 auf 40 Pollenkörner führte zu einer Steigerung der Mortalitätsrate von 95 auf 100 %, sowie zu einer Reduktion der verzehrten Blattfläche von 21 auf 13,5 %. In beiden Fällen erwiesen sich die Unterschiede als statistisch

nicht signifikant. Daraus wird ersichtlich, dass bereits die Verfütterung von nur 20 Pollenkörnern der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) eine derart toxische Wirkung auf Kohlmottenlarven des vierten Stadiums hat, dass eine weitere Dosissteigerung kaum noch zu einer Verstärkung der Effekte führt.

Ein Vergleich dieser Studie mit den von FELKE & LANGENBRUCH (2001), sowie FELKE et al. (2002) veröffentlichten Daten könnte darauf hindeuten, dass die Toxizität des Pollens von gentechnisch verändertem Mais infolge einer Lagerung in tiefgefrorenem Zustand abnehmen kann. Ganz besonders deutlich wird dies durch einen Vergleich der LD₅₀-Werte für Kohlmottenraupen des vierten Larvalstadiums. Während FELKE & LANGENBRUCH (2001), die für ihre Versuche teils frischen aber überwiegend eingefrorenen Pollen verwendeten, einen LD₅₀-Wert von 19,2 Pollenkörnern berechneten, wurde in der hier durchgeführten Studie ein LD₅₀-Wert von 7,77 Pollenkörnern ermittelt, der sich ausschließlich auf frisches Material bezieht. Diese Menge entspricht rund 40 % des o.g. LD₅₀-Werts von 19,2 Pollenkörnern. In beiden Fällen wurde die transgene Sorte PACTOL CB (Bt+) verwendet.

FELKE & LANGENBRUCH (2001) geben als 95%iges Konfidenzintervall des LD₅₀-Werts eine Spannbreite von 9,2 bis 29,8 Pollen an. Das 95%ige Konfidenzintervall des hier berechneten LD₅₀-Werts von 7,77 schwankt dagegen mit 6,14 bis 9,74 weit weniger stark. Dies kann damit erklärt werden, dass die Toxizität von frischem Pollen weit weniger stark schwankt als dies bei Verwendung von teils frischem und teils eingefrorenem Material der Fall ist. Auch alle übrigen in dieser Studie ermittelten LD₅₀-Werte beziehen sich auf die Verwendung von teilweise frischem und teilweise eingefrorenem Pollen. Dies bedeutet, dass alle Werte bei ausschließlicher Verwendung von frischem Pollen deutlich nach unten korrigiert werden müssten. Der Vergleich zwischen den beiden für *Plutella xylostella* berechneten LD₅₀-Werten könnte den hierfür benötigten Korrekturfaktor liefern.

Da die beiden Versuchsreihen in einem zeitlichen Abstand von rund 3 Jahren durchgeführt wurden, könnten auch Änderungen in der Bt-Empfindlichkeit der Larven für die abweichenden LD₅₀-Werte verantwortlich sein. Eine solche Änderung erscheint aber eher unwahrscheinlich, da Tiere aus Biotests nicht für die Zucht verwendet wurden, und es somit nicht zu einer Selektion in Richtung einer Bt-Toxin-Resistenz kommen konnte.

2.1.4. Biotests mit *Agrotis segetum*-Raupen (L₁ und L₂)

Material & Methoden

Es sollte geprüft werden, welchen Einfluss die Verfütterung des Pollens von konventionellem und transgenem Bt-Mais auf Mortalitätsrate und Gewichtszunahme von *Agrotis segetum*-Raupen (Lepidoptera, Noctuidae) hat. Für die Biotests wurden entweder Larven des ersten oder des zweiten Larvalstadiums verwendet. Im ersten Fall handelte es sich um neonate Tiere, die nicht älter als 24 Stunden waren. Für die übrigen Biotests wurden Larven verwendet, die sich gerade zum ersten Mal gehäutet hatten. Da die Larven hinsichtlich ihres Gewichts nicht einheitlich waren, mussten sie vor Versuchsbeginn einzeln gewogen werden. Die Versuchstiere stammten aus einer am Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt auf Kunstmedium etablierten Laborzucht. Um Tiere verwenden zu können, die an die

Aufnahme von Kohlblättern gewöhnt waren, erfolgte der Schlupf der Raupen direkt an jungen Blättern von Markstammkohl.

Die Versuche wurden in würfelförmigen Kunststoffdosen mit 2 cm Kantenlänge angesetzt, die mit je 1,5 ml einer 2%igen Agarlösung gefüllt wurden. Nach dem Auskühlen des Agars wurde in jeden Behälter ein rundes Blattstück Markstammkohl (*Brassica oleracea acephala medullosa*) mit einem Durchmesser von 3 mm gelegt, auf die eine Pollensuspension appliziert wurde. Nach einer Woche wurde der Versuch beendet und das Gewicht jeder einzelnen Larve bestimmt. Da die Larven zu Versuchsbeginn unterschiedlich schwer waren, wurde die Gewichtszunahme in Prozentwerten berechnet. Die Verdopplung des Ausgangsgewichts entspricht einer Gewichtszunahme von 100 Prozent.

Die Biotests mit neonaten Larven bestanden aus zwei verschiedenen Varianten, in denen entweder Pollen von konventionellem Mais (Sorte: PACTOL (Bt-)) oder Pollen von Bt-176-Mais (Sorte: PACTOL CB (Bt+)) verfüttert wurde. Diese Versuche wurden neunmal wiederholt, wobei pro Wiederholung und Variante 40 bis 50 Larven getestet wurden. Mit Raupen des zweiten Larvalstadiums wurden 2 verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, da Pollen von transgenem und konventionellem Mais nicht gleichzeitig zur Verfügung standen. Im ersten Ansatz wurde eine unbehandelte Kontrollvariante mit einer Gruppe verglichen, die mit Pollen von Bt-176-Mais (Sorte: PACTOL CB (Bt+)) gefüttert wurde. Im zweiten Ansatz fand ein Vergleich zwischen einer unbehandelten Kontrollvariante und solchen Tieren statt, die mit Pollen der konventionellen, isogenen Sorte PACTOL (Bt-) gefüttert wurden.

Beide Versuchsreihen wurden jeweils 14 mal wiederholt, wobei pro Wiederholung und Variante 25 Larven getestet wurden. Da die beiden Versuchsreihen unter den gleichen Bedingungen stattfanden, wurden sie später zur Berechnung von durchschnittlichen Mortalitätsraten bzw. durchschnittlicher Gewichtszunahme zusammengefasst und es erfolgte ein statistischer Vergleich der 3 Varianten unbehandelte Kontrolle, Pollen von PACTOL-Mais (Bt-) und Pollen von PACTOL CB-Mais (Bt+).

Da erste Versuche mit einer Dosis von bis zu 80 Pollenkörnern pro Larve mit der transgenen Sorte PACTOL CB (Bt+) keinen sichtbaren Effekt hatten, wurden später relativ hohe Pollenmengen verfüttert. Dies wurde dadurch erreicht, dass 0,5 µl Pollen, der sich aus einer Suspension abgesetzt hatte, direkt vom Boden der Küvette aufgenommen wurde. Durch mehrmaliges Auszählen dieser Menge wurde ein pro Larve applizierter Durchschnittswert von $542 \pm 28,17$ Pollenkörnern bestimmt.

Um Unterschiede bezüglich Mortalität und Gewichtszunahme von neonaten *Agrotis segetum*-Raupen zu untersuchen, wurden ein PROC t-test nach COCHRAN, sowie ein Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01). Die prozentuale Gewichtszunahme jedes einzelnen Individuums wurde als eine Wiederholung gewertet. Um die Unterschiede bezogen auf die Gewichtszunahme von *Agrotis segetum*-Raupen (L₂) auf ihre statistische Signifikanz zu testen, wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, Proc GLM), sowie ein Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte, benutzt (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

Bei allen Versuchen konnte häufig beobachtet werden, dass die Larven offensichtlich gezielt zuerst den auf das Blattstück applizierten Pollen fraßen und das Kohlblättchen erst später verzehrten. Aus diesem Grund wird die nach 24 Stunden konsumierte Blattfläche nicht angegeben.

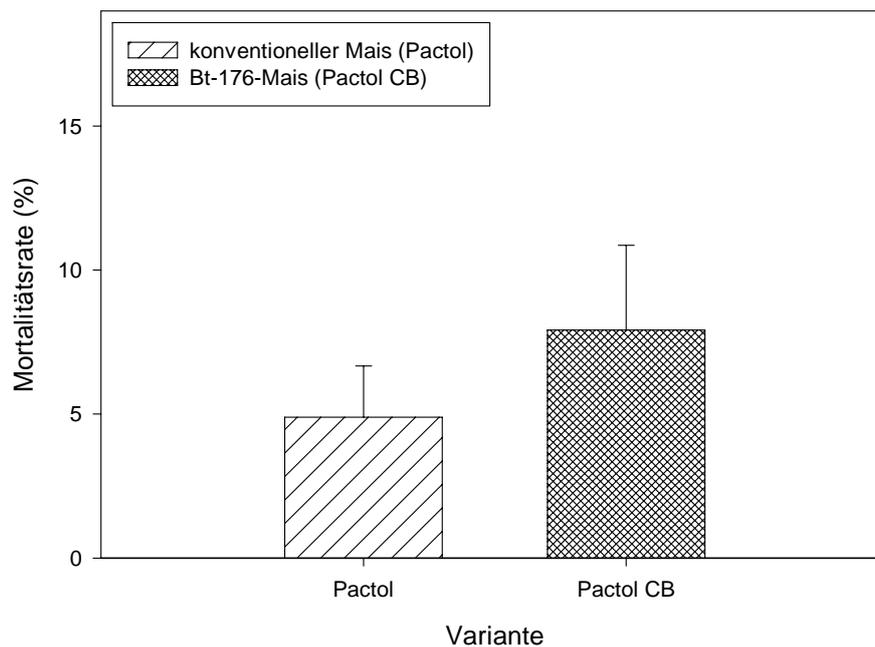


Abbildung 7: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Agrotis segetum* (L_1) nach einer Woche, die mit $542 \pm 28,17$ Pollenkörnern von konventionellem Mais (Sorte: PACTOL) oder Bt-176-Mais (Sorte: PACTOL CB) gefüttert worden waren (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($t(16 \text{ FG}) = 0,88$; $p = 0,3916$; Tukey-Test).

Wie Abbildung 7 zeigt, lag die durchschnittliche Mortalitätsrate in beiden Varianten deutlich unter 10 %. Der Unterschied von 3 % zwischen den Larven, die Pollen von konventionellem und transgenem Mais gefressen hatten, stellte sich als statistisch nicht signifikant heraus.

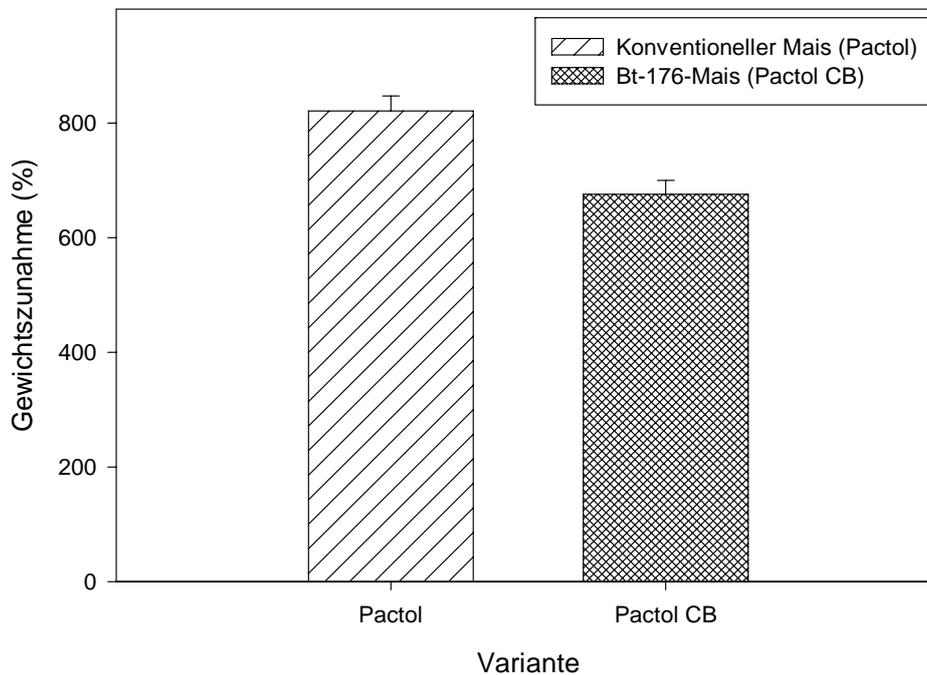


Abbildung 8: Durchschnittliche Gewichtszunahme ($\% \pm \text{SF}$) von *Agrotis segetum*-Raupen (L_1) nach einer Woche, die mit $542 \pm 28,17$ Pollenkörnern der konventionellen Maissorte PACTOL, oder der transgenen Sorte PACTOL CB gefüttert worden waren (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Eine Gewichtszunahme von 100 % entspricht einer Verdopplung des Ausgangsgewichts. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($t(700 \text{ FG}) = 4,05$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Wie Abbildung 8 zeigt, nahmen Larven, die mit Pollen von konventionellem Mais gefüttert worden waren, innerhalb einer Woche durchschnittlich stärker an Gewicht zu, als die Tiere, die Pollen von Bt-176-Mais gefressen hatten. Die durchschnittliche Gewichtszunahme der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) lag lediglich bei 82,3 % der Vergleichstiere. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen erwies sich als hoch signifikant. In allen 3 Varianten lag die durchschnittliche Mortalitätsrate bei fast 0 %. Aus diesem Grund wurde nicht untersucht, ob die aufgetretenen geringen Unterschiede statistisch signifikant sind.

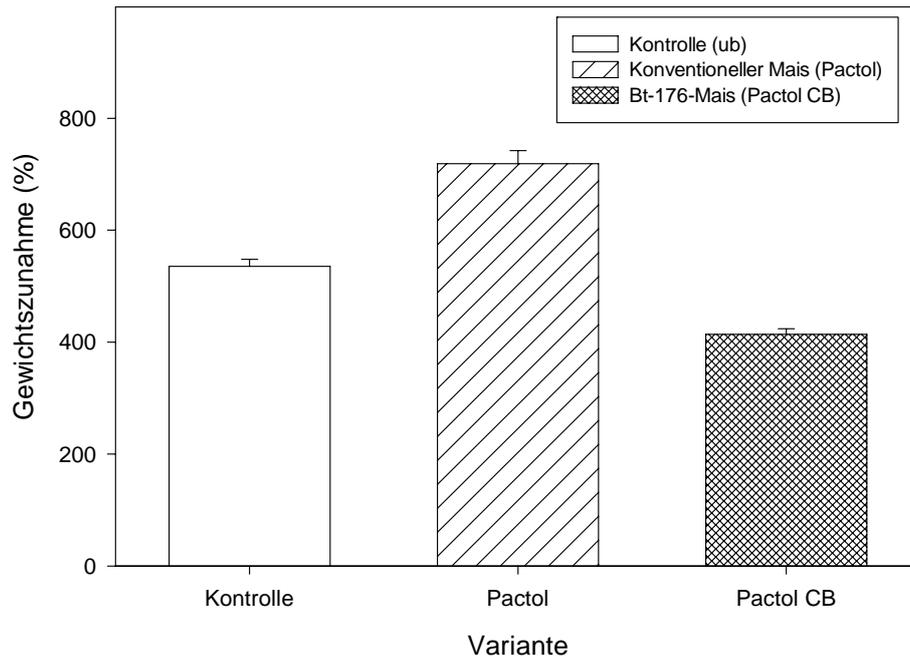


Abbildung 9: Durchschnittliche Gewichtszunahme nach einer Woche ($\% \pm \text{SF}$) für *Agrotis segetum*-Raupen (L_2), die mit $542 \pm 28,17$ Pollenkörnern der konventionellen Maissorte PACTOL, oder der transgenen Sorte PACTOL CB gefüttert worden waren. Die Larven der Kontrollgruppe erhielten unbehandeltes Futter. Eine Gewichtszunahme von 100 % entspricht einer Verdopplung des Ausgangsgewichts ($F(2 \text{ FG}) = 75,10; p < 0,0001$; Tukey-Test).

Wie Abbildung 9 zeigt, wuchsen Larven (L_2), die Pollen von konventionellem Mais aufgenommen hatten, innerhalb einer Woche deutlich schneller als unbehandelte Kontrolltiere. Diese wiederum nahmen wesentlich mehr an Gewicht zu als jene Raupen, die Pollen von Bt-176-Mais gefressen hatten. Die Unterschiede zwischen den Varianten erwiesen sich als signifikant.

Diskussion

Die Larven der Erdeulenart *Agrotis segetum* wurden im Biotest durch den Verzehr von Pollen der transgenen Maislinie Bt-176 kaum geschädigt. Selbst für neonate Raupen, die mehr als 500 Pollenkörner gefressen hatten, lag die Mortalitätsrate nach einer Woche lediglich bei knapp 8 % und war damit nur rund 3 % höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dieser geringe Unterschied erwies sich als statistisch nicht signifikant. Für Raupen des 2. Larvalstadiums von *Agrotis segetum* wurde nach Verzehr der gleichen PACTOL CB-Pollenmenge (Bt+) sogar nur eine Mortalitätsrate von durchschnittlich 0,29 % festgestellt. Dies war deutlich weniger als in den Varianten unbehandelte Kontrolle (0,58 %) und PACTOL (1,43 %). Es wurde nicht untersucht, ob diese Unterschiede statistisch signifikant sind, da eine Sterblichkeitsrate von rund 1 % für Raupen-Biotests extrem gering und somit zu vernachlässigen ist.

Ein Vergleich der Gewichtszunahme ergab allerdings für beide Larvalstadien signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten. Während neonate Larven, die mit Pollen von konventionellem Mais gefüttert worden waren ihr Gewicht innerhalb einer Woche

um durchschnittlich 821,13 % steigern konnten, betrug der Gewichtszuwachs bei der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) nur 675,81 %. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch für die etwas älteren Raupen (L₂) festgestellt werden. Die geringste Gewichtszunahme wurde mit 414,13 % bei den Larven festgestellt, die mit Pollen von gentechnisch verändertem Mais gefüttert worden waren. Die unbehandelten Kontrolltiere nahmen innerhalb einer Woche um durchschnittlich 535,30 % zu. Am stärksten fiel das Wachstum in der PACTOL-Gruppe (Bt-) mit 718,85 % aus.

Biotests wie die hier durchgeführten sollten sich aus verschiedenen Varianten zusammensetzen, die gleichzeitig, unter identischen Bedingungen (z. B. Temperatur, Tageslänge, usw.) und mit Larven gleicher Herkunft sowie gleichen Alters durchgeführt werden. Dagegen wurden mit *Agrotis segetum*-Raupen des zweiten Larvalstadiums zwei Versuchsreihen durchgeführt, die zur Berechnung von durchschnittlicher Gewichtszunahme bzw. Mortalitätsrate zusammengefasst wurden. Da alle Versuche unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden erscheint dies gerechtfertigt. Da Pollen der beiden zu untersuchenden Maissorten (PACTOL (Bt-) und PACTOL CB (Bt+)) nicht gleichzeitig zur Verfügung standen war es nicht möglich alle 3 Varianten in einem einzigen Biotest zusammenzufassen.

Abschließend lässt sich sagen, dass *A. segetum*-Larven durch transgenen Mais der Linie Bt-176 nicht gefährdet sind. Selbst die Aufnahme extrem hoher Pollenmengen führte bei Verfütterung an neonate Larven nicht zu einer signifikant erhöhten Mortalität. Allerdings wurden sowohl bei Raupen des ersten, wie auch des zweiten Larvalstadiums subletale Effekte in Form einer verringerten Gewichtszunahme festgestellt. Hierbei muss angemerkt werden, dass es unter Freilandbedingungen nicht sehr wahrscheinlich sein dürfte, dass Schmetterlingslarven außerhalb von Maisfeldern mehr als 500 Maispollen zusammen mit ihrer Nahrung aufnehmen können. Es ist aber denkbar, dass sich 500 Pollenkörner innerhalb mehrtägiger Perioden ohne Niederschlag innerhalb von Maisfeldern akkumulieren könnten.

Die Aufnahme von Pollen der konventionellen Sorte PACTOL (Bt-) schädigte die Tiere nicht. Hier wuchsen die Larven sogar schneller, als unbehandelte Kontrolltiere. Dieselbe Beobachtung konnten Felke & Langenbruch (2001) und Felke et al. (2002) auch für Raupen der beiden Kohlweißlingsarten *Pieris brassicae* und *P. rapae* machen. Maispollen scheint für die Raupen von *Agrotis segetum* generell eine attraktive Nahrungsquelle darzustellen. Hierfür spricht, dass viele Tiere im Biotest offensichtlich gezielt zuerst den auf das Blattstückchen applizierten Pollen fraßen, bevor sie das Kohlblättchen verzehrten. Die Wintersaateule (*Agrotis segetum*) wird bei Krieg & Langenbruch (1981) als schwach empfindlich gegenüber *Bacillus thuringiensis*-Endotoxinen eingestuft. Im Rahmen von Laborversuchen erzielte Langenbruch (1977) unter Verwendung einer 5-prozentigen Dipel-Sprühlösung (Expositionszeit: 72 Stunden) bei *A. segetum*-Raupen (L₁) nach 10 Tagen eine Mortalitätsrate von 56 %. Allerdings zeigten bereits Raupen des zweiten Larvalstadiums unter diesen Bedingungen überhaupt keine Mortalität mehr. Wesentlich erfolgreicher verliefen Köderversuche. Bei Raupen des dritten Larvalstadiums bewirkte der Einsatz eines 2-prozentigen Dipel-Köders (in % der Trockensubstanz) nach 20 Tagen eine Sterblichkeitsrate von 80 %. Wurde die Dipel-Konzentration auf 9,5 % erhöht, konnte die Mortalitätsrate in

Tischversuchen auf 100 % gesteigert werden. Auch L₄ und L₅-Tiere konnten mit dieser Methode recht gut abgetötet werden, allerdings nahm der Wirkungsgrad mit zunehmender Larvengröße ab. Das kommerzielle BT-Präparat Dipel enthält sowohl Sporen, als auch δ-Endotoxin-Kristalle in einer Konzentration von ca. 25 × 10⁹ pro Gramm. Von Koziel et al. (1993) wird angegeben, dass DIPEL die Toxine Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, CryIIA und CryIIB enthält. MacIntosh et al. (1990) untersuchten die Wirkung von 3 verschiedenen, trypsinisierten δ-Endotoxin-Kristallen auf einen weiteren Vertreter der Gattung *Agrotis*, die Art *A. ipsilon*.

Sie konnten für das Cry1Ac-Toxin einen LC₅₀-Wert von 18 µg/ml und für das auch in Bt-Mais exprimierte Cry1Ab-Toxin einen LC₅₀-Wert von > 80 µg/ml feststellen. Beide Werte beziehen sich auf neonate Larven. Insofern ist die hier festgestellte geringe Empfindlichkeit von *Agrotis segetum* gegenüber der Aufnahme von Pollen der Maislinie Bt-176 nicht weiter überraschend, da in dieser Linie ausschließlich eine verkürzte Form des Cry1Ab-Endotoxins von *B. t. subsp. kurstaki* HD-1 exprimiert wird.

Ob sich die Ergebnisse von *A. segetum* auf andere einheimische Noctuiden übertragen lassen, bleibt allerdings fraglich. Es wird daher angeregt Larven weiterer einheimischer Noctuidenarten zu untersuchen, die aufgrund von Phänologie und Habitatpräferenzen mit Maispollen in Kontakt kommen können.

2.1.5. Biotests mit *Inachis io*-Raupen (verschiedene Stadien)

Hierbei wurde getestet, welchen Einfluss die Verfütterung des Pollens von konventionellem und transgenem Mais auf Überlebensrate und Gewichtszunahme von *Inachis io*-Raupen des ersten, zweiten und vierten Larvalstadiums hat. Wie sich im Verlauf der Versuche zeigte, erwiesen sich die verschiedenen Larvenstadien gegenüber den Biotest-Bedingungen als unterschiedlich empfindlich. Raupen des vierten Larvalstadiums tolerierten die Standard-Biotest-Bedingungen (Einzelhaltung in mit Agar gefüllten Kunststoffwürfeln) ohne Probleme. Dagegen zeigten Tiere des zweiten Larvalstadiums unter diesen Voraussetzungen auch in der unbehandelten Kontrolle fast stets eine 100%ige Mortalitätsrate. Es ist anzunehmen, dass es durch die relativ hohe Luftfeuchtigkeit in den kleinen Behältern zur Entstehung von Bakteriosen gekommen war. Auch eine Erhöhung der Agar-Konzentration konnte das Problem nicht beheben.

Aus diesem Grund musste eine modifizierte Biotest-Methode entwickelt werden, bei der eine Gruppe von Larven auf Blätter kompletter Brennnesselpflanzen gesetzt wurde (s. 2.1.5.1.). Unter diesen Bedingungen war eine Verfütterung einer genau definierten Pollenmenge an eine einzelne Larve nicht mehr möglich. Die später aufgeführte applizierte Pollenmenge pro Larve bezieht sich daher auf berechnete Durchschnittswerte. Über die tatsächlich aufgenommene Pollenmenge kann keine Angaben gemacht werden. Im Einzelfall ist es möglich, dass ein Individuum auch mehr oder weniger Pollen aufgenommen hat, als die durchschnittlich pro Larve applizierte Pollenmenge.

2.1.5.1. Biotests mit neonaten *Inachis io*-Raupen

Material & Methoden

Pro Biotest wurden insgesamt 150 frisch geschlüpfte Larven verwendet. Da die Tiere hinsichtlich ihres Gewichts einheitlich waren, wurden sie zu Beginn des Biotests nicht gewogen. Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Gewichtszunahme von *Inachis io*-Raupen (L_1) der 3 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Student-Newman-Keuls- und Waller-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

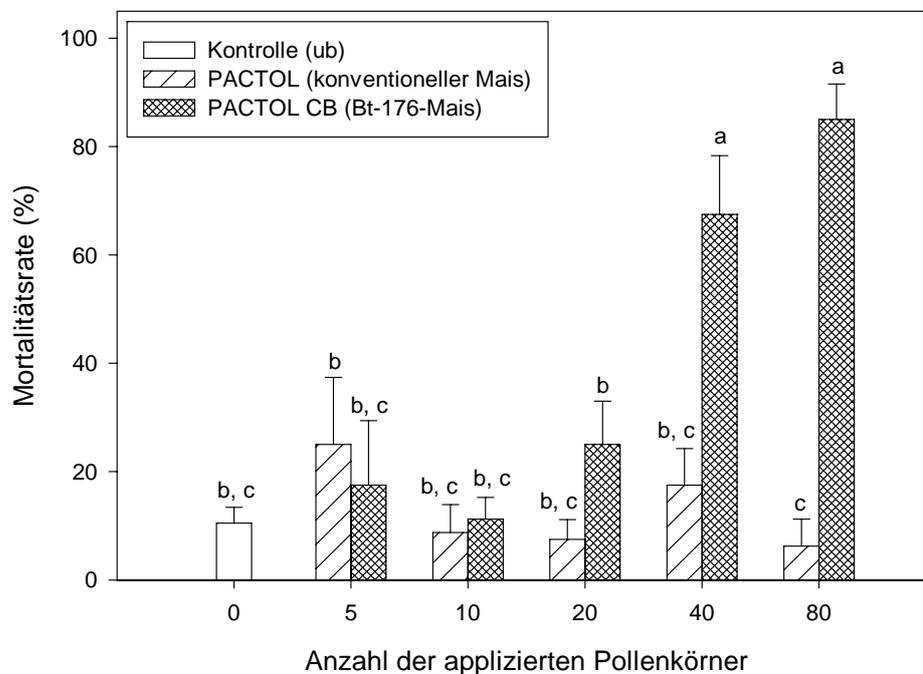


Abbildung 10: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_1) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(10 \text{ FG}) = 13,75$; $p < 0,0001$; Waller-Duncan-Test).

Wie aus Abbildung 10 ersichtlich wird, erhöhte sich die Mortalitätsrate für die getesteten *Inachis io*-Larven mit zunehmender Anzahl der applizierten Pollenkörner (PACTOL CB-Mais (Bt+)), so dass eine Dosis-Wirkungsbeziehung eindeutig nachgewiesen werden konnte. Bis zu einer Menge von 20 Pollenkörnern war dieser Anstieg allerdings noch nicht besonders stark ausgeprägt. Erst ab einer Zahl von 40 Pollen war der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle signifikant. Bei der höchsten hier getesteten Menge (80 Pollenkörner) lag die Sterblichkeit nach einer Woche bei 85 %. Bei Verfütterung von Pollen der isogenen Sorte PACTOL (Bt-) ließ sich in keiner Variante ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nachweisen.

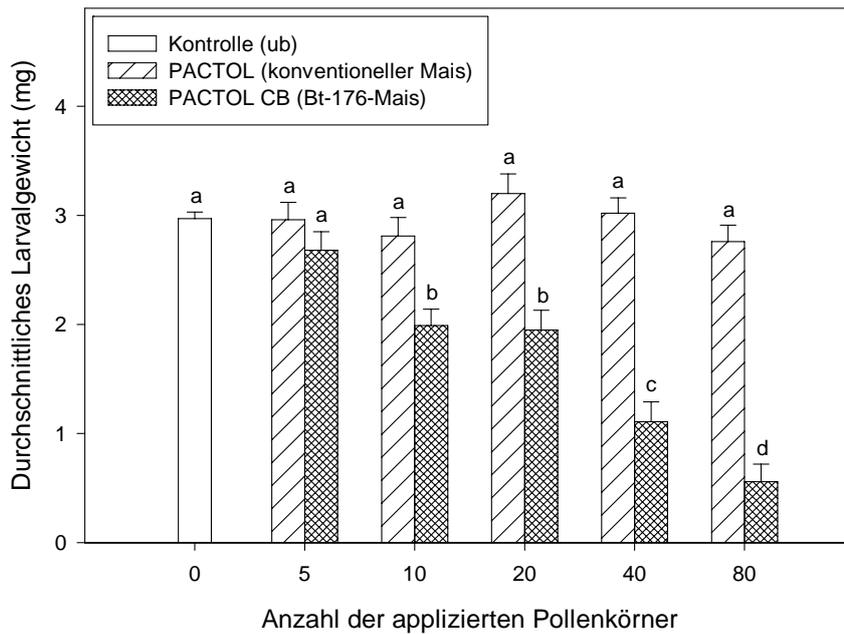


Abbildung 11: Durchschnittliches Larvalgewicht (mg \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L₁) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant (F (10 FG) = 17,26; p < 0,0001; Student-Newman-Keuls-Test).

Abbildung 11 zeigt, dass das durchschnittliche Gewicht der Larven, die die Aufnahme von Pollen der transgenen Sorte PACTOL CB (Bt+) überlebt hatten, umso niedriger lag je mehr Pollen auf das Brennnesselblatt appliziert worden war. Bereits ab einer Zahl von 10 Pollenkörnern erwies sich der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle als signifikant. Bei der höchsten applizierten Menge (80 Pollenkörner) wogen die überlebenden Tiere durchschnittlich 0,56 mg und wiesen somit lediglich 19 % des Körpergewichts auf, das die Larven der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht hatten. Bei Verfütterung von Pollen der isogenen Sorte PACTOL (Bt-) konnte in keinem Fall ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden.

Diskussion

Sowohl ein Vergleich der Mortalitätsrate, als auch des Durchschnittsgewichts nach einer Woche belegen eindeutig, dass neonate *Inachis io*-Larven durch die Aufnahme von Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) massiv geschädigt werden. Diese Schädigung ist dosisabhängig. Wie Abbildung 10 zeigt, trat aber im Vergleich zu unbehandelter Kontrolle und PACTOL-Variante (Bt-) erst bei Applikation von 40 Pollenkörnern der Sorte PACTOL CB (Bt+) eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate von 67,5 % auf. Doch schon die Verfütterung von 10 Pollenkörnern von PACTOL CB-Mais (Bt+) führte bei den überlebenden Individuen im Vergleich zu Kontrolle bzw. PACTOL-Variante (Bt-) zu einer signifikant geringeren Gewichtszunahme. Mit zunehmender Pollenmenge verstärkte sich dieser Effekt. Die Tiere, die eine Pollendosis von 80 Pollenkörnern pro Individuum überlebt hatten, wiesen mit durchschnittlich 0,56 mg lediglich 19 % des Körpergewichts auf, das die Larven der

unbehandelten Kontrollgruppe erreicht hatten. Eine Verfütterung von Pollen der isogenen, konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) beeinträchtigte die Entwicklung der *I. io*-Larven generell nicht. Damit konnte nachgewiesen werden, dass die genannten Effekte nach der Aufnahme von Pollen der transgenen Linie Bt-176 nicht durch das Vorhandensein eines für die Larven ungewohnten „Fremdkörpers“ auf der Futterpflanze verursacht werden, sondern durch das im Pollen enthaltene Bt-Toxin.

2.1.5.2. Biotests mit *Inachis io*-Raupen des zweiten Larvalstadiums

Material & Methoden

Es wurden ausschließlich Larven verwendet, die sich gerade zum ersten Mal gehäutet hatten. Da das Gewicht der Larven nicht einheitlich war, mussten sie zu Beginn des Biotests gewogen werden. Zu Versuchsbeginn stand Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) nicht zur Verfügung. Daher bestanden die ersten Biotests lediglich aus einer unbehandelten Kontrolle, sowie verschiedenen BT-Pollen-Varianten. Später setzten sich die Biotests aus verschiedenen Varianten mit BT-Pollen und konventionellem Maispollen zusammen. In diesem Fall wurde eine unbehandelte Kontrolle weggelassen, da nicht mehr ausreichend viele Larven der gewünschten Größe vorhanden waren. Da alle Versuche unter den gleichen Bedingungen stattfanden, wurden sie später zur Berechnung von durchschnittlichen Mortalitätsraten bzw. durchschnittlicher Gewichtszunahme zusammengefasst. Zuerst bestand jeder Biotest aus 7 Varianten: unbehandelte Kontrolle sowie 6 Behandlungen mit Pollen von Bt-176-Mais (Sorte: PACTOL CB) in verschiedenen Konzentrationen. Die Kontrolltiere erhielten stets unbehandeltes Futter. Bei den einzelnen Pollen-Varianten wurden unterschiedliche Pollenmengen auf die Raupenfutterpflanzen appliziert. In der ersten Variante wurden 100, in der zweiten 200, in der dritten 400, in der vierten 800 in der fünften 1.600 und in der sechsten Variante 3.200 Pollenkörner auf die Raupenfutterpflanze aufgetragen. Da für jede Wiederholung 10 Larven verwendet wurden, wurden somit durchschnittlich 10, 20, 40, 80, 160 und 320 Pollenkörner pro Individuum appliziert. Später bestanden die Biotests aus 8 Varianten. Hier wurden 4 PACTOL (Bt-) und 4 PACTOL CB-Varianten (Bt+) mit identischen Pollenmengen miteinander verglichen. Pro Individuum wurden rechnerisch 40, 80, 160 und 320 Pollenkörner appliziert.

Nach einer Woche wurde der Versuch beendet und das Gewicht jeder einzelnen Larve bestimmt. Da die Larven zu Versuchsbeginn unterschiedlich schwer waren, wurde die Gewichtszunahme in Prozentwerten berechnet. Die Verdopplung des Ausgangsgewichts entspricht einer Gewichtszunahme von 100 Prozent. Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Gewichtszunahme von *Inachis io*-Raupen (L₂) der 3 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Student-Newman-Keuls- und Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

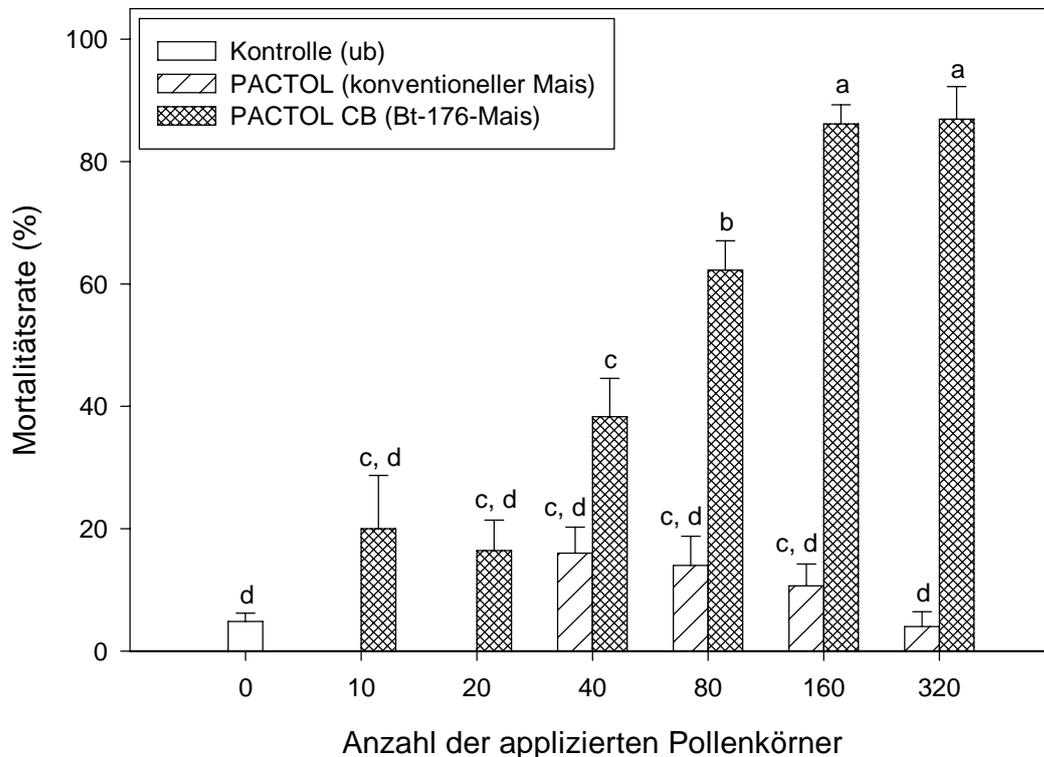


Abbildung 12: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_2) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(10 \text{ FG}) = 28,61$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test).

Abbildung 12 lässt erkennen, dass sich die Mortalitätsrate für die getesteten *Inachis io*-Larven mit zunehmender Anzahl der applizierten Pollenkörner (PACTOL CB-Mais (Bt+)) erhöhte, so dass sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung eindeutig nachweisen ließ. Ab einer Zahl von 40 Pollen war der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle signifikant. Bei der zweithöchsten getesteten Pollendosis (160 Pollenkörner) lag die Sterblichkeit nach einer Woche bei 86 %. Eine Verdopplung der applizierten Pollenmenge führte nur noch zu einer unerheblichen Steigerung der Mortalitätsrate. Bei Verfütterung von Pollen der isogenen Sorte PACTOL (Bt-) ließ sich nie ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nachweisen. Bei Applikation von 320 Pollenkörnern war die Mortalitätsrate sogar niedriger als in der unbehandelten Kontrolle.

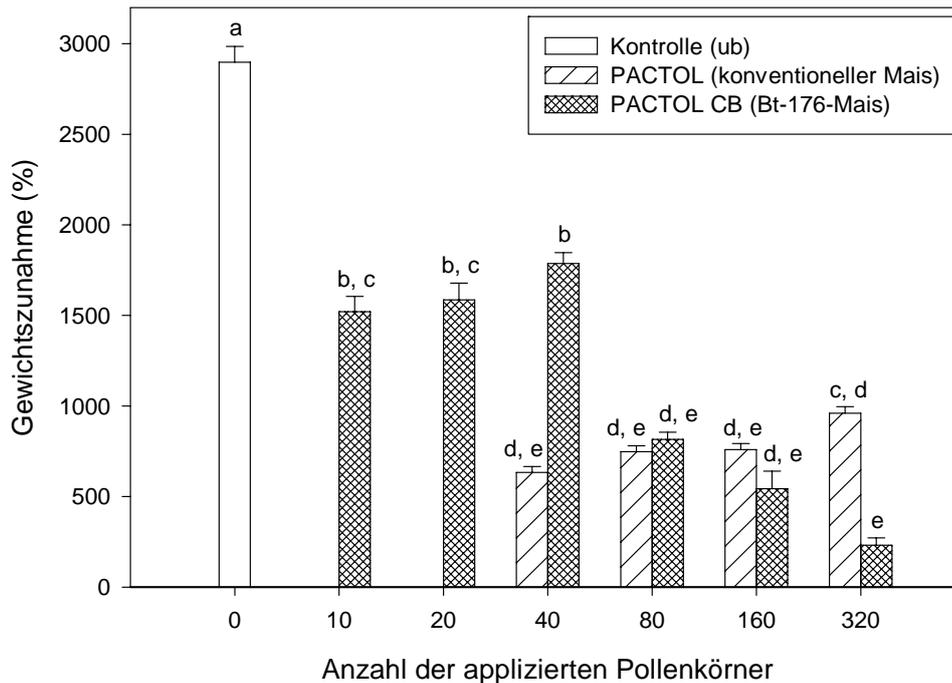


Abbildung 13: Durchschnittliche Gewichtszunahme (% \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L₂) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Eine Gewichtszunahme von 100 % entspricht einer Verdopplung des Ausgangsgewichts. Die durchschnittliche Gewichtszunahme wurde aus der Zusammenfassung beider Versuchsreihen errechnet. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant (F (10 FG) = 93,00; $p < 0,0001$, Tukey-Test).

Abbildung 13 zeigt, dass die durchschnittliche Gewichtszunahme der Larven, die die Aufnahme von Pollen der transgenen Sorte PACTOL CB (Bt+) überlebt hatten, umso niedriger ausfiel je mehr Pollen auf das Brennnesselblatt appliziert worden war. Bereits ab 10 Pollenkörnern erwies sich der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle als signifikant. Bei der höchsten applizierten Menge (320 Pollenkörner) erreichten die überlebenden Tiere lediglich 14 % der Gewichtszunahme, die die Larven der unbehandelten Kontrollgruppe im selben Zeitraum erzielt hatten. Auch die prozentuale Gewichtszunahme der PACTOL-Varianten (Bt-) war deutlich geringer als die der unbehandelten Kontrolle. Mögliche Ursachen hierfür werden weiter unten diskutiert.

Diskussion

Da Tagpfauenaugenraupen des zweiten Larvalstadiums nicht einzeln getestet werden konnten, musste die Biotest-Methode modifiziert werden. Da eine Gruppe von 10 Larven gemeinsam zum Biotests angesetzt wurde, war die Verfütterung einer genau definierten Pollenmenge an eine einzelne Larve nicht mehr möglich. Die genannten applizierten Pollenmengen pro Larve beziehen sich daher auf berechnete Durchschnittswerte. Über die tatsächlich aufgenommene Pollenmenge können keine Angaben gemacht werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass einzelne Individuen z. T. mehr, z. T. aber auch weniger Pollen aufgenommen haben, als die durchschnittlich pro Larve applizierte Pollenmenge. In der Regel besteht ein Biotest aus einer Anzahl von Varianten, die gleichzeitig, unter gleichen Bedingungen (z. B. Temperatur,

Tageslänge, usw.) und mit Larven gleicher Herkunft sowie gleichen Alters durchgeführt werden. Im hier geschilderten Fall handelt es sich um zwei Versuchsreihen, die zu Berechnung von durchschnittlicher Gewichtszunahme und Mortalitätsrate zusammengefasst wurden. Dies erscheint gerechtfertigt, da alle Versuche unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden. Die Gründe weshalb nicht alle Varianten in einem einzigen Biotest zusammengefasst werden konnten sind folgende: zum einen stand Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) zu Beginn der Tests nicht zur Verfügung und zum anderen gab es aufgrund einer Schlechtwetterperiode vorübergehend Probleme genügend Tagpfauenaugenlarven des gewünschten Stadiums zu erhalten. Sowohl ein Vergleich der Mortalitätsrate, als auch des Durchschnittsgewichts nach einer Woche belegen eindeutig, dass *Inachis io*-Raupen (L₂) durch die Aufnahme von Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB geschädigt werden können. Diese Schädigung ist dosisabhängig. Wie Abbildung 12 zeigt, trat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Mortalitätsrate: 4,84 %) ab einer Dosis von 40 Pollenkörnern eine statistisch signifikant erhöhte Mortalitätsrate in der PACTOL-CB-Variante (Bt+) auf. Mit zunehmender Pollendosis stieg die Larvalmortalität stark an. Ab 160 Pollenkörnern pro Larve führte eine weitere Dosis-Steigerung zu keinem weiteren Anstieg der Sterblichkeit mehr. Die Larven, die die Aufnahme von PACTOL-CB-Pollen (Bt+) überlebten, hatten nach einer Woche im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe deutlich weniger an Gewicht zugelegt. Bei einer Dosis von 10 Pollen betrug der vergleichende Gewichtszuwachs lediglich 52,48 % und reduzierte sich mit erhöhter Pollen-Applikation weiter. Die Gewichtssteigerung innerhalb einer Woche bei den Larven, die eine Applikation von 320 Pollenkörnern überlebt hatten, betrug im Vergleich zur Kontrolle nur noch 8 %.

Bei Verfütterung von Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) trat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine signifikant erhöhte Larvalmortalität auf. Bemerkenswert war, dass die Mortalitätsrate mit zunehmender Pollenmenge sogar deutlich abnahm. So betrug sie bei einer Dosis von 40 Pollenkörnern pro Larve 16 %, bei der 8-fachen Menge dagegen nur noch 4 %. Interessanterweise fiel die Gewichtszunahme innerhalb einer Woche in der PACTOL-Gruppe (Bt-) signifikant niedriger aus als bei den Kontrolltieren. Von einer Schädigung der Larven durch den Pollen von konventionellem Mais ist aber vermutlich nicht auszugehen. Erstens war die Mortalitätsrate nicht signifikant erhöht und zweitens verringerte sich der Unterschied in der Gewichtszunahme zwischen Kontrolle und PACTOL-Gruppe (Bt-) mit steigender Pollenmenge. Die geringere Gewichtszunahme innerhalb der PACTOL-Gruppe (Bt-) lässt sich damit erklären, dass für die PACTOL-Varianten (Bt-) z. T. wesentlich schwerere Individuen verwendet wurden, als für die Kontrollvariante und leichtere Larven unter identischen Bedingungen prozentual deutlich mehr an Gewicht zulegen können als ältere Larven. Die Verwendung von etwas älteren L₂-Tieren ließ sich nicht umgehen, da gegen Ende der recht kurzen Fortpflanzungsperiode von *Inachis io* keine geeigneteren Larven vorhanden waren. Es wird daher angenommen, dass die beobachteten Unterschiede in der prozentualen Gewichtszunahme zwischen Kontroll- und PACTOL-Gruppe (Bt-) methodisch bedingt waren und die Verfütterung von Pollen der isogenen, konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) die Entwicklung der *I. io*-Raupen (L₂) nicht beeinträchtigt. Die hier

geschilderten methodischen Schwierigkeiten beziehen sich nur auf Biotests mit Tagpfauenaugenraupen des zweiten Larvalstadiums.

Eine Gefährdung von Tagpfauenaugenraupen des zweiten Stadiums ist unter Freilandbedingungen nicht völlig auszuschließen. Diese Tiere erwiesen sich im Laborversuch als relativ empfindlich, so dass zumindest subletale Effekte in der Nähe von Maisfeldern der transgenen Linie Bt-176 möglich erscheinen. Derartige subletale Effekte könnten sich in einer geringeren Gewichtszunahme der Larven manifestieren und in der Folgezeit zu verlängerten Entwicklungszeiten oder einer höheren Anfälligkeit gegenüber Pathogenen führen.

2.1.5.3. Biotests mit *Inachis io*-Raupen des vierten Larvalstadiums

Material & Methoden

Es wurden Larven verwendet, die sich gerade zum dritten Mal gehäutet hatten. Da die Raupen hinsichtlich ihres Gewichts nicht einheitlich waren, wurden sie zu Beginn des Versuchs gewogen. Die Biotests bestanden lediglich aus einer Kontroll-Variante, sowie 4 verschiedenen Pollen-Varianten (Sorte: PACTOL CB (Bt+)), da Tiere dieser Größe nur begrenzt verfügbar waren. In der ersten Variante wurden im Schnitt 10 Pollenkörner pro Individuum verfüttert. In der zweiten wurden durchschnittlich 20, in der dritten 40 und in der vierten Variante 80 Pollenkörner pro Larve verabreicht. Es gab keine Varianten, in denen Pollen von konventionellem Mais verfüttert wurde. Die Versuche wurden in $2 \times 2 \times 2$ cm großen Kunststoffwürfeln angesetzt, die mit je 1,5 ml einer 2%igen Agarlösung gefüllt wurden. Nach dem Auskühlen des Agars wurde in jeden Behälter ein Brennessel-Blattstück mit einem Durchmesser von 3 mm gelegt, auf das die vorbereitete Pollensuspension appliziert wurde. Nach 2 Tagen wurden die Larven in Kunststoffbecher mit gelochtem Deckel überführt, die 5 cm hoch waren und einen Durchmesser von 7 cm aufwiesen. Insgesamt wurde der Versuch fünfmal bonitiert, wobei die Anzahl der noch lebenden Tiere festgehalten wurde. Außerdem erhielten die Larven bei dieser Gelegenheit frische Blattstücke.

Nach einer Woche wurde der Versuch beendet und das Gewicht jeder einzelnen Larve bestimmt. Da die Larven zu Versuchsbeginn unterschiedlich schwer waren, wurde die Gewichtszunahme in Prozentwerten berechnet. Eine Gewichtszunahme von 100 Prozent entspricht der Verdopplung des Ausgangsgewichts. Um Unterschiede bezüglich der Gewichtszunahme von *Inachis io*-Raupen (L_4) der beiden Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

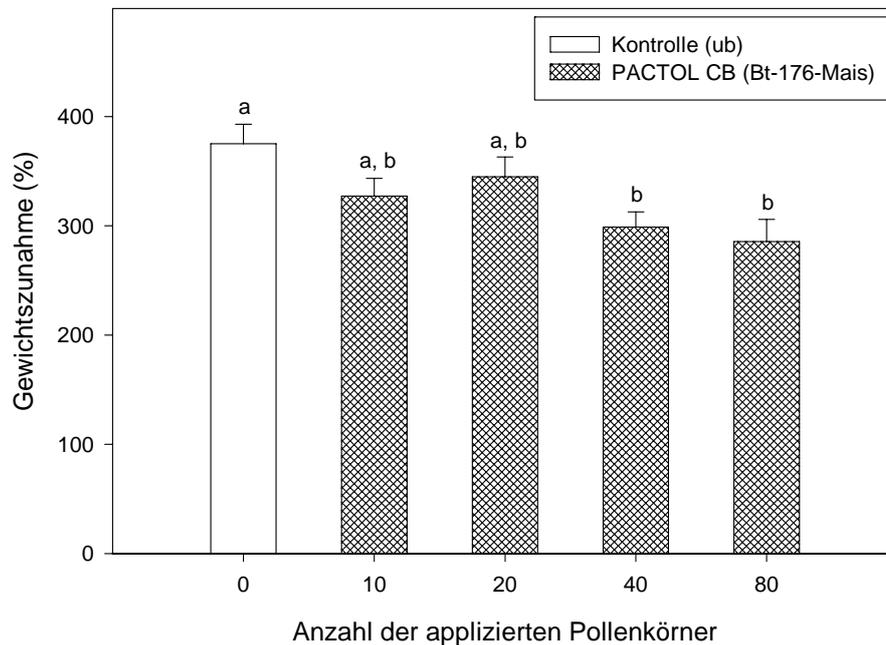


Abbildung 14: Gewichtszunahme (% \pm SF) nach einer Woche für *Inachis io*-Raupen (L_4), bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Eine Gewichtszunahme von 100 % entspricht einer Verdopplung des Ausgangsgewichts. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(4 \text{ FG}) = 4,34$; $p < 0,002$, Tukey-Test).

Abbildung 14 zeigt, dass die Gewichtszunahme der Larven tendenziell abnahm, je mehr Pollen (PACTOL CB-Mais (Bt+)) auf das Kohlblattstückchen appliziert worden war. Ab einer Zahl von 40 Pollenkörnern erwies sich der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle als signifikant. Bei der höchsten hier getesteten Menge (80 Pollenkörner) erreichten die Raupen aber noch fast 76 % der Gewichtszunahme von unbehandelten Kontrolltieren. Die Mortalitätsrate betrug in der Kontrollgruppe 0 %, in der Gruppe mit 10 Pollenkörnern 1,85 %, in der Gruppe mit 20 Pollenkörnern 3,77 %, in der Gruppe mit 40 Pollenkörnern 0 % und in der Gruppe mit 80 Pollenkörnern 3,57 %.

Diskussion

Die Biotestmethode für *Inachis io*-Raupen des vierten Larvalstadiums ist ähnlich der Methodik wie sie für *Agrotis segetum* oder *Plutella xylostella* entwickelt wurde (Einzeldosen-Methode). Allerdings unterscheidet sie sich deutlich von den Methoden, die später für kleinere *Inachis io*-Raupen (L_1 und L_2) entwickelt wurden (Petrischalen-Methode). Die Biotest-Methode für kleinere Raupen musste zwangsläufig modifiziert werden, da die Kontroll-Mortalität unakzeptabel hoch war. Für *Inachis io*-Raupen des vierten Larvalstadiums konnte dagegen die Einzeldosen-Methode angewendet werden, da in der Kontroll-Gruppe keine erhöhte Sterblichkeit auftrat.

Vergleich von Mortalitätsrate und Durchschnittsgewicht nach einer Woche zeigen, dass die schon recht großen *Inachis io*-Raupen des vierten Larvalstadiums durch die Aufnahme von bis zu 80 Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) nur mäßig geschädigt wurden. Die höchste Sterblichkeit trat mit knapp 4 % in der Gruppe auf, die mit 20 Pollenkörnern pro Individuum gefüttert worden war. Demgegenüber lag die Mortalitätsrate für die Larven, die im Durchschnitt 80 Pollenkörner gefressen hatten bei 0 %. Erst bei Analyse der prozentualen Gewichtszunahme wird deutlich, dass auch derart große Raupen noch durch das im Pollen enthaltene Cry1Ab-Toxin geschädigt werden können. Es handelt sich aber nur um subletale Effekte, die zudem im Vergleich mit Raupen des ersten und zweiten Larvalstadiums recht gering ausfielen. So erzielten selbst die Larven, die durchschnittlich 80 Pollenkörner verzehrt hatten, noch fast 76 % der Gewichtszunahme von unbehandelten Kontrolltieren. Bei entsprechender Pollendosis erreichten *Inachis io*-Raupen (L₂) 45,26 % und neonate Tagpfauenaugen-Larven sogar nur 19 % der Gewichtszunahme von unbehandelten Kontrolltieren. Hinzu kommt, dass überhaupt nur ein geringer Teil der Versuchstiere diese Pollendosis überlebt hatte. Ein LD₅₀-Wert konnte für Tagpfauenaugenraupen des vierten Larvalstadiums nicht berechnet werden, da in den Versuchen kaum Mortalität auftrat. Um einen LD₅₀-Wert für dieses schon recht unempfindliche Larvenstadium berechnen zu können müssten Fütterungs-Versuche mit deutlich höheren Pollendosen durchgeführt werden.

Es bleibt festzuhalten, dass größere Raupen des Tagpfauenauges durch die Aufnahme von Maispollen der transgenen Linie Bt-176 unter Freilandbedingungen in den meisten Fällen nur subletal geschädigt werden dürften. Pollenmengen, die für eine Schädigung ausreichen könnten sind nur innerhalb von Maisfeldern bzw. in direkt angrenzenden Bereichen zu erwarten.

2.1.6. Biotests mit *Aglais urticae*-Raupen (L₁)

Material & Methoden

In Laborbiotests wurde untersucht, welchen Einfluss die Verfütterung des Pollens von konventionellem und transgenem Mais auf Mortalitätsrate und Gewichtszunahme von neonaten *Aglais urticae*-Raupen (Kleiner Fuchs) hat. Pro Biotest wurden insgesamt 150 frisch geschlüpfte Larven verwendet. Da die Tiere hinsichtlich ihres Gewichts einheitlich waren, wurden sie zu Beginn des Biotests nicht gewogen. Jeder Biotest bestand aus 11 Varianten: unbehandelte Kontrolle, 5 Behandlungen mit Pollen von konventionellem Mais (Sorte: PACTOL) in verschiedenen Konzentrationen, sowie 5 Behandlungen mit Pollen von Bt-176-Mais (Sorte: PACTOL CB) in verschiedenen Konzentrationen. Für die unbehandelte Kontrolle wurden pro Versuch 50 (5 Pflanzen mit je 10 Larven) und für die restlichen Varianten jeweils 10 Tiere verwendet. Bei den einzelnen Varianten wurden unterschiedliche Pollenmengen auf die Raupenfutterpflanzen appliziert. In der ersten Variante wurden 50, in der zweiten 100, in der dritten 200, in der vierten 400 und in der fünften Variante 800 Pollenkörner aufgetragen. Es wurden somit durchschnittlich 5, 10, 20, 40 bzw. 80 Pollenkörner pro Larve appliziert. Die Versuche wurden insgesamt neunmal wiederholt.

Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Gewichtszunahme von *Aglais urticae*-Raupen (L_1) der 11 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Student-Newman-Keuls- und Waller-Duncan-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

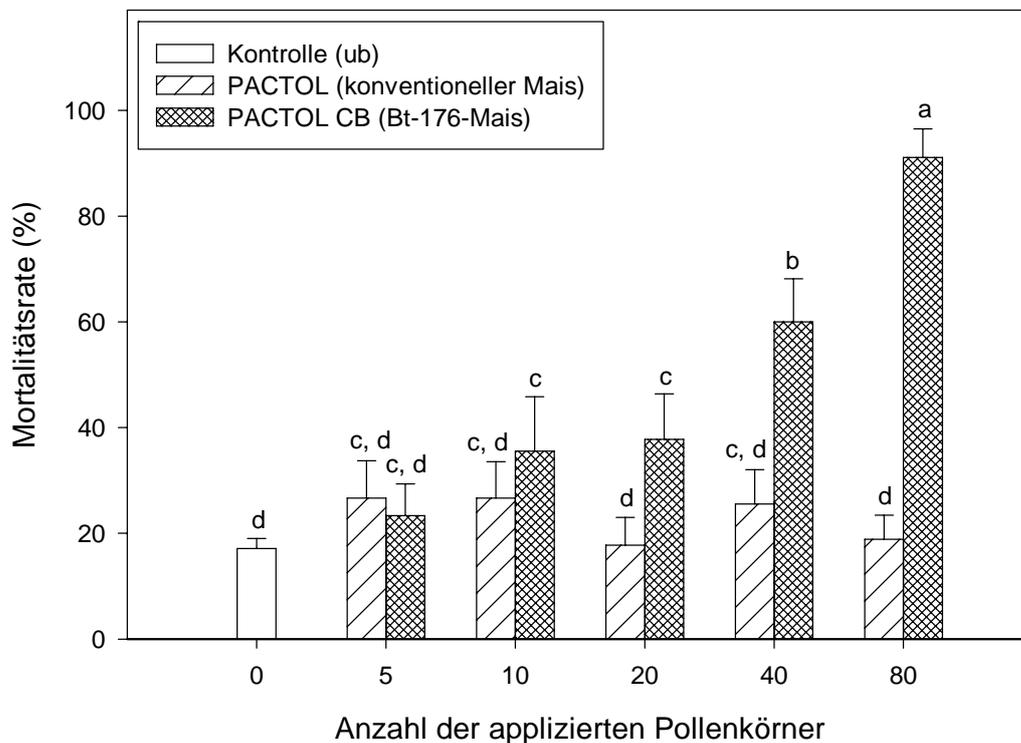


Abbildung 15: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Aglais urticae* -Raupen (L_1) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(10 \text{ FG}) = 19,03$; $p < 0,0001$; Waller-Duncan-Test).

Die Mortalitätsrate erhöhte sich für die getesteten *Aglais urticae* -Larven mit zunehmender Anzahl der applizierten Pollenkörner (Bt-176-Mais), so dass eine Dosis-Wirkungsbeziehung eindeutig nachgewiesen werden konnte. Bereits ab einer Zahl von 10 Pollen war der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle signifikant. Eine Verdopplung der Pollenmenge auf 20 Pollenkörner brachte zunächst keine weitere Zunahme der Larvalsterblichkeit. Erst bei Applikation von 40 Maispollen nahm die Mortalitätsrate wieder deutlich zu. Bei der höchsten verabreichten Menge (80 Pollenkörner) lag die Sterblichkeit nach einer Woche bei 91 %. Bei Verfütterung von Pollen der isogenen Sorte PACTOL (Bt-) ließ sich in keiner Variante ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle nachweisen. Die Larven vom Kleinen Fuchs reagierten generell recht empfindlich, was die relativ hohe Mortalität in un behandelter Kontrolle, sowie den 5 PACTOL-Varianten (Bt-) ausdrückt.

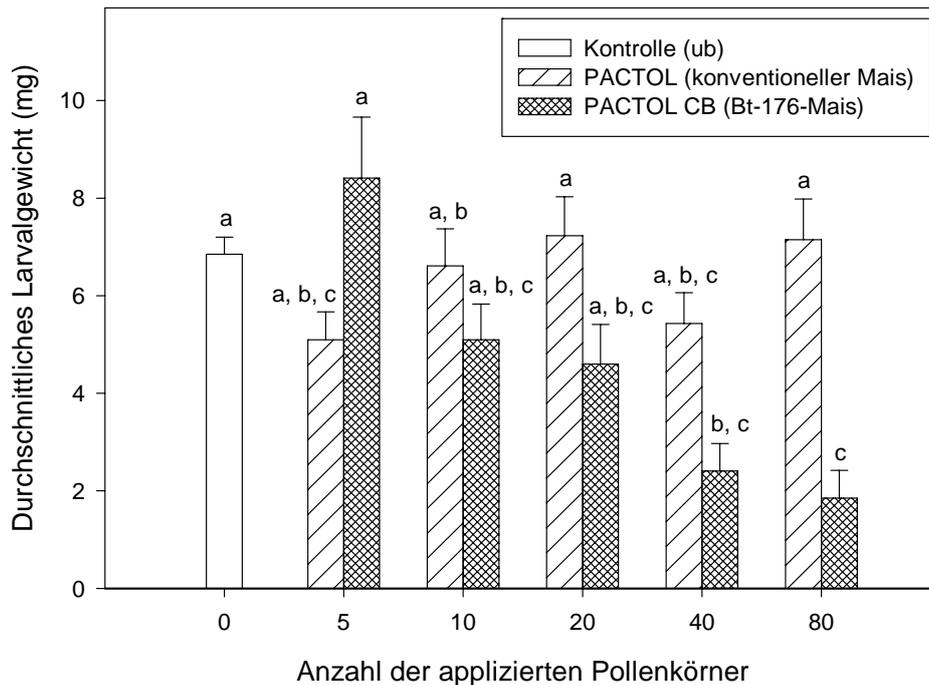


Abbildung 16: Durchschnittliches Larvalgewicht (mg \pm SF) von *Aglais urticae* -Raupen (L₁) nach einer Woche, bezogen auf die pro Larve applizierte Pollenmenge (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant (F (10 FG) = 3,69; p < 0,0001, Student-Newman-Keuls-Test).

Abbildung 16 zeigt, dass das durchschnittliche Gewicht der Larven, die die Aufnahme von Pollen der transgenen Sorte PACTOL CB (Bt+) überlebt hatten, umso niedriger lag je mehr Pollen auf das Brennnesselblatt appliziert worden war. Allerdings erwies sich der Unterschied zur unbehandelten Kontrolle erst ab einer Zahl von 40 Pollenkörnern als signifikant. Bei der höchsten applizierten Menge (80 Pollenkörner) wogen die überlebenden Tiere durchschnittlich 1,85 mg und wiesen somit 27 % des Körpergewichts auf, das die Larven der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht hatten. Bei Verfütterung von Pollen der isogenen Sorte PACTOL (Bt-) trat in keiner Variante ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle auf.

Diskussion

In ersten Versuchen erwiesen sich die Raupen vom Kleinen Fuchs als extrem empfindlich. Fast alle Kontrolltiere starben im Verlauf einer Woche, wenn sie nach der z. B. für *Agrotis segetum* oder *Plutella xylostella* beschriebenen Standardmethode getestet wurden. Da eine mikroskopische Untersuchung der toten Larven außer einem Befall mit saprophytischen Bakterien keinen Befund lieferte ist zu vermuten, dass die Feuchtigkeit in der mit Agar ausgegossenen Kunststoffdose für die Larven zu hoch war, was letztlich Bakteriosen verursachte. Da auch eine erhöhte Agarkonzentration keine besseren Überlebensraten in der unbehandelten Kontrolle erbrachte, musste schließlich die oben beschriebene, extrem arbeitsaufwändige Biotestmethode (Petrischalen-Methode) entwickelt werden. Nachteilig bei dieser Methode war, dass nun eine größere Pollenmenge an eine Gruppe von 10 Tieren verfüttert wurde. Es ist zu vermuten, dass innerhalb der einzelnen Gruppen eine größere

Streubreite bezüglich der Pollenaufnahme auftrat, als dies bei Einzelapplikation der Fall gewesen wäre.

Sowohl ein Vergleich der Mortalitätsrate, als auch des Durchschnittsgewichts nach einer Woche belegen eindeutig, dass neonate *A. urticae*-Larven durch die Aufnahme von Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) massiv geschädigt werden. Diese Schädigung ist dosisabhängig. Wie Abbildung 15 zeigt, trat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bereits bei Applikation von 10 Pollenkörnern der Sorte PACTOL CB (Bt+) eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate auf. Die gleiche Pollendosis führte darüber hinaus bei den überlebenden Individuen zu einer deutlich geringeren Gewichtszunahme. Mit zunehmender Pollenmenge verstärkten sich diese Effekte. So trat bei der höchsten hier verwendeten Pollendosis (80 Pollenkörner pro Individuum) eine Mortalitätsrate von 91,11 auf. Die Tiere, die bis zu diesem Zeitpunkt überlebt hatten, wiesen mit durchschnittlich 1,85 mg lediglich 27 % des Körpergewichts auf, das die Larven der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht hatten. Eine Verfütterung von Pollen der isogenen, konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) beeinträchtigte dagegen die Entwicklung der *A. urticae*-Larven nicht. Damit muss angenommen werden, dass die genannten Effekte nach der Aufnahme von Pollen der transgenen Linie Bt-176 nicht durch das Vorhandensein eines für die Larven ungewohnten „Fremdkörpers“ auf der Futterpflanze verursacht werden, sondern durch das im Pollen enthaltene Bt-Toxin.

2.1.7. Bestimmung von LD₅₀-Werten für alle untersuchten Schmetterlingsarten bzw. Larvalstadien, bezogen auf Maispollen der Linie Bt-176

Material & Methoden

Zur Berechnung von LD₅₀-Werten wurde zunächst aus der Zahl der überlebenden Larven für jeden Biotest die Mortalitätsrate nach Ablauf von 7 Tagen berechnet. Danach ließ sich unter Einbeziehung der innerhalb der Kontrollgruppe beobachteten Mortalität die korrigierte Mortalitätsrate nach SCHNEIDER-ORELLI (s. UNTERSTENHÖFER 1963) ermitteln. Mit Hilfe der gewählten Versuchsanordnung ohne Auswahlmöglichkeit sollte erreicht werden, dass jedes Individuum das gesamte Blattstück einschließlich der darauf applizierten Substanz verzehrt. Dadurch ist es möglich, einen LD₅₀-Wert zu bestimmen, also das Maß an Aktivsubstanz, das zu einer Mortalität von 50 % der Versuchstiere führt. Allerdings fraßen die Raupen häufig nur einen Teil des angebotenen Blattmaterials und damit auch meist nicht die gesamte aufgebrachte Pollenmenge. Nur im Fall des Biotests mit *Plutella xylostella* (L₄) (frischer Pollen) wurde die verfütterte Pollenmenge unter dem Binokular abgezählt. Ansonsten erfolgte die Applikation in Form einer wässrigen Pollensuspension. Bei den hier angegebenen Pollenmengen handelt es sich daher um empirisch ermittelte Durchschnittswerte.

Bei allen getesteten Arten, mit Ausnahme von *Agrotis segetum*, konnte man beobachten, dass die durchschnittliche Nahrungsaufnahme mit zunehmender Pollenbedeckung (PACTOL CB (Bt+)) abnahm. Die hier angegebenen LD₅₀-Werte beziehen sich daher auf die Anzahl der pro Individuum applizierten Pollenkörner und nicht auf die Pollenmenge, die von den Larven

aufgenommen wurde. Die Berechnung der LD₅₀-Werte erfolgte mit Hilfe der von FINNEY (1971) entwickelten Probit-Regressionsanalyse (SAS-Programm 8.01). In die Probit-Regressionsanalyse gingen nur solche Biotests ein, für die die Mortalitätsrate in der unbehandelten Kontrollgruppe bei maximal 20 % lag.

Für die Versuche wurde nach Möglichkeit frischer Maispollen verwendet. Falls dieser nicht zur Verfügung stand musste auf eingefrorenes Material zurückgegriffen werden, das bei – 30°C in der Tiefkühltruhe gelagert worden war. Um zu überprüfen, ob es durch diese Art der Aufbewahrung zu Toxizitätsveränderungen des Pollens kommen kann, wurde im Verlauf des dritten Projektjahres eine zusätzliche Testreihe mit *Plutella xylostella* durchgeführt, bei der die Raupen ausschließlich mit frisch geerntetem Pollen gefüttert wurden.

Ergebnisse

Von 6 der insgesamt 7 untersuchten Schmetterlingsarten konnten LD₅₀-Werte bezüglich der pro Individuum applizierten Pollenmenge von Bt-176-Mais der Sorte PACTOL CB (Bt+) berechnet werden. Lediglich für die Larven der Noctuidenart *Agrotis segetum*, die bei Aufnahme von Bt-176-Pollen gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe keine signifikant erhöhte Mortalität zeigten, war dies nicht möglich. Auch für Tagpfauenaugen-Raupen im vierten Larvalstadium konnte kein LD₅₀-Wert bestimmt werden, da die mit Pollen gefütterten Tiere im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle keine erhöhte Mortalitätsrate zeigten. Die in Tabelle 1 zuletzt aufgeführten LD₅₀-Werte für *Plutella xylostella*, *Pieris rapae* und *Pieris brassicae* wurden nicht im Rahmen des F&E-Vorhabens ermittelt, sondern entstammen einer bereits 1999 am Institut für biologischen Pflanzenschutz durchgeführten Studie, deren Ergebnisse mittlerweile publiziert sind (FELKE & LANGENBRUCH, 2001).

Tabelle 1: LD₅₀-Werte der 7 untersuchten Lepidopterenarten mit 95%igem Vertrauensbereich. Die LD₅₀-Werte beziehen sich auf die pro Larve applizierte Pollenmenge von Bt-176-Mais (Sorte: PACTOL CB). * Es wurde teils frischer, teils tiefgefrorener Pollen (– 30°C) verwendet. (1) Applikation einer wässrigen Pollensuspension, d. h. Pollenmengen wurden empirisch ermittelt. (2) Applikation einer abgezählten Pollenmenge.

Art (Larvalstadium)	LD ₅₀ -Wert	95 % VB
⁽¹⁾ <i>Aglais urticae</i> (L ₁) *	32,04	0,88 – 61,96
⁽¹⁾ <i>Agrotis segetum</i> (L ₁) *	>> 542	–
⁽¹⁾ <i>Agrotis segetum</i> (L ₂) *	>> 542	–
⁽¹⁾ <i>Inachis io</i> (L ₁) *	36,67	21,59 – 54,34
⁽¹⁾ <i>Inachis io</i> (L ₂) *	61,4	29,3 – 88,70
⁽¹⁾ <i>Inachis io</i> (L ₄) *	>> 80	–
⁽¹⁾ <i>Ostrinia nubilalis</i> (L ₂) *	32,43	19,38 – 48,80
⁽²⁾ <i>Plutella xylostella</i> (L ₄) (frischer Pollen)	7,77	6,14 – 9,74
⁽¹⁾ <i>Pieris brassicae</i> (L ₂) *	139,20	54,6 – 846.000
⁽¹⁾ <i>Pieris rapae</i> (L ₂) *	39,00	25,70 – 122,70
⁽¹⁾ <i>Plutella xylostella</i> (L ₄) *	19,20	9,20 – 29,80

Diskussion

Wie bereits oben erläutert wurde, beziehen sich die hier veröffentlichten LD₅₀-Werte auf die applizierte Pollenmenge. Da die Fraßleistung der Raupen mit zunehmender Pollenbedeckung der Futterpflanzen abnahm und somit nicht mehr der gesamte applizierte Pollen verzehrt wurde ist davon auszugehen, dass LD₅₀-Werte, die sich auf die tatsächlich aufgenommene Pollenmenge beziehen würden, mit Sicherheit niedriger lägen als die o.g. Werte.

Die Larven der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) erwiesen sich von allen getesteten Arten gegenüber dem Pollen von transgenem Mais der Linie Bt-176 (Sorte: PACTOL CB) am empfindlichsten (s. Tabelle 1). Nach Verfütterung von teilweise eingefrorenem Pollen starben 50 % der Versuchstiere bei Applikation von durchschnittlich 19,20 Pollenkörnern auf die Futterpflanze. Bei ausschließlicher Verfütterung von frischem Pollen lag der LD₅₀-Wert für diese Art sogar bei nur noch 7,77 applizierten Pollenkörnern. Am unempfindlichsten zeigten sich die Eulenraupen der Art *Agrotis segetum*. Hier führte selbst die Verfütterung von extrem hohen Bt-Pollenmengen (542 ± 28,17 Pollenkörner) an neonate Larven nicht zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate. Aus diesem Grund ließen sich weder für *A. segetum*-Raupen des ersten, noch des zweiten Larvalstadiums LD₅₀-Werte berechnen. Für die übrigen 5 Spezies konnten LD₅₀-Werte zwischen 32 und 139 Pollenkörnern berechnet werden. Interessanterweise konnte für Raupen von vier verschiedenen Lepidopterenarten eine ähnliche Suszeptibilität nachgewiesen werden. *Aglais urticae* (L₁), *Inachis io* (L₁), *Ostrinia nubilalis* (L₂) und *Pieris rapae* (L₂) zeigten alle LD₅₀-Werte zwischen 32 und 39 Pollenkörnern. Dies

könnte darauf hindeuten, dass die Larven etlicher Nicht-Ziel-Schmetterlinge durch den Pollen von Mais der transgenen Linie Bt-176 mindestens in gleichem Maße geschädigt werden können, wie die Maiszünsler-Raupe.

Wie die Untersuchungen mit verschiedenen Larvalstadien des Tagpfauenauges (*Inachis io*) belegen, sind ältere und somit auch schwerere Larven weitaus weniger empfindlich als Jungrauen. Dies bestätigt frühere Ergebnisse von FELKE & LANGENBRUCH (2001) sowie FELKE et al. (2002), die ähnliche Empfindlichkeits-Unterschiede auch bei verschiedenen alten Kohlweißlingsraupen (*Pieris brassicae* und *P. rapae*) feststellten. Innerhalb derselben Art dürften neonate Larven somit generell am stärksten durch die Aufnahme von Bt-Maispollen geschädigt werden. Wie das Beispiel der extrem sensitiven Kohlmotte zeigt, könnte auch im interspezifischen Vergleich das Gewicht der Larven bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber dem Pollen von Bt-Mais eine entscheidende Rolle spielen. Dies würde bedeuten, dass kleine Schmetterlingsarten mit sehr leichten Raupen in weitaus stärkerem Maß durch den Anbau von Bt-Mais gefährdet sein könnten, als die Mehrzahl der hier untersuchten, relativ großen Tagfalterarten. Allerdings bedarf es zur Absicherung dieser These noch weiterer Untersuchungen mit einer Reihe von Kleinschmetterlingen.

Das Beispiel der beiden untersuchten Kohlweißlingsarten verdeutlicht, dass auch phylogenetisch nah verwandte Spezies deutliche Suszeptibilitäts-Unterschiede zeigen können. Obwohl die Raupen von *P. brassicae* und *P. rapae* zu Testbeginn nahezu das gleiche Durchschnittsgewicht aufwiesen, wichen die erhaltenen LD₅₀-Werte deutlich voneinander ab (FELKE & LANGENBRUCH, 2001; FELKE et al., 2002). Mögliche Ursachen hierfür könnten interspezifische Unterschiede in der Struktur der Toxin-Rezeptoren, und/oder beim pH-Wert des Darmsafts sein. So gibt BERENBAUM (1980) für *Pieris rapae* einen Mitteldarm-pH-Wert von 7,3 bis 7,6 und für *P. brassicae* von 8,0 an.

Die beiden Versuchsreihen mit *Plutella xylostella*-Raupen deuten darauf hin, dass die Lagerung des Pollens großen Einfluss auf dessen Toxizität haben kann. Im Rahmen der ersten Untersuchung stand nur für einen Teil der Biotests frischer Pollen zur Verfügung. Für die restlichen Versuche wurde tiefgefrorener Pollen verwendet, der bei - 30°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt worden war. Unter diesen Bedingungen starben 50 % der Versuchstiere bei Verfütterung von durchschnittlich 19,2 Pollenkörnern. Im Rahmen einer späteren Versuchsreihe wurde ausschließlich frischer Pollen angeboten. Hier lag der LD₅₀-Wert bei nur noch 7,77 Pollenkörnern. Diese Menge entspricht 40,47 % des o.g. LD₅₀-Werts von 19,2 Pollenkörnern. Für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Situation im Freiland bedeutet dies, dass die hier vorgestellten LD₅₀-Werte für den Fall eines Kontakts der Raupen mit frischem Maispollen deutlich nach unten korrigiert werden müssen.

Es ist anzunehmen, dass die z.T. deutlichen Unterschiede in der Pollenwirkung, die sich in den 95-prozentigen Vertrauensbereichen der LD₅₀-Werte manifestieren, auf unterschiedlich lange Lagerung des Pollens zurückzuführen sind. Hierfür spricht, dass der 95-prozentige Vertrauensbereich bei Verfütterung von frischem Pollen an Kohlmottenlarven wesentlich enger war als der aller anderen Versuche, in denen unterschiedlich alter Pollen verwendet worden war. Darüber hinaus können die z. T. großen Vertrauensbereiche darauf

zurückgeführt werden, dass pro Biotest verschieden schwere und damit vermutlich auch unterschiedlich *Bt*-tolerante Larven zusammengefasst wurden. Außerdem schwankte die applizierte Pollenzahl um den pro Variante angegebenen Mittelwert. Denkbar wäre auch, dass der Toxingehalt des Pollens nicht bei allen Pflanzen einheitlich ist und beispielsweise von der Vitalität der einzelnen Pflanzen abhängt. Auch ist vorstellbar, dass es im Laufe der ca. einwöchigen Blühperiode einer Pflanze zu Änderungen im Toxingehalt des Pollens kommen kann.

Nach den bisher vorliegenden Laborergebnissen ist anzunehmen, dass Pollen von transgenem Mais der Linie Bt-176 vor allem für Kleinschmetterlinge mit entsprechend *Bt*-empfindlichen Larven gefährlich werden könnte. Darüber hinaus sind generell neonate Raupen einem höheren Risiko ausgesetzt als ältere Larven. Wie vergleichende Untersuchungen mit Kohlmottenlarven gezeigt haben, wirkt frischer Pollen wesentlich stärker toxisch als eingefrorenes Material. Die hier ermittelten LD₅₀-Werte ermöglichen, zusammen mit Angaben zur Pollenexposition in bestimmten Entfernungen zum Maisfeld, gute Anhaltspunkte um das Gefährdungsrisiko der einzelnen Arten durch Bt-176-Mais abschätzen zu können. Dieser Aspekt wird in der allgemeinen Diskussion noch einmal aufgegriffen.

2.1.8. Langzeituntersuchungen mit *Plutella xylostella*-Raupen (L4) zu Auswirkungen geringer Pollenmengen

2.1.8.1. Effekte bei einmaliger Verfütterung einer geringen Pollendosis

Material & Methoden

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollten Langzeiteffekte wie Entwicklungsdauer, Verpuppungs- und Schlupfrate an Kohlmottenraupen untersucht werden, die kurz nach der dritten Häutung mit 5 bis 6 Pollenkörnern von transgenem bzw. konventionellem Mais gefüttert worden waren. Der verwendete Pollen stammte zum einen von gentechnisch verändertem Mais der Linie Bt-176 (Sorte: PACTOL CB) und zum anderem von der dazugehörigen isogenen Linie (Sorte: PACTOL). Die Biotests wurden mit Raupen durchgeführt, die sich gerade zum dritten Mal gehäutet hatten und somit im vierten Larvalstadium waren. Solche Tiere sind relativ leicht an der verhältnismäßig großen und noch hellen Kopfkapsel zu erkennen. Die Larven für die Versuche stammten aus einer am Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt etablierten Laborzucht.

Die Versuche wurden in 2 × 2 × 2 cm großen Kunststoffwürfeln angesetzt, die mit je 1,5 ml einer 2%igen Agarlösung gefüllt wurden. Nachdem der Agar fest geworden war, wurde in jedes Gefäß ein Blattstück Markstammkohl (*Brassica oleracea acephala medullosa*) von 3 mm Durchmesser gelegt. Hierbei wurden die Blattstückchen stets so platziert, dass die Blattoberseite nach oben zeigte. Anschließend wurde die Blattscheibe leicht auf die Unterlage gedrückt und die vorbereitete Pollensuspension appliziert. Mit Hilfe eines Binokulars wurde der Pollen gezählt und sichergestellt, dass pro Blattscheibe nicht mehr als 5 oder 6 Pollenkörner appliziert worden waren. Nachdem das Wasser komplett verdunstet war, wurde

in jeden Würfel eine Larve gesetzt. Nach 6 Stunden erfolgte die erste Bonitur und die bis dahin verzehrte Blattfläche, sowie der noch vorhandene Pollen wurden festgehalten. Alle Larven, die den Pollen bis zu diesem Zeitpunkt komplett verzehrt hatten, erhielten unbehandeltes Futter in Form eines ca. 2 Quadratzentimeter großen Kohl-Blattstücks. Für die übrigen Tiere wurde diese Bonitur 24 Stunden nach Biotest-Beginn wiederholt. Spätestens zu diesem Zeitpunkt wurden alle Tiere mit unbehandeltem Futter nachgefüttert, unabhängig davon, ob sie den Pollen komplett gefressen hatten oder nicht. Von nun an wurden die Versuche täglich bonitiert, wobei Mortalität, Umwandlung zur Vorpuppe, Verpuppung und Falterschlupf registriert wurden.

Darüber hinaus wurden eine Woche nach Biotest-Beginn alle noch lebenden Individuen gewogen. Zusätzlich wurden die Puppengewichte ermittelt, sobald sich alle Tiere innerhalb einer Wiederholung verpuppt hatten. Sobald der letzte Falter geschlüpft war, wurde der Biotest beendet. Für die gesamte Biotest-Dauer verblieben die Polystyrolwürfel in einem Klimaschrank mit Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h hell/ 8 h dunkel). Während der Dunkelphase sank die Temperatur auf 15°C, während sie nach Einschalten der Beleuchtung auf bis zu 25°C anstieg.

Um Unterschiede bezüglich Nahrungsaufnahme (verzehrte Blattfläche und dabei aufgenommene Pollenmenge), durchschnittliche Larven- und Puppengewichte, sowie den Anteil von Vorpuppen und Larven 5 Tage nach Biotestbeginn zu untersuchen, wurden PROC t-test nach COCHRAN, sowie Student-Newman-Keuls-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01). Um die Unterschiede in der Überlebensrate zwischen den beiden Varianten vergleichen zu können, wurde ein PROC-Lifetest angewandt (SAS-Programm 8.01), der normalerweise dazu benutzt wird, die Überlebensdauer von 2 unterschiedlich behandelten Testgruppen nach einer Behandlung zu vergleichen. Hiermit lassen sich z. B. Aussagen über die Wirksamkeit von Insektiziden machen.

Ergebnisse

Jede der beiden Varianten bestand aus 8 zeitlichen Wiederholungen, d. h. 8 verschiedenen Biotests, die nacheinander innerhalb eines Zeitraums von mehreren Wochen angesetzt wurden. Insgesamt wurden pro Variante somit 80 Larven getestet.

Nach 24 Stunden hatten die Larven in der PACTOL-Gruppe (Bt-) im Durchschnitt $88,00 \pm 3,29$ % der Kohlblattscheibe verzehrt und dabei $4,27 \pm 0,16$ Pollenkörner aufgenommen. Die Tiere der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) hatten mit $52,12 \pm 3,78$ % zwar deutlich weniger Blattfläche verzehrt, die dabei mit aufgenommene Pollenmenge ($4,09 \pm 0,14$ Pollenkörner) war dagegen nur leicht reduziert. Hinsichtlich der verzehrten Blattfläche erwies sich der Unterschied als statistisch signifikant ($t(79 \text{ FG}) = 7,16$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test), bezüglich der dabei aufgenommenen Pollenmenge dagegen nicht ($t(79 \text{ FG}) = 0,18$; $p = 0,8553$; Student-Newman-Keuls-Test).

5 Tage nach Beginn des Biotests wurde die Zahl der Larven und Vorpuppen festgehalten. Bei den Tieren, die mit Pollen der Maissorte PACTOL (Bt-) gefüttert worden waren, lebten zu diesem Zeitpunkt 49 Larven ($66,22 \pm 14,28$ %) und 25 Vorpuppen ($33,78 \pm 14,28$ %),

während es in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) 39 Larven ($97,5 \pm 2,71$ %) und eine Vorpuppe ($2,5 \pm 2,71$ %) waren. 5 Tage nach Biotest-Beginn lag das Durchschnittsgewicht in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bei $6,73 \pm 0,15$ mg ($n = 74$), in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) dagegen bei $6,82 \pm 0,31$ mg ($n = 40$). Das durchschnittliche Puppengewicht betrug in der PACTOL-Gruppe (Bt-) $5,73 \pm 0,11$ mg ($n = 63$) und in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) $5,54 \pm 0,25$ mg ($n = 28$). Die Unterschiede bei Larven- und Puppengewichten zwischen den Gruppen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. T-Test für Larvalgewicht: (t (112 FG) = 0,27; $p = 0,7893$; Student-Newman-Keuls-Test). T-Test für Puppengewicht: (t (89 FG) = 0,70; $p = 0,4909$; Student-Newman-Keuls-Test).

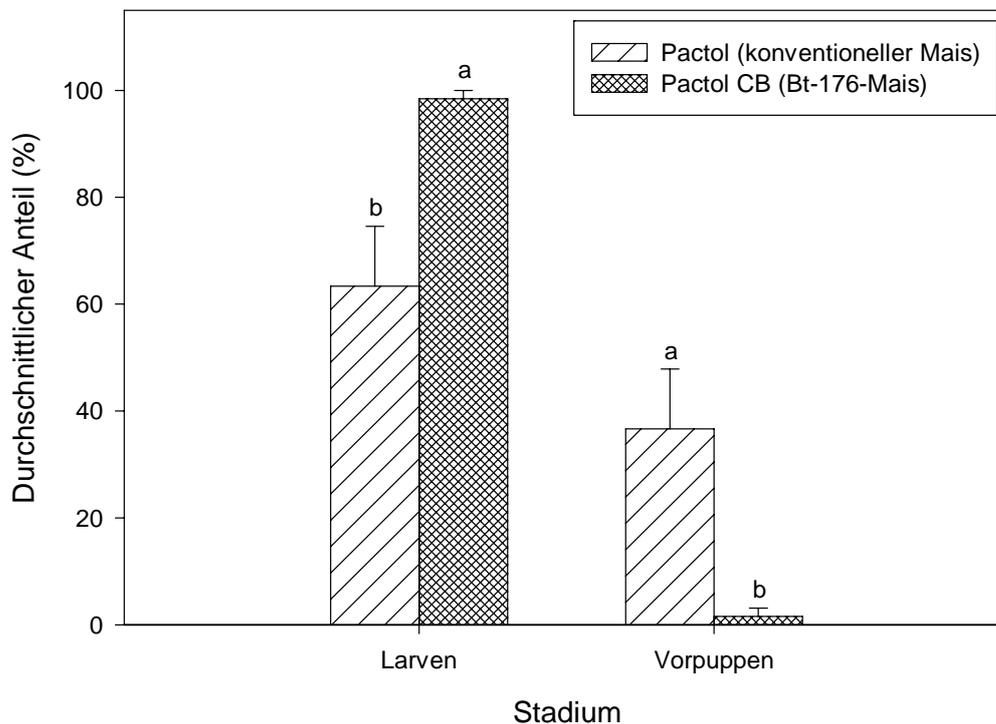


Abbildung 17: Durchschnittlicher Anteil der noch lebenden Larven und Vorpuppen ($\% \pm SF$) 5 Tage nach Biotestbeginn für *Plutella xylostella*, die als Raupen (L_4) mit 5 Pollenkörnern der Maissorten PACTOL (konventioneller Mais) oder PACTOL CB (Bt-176-Mais) gefüttert worden waren. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant. T-Test für Vergleich des Vorpuppen-Anteils: (t (7 FG) = 3,34; $p = 0,0124$; Student-Newman-Keuls-Test). T-Test für Vergleich des Larven-Anteils: (t (7 FG) = 3,34; $p = 0,0124$; Student-Newman-Keuls-Test).

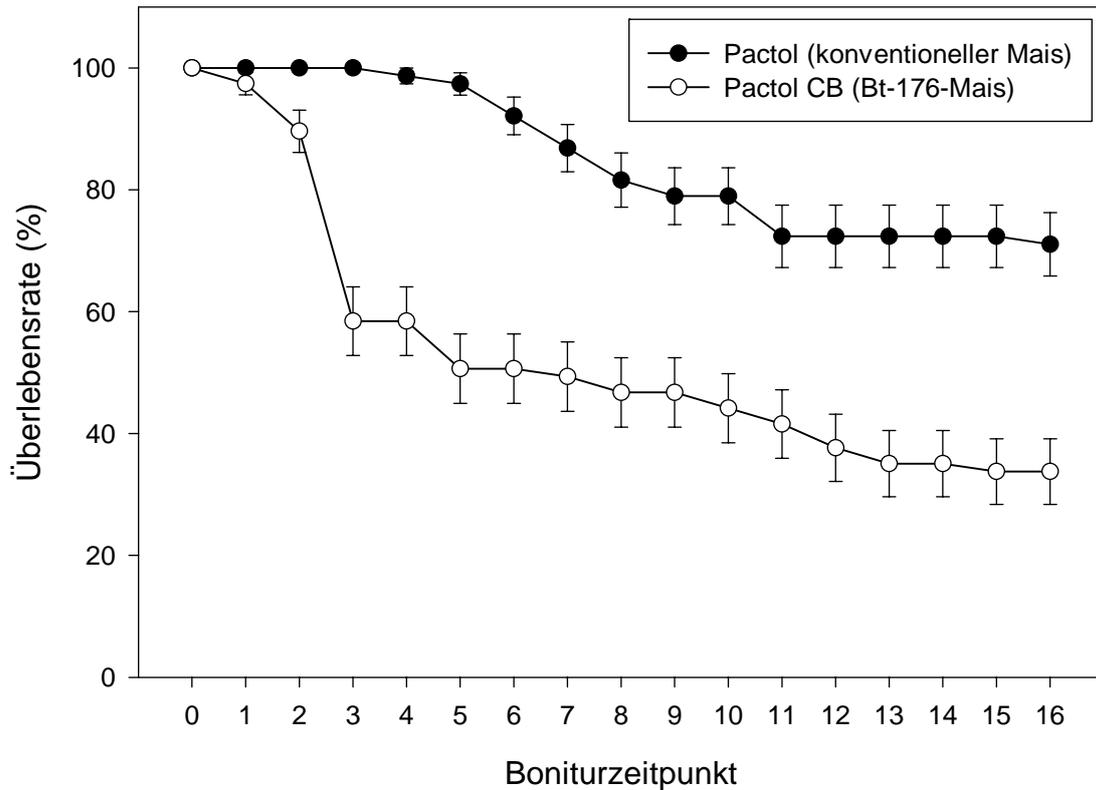


Abbildung 18: Überlebensrate (% \pm SF) im Verlauf des Biotests für *Plutella xylostella*, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an einem einzigen Termin mit 5 Maispollen (Pactol (Bt-) oder Pactol CB (Bt+)) gefüttert wurden. Das Endergebnis nach der 16. Bonitur bezieht sich auf alle Stadien (Larven, Vorpuppen, Puppen und Falter). χ^2 (1 FG) = 26,8352; $p < 0,0001$ (Log-Rank-Test).

Wie unter Material & Methoden vermerkt, wurde der Versuch nach dem Schlupf des letzten Falters abgebrochen. Um Unterschiede in der Überlebenszeit beider Gruppen vergleichen zu können, wurde angenommen, dass alle Individuen, die zum Zeitpunkt der 16. Bonitur nach Biotest-Beginn noch lebten, einen Tag später starben. Somit hätte sich für die Tiere der PACTOL-Gruppe (Bt-) eine durchschnittliche Überlebenszeit von $13,76 \pm 0,44$ und für die PACTOL CB-Gruppe (Bt+) eine durchschnittliche Überlebenszeit von $8,42 \pm 0,64$ Tage ergeben. Um einen korrekten Vergleich der Überlebensraten durchführen zu können, wäre es allerdings nötig gewesen, die Falter bis zum Tod des letzten Individuums weiter zu pflegen.

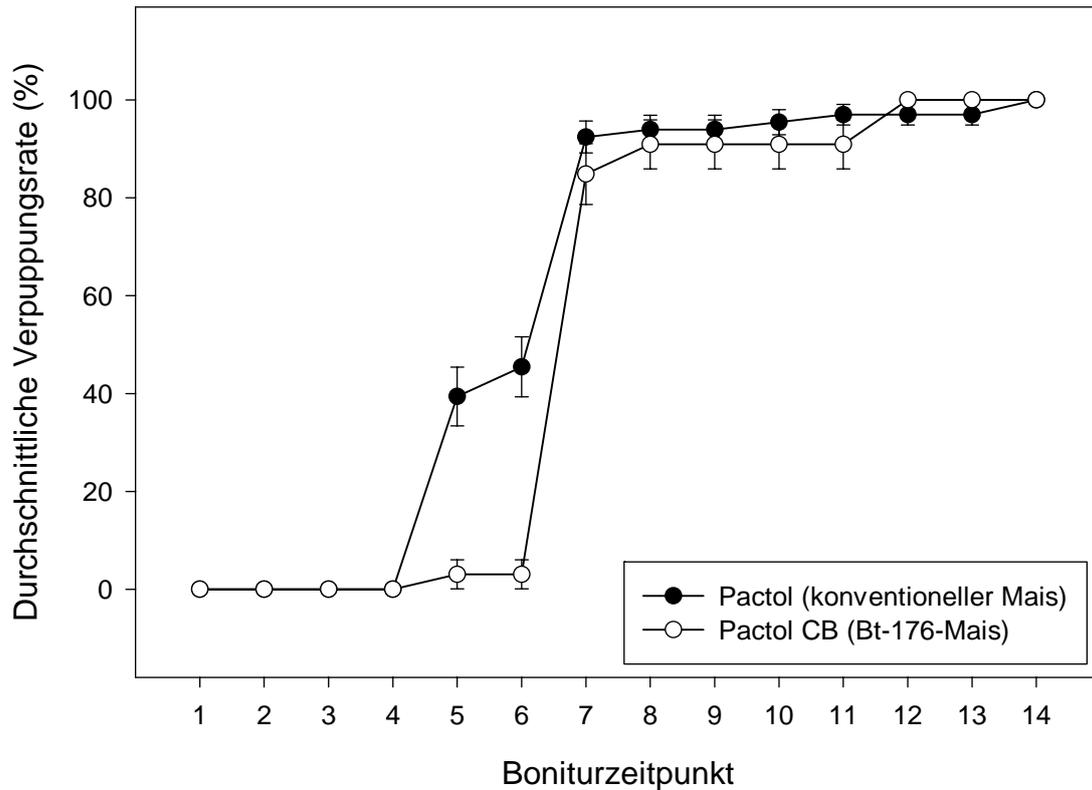


Abbildung 19: Puppenanteil (% \pm SF) im Verlauf des Biotests für *Plutella xylostella*, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an einem einzigen Termin mit 5 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden.

Wie Abbildung 19 zeigt, verpuppten sich die ersten Kohlmottenlarven am fünften Tag nach Beginn des Biotests. Während sich zu diesem Zeitpunkt in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bereits 39 % der Tiere verpuppt hatten, trat in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) lediglich eine Puppe auf (3 %). Am darauf folgenden Tag war dieser Unterschied mit 45 % (PACTOL) zu 3 % (PACTOL CB) noch größer geworden. Erst 8 Tage nach Biotest-Beginn war der Puppenanteil in beiden Varianten nahezu identisch. Die Anzahl der zum Boniturzeitpunkt noch lebenden Individuen wird mit 100 % gleichgesetzt.

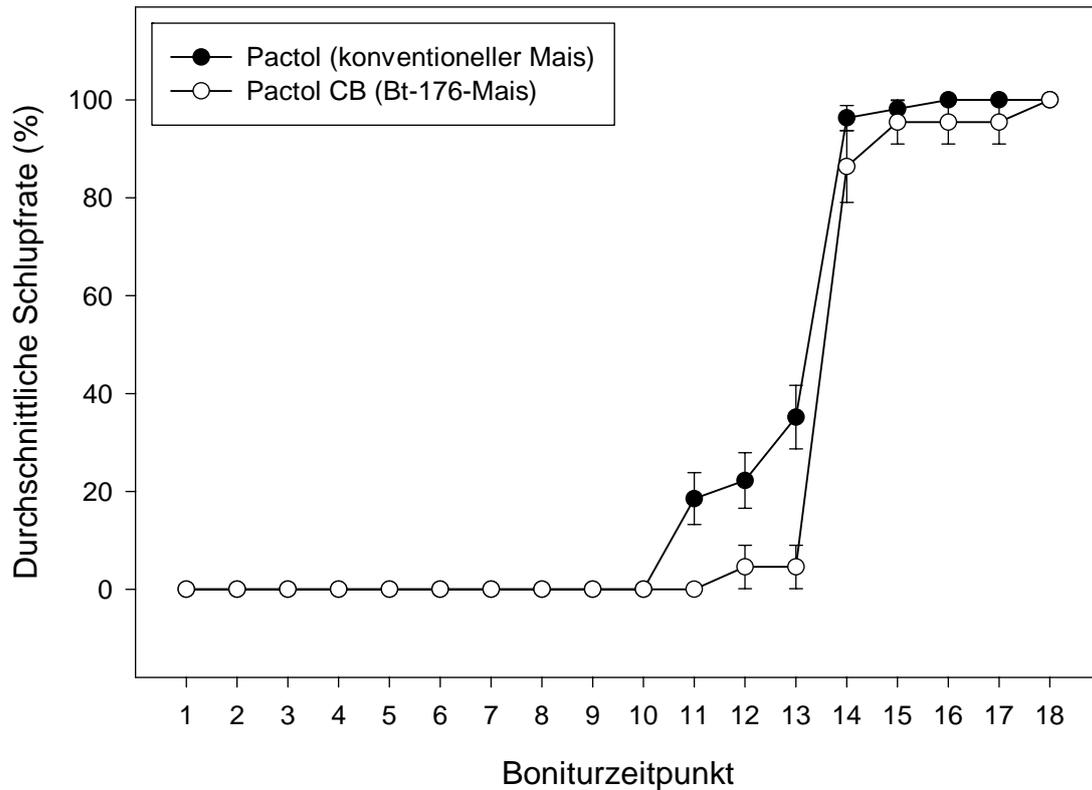


Abbildung 20: Falteranteil (% \pm SF) im Verlauf des Biotests für *Plutella xylostella*, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an einem einzigen Termin mit 5 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden.

Wie aus Abbildung 20 ersichtlich wird, schlüpfen die ersten Imagines in der PACTOL-Gruppe (Bt-) am elften Tag nach Beginn des Biotests. Erst einen Tag später tauchte in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) der erste Falter auf. Am 13. Tag nach Beginn des Biotests lag der Falteranteil in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bei 35 %, während er in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) lediglich 4 % erreicht hatte. Erst 15 Tage nach Biotest-Beginn war der Falteranteil der beiden Varianten nahezu identisch. Die Anzahl der zum Boniturzeitpunkt noch lebenden Individuen wird mit 100 % gleichgesetzt.

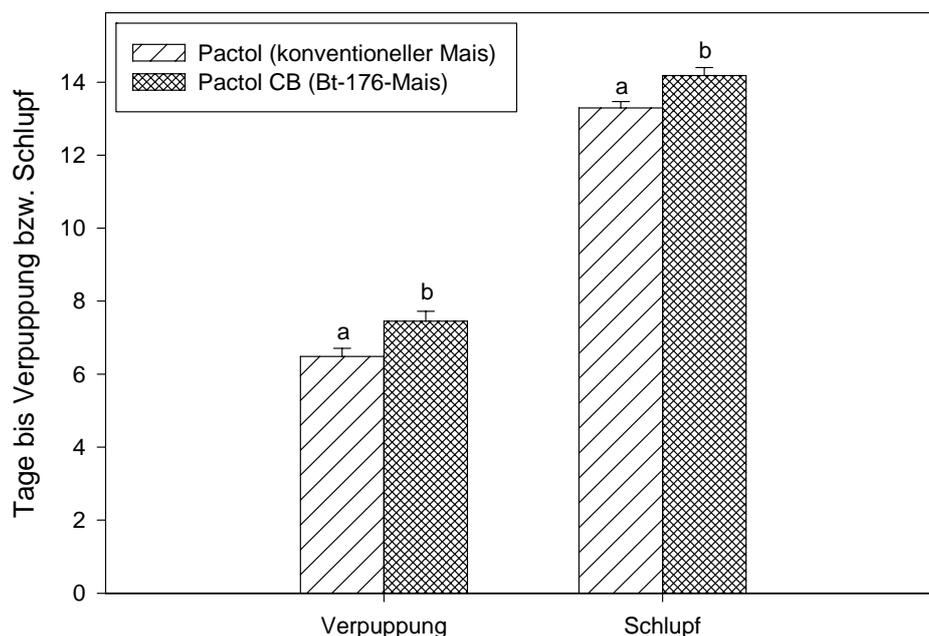


Abbildung 21: Durchschnittliche Zeit bis zu Verpuppung bzw. Schlupf (in Tagen \pm SF) für *Plutella xylostella*-Raupen, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an einem einzigen Termin mit 5 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden. T-Test für Verpuppung: Pactol (Bt-): N = 66; Pactol CB: N = 33. $t(97 \text{ FG}) = 3,33$; $p < 0,0012$. Log-Transformation; pooled; equal variances. T-Test für Schlupf: Pactol (Bt-): N = 54; Pactol CB: N = 22. $t(74 \text{ FG}) = 2,91$; $p < 0,0048$. Log-Transformation; pooled; equal variances.

Wie Abbildung 21 verdeutlicht, benötigten die Tiere, die mit Pollen der transgenen Variante PACTOL CB (Bt+) gefüttert worden waren signifikant mehr Zeit bis zur Verpuppung, bzw. bis zum Falterschlupf als die Individuen der PACTOL-Variante (Bt-). Die Tiere der PACTOL CB-Variante (Bt+) brauchten mit 7,45 Tagen durchschnittlich einen Tag länger bis zur Verpuppung als die Individuen der nicht-transgenen Variante mit 6,48 Tagen. Ähnlich waren die Verhältnisse hinsichtlich des Falterschlupfs. Die Tiere der PACTOL CB-Variante (Bt+) brauchten mit durchschnittlich 14,2 Tagen fast einen Tag länger für die Entwicklung zur Imago als die Individuen der transgenen Variante mit 13,3 Tagen.

Diskussion

Ziel der hier durchgeführten Versuche war es, Effekte subletaler Pollenmengen auf *Plutella xylostella*-Raupen des vierten Stadiums zu ermitteln. Da in einer ersten Untersuchung ein LD₅₀-Wert von 19,20 Pollenkörnern von transgenem BT-176-Mais berechnet werden konnte, wurden für die Erfassung subletaler Effekte lediglich fünf Pollenkörner an die Larven verfüttert. Der Vergleich von verzehrter Blattfläche und dabei aufgenommener Pollenmenge ergab eindeutig, dass beide Gruppen fast gleich viel Pollen verzehrt hatten und dies, obwohl die gefressene Blattfläche deutlich von einander abwich. Während die Larven der PACTOL-Gruppe (Bt-) nach einem Tag durchschnittlich 88 % der Blattfläche verzehrt hatten, konsumierte die zweite Gruppe mit 52 % deutlich weniger. Man kann darauf schließen, dass

bei den Larven, die mit Pollen von PACTOL CB-Mais (Bt+) gefüttert worden waren nach dem Verzehr von rund 4 Pollenkörnern ein Fraßstopp einsetzte und kein weiteres Blattmaterial mehr konsumiert wurde. Nach einer Woche waren zwischen beiden Gruppen schon deutliche Unterschiede in der Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven auszumachen. Während sich bei den Tieren, die mit Pollen der Maissorte PACTOL (Bt-) gefüttert worden waren zu diesem Zeitpunkt schon ein Drittel der Larven zu Vorpuppen umgewandelt hatten, konnte in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) lediglich eine Vorpuppe festgestellt werden.

Keine signifikanten Unterschiede ließen sich zwischen den beiden Gruppen bezüglich des Larval- bzw. Puppengewichts registrieren. Das etwas höhere Durchschnittsgewicht in der BT-Gruppe könnte damit erklärt werden, dass sich diese Werte sowohl auf Larven, als auch auf Vorpuppen beziehen. Die Larven der Kohlmotte stellen einige Stunden vor der Verpuppung das Fressen ein und verlieren durch das Verpuppen zusätzlich etwas an Gewicht. Da sich in der PACTOL-Gruppe (Bt-) zum Zeitpunkt der Gewichtsbestimmung deutlich mehr Vorpuppen befanden als in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+), könnte dies das höhere Durchschnittsgewicht von Individuen der BT-Gruppe erklären. Das durchschnittliche Puppengewicht war in der PACTOL-Gruppe (Bt-) mit $5,73 \pm 0,11$ mg etwas höher als in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) mit $5,54 \pm 0,25$ mg. Allerdings stellte sich auch diese geringe Differenz als statistisch nicht signifikant heraus. Nach den deutlichen Differenzen bezüglich der Mortalitätsraten zwischen beiden Gruppen wäre hier ein wesentlich größerer Unterschied zu erwarten gewesen. Auffällig war dass die Tiere der PACTOL CB-Gruppe (Bt+), die den Biotest überlebten, meist sehr groß waren. Eine plausible Erklärung für dieses Phänomen kann nicht gegeben werden. Entweder handelte es sich bei diesen Individuen um recht *B. t.*-unempfindliche Larven, oder aber um solche Tiere, die nur wenig Pollen gefressen hatten. Da Larven aus den Pollenversuchen generell nicht mehr für die Zucht verwendet wurden, ist es recht unwahrscheinlich, dass sich eine *Bt*-Resistenz gegenüber dem Cry1Ab-Toxin ausbilden konnte.

Die einmalige Verfütterung von rund 5 Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) verlangsamte die Entwicklung der getesteten Kohlmottenlarven im Vergleich zur konventionellen Variante deutlich. Verpuppung und Falterschlupf setzten in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) nicht nur später ein als in der nicht-transgenen Variante, auch benötigten die Individuen der BT-Variante bis zum Erreichen des Puppen- bzw. Imaginalstadiums durchschnittlich deutlich mehr Zeit als die Tiere der konventionellen Variante.

Ganz eindeutig sind die Unterschiede zwischen beiden Gruppen auch hinsichtlich der Mortalitätsrate. Nach einer Woche lebten in der PACTOL-Gruppe (Bt-) noch mehr als 97 % der Tiere, während in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) schon die Hälfte aller Larven gestorben waren. In beiden Varianten nahm die Sterblichkeit bis Versuchsende weiter zu. Während sich in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) nur ein Drittel der Tiere bis zum Falter entwickeln konnte, waren es in der Vergleichsvariante immerhin 71 %. Es ließ sich somit nachweisen, dass auch Pollenmengen unterhalb des ermittelten LD₅₀-Werts (7,77 Pollenkörner pro Larve) Überlebensrate und Entwicklung der betroffenen Larven eindeutig negativ beeinflussen.

Vergleicht man diese Laborergebnisse mit den Daten zur Pollenexposition unter Freilandbedingungen, so wird deutlich, dass die Pollendichte mindestens bis zu einer Entfernung von 32 Metern vom Feldrand noch so hoch sein kann, dass Raupen, die ähnlich Bt-empfindlich sind wie Kohlmottenlarven geschädigt werden können.

2.1.8.2. Effekte bei wiederholter Verfütterung einer geringen Pollendosis

Material & Methoden

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollten Langzeiteffekte wie Entwicklungsdauer, Verpuppungs- und Schlupfrate an Kohlmottenraupen untersucht werden, die kurz nach der dritten Häutung an **4 aufeinander folgenden Tagen** mit 5 bis 6 Pollenkörnern von transgenem bzw. konventionellem Mais gefüttert worden waren. Der verwendete Pollen stammte zum einen von gentechnisch verändertem Mais der Linie Bt-176 (Sorte: PACTOL CB) und zum anderen von der dazugehörigen isogenen Linie (Sorte: PACTOL). Die Biotests wurden mit Raupen durchgeführt, die sich gerade zum dritten Mal gehäutet hatten und sich demnach im vierten Larvalstadium befanden. Solche Tiere sind relativ leicht an der verhältnismäßig großen und noch hellen Kopfkapsel zu erkennen. Die Larven für die Versuche stammten aus einer am Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt etablierten Laborzucht.

Die Versuche wurden in $2 \times 2 \times 2$ cm großen Kunststoffwürfeln angesetzt, die mit je 1,5 ml einer 2%igen Agarlösung gefüllt wurden. Nachdem der Agar fest geworden war, wurde in jedes Gefäß ein Blattstück Markstammkohl (*Brassica oleracea acephala medullosa*) von 3 mm Durchmesser gelegt. Hierbei wurden die Blattstückchen stets so platziert, dass die Blattoberseite nach oben zeigte. Anschließend wurde die Blattscheibe leicht auf die Unterlage gedrückt und die vorbereitete Pollensuspension appliziert. Mit Hilfe eines Binokulars wurde der Pollen gezählt und sichergestellt, dass pro Blattscheibe nicht mehr als 5 oder 6 Pollenkörner appliziert worden waren. Nachdem das Wasser komplett verdunstet war, wurde in jeden Würfel eine einzelne Larve gesetzt. Nach 6 Stunden erfolgte die erste Bonitur und die bis dahin verzehrte Blattfläche, sowie die noch vorhandenen Pollen wurden festgehalten. Alle Larven, die den Pollen bis zu diesem Zeitpunkt komplett verzehrt hatten, erhielten unbehandeltes Futter in Form eines ca. 2 Quadratzentimeter großen Kohl-Blattstücks. Für die übrigen Tiere wurde diese Bonitur 24 Stunden nach Biotest-Beginn wiederholt. Diese Prozedur wurde an 4 aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Zusätzlich wurde die Mortalität in beiden Varianten festgehalten. Ab dem fünften Tag wurden die Larven mit unbehandelten Kohlblattstücken ernährt. Im weiteren Verlauf des Biotests wurden Mortalität, Umwandlung zur Vorpuppe, Verpuppung und Falterschlupf täglich registriert. Darüber hinaus wurden eine Woche nach Biotest-Beginn alle noch lebenden Individuen gewogen. Zusätzlich wurden die Puppengewichte ermittelt, sobald sich alle Tiere innerhalb einer Wiederholung verpuppt hatten. Sobald der letzte Falter geschlüpft war, wurde der Biotest beendet.

Für die gesamte Biotest-Dauer verblieben die Polystyrolwürfel in einem Klimaschrank mit Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h hell/ 8 h dunkel). Während der Dunkelphase sank die Temperatur auf 15°C, während sie nach Einschalten der Beleuchtung auf bis zu 25°C anstieg.

Um Unterschiede bezüglich Nahrungsaufnahme (verzehrte Blattfläche und dabei aufgenommene Pollenmenge), durchschnittliche Larven- und Puppengewichte, sowie den Anteil von Vorpuppen und Larven 5 Tage nach Biotestbeginn zu untersuchen, wurden PROC t-test nach COCHRAN, sowie Student-Newman-Keuls-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01). Um die Unterschiede in der Überlebensrate zwischen den beiden Varianten vergleichen zu können, wurde ein PROC-Lifetest angewandt (SAS-Programm 8.01), der normalerweise dazu benutzt wird, die Überlebensdauer von 2 unterschiedlich behandelten Testgruppen nach einer Behandlung zu vergleichen. Hiermit lassen sich z. B. Aussagen über die Wirksamkeit von Insektiziden machen.

Ergebnisse

Jede der beiden Varianten bestand aus 7 zeitlichen Wiederholungen d. h. 7 verschiedenen Biotests, die nacheinander innerhalb eines Zeitraums von mehreren Wochen angesetzt wurden.. Insgesamt wurden pro Variante 70 Larven getestet (d. h. 10 Tiere pro Wiederholung und Variante). Das in Tabelle 2 genannte n bezieht sich auf die Anzahl der gemachten Beobachtungen.

Tabelle 2: Durchschnittlich verzehrte Blattfläche des mit Pollen bedeckten Kohlblattstückchens und dabei aufgenommene Pollenmenge (PK) für Tiere, die mit Pollen der konventionellen Maissorte Pactol, bzw. mit Pollen der transgenen Sorte Pactol CB (Linie Bt-176) gefüttert worden waren. Mit n wird die Zahl der *Plutella xylostella* angegeben, die zum Boniturzeitpunkt noch lebten – n bezieht sich somit auf die Anzahl der gemachten Beobachtungen. SF bezeichnet den Standardfehler.

Endergebnis (alle 4 Bonituren zusammen)										
Pactol-Gruppe (Bt-)					Pactol CB-Gruppe (Bt+)					
Frass (%)	SF	PK	SF	n	Frass (%)	SF	PK	SF	n	
96,89	0,70	5,25	0,06	270	61,26	2,42	4,91	0,09	166	
Ergebnis nach der 1. Bonitur										
Pactol-Gruppe (Bt-)					Pactol CB-Gruppe (Bt+)					
Frass (%)	SF	PK	SF	n	Frass (%)	SF	PK	SF	n	
96,00	1,56	5,33	0,12	70	56,09	3,32	5,01	0,14	69	
Ergebnis nach der 2. Bonitur										
Pactol-Gruppe (Bt-)					Pactol CB-Gruppe (Bt+)					
Frass (%)	SF	PK	SF	n	Frass (%)	SF	PK	SF	n	
98,14	1,11	5,40	0,11	70	55,65	4,98	4,63	0,21	46	
Ergebnis nach der 3. Bonitur										
Pactol-Gruppe (Bt-)					Pactol CB-Gruppe (Bt+)					
Frass (%)	SF	PK	SF	n	Frass (%)	SF	PK	SF	n	
98,70	0,68	5,25	0,10	69	72,07	5,44	5,07	0,14	29	
Ergebnis nach der 4. Bonitur										
Pactol-Gruppe (Bt-)					Pactol CB-Gruppe (Bt+)					
Frass (%)	SF	PK	SF	n	Frass (%)	SF	PK	SF	n	
94,43	1,96	4,98	0,18	61	75,00	6,42	4,95	0,19	22	

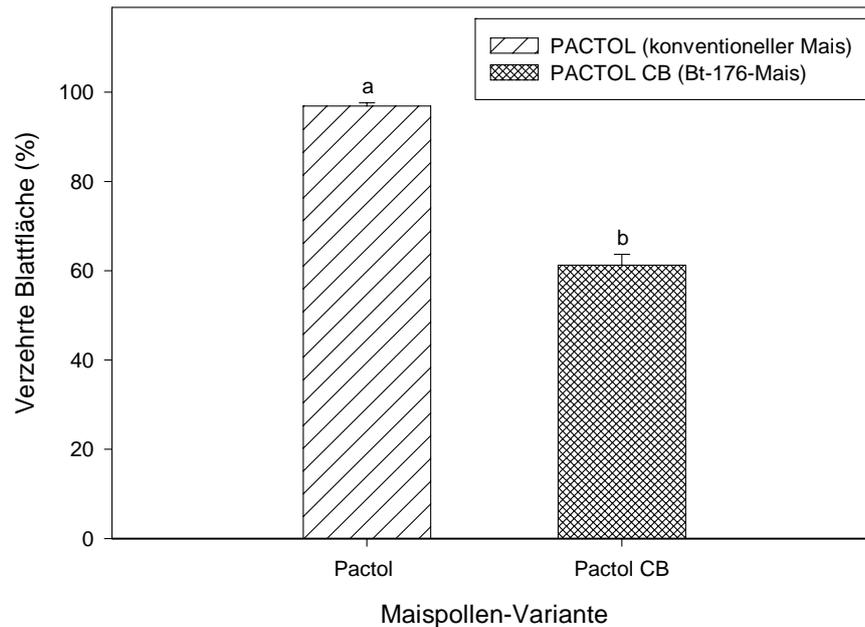


Abbildung 22: Durchschnittlich gefressene Blattfläche (% \pm SF) jeweils 24 Stunden nach Pollenapplikation für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die an 4 aufeinander folgenden Tagen mit je 5 Pollenkörnern der Maissorten PACTOL (konventioneller Mais) oder PACTOL CB (Bt-176-Mais) gefüttert worden waren. Angegeben ist ein Durchschnittswert für 4 Bonituren. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($t(434 \text{ FG}) = 14,14$; $p < 0,0001$, Student-Newman-Keuls-Test).

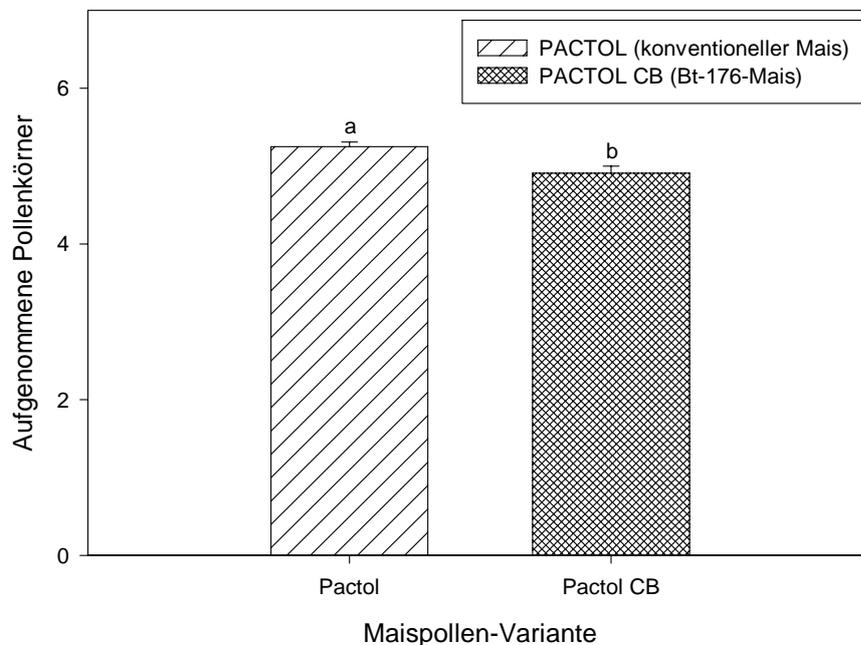


Abbildung 23: Durchschnittlich gefressene Maispollen \pm SF für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), auf deren Futter an 4 aufeinander folgenden Tagen 5 Pollenkörner der Maissorten PACTOL (konventioneller Mais) oder PACTOL CB (Bt-176-Mais) appliziert worden waren. Angegeben ist ein Durchschnittswert für 4 Bonituren. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($t(434 \text{ FG}) = 2,33$; $p = 0,0209$, Student-Newman-Keuls-Test).

5 Tage nach Beginn des Biotests wurde die Zahl der Larven und Vorpuppen festgehalten. Bei den Tieren, die mit Pollen der Maissorte PACTOL (Bt-) gefüttert worden waren, lebten zu diesem Zeitpunkt 47 Larven ($69,12 \pm 9,85 \%$) und 21 Vorpuppen ($30,88 \pm 9,85 \%$), während es in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) 22 Larven (100 %) waren. Kein einziges Tier hatte sich bis dato in eine Vorpuppe umgewandelt. Eine Woche nach Biotest-Beginn lag das Durchschnittsgewicht in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bei $6,34 \pm 0,19$ mg ($n = 68$), in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) dagegen bei $5,18 \pm 0,41$ mg ($n = 22$). Das durchschnittliche Puppengewicht betrug in der PACTOL-Gruppe (Bt-) $5,35 \pm 0,21$ mg ($n = 30$) und in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) $6,53 \pm 0,77$ mg ($n = 7$).

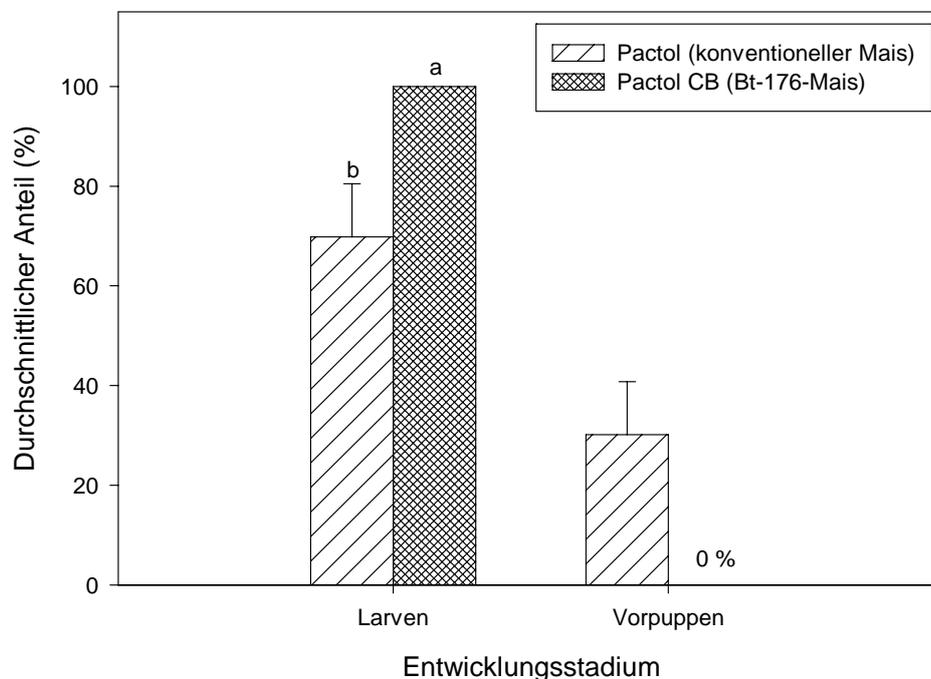


Abbildung 24: Durchschnittlicher Anteil der noch lebenden Larven und Vorpuppen ($\% \pm SF$) 5 Tage nach Biotestbeginn für *Plutella xylostella*, die als Raupen (L_4) an 4 aufeinander folgenden Tagen mit 5 Pollenkörnern der Maissorten PACTOL (konventioneller Mais) oder PACTOL CB (Bt-176-Mais) gefüttert worden waren. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant. T-Test für Vergleich des Vorpuppen-Anteils: ($t(6 \text{ FG}) = 3,30$; $p = 0,0165$, Student-Newman-Keuls-Test). T-Test für Vergleich des Larven-Anteils: ($t(6 \text{ FG}) = 3,30$; $p = 0,0165$, Student-Newman-Keuls-Test). Die Anzahl der zum Boniturzeitpunkt noch lebenden Individuen wird mit 100 % gleichgesetzt.

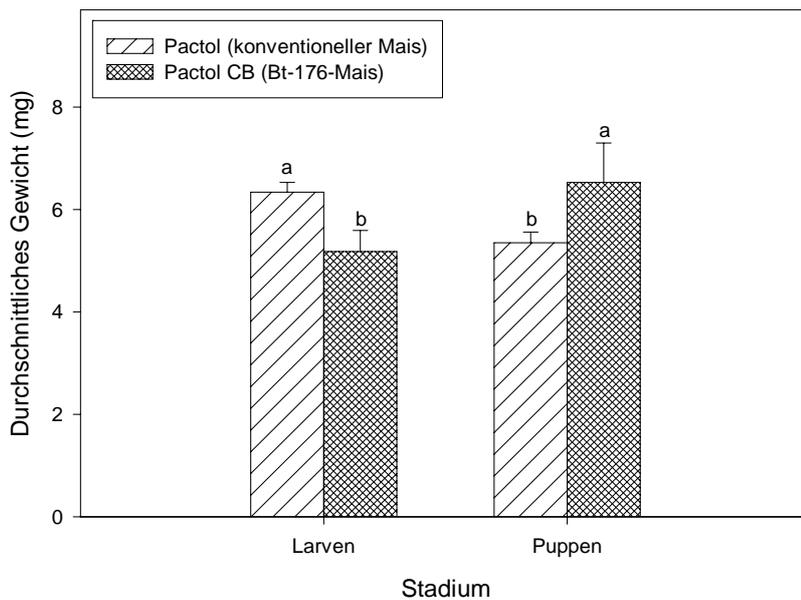


Abbildung 25: Durchschnittliches Larvalgewicht (mg \pm SF) 5 Tage nach Biotestbeginn, bzw. Puppengewicht (mg \pm SF) für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die an 4 aufeinander folgenden Tagen mit jeweils 5 Pollenkörnern der Maissorten PACTOL (konventioneller Mais) oder PACTOL CB (Bt-176-Mais) gefüttert worden waren. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant. T-Test für Larvalgewicht: $t(88 \text{ FG}) = 2,57$; $p = 0,0168$, Student-Newman-Keuls-Test). T-Test für Puppengewicht: $t(35 \text{ FG}) = 1,47$; $p = 0,1883$, Student-Newman-Keuls-Test).

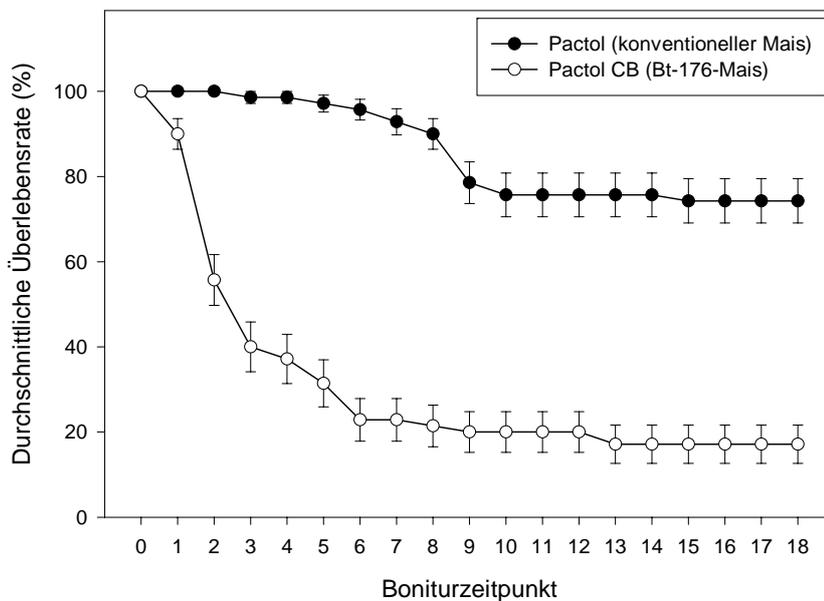


Abbildung 26: Überlebensrate (% \pm SF) im Verlauf des Biotests für *Plutella xylostella*, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an 4 aufeinander folgenden Terminen mit 5 bis 6 Maisspollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden. Das Endergebnis nach der 18. Bonitur bezieht sich auf alle Stadien (Larven, Vorpuppen, Puppen und Falter). $\chi^2(1 \text{ FG}) = 68,3968$; $p < 0,0001$ (Log-Rank-Test).

Wie unter Material & Methoden vermerkt, wurde der Versuch nach dem Schlupf des letzten Falters abgebrochen. Um Unterschiede in der Überlebenszeit beider Gruppen vergleichen zu können, wurde angenommen, dass alle Individuen, die zum Zeitpunkt der 18. Bonitur nach Biotest-Beginn noch lebten, einen Tag später starben. Somit hätte sich für die Tiere der PACTOL-Gruppe (Bt-) eine durchschnittliche Überlebenszeit von $13,30 \pm 0,38$ und für die PACTOL CB-Gruppe (Bt+) eine durchschnittliche Überlebenszeit von $5,01 \pm 0,52$ Tage ergeben. Um einen korrekten Vergleich der Überlebensraten durchführen zu können, wäre es allerdings nötig gewesen, die Falter bis zum Tod des letzten Individuums weiter zu pflegen.

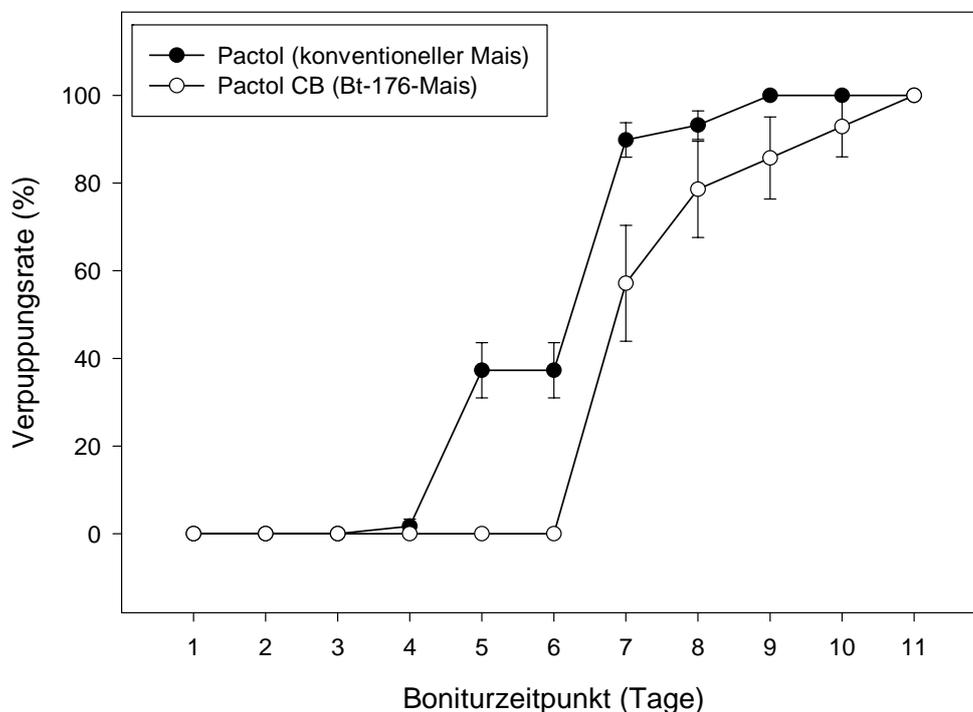


Abbildung 27: Puppenanteil ($\% \pm SF$) im Verlauf des Biotests für *Plutella xylostella*, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an 4 aufeinander folgenden Terminen mit 5 bis 6 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden.

Wie Abbildung 27 zeigt, verpuppten sich die ersten Kohlmottenlarven am vierten Tag nach Beginn des Biotests. Während sich am sechsten Tag in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bereits 37 % der Tiere verpuppt hatten, traten die ersten Puppen in der PACTOL CB-Variante erst am siebten Tag nach Beginn des Biotests auf. In der PACTOL-Gruppe (Bt-) verpuppte sich die letzte Larve am neunten Tag, während in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) die Verpuppungsphase erst 2 Tage später abgeschlossen war. Die Anzahl der zum Boniturzeitpunkt noch lebenden Individuen wird mit 100 % gleichgesetzt.

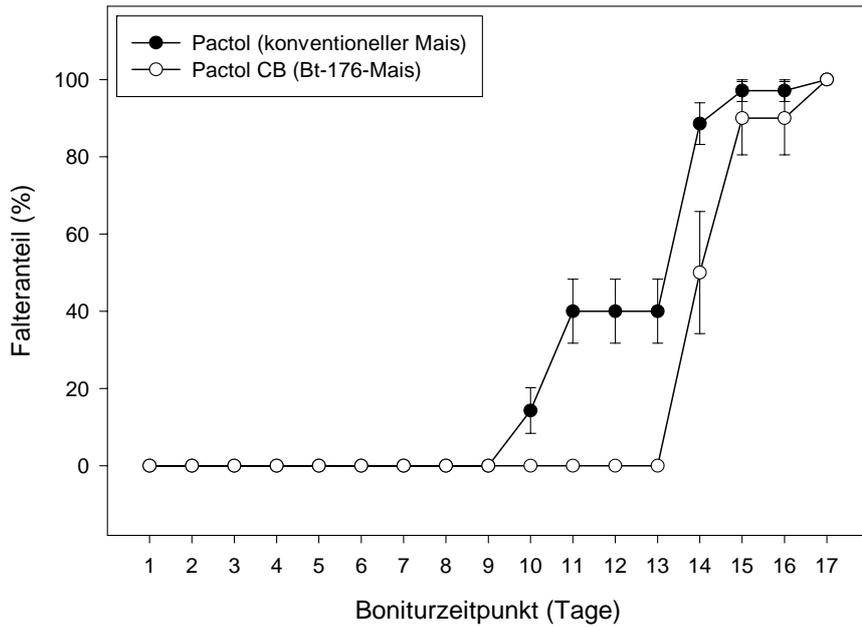


Abbildung 28: Falteranteil (% \pm SF) im Verlauf des Biotests für *Plutella xylostella*, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an 4 aufeinander folgenden Terminen mit 5 bis 6 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden.

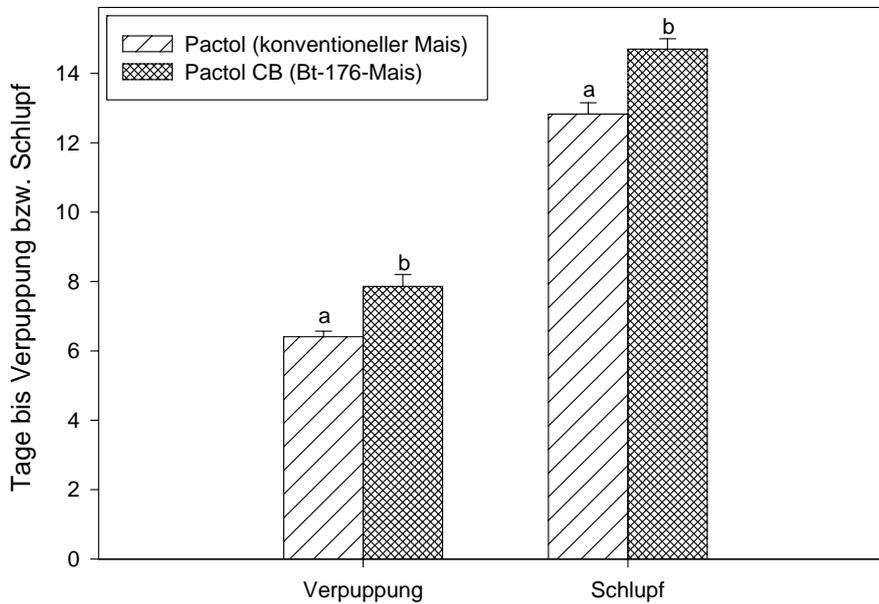


Abbildung 29: Durchschnittliche Zeit bis zu Verpuppung bzw. Schlupf (in Tagen \pm SF) für *Plutella xylostella*-Raupen, die kurz nach der dritten Larvalhäutung an 4 aufeinander folgenden Terminen mit 5 bis 6 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden. T-Test für Verpuppung: Pactol (N = 59); Pactol CB (N = 14). t (71 FG) = 3,73; $p < 0,0004$. Log-Transformation; pooled; equal variances. T-Test für Schlupf: Pactol: N = 35; Pactol CB: N = 10. t (43 FG) = 2,91; $p < 0,0057$. Log-Transformation; pooled; equal variances.

Wie aus Abbildung 28 ersichtlich wird, schlüpfen die ersten Imagines in der PACTOL-Gruppe (Bt-) am zehnten Tag nach Beginn des Biotests. Dagegen tauchten die ersten Falter in der PACTOL CB-Gruppe erst 2 Wochen nach Beginn des Biotests auf. Am 14. Tag lag der Falteranteil in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bei fast 90 %, während er in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) lediglich 50 % erreicht hatte. In beiden Varianten schlüpfte der letzte Falter am Tag 17 aus der Puppenhülle. Die Anzahl der zum Boniturzeitpunkt noch lebenden Individuen wird mit 100 % gleichgesetzt.

Wie Abbildung 29 verdeutlicht, benötigten die Tiere, die mit Pollen der transgenen Variante PACTOL CB (Bt+) gefüttert worden waren signifikant mehr Zeit bis zur Verpuppung, bzw. bis zum Falterschlupf als die Individuen der PACTOL-Variante (Bt-). Die Tiere der PACTOL CB-Variante (Bt+) brauchten mit 7,86 Tagen durchschnittlich fast eineinhalb Tage länger bis zur Verpuppung als die Individuen der nicht-transgenen Variante mit 6,41 Tagen. Ähnlich waren die Verhältnisse hinsichtlich des Falterschlupfs. Hier brauchten die Tiere der PACTOL CB-Variante (Bt+) mit durchschnittlich 14,7 Tagen fast zwei Tage länger für die Entwicklung zur Imago als die Individuen der konventionellen Variante mit 12,8 Tagen.

Diskussion

Für den Vergleich von verzehrter Blattfläche und dabei aufgenommener Pollenmenge zwischen beiden Gruppen wurden die Durchschnittswerte der ersten 4 Bonituren für alle die Larven berechnet, die zum Zeitpunkt der 5. Bonitur noch lebten. Während die Larven der PACTOL-Gruppe (Bt-) durchschnittlich fast 97 % der Blattfläche verzehrt hatten, lag der Wert der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) mit rund 61 % signifikant niedriger. Auch hinsichtlich der dabei aufgenommenen Pollenmenge war der Unterschied signifikant (PACTOL-Gruppe (Bt-): 5,25 und PACTOL CB-Gruppe (Bt+): 4,91 Pollenkörner). Wären die Larven, die im Verlauf der ersten Woche starben mit einbezogen worden, so wäre der Unterschied sicherlich noch weitaus deutlicher ausgefallen. Nach einer Woche waren zwischen beiden Gruppen deutliche Unterschiede in der Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven auszumachen. Während sich bei den Tieren, die mit Pollen der Maissorte PACTOL (Bt-) gefüttert worden waren zu diesem Zeitpunkt schon fast ein Drittel der Larven zu Vorpuppen umgewandelt hatten, konnte in der PACTOL CB-Gruppe keine einzige Vorpuppe festgestellt werden.

Die Ergebnisse zu Larven- und Puppengewichten waren uneinheitlich. Eine Woche nach Biotest-Beginn lag das Durchschnittsgewicht in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bei $6,34 \pm 0,19$ mg, in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) dagegen bei $5,18 \pm 0,41$ mg. Umgekehrt war allerdings das Verhältnis beim Puppengewicht. In der PACTOL-Gruppe (Bt-) betrug der Durchschnittswert $5,35 \pm 0,21$ mg. In der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) lag er mit $6,53 \pm 0,77$ mg deutlich höher. Hierbei muss allerdings angemerkt werden, dass sich in der BT-Pollen-Gruppe nur 7 Individuen verpuppen konnten (PACTOL-Gruppe: 30). Nach den deutlichen Differenzen bezüglich der Mortalitätsraten zwischen beiden Gruppen ist dieses Ergebnis nicht plausibel zu erklären. Anscheinend handelte es sich bei den wenigen überlebenden Individuen um recht *B. t.*-unempfindliche Larven. Allerdings ist es recht unwahrscheinlich, dass sich eine Resistenz gegenüber dem Cry1Ab-Toxin ausbilden konnte, da Larven aus den Pollenversuchen generell nicht mehr für die Zucht verwendet wurden. Zu berücksichtigen ist

auch, dass die Puppen nicht alle zum exakt gleichen Entwicklungszeitraum gewogen wurden und die Gewichte von jungen und alten Puppen sicherlich voneinander abweichen.

Die viermalige Verfütterung einer geringen Menge Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) verlangsamte die Entwicklung der getesteten Kohlmottenlarven im Vergleich zur konventionellen Variante signifikant. Verpuppung und Falterschlupf setzten in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) nicht nur später ein als in der nicht-transgenen Variante, auch durchschnittlich benötigten die Individuen der BT-Variante bis zum Erreichen des Puppen- bzw. Imaginalstadiums deutlich mehr Zeit als die Tiere der konventionellen Variante. Bei der viermal wiederholten Verfütterung von Maispollen waren die Unterschiede zwischen den beiden Varianten sogar noch größer, als bei einer einzelnen Pollenapplikation.

Ganz eindeutig sind die Unterschiede zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der Mortalitätsrate. Nach einer Woche (5. Bonitur) waren in der PACTOL-Gruppe (Bt-) erst rund 3 % der Tiere gestorben, während in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) nur noch rund 31 % am Leben waren. In beiden Varianten nahm die Sterblichkeit bis Versuchsende weiter zu. Während sich in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) nur 17 % der Tiere bis zum Falter entwickeln konnten, waren es in der Vergleichsvariante jedoch mehr als 74 %.

2.1.9. Langzeituntersuchungen mit *Inachis io*-Raupen (L1 und L2) zu Auswirkungen geringer Pollenmengen

Material & Methoden

Pro Biotest wurden insgesamt 300 Larven (10 mal jeweils 10 Individuen/Variante) verwendet. Es handelte sich entweder um neonate Raupen, oder um Tiere, die sich erstmals gehäutet hatten. Jeder Biotest bestand aus 3 Varianten: unbehandelte Kontrolle, Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (100 Pollenkörner pro Blattstück, d. h. durchschnittlich 10 Pollenkörner pro Larve), sowie Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (100 Pollenkörner pro Blattstück, d. h. durchschnittlich 10 Pollenkörner pro Larve).

Die Pollensuspension wurde auf die Mittelrippe eines mittelgroßen Blattes einer jungen, frischen Brennnesselpflanze aufgetragen. Nach dem Trocknen der Pollenlösung wurde das Blatt abgeschnitten und in eine, mit 3 ml 2%igem Agar gefüllte Petrischale (Durchmesser: 3 cm), gelegt. Anschließend konnten die Raupen unter Verwendung eines feinen Pinsels auf das Blättchen übertragen werden. Um ein Entweichen der Tiere zu verhindern, wurde ein Stück Handtuchpapier (SCOTT HOSTESS Natura, Fa. Kimberly-Clark) unter den Deckel der Petrischale geklemmt. Sobald das mit Pollen versehene erste Blättchen komplett verzehrt und damit auch der anhaftende Pollen gefressen war, wurden die Tiere mit unbehandelten Brennnesselblättern nachgefüttert. Larven der Kontrollgruppe erhielten von Beginn an unbehandeltes Futter. Eine Woche nach Versuchsbeginn wurden alle bis dahin noch lebenden Individuen einzeln gewogen und anschließend in Plastikzylinder mit einer Höhe von 20 cm und einem Durchmesser von 14 cm überführt. Die Tiere wurden nach Bedarf mit frischen Brennnesselblättern nachgefüttert, die in einem mit Wasser gefüllten 50 ml Erlenmeyerkolben

standen. Im weiteren Biotest-Verlauf wurden Verpuppungs- und Schlupfzeitpunkt jedes einzelnen Tieres erfasst. Die Tiere verblieben für die gesamte Biotest-Dauer in einem Klimaschrank mit Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h hell/ 8 h dunkel). Während der „Nacht“ sank die Temperatur auf 15°C, während sie am „Tag“ auf 25°C stieg. Um Unterschiede bezüglich Gewichtszunahme und Mortalitätsrate von *Inachis io*-Raupen (L₁ und L₂) der 3 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Student-Newman-Keuls-, Tukey- und Waller-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01). Um die durchschnittlichen Entwicklungszeiten der 3 Gruppen bis zur Verpuppung bzw. bis zum Falterschlupf vergleichen zu können wurde ein PROC t-test nach COCHRAN, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

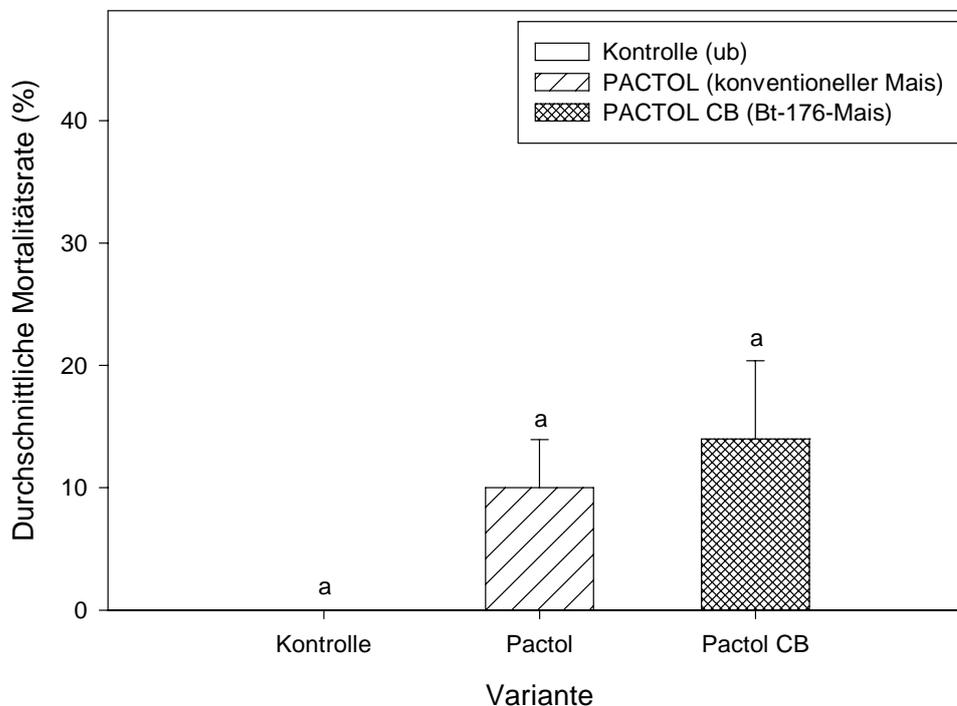


Abbildung 30 zeigt die durchschnittliche Mortalitätsrate in der Bt-Maispollen-Variante mit 14 % am höchsten. Die festgestellten Unterschiede erwiesen sich allerdings als statistisch nicht absicherbar. Zwischen den einzelnen Varianten bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($F(2, 32) = 2,32; p = 0,1072$; Tukey-Test).

Wie Abbildung 30 zeigt, ist die Mortalitätsrate in der Bt-Maispollen-Variante mit 14 % am höchsten. Die festgestellten Unterschiede erwiesen sich allerdings als statistisch nicht absicherbar.

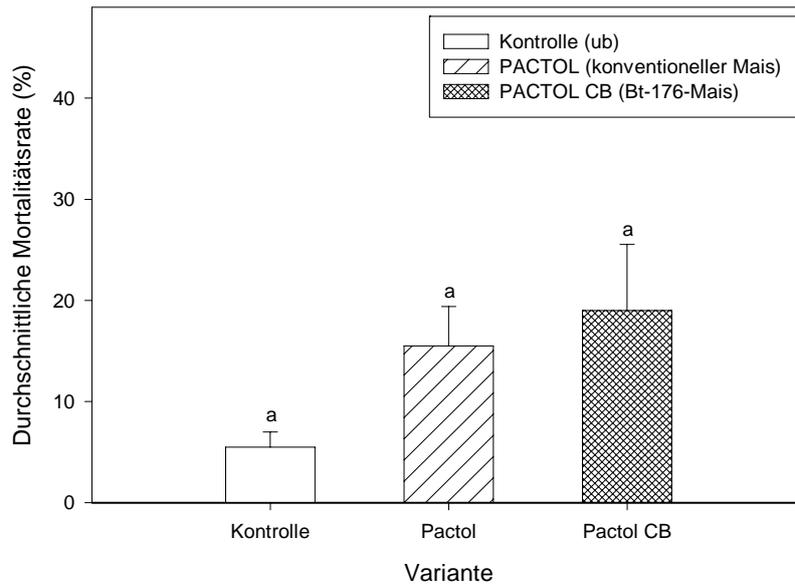


Abbildung 31: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_1) **nach zwei Wochen**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Zwischen den einzelnen Varianten bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($F(2 \text{ FG}) = 2,15$; $p = 0,1258$; Tukey-Test).

Auch 2 Wochen nach Biotestbeginn besteht hinsichtlich der Mortalitätsrate zwischen den drei Varianten kein signifikanter Unterschied. Allerdings ist die Sterblichkeit nach wie vor in der Bt-Pollen-Gruppe am höchsten.

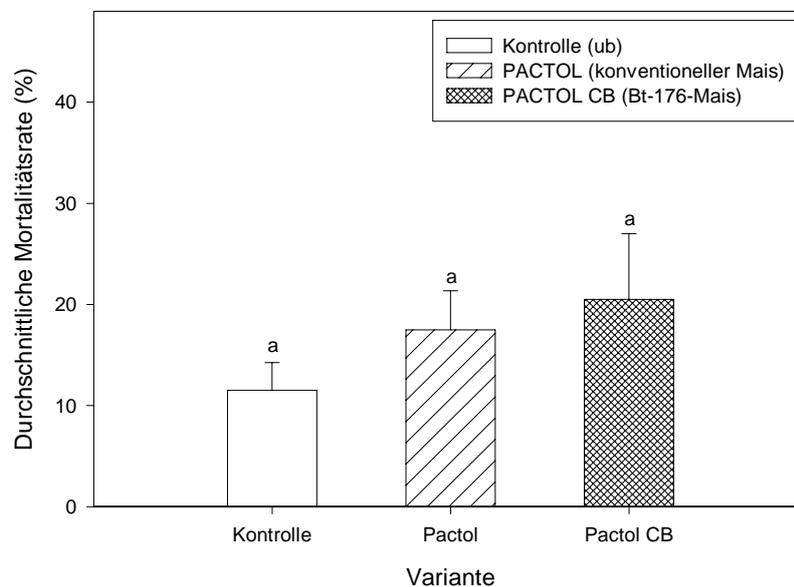


Abbildung 32: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_1) **nach drei Wochen**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Zwischen den einzelnen Varianten bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($F(2 \text{ FG}) = 1,21$; $p = 0,3061$; Tukey-Test).

Auch 3 Wochen nach Biotestbeginn ist die Sterblichkeit in der Bt-Pollen-Gruppe nach wie vor am höchsten. Die Unterschiede zwischen den Gruppen erwiesen sich allerdings als statistisch nicht signifikant.

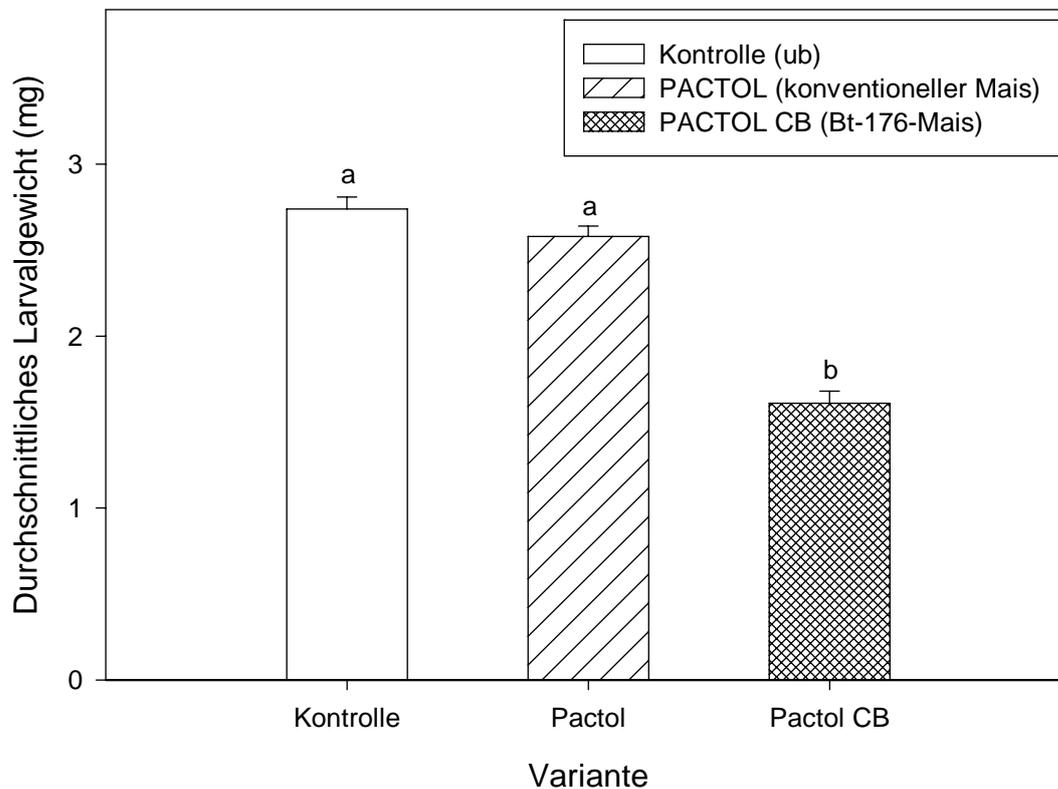


Abbildung 33: Durchschnittliches Larvalgewicht ($\text{mg} \pm \text{SF}$) von *Inachis io*-Raupen (L_1) **nach einer Woche**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 94,62$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Wie Abbildung 33 verdeutlicht betrug das Durchschnittsgewicht der Larven, die mit Pollen der transgenen Maislinie Bt-176 gefüttert wurden, nach einer Woche lediglich 1,61 mg und lag somit statistisch signifikant unter den Werten der anderen beiden Varianten.

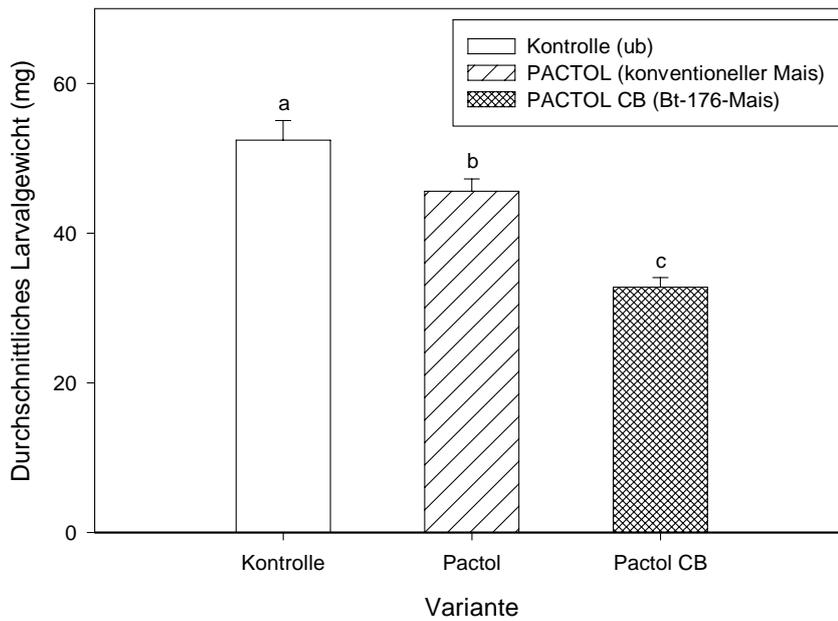


Abbildung 34: Durchschnittliches Larvalgewicht (mg \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_1) **nach zwei Wochen**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 24,23$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Zwei Wochen nach Biotest-Beginn weist die Kontrollgruppe das höchste und die Pactol CB-Gruppe (Bt+) das geringste Durchschnittsgewicht auf. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten erwiesen sich als statistisch signifikant.

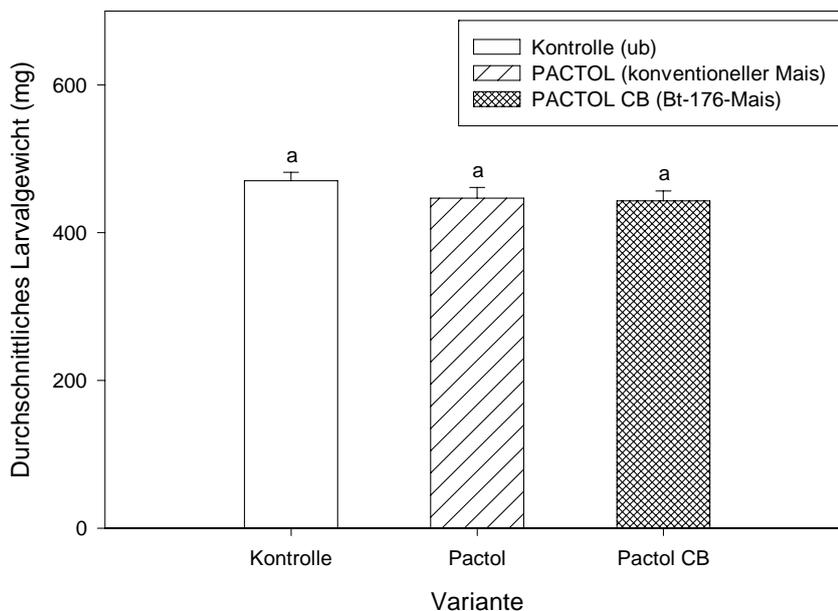


Abbildung 35: Durchschnittliches Larvalgewicht (mg \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_1) **nach drei Wochen**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Zwischen den einzelnen Varianten bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($F(2 \text{ FG}) = 1,33$; $p = 0,2658$; Tukey-Test).

Drei Wochen nach Versuchsbeginn haben sich die Durchschnittsgewichte der überlebenden Larven weitgehend angenähert, so dass zwischen den 3 Varianten keine statistisch absicherbaren Unterschiede mehr feststellbar sind.

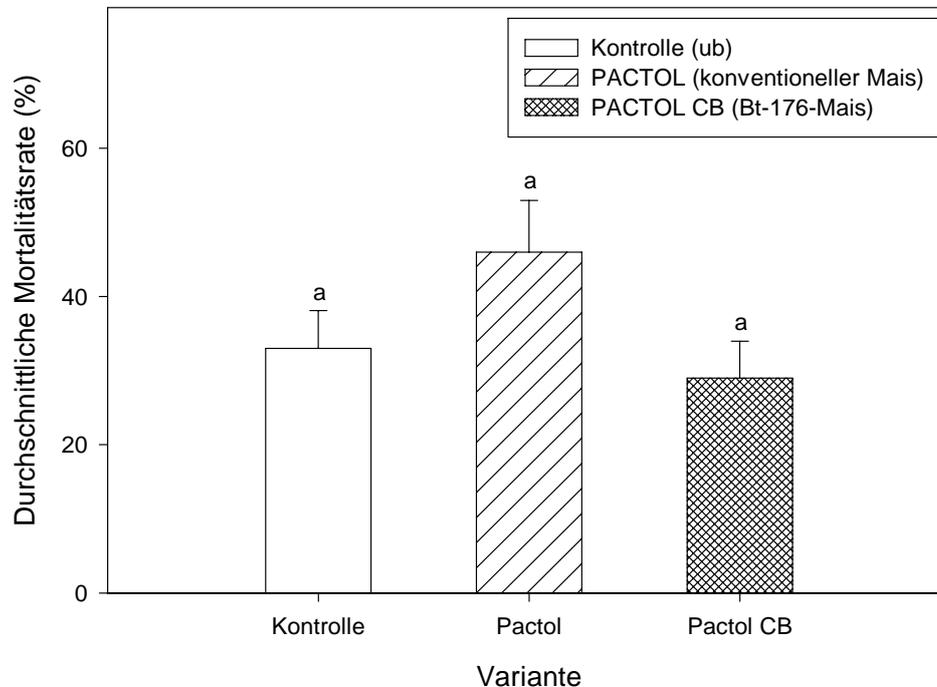


Abbildung 36: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) zu Versuchsende, bezogen auf die pro Larve (*Inachis io* - erstes Larvalstadium) applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Zwischen den einzelnen Varianten bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($F(2 \text{ FG}) = 2,08$; $p = 0,1450$; Tukey-Test).

Am Ende des Versuchs, nachdem der letzte Falter geschlüpft war, lag die Mortalitätsrate in der PACTOL-Gruppe (Bt-) bei 46 % und war somit deutlich höher als in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) (29 %). Die Unterschiede zwischen den Varianten erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

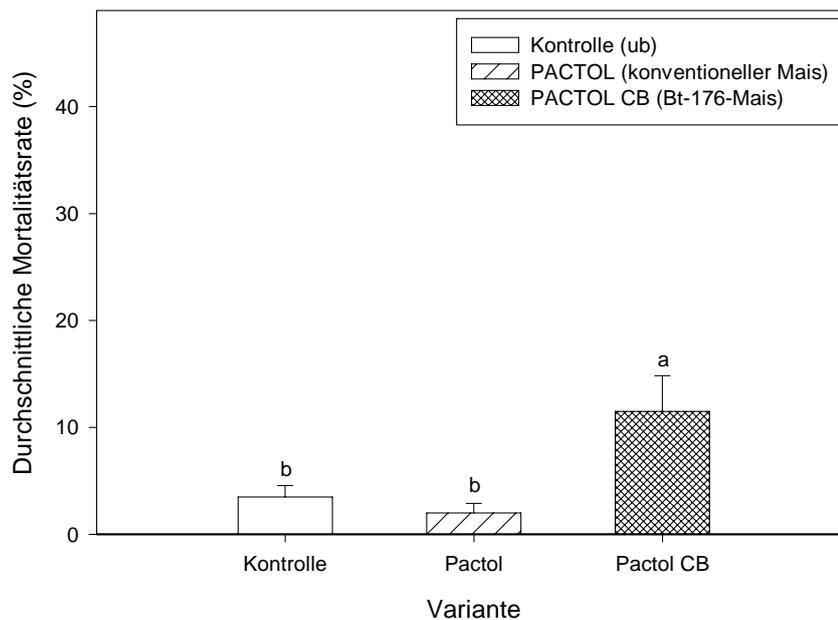


Abbildung 37: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_2) **nach einer Woche**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 5,53$; $p < 0,0064$; Tukey-Test).

Eine Woche nach Biotestbeginn war die Sterblichkeit in der Bt-Pollen-Gruppe mit 11,5 % wesentlich höher als in den anderen beiden Varianten. Der Unterschied stellte sich als statistisch signifikant heraus.

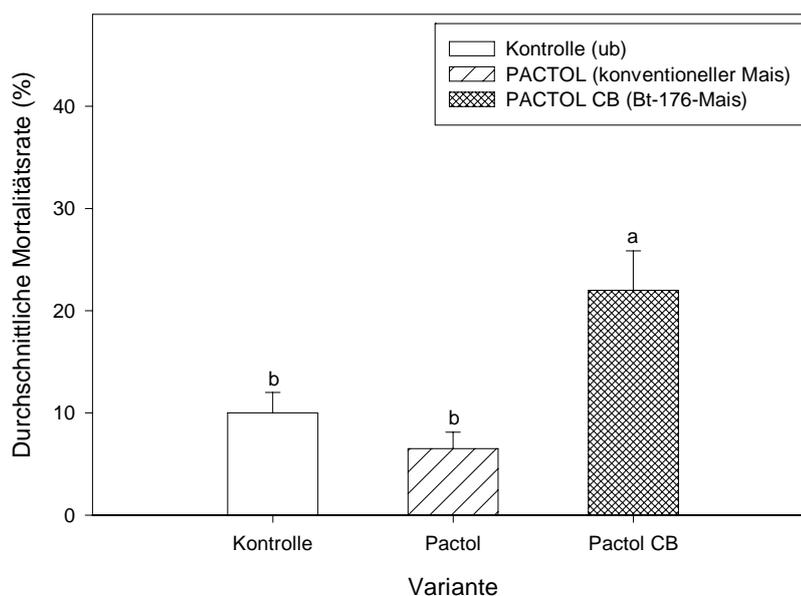


Abbildung 38: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) von *Inachis io*-Raupen (L_2) **nach zwei Wochen**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 8,66$; $p < 0,0005$; Tukey-Test).

Zwei Wochen nach Beginn des Versuchs lag die Sterblichkeit der Larven, die mit Pollen von transgenem Bt-Mais gefüttert worden waren, signifikant höher als die Mortalitätsraten in den beiden anderen Varianten.

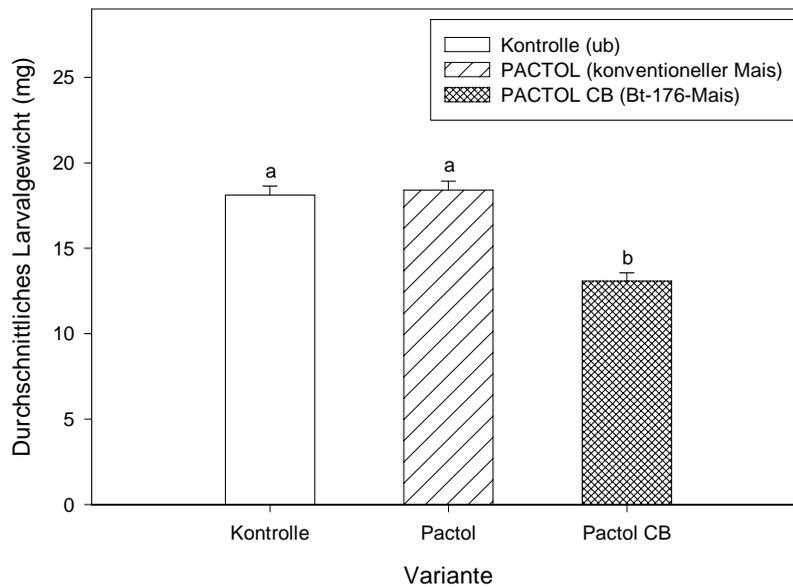


Abbildung 39: Durchschnittliches Larvalgewicht ($\text{mg} \pm \text{SF}$) von *Inachis io*-Raupen (L_2) **nach einer Woche**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 32,53$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Wie Abbildung 39 zeigt, liegt das Durchschnittsgewicht in der Bt-Pollen-Variante eine Woche nach Biotestbeginn signifikant unter dem der anderen beiden Gruppen.

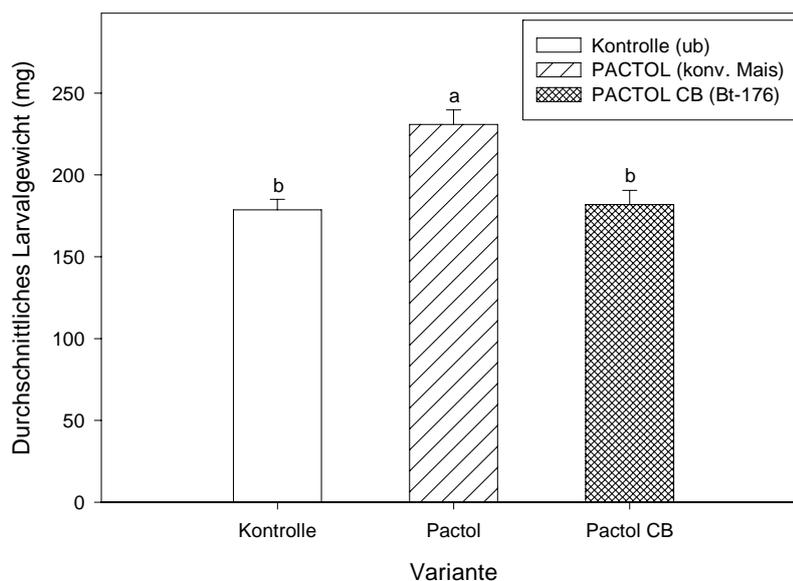


Abbildung 40: Durchschnittliches Larvalgewicht ($\text{mg} \pm \text{SF}$) von *Inachis io*-Raupen (L_2) **nach zwei Wochen**, bezogen auf die pro Larve applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 13,57$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Zwei Wochen nach Versuchsbeginn lag das Durchschnittsgewicht in der PACTOL-Variante (Bt-) deutlich höher als in den anderen beiden Gruppen. Demgegenüber erwies sich der geringe Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrolle und der PACTOL CB-Variante (Bt+) als statistisch nicht signifikant.

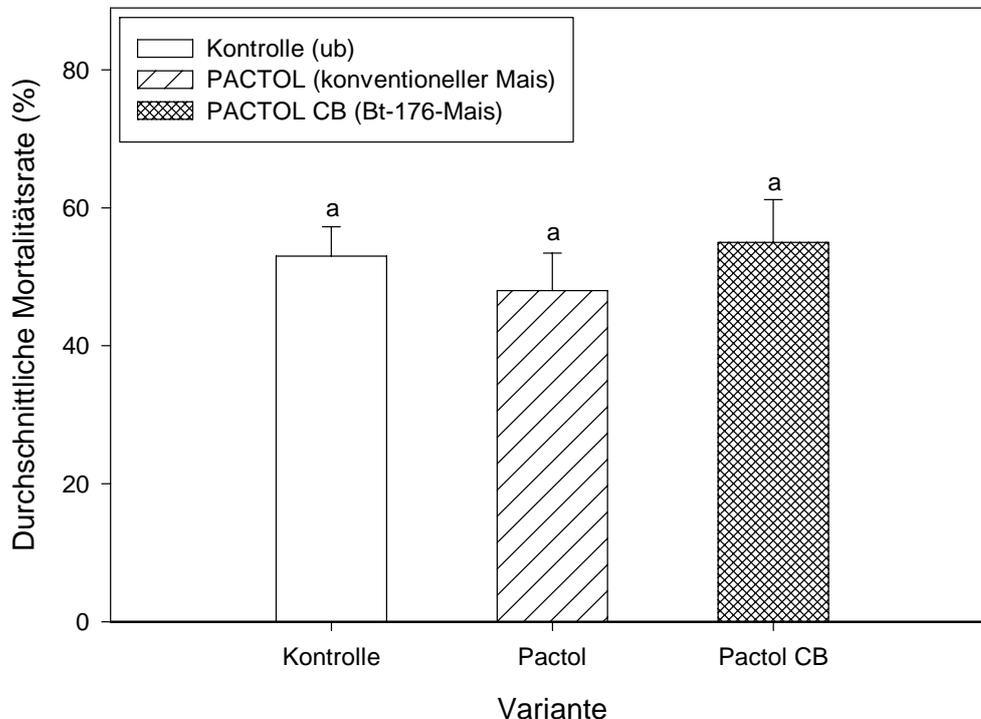
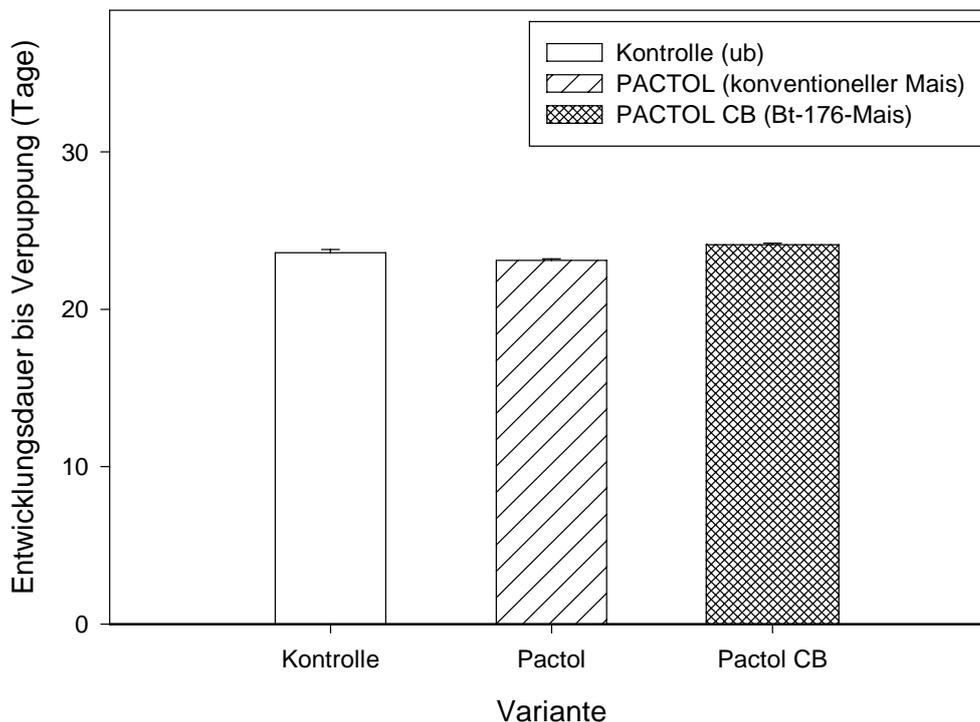


Abbildung 41: Durchschnittliche Mortalitätsrate (% \pm SF) zu Versuchsende, bezogen auf die pro Individuum (*Inachis io*-zweites Larvalstadium) applizierte Menge von 10 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Zwischen den einzelnen Varianten bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede ($F(2 \text{ FG}) = 0,42$; $p = 0,6586$; Tukey-Test).

Am Versuchsende lag die Mortalitätsrate in der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) mit 55 % nur unwesentlich höher als in den beiden übrigen Varianten. Die geringen Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Neben Sterblichkeit und Gewichtszunahme wurde in den Untersuchungen zu subletalen Effekten auch die Dauer der Entwicklung von der Larve zum Falter ermittelt. Hierzu wurde für jedes Individuum der Zeitpunkt der Verpuppung, sowie des Falterschlupfes festgehalten.



Abbildung

die als neonate Larven mit 10 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Larven der Kontrollgruppe erhielten unbehandeltes Futter.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL (Bt-): Kontrolle (N = 78); PACTOL (N = 71). $t(147 \text{ FG}) = 2,16$; $p = 0,0326$. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL CB (Bt+): Kontrolle (N = 78); PACTOL CB (N = 89). $t(165 \text{ FG}) = 2,48$; $p = 0,0140$. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten PACTOL (Bt-) und PACTOL CB (Bt+): PACTOL (N = 71); PACTOL CB (N = 89). $t(158 \text{ FG}) = 5,70$; $p < 0,0001$. Log Transformation; pooled; equal variances.

Die Unterschiede in den Entwicklungszeiten bis zur Verpuppung waren zwischen den 3 Varianten gering. Lediglich zwischen der PACTOL (Bt-) und der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt. Mit 24,1 Tagen benötigten die Tiere der PACTOL CB-Gruppe durchschnittlich einen Tag mehr bis zur Verpuppung als die Angehörigen der PACTOL-Variante (23,1 Tage). Die unbehandelte Kontrollgruppe lag mit durchschnittlich 23,6 Tagen zeitlich genau zwischen den anderen beiden Varianten.

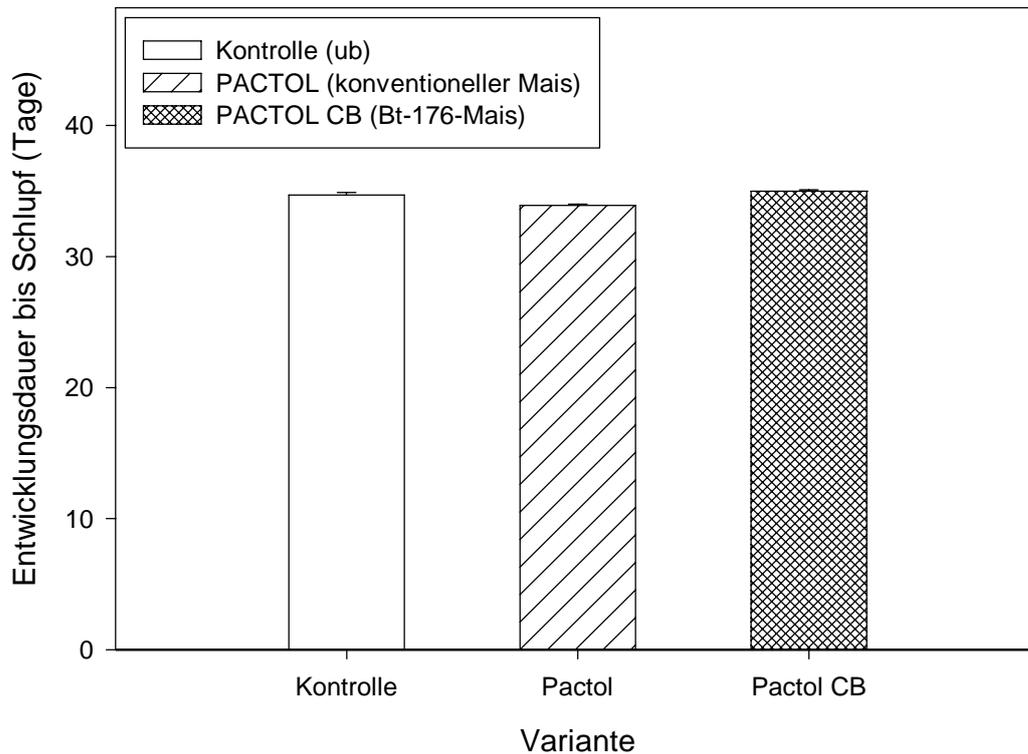


Abbildung 43: Durchschnittliche Zeit bis zum Falterschlupf (in Tagen \pm SF) für *Inachis io*-Raupen, die als neonate Larven mit 10 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Larven der Kontrollgruppe erhielten unbehandeltes Futter.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL (Bt-): Kontrolle (N = 67); PACTOL (N = 54). t (119 FG) = 3,33; p = 0,0012. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL CB (Bt+): Kontrolle (N = 67); PACTOL CB (N = 71). t (136 FG) = 1,40; p = 0,1628. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten PACTOL (Bt-) und PACTOL CB (Bt+): PACTOL (N = 54); PACTOL CB (N = 71). t (129 FG) = 5,70; p < 0,0001. Log Transformation; pooled; equal variances.

Hinsichtlich der Entwicklungszeiten bis zum Schlupf wurde zwischen der PACTOL (Bt-) und der PACTOL CB-Gruppe (Bt+) ein signifikanter Unterschied festgestellt. Die Falter der PACTOL-Gruppe (Bt-) schlüpften nach durchschnittlich 33,9 – die Falter der PACTOL CB-Variante dagegen erst nach 35 Tagen. Die Entwicklungsdauer für Falter der unbehandelten Kontrollgruppe lag bei durchschnittlich 34,7 Tagen.

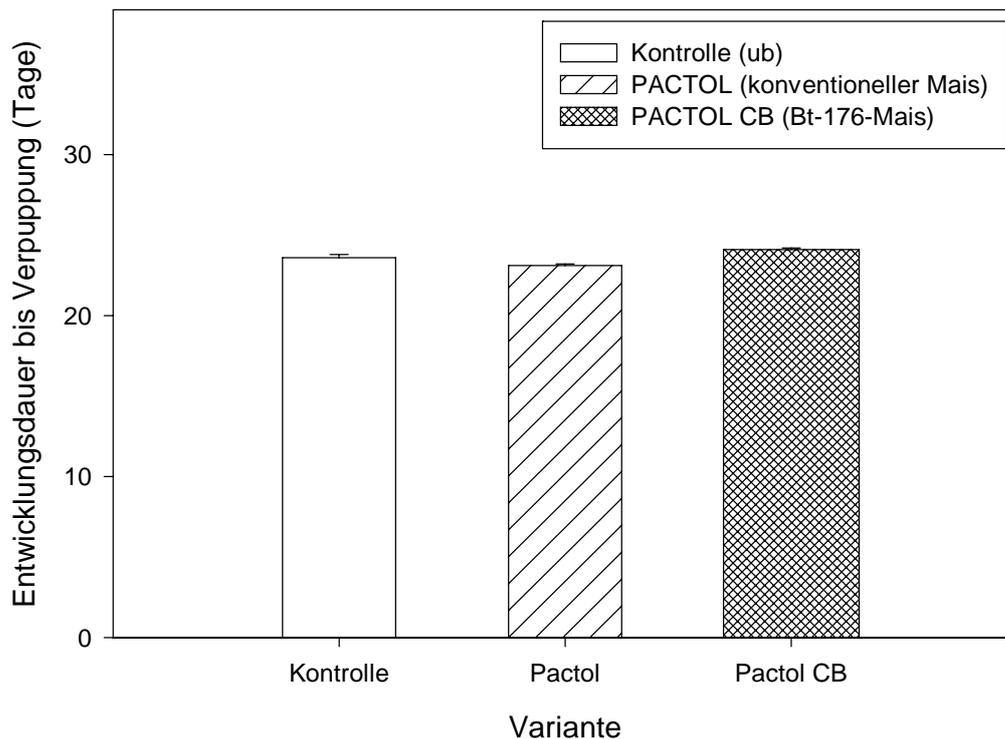


Abbildung 44: Durchschnittliche Zeit bis zur Verpuppung (in Tagen \pm SF) für *Inachis io*-Raupen, die kurz nach der ersten Larvalhäutung mit 10 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Larven der Kontrollgruppe erhielten unbehandeltes Futter.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL (Bt-): Kontrolle (N = 68); PACTOL (N = 85). t (151 FG) = 5,13; $p < 0,0001$. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL CB (Bt+): Kontrolle (N = 68); PACTOL CB (N = 73). t (139 FG) = 3,74; $p = 0,0003$. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten PACTOL (Bt-) und PACTOL CB (Bt+): PACTOL (N = 85); PACTOL CB (N = 73). t (156 FG) = 1,24; $p = 0,2186$. Log Transformation; pooled; equal variances.

Bis zur Verpuppung benötigten die Larven der beiden Pollengruppen fast die selbe Zeitspanne (Pactol: 22,5 Tage; Pactol CB: 22,7 Tage). Der geringe Unterschied erwies sich als statistisch nicht signifikant. Die Raupen der unbehandelten Kontrollgruppe brauchten mit 23,4 Tagen deutlich länger um sich zu verpuppen.

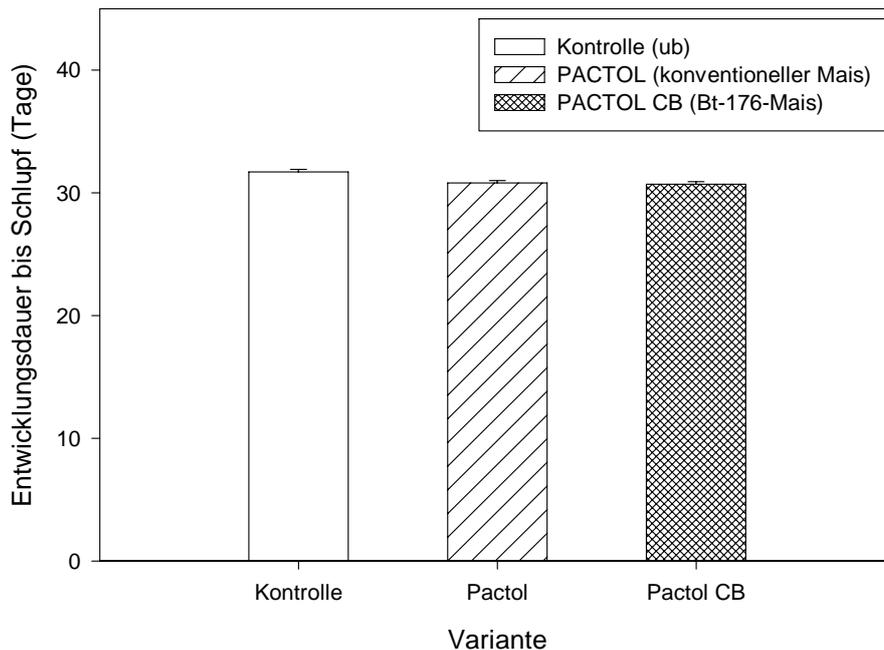


Abbildung 45: Durchschnittliche Zeit bis zum Falterschlupf (in Tagen \pm SF) für *Inachis io*-Raupen, die kurz nach der ersten Larvalhäutung mit 10 Maispollen (PACTOL (Bt-) oder PACTOL CB) gefüttert wurden (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Larven der Kontrollgruppe erhielten unbehandeltes Futter.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL (Bt-): Kontrolle (N = 47); PACTOL (N = 52). t (97 FG) = 3,54; p = 0,0006. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten Kontrolle und PACTOL CB (Bt+): Kontrolle (N = 47); PACTOL CB (N = 45). t (90 FG) = 3,41; p = 0,001. Log Transformation; pooled; equal variances.

T-Test zwischen den Varianten PACTOL (Bt-) und PACTOL CB (Bt+): PACTOL (N = 52); PACTOL CB (N = 45). t (95 FG) = 0,15; p = 0,8833. Log Transformation; pooled; equal variances.

Bis zum Falterschlupf verging in den beiden Pollengruppen fast die selbe Zeitspanne (PACTOL: 30,8 Tage; PACTOL CB: 30,7 Tage). Der geringe Unterschied erwies sich als statistisch nicht signifikant. Die Angehörigen der unbehandelten Kontrollgruppe brauchten mit 31,7 Tagen deutlich länger bis zum Schlupf der Imago aus der Puppenhülle.

Diskussion

Mit den hier geschilderten Biotests sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Verfütterung einer subletalen Bt-Pollendosis auf die Entwicklung von Tagpfauenaugenraupen des ersten und zweiten Larvalstadiums hat. Die in den hier durchgeführten Langzeituntersuchungen gewählte Dosis von 10 Pollenkörnern resultierte aus den Erfahrungen der unter 2.1.5.1. und 2.1.5.2. aufgeführten Biotests zur Ermittlung von LD₅₀-Werten von *Inachis io*-Raupen (L₁ und L₂). Es stellte sich heraus, dass 10 PACTOL CB-

Pollenkörner (Bt+) für beide Larvenstadien eine subletale Dosis darstellen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle fiel die Gewichtszunahme der Bt-Pollengruppe in diesen Versuchen nach einer Woche signifikant niedriger aus. Hinsichtlich der Mortalitätsrate gab es dagegen keinen signifikanten Unterschied.

Bei den Versuchen mit neonaten Larven zeigte sich, dass die Mortalitätsrate der Bt-Pollengruppe an den ersten 3 Boniturterminen über der der anderen beiden Varianten lag. Allerdings war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Über die gesamte Dauer des Biotests wurde in der Bt-Variante sogar die geringste Sterblichkeit festgestellt. Die Larven der Bt-Variante wogen sowohl zum ersten, als auch zum zweiten Boniturtermin wesentlich weniger als die Raupen der beiden anderen Varianten. Nach drei Wochen hatten sich die Durchschnittsgewichte allerdings so weit angenähert, dass keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar waren. Die Tiere der Bt-Gruppe benötigten bis zur Verpuppung durchschnittlich einen Tag mehr als die Angehörigen der PACTOL-Variante (Pollen von konventionellem Mais). Dieser Unterschied erwies sich als signifikant. Im weiteren Verlauf des Biotests ließ sich dieser Entwicklungsvorsprung nicht mehr aufholen. In der PACTOL-Gruppe (Bt-) schlüpfen die Falter nach durchschnittlich 33,9 – die Falter der PACTOL CB-Variante dagegen erst nach 35 Tagen.

In den Versuchen mit Tieren des zweiten Larvalstadiums war die Mortalitätsrate in der Bt-Gruppe sowohl eine, als auch zwei Wochen nach Beginn des Biotests statistisch signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen. Zum Versuchsende lag die Mortalitätsrate in der Bt-Gruppe dagegen nur unwesentlich höher als in den beiden übrigen Varianten. Die geringen Unterschiede erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. Das Durchschnittsgewicht in der Bt-Variante lag eine Woche nach Biotestbeginn signifikant unter dem der anderen beiden Gruppen. Nach zwei Wochen hatte sich das Durchschnittsgewicht der Bt-Gruppe dem der Kontrollgruppe angenähert. Lediglich zu den Larven der PACTOL-Gruppe (Pollen von konventionellem Mais) bestand nach wie vor ein signifikanter Unterschied. Larven, die mit Pollen von transgenem oder konventionellem Mais gefüttert worden waren, entwickelten sich fast gleich schnell. Demgegenüber benötigten die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe signifikant mehr Zeit bis zur Verpuppung, bzw. bis zum Falterschlupf. Unbefriedigend ist generell die hohe Mortalitätsrate in den beiden Kontrollgruppen. Hierfür können entweder eine Krankheit, oder aber unzureichende Haltungsbedingungen, bzw. beides verantwortlich sein. Es erscheint daher wünschenswert, die hier geschilderten Untersuchungen noch einmal zu wiederholen.

Nichtsdestotrotz belegen die Langzeituntersuchungen mit *Inachis io* eindeutig, dass die Aufnahme einer sehr geringen Menge von Maispollen der Linie Bt-176 die Larvalentwicklung zunächst deutlich verlangsamen kann, was sich eine (L_1 und L_2) bzw. zwei Wochen (L_1) nach Beginn des Biotests anhand des signifikant verringerten Durchschnittsgewichts äußerte. Allerdings zeigte sich auch, dass sich die Durchschnittsgewichte der Larven kurz vor der Verpuppung weitgehend angeglichen hatten. Dies spricht dafür, dass Larven, die durch die Aufnahme von Bt-Toxin subletal geschädigt wurden, eine zunächst geringere Gewichtszunahme im Lauf der Entwicklung wieder ausgleichen können. Wie das Beispiel des Versuchs mit neonaten Larven zeigt, können sich

aber selbst bei diesen Raupen negative Langzeiteffekte in Form einer längeren Entwicklungsdauer bemerkbar machen.

Bezogen auf die Situation im Freiland belegen diese Laboruntersuchungen, dass Bt-empfindliche Schmetterlingslarven nicht nur in direkter Nachbarschaft von Bt-176-Maisfeldern geschädigt werden können, sondern dass subletale Effekte, ausgelöst durch sehr geringe Pollenmengen, auch noch in Entfernungen von mehr als 10 Metern auftreten können. Larven, deren Organismus durch die Aufnahme von geringen Bt-Pollendosen gestresst ist, erscheinen in höherem Maße durch Prädatoren oder Krankheiten gefährdet zu sein.

2.1.10. Biotests mit *Plutella xylostella*-Raupen (L₄) zur Toxizitätsbestimmung von unterschiedlich altem Maispollen der Linie Bt-176

Material & Methoden

Um die Toxizität von älterem Pollen der Linie Bt-176 zu ermitteln, wurden ähnliche no-choice-Versuche durchgeführt wie zur Ermittlung des LD₅₀-Werts für Kohlmottenlarven des vierten Larvalstadiums (s. 2.1.3.). Jeder Biotest bestand aus einer unbehandelten Kontrollvariante und zwei Pollen-Varianten. Zum einen wurde frisch geernteter Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt+) verwendet, zum anderen zwei bzw. drei Wochen alter Pollen derselben Sorte. Dieser Pollen war bis Biotestbeginn unter Gewächshausbedingungen in nicht abgedeckten Kunststoffdosen gelagert worden. Die Temperatur lag zwischen 20 und 30°C, die Luftfeuchtigkeit bewegte sich zwischen 70 und 80 %.

Die Biotests mit zwei Wochen altem Pollen wurden viermal, die Versuche mit drei Wochen altem Pollen fünfmal wiederholt. Pro Wiederholung und Variante wurden 10 Larven verwendet. Unter Binokularkontrolle wurden den Larven jeweils genau 15 Pollenkörner appliziert. Bei der statistischen Auswertung wurden die Versuche mit unterschiedlich altem Pollen getrennt betrachtet. Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Nahrungsaufnahme von *Plutella xylostella*-Raupen (L₄) in den 3 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Tukey- bzw. Student-Newman-Keuls-Test zum Vergleich der Mittelwerte verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

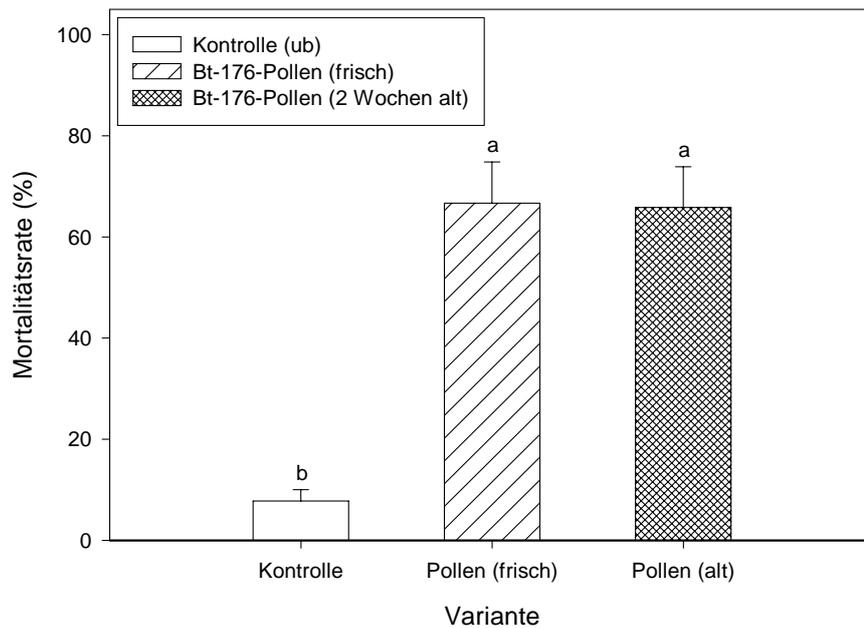


Abbildung 46: Durchschnittliche Mortalitätsrate nach einer Woche ($\% \pm SF$) für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die entweder mit frischem, oder 2 Wochen altem Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB gefüttert worden waren. In beiden Fällen wurden genau 15 Pollenkörner appliziert. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 13,38$; $p = 0,0020$; Tukey-Test).

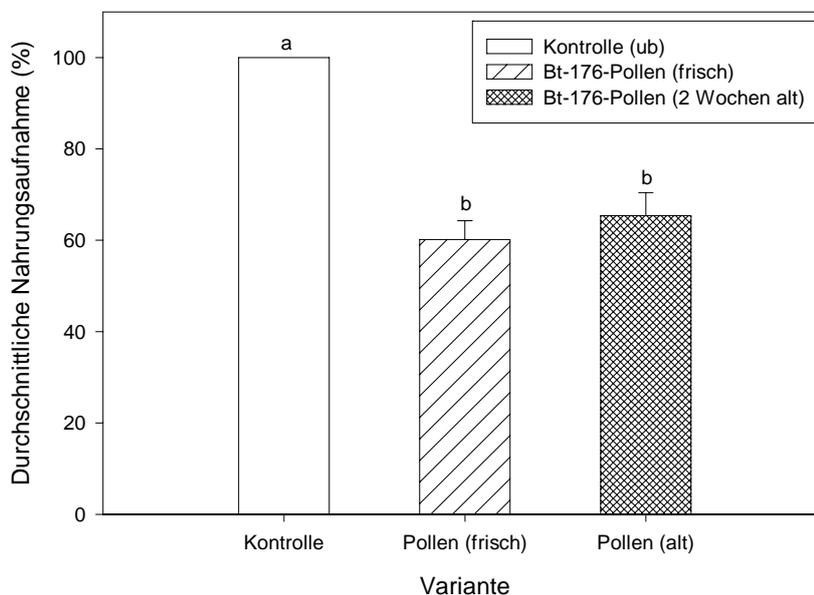


Abbildung 47: Durchschnittliche Nahrungsaufnahme nach 24 Stunden ($\% \pm SF$) für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die entweder mit frischem, oder 2 Wochen altem Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB gefüttert worden waren. In beiden Fällen wurden genau 15 Pollenkörner appliziert. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 33,89$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Die Mortalitätsrate der Larven, die mit unbehandeltem Futter versorgt wurden, lag mit knapp 8 % signifikant niedriger als in den beiden anderen Varianten. Der geringe Unterschied von rund einem Prozent zwischen frischem und 2 Wochen altem Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt+) erwies sich dagegen als statistisch nicht signifikant.

24 Stunden nach Versuchsbeginn hatte die unbehandelte Kontrollgruppe eine signifikant größere Fläche der ersten Kohlblattscheibe gefressen, als die Larven der beiden Pollenvarianten. Raupen, denen 2 Wochen alter Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt+) auf das Futter appliziert worden war, konsumierten mit rund 65 % gut 5 % mehr Blattfläche als die Tiere, die frischen PACTOL CB-Pollen (Bt+) erhalten hatten. Dieser geringe Unterschied erwies sich allerdings als statistisch nicht signifikant.

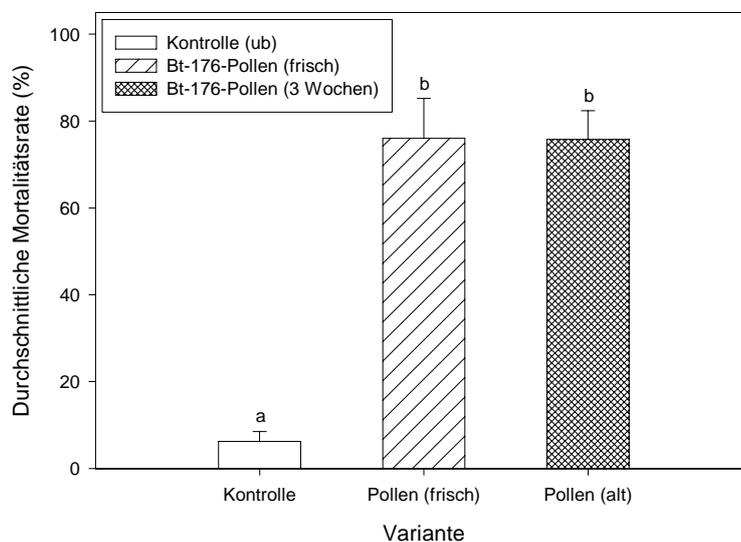


Abbildung 48: Durchschnittliche Mortalitätsrate nach einer Woche (% \pm SF) für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die entweder mit frischem, oder 3 Wochen altem Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB gefüttert worden waren. In beiden Fällen wurden genau 15 Pollenkörner appliziert. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 15,08$; $p = 0,0005$; Tukey-Test).

Die Mortalitätsrate in der unbehandelten Kontrollgruppe war mit rund 6 % signifikant niedriger als in den beiden anderen Varianten. Dagegen wiesen Larven, die mit frischem bzw. 3 Wochen altem Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt+) gefüttert worden waren, eine Woche nach Versuchsbeginn eine fast identische Sterblichkeitsrate auf.

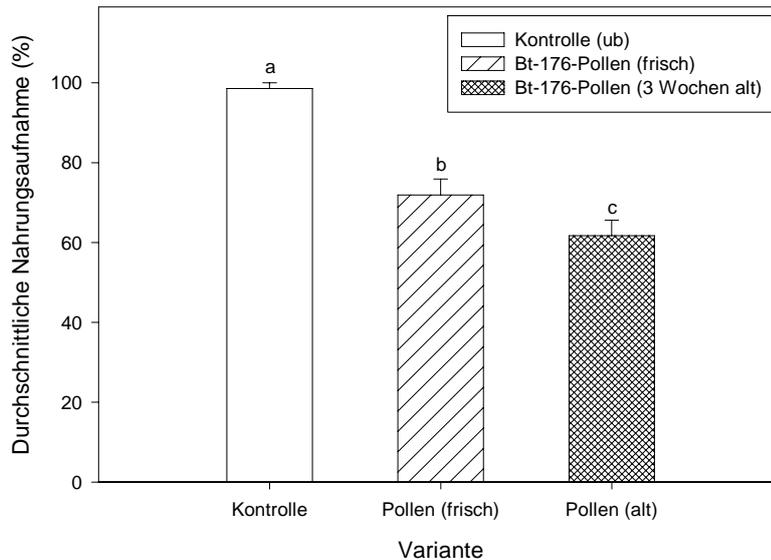


Abbildung 49: Durchschnittliche Nahrungsaufnahme nach 24 Stunden ($\% \pm \text{SF}$) für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die entweder mit frischem, oder 3 Wochen altem Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) gefüttert worden waren. In beiden Fällen wurden genau 15 Pollenkörner appliziert. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 33,36$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test).

24 Stunden nach Versuchsbeginn hatte die unbehandelte Kontrollgruppe eine signifikant größere Fläche der ersten Kohlblattscheibe gefressen, als die Larven der beiden Pollenvarianten. Raupen, denen 3 Wochen alter Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt+) auf das Futter appliziert worden war, konsumierten mit rund 62 % sogar noch weniger Blattfläche als die Tiere, die frischen PACTOL CB-Pollen (Bt+) erhalten hatten. Dieser Unterschied von ca. 10 % erwies sich als statistisch signifikant.

Diskussion

Insbesondere bei ausbleibenden Niederschlägen dürfte es unter Freilandverhältnissen häufig vorkommen, dass Maispollen zumindest für einige Tage auf Pflanzen in der Nähe von Maisfeldern liegen bleibt. Eine Akkumulation des Pollens kann vor allem in Blattachsen beobachtet werden. Mit der hier durchgeführten Untersuchung sollte geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß die Toxizität von Maispollen der Linie Bt-176 im Verlauf der Zeit abnimmt. Wie die hier durchgeführten Untersuchungen belegen, kann Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) unter bestimmten Bedingungen über einen Zeitraum von mindestens 3 Wochen seine toxische Wirkung auf Kohlmottenlarven beibehalten. In dem hier durchgeführten Experiment war der Pollen unter Gewächshaus-Bedingungen gelagert worden. Die Temperatur lag zwischen 20°C und 30°C , die Luftfeuchtigkeit bewegte sich zwischen 70 und 80%. Wie die Abbildungen 49 und 51 zeigen, waren die beobachteten geringen Unterschiede hinsichtlich der Mortalität zwischen den Varianten Pollen (frisch) und Pollen (alt) nicht signifikant. Beim Vergleich von frischem und 2 Wochen altem PACTOL CB-Pollen (Bt+) trat auch bezüglich der Nahrungsaufnahme kein signifikanter Unterschied

auf. Dagegen konsumierten Raupen, die mit 3 Wochen altem Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt+) gefüttert worden waren, signifikant weniger Blattfläche als die Tiere, die frischen PACTOL CB-Pollen (Bt+) erhalten hatten. Dies spricht dafür, dass das Cry1Ab-Toxin unter den im Gewächshaus herrschenden Bedingungen nicht abgebaut wurde. Im Freiland könnten die hier simulierten Bedingungen der Pollenlagerung (geringe Schwankungen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit, keine direkte Sonnen-Einstrahlung) beispielsweise für Pollen gelten der sich in Blattachsen gesammelt hat.

Ob es unter anderen Bedingungen eher zu einer Denaturierung des Toxins kommen kann müsste noch untersucht werden. Hierzu sollte der Pollen vor der Verwendung im Biotest stärkeren Temperatur- und Luftfeuchtigkeits-Schwankungen, sowie einer UV-Strahlung ausgesetzt werden. Auch müsste noch genauer auf den Zeitfaktor eingegangen und überprüft werden, ab welchem Zeitpunkt der Pollen an Toxizität verliert. Nach den hier erzielten Resultaten muss aber davon ausgegangen werden, dass der Pollen der transgenen Maislinie Bt-176 innerhalb einer unter Freilandverhältnissen realistischen Verweildauer auf Raupen-Futterpflanzen kaum etwas von seiner Toxizität einbüßen dürfte.

2.2. Wahlversuche mit Maispollen der Linie Bt-176

2.2.1. Wahlversuche zum Fraßverhalten von *Plutella xylostella*-Raupen (L₄)

Material & Methoden

Wahlversuche mit Raupen der Kohlmotte wurden durchgeführt um zu testen, ob Schmetterlingslarven in der Lage sind, den für sie toxischen Pollen von Bt-176-Mais zu erkennen und zu vermeiden. Die Biotests wurden mit Raupen durchgeführt, die sich gerade zum dritten Mal gehäutet hatten und sich also im vierten Larvalstadium befanden. Solche Tiere sind relativ leicht an der verhältnismäßig großen und noch hellen Kopfkapsel zu erkennen. Die verwendeten Larven stammten aus einer am Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt etablierten Laborzucht. Die Versuche fanden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5,5 cm statt, die mit je 10 ml 2 %igem Agar gefüllt wurden. Nachdem die Agarlösung fest geworden war und sich abgekühlt hatte, wurden in jede Petrischale 4 Blattstücke Markstammkohl (Ø: 3 mm) mit der Blattoberseite nach oben platziert. Anschließend wurden auf zwei Blattstücke Maispollen appliziert, während die beiden gegenüberliegenden Blattscheiben als unbehandelte Kontrolle fungierten. Eine zweite Gruppe Larven erhielt 4 unbehandelte Kontrollblätter zu fressen. Jeder Versuch bestand nur aus diesen 2 Varianten, pro Variante wurden 10 Larven verwendet. Bei einem Teil der Versuche wurde Pollen der transgenen Sorte PACTOL CB (Bt+), und bei einem anderen Teil Pollen der isogenen, konventionellen Sorte PACTOL (Bt-) appliziert. Nach 24 Stunden wurde die bis dahin verzehrte Fläche der beiden Blattscheiben durch Schätzen ermittelt. Anschließend wurden alle Larven einer Variante in einen größeren Behälter umgesetzt und dort mit unbehandelten Markstammkohlblättern weiter gefüttert. Der Versuch wurde nach

einer Woche beendet. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Mortalitätsrate ($\% \pm \text{SF}$), sowie die Anzahl der Larven ermittelt, die sich bis dato verpuppt hatten ($\% \pm \text{SF}$).

In den beiden folgenden Tabellen steht jede Zeile für einen anderen Versuch. Die einzelnen Versuche sind schwer miteinander zu vergleichen, da die Pollenmenge (PK) nur geschätzt wurde. Aus diesem Grund wurde auch kein statistischer Vergleich der Mittelwerte der 3 Varianten (ub/ub; PACTOL/ub; PACTOL CB/ub) durchgeführt. Ein Vergleich ist nur zwischen den beiden Varianten eines Versuchs möglich. Die Applikation unterschiedlicher Pollenmengen wurde gewählt, um einen möglichen dosisabhängigen Effekt aufzudecken. Um einen Vergleich zwischen Pollen- und Kontrollvariante vereinheitlichen zu können, wurde die Position jedes einzelnen Blattes festgehalten (Pollen: 1 und 3; ub: 2 und 4).

Ergebnisse

Tabelle 3: Wahlversuche mit *Plutella xylostella*-Raupen (L₄). Jede Zeile stellt einen Versuch mit 20 Larven dar. 10 Tiere erhielten 2 Kohlblattscheiben, auf die Pollen der konventionellen Maissorte Pactol appliziert war (1/3), sowie 2 unbehandelte Kontrollblätter (2/4). 10 weitere Larven erhielten 4 unbehandelte Kontrollblätter (1-4). Verglichen werden der durchschnittliche Blattscheibenfrass nach 24 Stunden (% ± SF), sowie Mortalitätsrate (%) und Verpuppungsrate (%) nach einer Woche. PK: Anzahl der pro Blattscheibe applizierten Pollenkörner.

PK	Blattscheibenfrass (% ± SF)						Mortalitätsrate (%)		Verpuppungsrate (%)	
	PACTOL (1/3)	ub (2/4)	Mittelwert	ub (1/3)	ub (2/4)	Mittelwert	PACTOL/ub	ub	PACTOL/ub	ub
ca. 20	63,00 ± 9,00	62,25 ± 9,34	62,62 ± 6,49	61,25 ± 8,12	60,00 ± 9,16	60,63 ± 6,12	30	70	40	30
ca. 20	49,50 ± 9,23	47,00 ± 7,85	48,25 ± 6,06	35,50 ± 7,89	50,00 ± 7,97	42,75 ± 5,72	0	0	50	40
ca. 20	90,50 ± 4,72	96,50 ± 2,48	93,50 ± 2,71	75,00 ± 7,12	80,00 ± 6,48	77,50 ± 4,83	0	10	100	70
ca. 100	78,50 ± 6,79	76,25 ± 8,42	77,38 ± 5,41	66,25 ± 8,31	67,75 ± 7,77	67,00 ± 5,69	0	0	100	90
ca. 100	99,50 ± 0,49	100,00 ± 0,00	99,75 ± 0,25	93,00 ± 4,75	92,50 ± 5,04	92,75 ± 3,46	0	10	100	90
ca. 100	59,72 ± 9,92	68,61 ± 8,78	64,17 ± 6,67	61,67 ± 10,54	63,33 ± 9,96	62,50 ± 7,25	22,22	33,33	33,33	44,44
ca. 100	51,94 ± 9,93	52,22 ± 9,85	52,08 ± 7,00	47,50 ± 9,31	49,17 ± 10,44	48,33 ± 7,00	44,44	44,44	22,22	33,33
ca. 100	75,00 ± 7,66	72,50 ± 8,20	73,75 ± 5,61	54,72 ± 7,35	57,50 ± 7,03	56,11 ± 5,09	30	22,22	40	22,22
ca. 100	54,17 ± 9,51	36,94 ± 9,72	45,56 ± 6,95	42,25 ± 8,99	41,50 ± 9,43	41,88 ± 6,52	0	20	66,67	80
ca. 100	85,00 ± 7,23	65,50 ± 9,33	75,25 ± 6,10	78,50 ± 8,84	80,75 ± 7,99	79,63 ± 5,96	0	0	90	80

Tabelle 4: Wahlversuche mit *Plutella xylostella*-Raupen (L₄). Jede Zeile stellt einen Versuch mit jeweils 20 Larven dar. 10 Tiere erhielten 2 Kohlblattscheiben, auf die Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB appliziert war (1/3), sowie 2 unbehandelte Kontrollblätter (2/4). 10 weitere Larven erhielten 4 unbehandelte Kontrollblätter (1-4). Verglichen werden der durchschnittliche Blattscheibenfrass nach 24 Stunden (% ± SF), sowie Mortalitätsrate (%) und Verpuppungsrate (%) nach einer Woche. PK: Anzahl der pro Blattscheibe applizierten Pollenkörner.

PK	Blattscheibenfrass (% ± SF)						Mortalitätsrate (%)		Verpuppungsrate (%)	
	Pactol CB (1/3)	ub (2/4)	Mittelwert	ub (1/3)	ub (2/4)	Mittelwert	Pactol CB/ub	ub	Pactol CB/ub	ub
ca. 20-50	20,50 ± 6,28	20,25 ± 7,63	20,38 ± 4,94	90,25 ± 6,36	85,50 ± 7,30	87,88 ± 4,86	20	0	100	100
ca. 20-50	17,50 ± 5,93	33,75 ± 8,57	25,63 ± 5,37	54,00 ± 9,50	47,00 ± 9,52	50,50 ± 6,74	0	20	80	87,5
ca. 20-50	25,50 ± 5,57	30,75 ± 9,13	28,13 ± 5,36	96,00 ± 3,42	93,75 ± 4,68	94,88 ± 2,90	40	10	33,33	77,78
ca. 20-50	5,50 ± 2,40	37,50 ± 9,71	21,50 ± 5,60	100,00 ± 0,00	95,00 ± 4,87	97,50 ± 2,47	10	10	77,78	100
ca. 20-50	1,39 ± 0,77	7,50 ± 4,47	4,44 ± 2,32	27,25 ± 6,76	26,00 ± 7,62	26,63 ± 5,09	22,22	10	42,86	0
Ca. 100	5,00 ± 2,18	7,00 ± 2,66	6,00 ± 1,72	83,33 ± 7,54	88,33 ± 6,44	85,83 ± 4,97	50	0	50	77,78
ca. 100	8,06 ± 2,39	14,72 ± 6,40	11,39 ± 3,46	48,25 ± 8,32	50,00 ± 9,05	49,13 ± 6,15	11,11	40	12,5	66,67
ca. 100	5,50 ± 1,32	27,00 ± 8,58	16,25 ± 4,66	65,50 ± 8,93	62,50 ± 9,87	64,00 ± 6,66	30	10	85,71	66,67
ca. 100	5,63 ± 1,65	20,00 ± 7,87	12,81 ± 4,22	44,50 ± 8,96	49,50 ± 7,84	47,00 ± 5,97	75	20	0	37,5
ca. 100	3,33 ± 0,68	9,72 ± 4,88	6,53 ± 2,52	80,75 ± 7,86	80,00 ± 7,04	80,38 ± 5,27	50	0	75	100

Diskussion

Wie Tabelle 3 zeigt, hat die Applikation von Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) keinen repellierenden Einfluss auf die Nahrungsaufnahme von Kohlmottenlarven. In Versuch 1 wurden in der Pollenvariante von den beiden mit PACTOL-Pollen (Bt-) bedeckten Blattscheiben durchschnittlich 63 % verzehrt. Somit bestand kein Unterschied zu den übrigen beiden, unbehandelten Blattstückchen von denen 62,25 % gefressen wurden. In der Kontrollvariante, in denen die Raupen 4 identische, unbehandelte Blattstücke erhielten, trat wie zu erwarten kein Unterschied zwischen den Blättern 1 und 3 (61,25 %) und 2 und 4 (60 %) auf. Auch beim Gesamtvergleich der beiden Varianten (alle 4 Blattscheiben) werden keine Unterschiede in der Nahrungsaufnahme sichtbar. In der PACTOL-Pollenvariante (Bt-) wurden insgesamt 62,6 % der Blattfläche konsumiert, während es in der Kontrollvariante 60,6 % waren. Auch bezüglich Mortalitäts- und Verpuppungsrate ließen sich keine negativen Effekte durch die Verfütterung von Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) ausmachen. In den meisten Versuchen war die Mortalitätsrate in der Pollenvariante sogar niedriger und die Verpuppungsrate höher als in der Kontrollvariante.

Ganz anders stellte sich die Situation dar, wenn die Versuche mit Pollen von transgenem Bt-Mais der Sorte PACTOL CB (Bt+) durchgeführt wurden. In dem ersten in Tabelle 4 aufgelisteten Versuch wurden in der Pollenvariante von den beiden mit PACTOL CB-Pollen (Bt+) bedeckten Blattscheiben durchschnittlich nur 20,5 % verzehrt. Auch von den beiden übrigen, unbehandelten Blattstückchen wurden lediglich 20,25 % gefressen. In der Kontrollvariante, in denen die Raupen 4 identische, unbehandelte Blattstücke erhielten, war die durchschnittliche Nahrungsaufnahme bedeutend höher. Wie zu erwarten trat kein Unterschied zwischen den Blättern 1 und 3 (90,25 %) und 2 und 4 (85,5 %) auf. Der deutliche Unterschied in der Nahrungsaufnahme wird auch beim Gesamtvergleich der beiden Varianten (alle 4 Blattscheiben) sichtbar. In der Kontrollvariante wurden insgesamt fast 88 % der Blattfläche konsumiert, während es in der PACTOL CB-Pollenvariante (Bt+) lediglich 20,38 % waren. Diese deutliche Diskrepanz im Gesamtvergleich zwischen den beiden Varianten kommt in allen 10 durchgeführten Versuchen zum Ausdruck und verstärkt sich mit zunehmender Pollenmenge. Dieser Unterschied in der Nahrungsaufnahme kann damit erklärt werden, dass der Konsum von Bt-Pollen bei den Raupen der Kohlmotte einen Fraßstopp auslöst. Auch bezüglich Mortalitäts- und Verpuppungsrate ließen sich negative Effekte durch die Verfütterung von Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) ausmachen. In den meisten Versuchen war die Mortalitätsrate in der Pollenvariante höher und die Verpuppungsrate niedriger als in der Kontrollvariante.

In den meisten Versuchen konsumierten die Larven der PACTOL CB-Variante (Bt+) mehr von den beiden unbehandelten Blattscheiben, als von den beiden mit Pollen bedeckten Blattstücken. Dies kann damit erklärt werden, dass die Raupen mit 50-prozentiger Wahrscheinlichkeit zuerst auf ein unbehandeltes Blattstück trafen. In der Regel wird ein solches Blattstück dann weitgehend komplett verzehrt. Beginnt die Larve jedoch zuerst an einer mit Pollen bedeckten Blattscheibe zu fressen, dann wird diese durch den bald einsetzenden Fraßstopp i. d. R. nur zum Teil verzehrt.

Wie die Untersuchungen mit Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) belegen, zeigen die Raupen der Kohlmotte keine Vermeidungsreaktion wenn die Blätter ihrer Futterpflanze mit Maispollen bedeckt sind. Weder beim Betasten der Blattoberfläche, noch bei der Aufnahme des Pollens konnten Verhaltensweisen der Larven beobachtet werden, die vom normalen Fraßverhalten abwichen. Die Anwesenheit eines Fremdstoffes auf der Futterpflanze löst somit noch keinen Fraßstop aus. Dieser tritt erst ein, wenn die Raupe einige Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) mit dem darin enthaltenen Cry1Ab-Toxin verzehrt hat. Offensichtlich muss es erst zu Reaktionen des Toxins im Darm der Larve kommen, bevor die Nahrungsaufnahme eingestellt wird. Es konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass *Plutella xylostella*-Larven in der Lage sind die Aufnahme von für sie toxischen Maispollen der Linie Bt-176 zu meiden. Zum gleichen Ergebnis kamen auch FELKE & LANGENBRUCH (2001). Wie Wahlversuche mit *Pieris brassicae*- und *P. rapae*-Larven ergaben, unterschieden zumindest die verwendeten älteren Raupen in ihrem Fraßverhalten nicht zwischen transgenem und nicht-transgenem Maispollen.

Unter Freilandbedingungen bedeutet dies, dass Pollen von transgenem Bt-Mais beim Vorhandensein auf der Futterpflanze auch gefressen wird. Es ist allerdings möglich, dass die Larven die aufgenommene Pollendosis überleben können, wenn bis zum Einsetzen des Fraßstops nur eine geringe Menge Pollen verzehrt wurde. Zum einen könnten Wind oder Regen den Maispollen bis zum Wiedereinsetzen der Nahrungsaufnahme von den Raupenfutterpflanzen entfernen. Zum anderen könnte die Larve selbst durch eine nicht zielgerichtete Ortsveränderung Pflanzen verlassen, die mit Maispollen bedeckt sind.

2.2.2. Wahlversuche zum Fraßverhalten von *Pieris rapae*-Raupen (L₂)

Material & Methoden

Ähnlich wie schon bei den Wahlversuchen mit Raupen der Kohlmotte geschildert, sollte auch hier überprüft werden, ob Schmetterlingslarven in der Lage sind, den für sie toxischen Pollen von Bt-176-Mais zu erkennen und zu vermeiden. Um den Versuchsaufbau praxisnäher zu gestalten, wurden allerdings für die Versuche mit Larven des Kleinen Kohlweißlings getopfte, komplette Futterpflanzen eingesetzt. Für die Biotests wurden Raupen verwendet, die sich gerade zum ersten Mal gehäutet hatten. Die Larven stammten aus einer am Institut für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt etablierten Laborzucht. Zur Versuchsvorbereitung wurde eine getopfte Chinakohlpflanze zunächst mit Wasser benetzt. Anschließend wurde die Kohlpflanze unter eine blühende Fahne von PACTOL CB-Mais (Linie Bt-176) gehalten und Pollen durch Antippen der Fahne auf die Blätter der Kohlpflanze appliziert. Nach dem Antrocknen des Pollens wurden 10 Kohlweißlingsraupen auf die Pflanze gesetzt. Rechts und links dieser mit Pollen bedeckten Pflanze wurde jeweils eine unbehandelte Kohlpflanze gestellt. Da sich die Blätter der Pflanzen berührten, war es den Larven möglich auf eine der beiden unbehandelten Chinakohlpflanzen zu gelangen. Die drei Pflanzen wurden in eine mit Wasser gefüllte Schale gestellt, so dass ein Überwechseln von einer zur nächsten Pflanze nur

direkt über die Blätter erfolgen konnte. Nach einer Woche wurde die Zahl der überlebenden Larven pro Pflanze registriert.

Die Pollenbedeckung der Kohlpflanzen hing davon ab, wie viel Pollen die einzelnen Maisfahnen lieferten. Auch auf den Blättern war die Pollendichte nicht einheitlich. Da hinsichtlich der Pollenbedeckung keine einheitlichen Versuchsbedingungen geschaffen werden konnten, wurde darauf verzichtet Unterschiede im Larvenbesatz zwischen den drei Pflanzen bei Ende des Versuchs statistisch miteinander zu vergleichen. Insgesamt wurde der Versuch 16 mal wiederholt.

Ergebnisse

Tabelle 5: Mortalitätsrate bzw. Anzahl überlebender Larven pro Pflanze nach einer Woche in Wahlversuchen zum Fraßverhalten von *Pieris rapae* (L₂) für die getopfte Chinakohl-Pflanzen verwendet wurden. Auf die zentral stehende Chinakohlpflanze wurde Pollen der Maissorte Pactol CB (Linie Bt-176) appliziert.

Wiederholung	Mortalitätsrate (%)	Anzahl überlebender Larven pro Chinakohl-Pflanze		
		ub-links	PACTOL CB	ub-rechts
1	30,00	0	7	0
2	20,00	0	7	1
3	40,00	0	6	0
4	10,00	3	3	3
5	20,00	0	4	4
6	10,00	0	9	0
7	20,00	0	4	4
8	60,00	0	2	2
9	20,00	2	4	2
10	50,00	1	3	1
11	70,00	0	2	1
12	60,00	1	2	1
13	60,00	1	2	1
14	40,00	0	4	2
15	60,00	1	2	1
16	30,00	3	4	0
Gesamt (% ± SF)	37,5 ± 5,72	13,95 ± 3,67	62,79 ± 5,16	23,26 ± 4,31

Nach einer Woche lag die durchschnittliche Mortalitätsrate für die getesteten *Pieris rapae*-Raupen bei 37,5 %. Mit knapp 63 % befanden sich die meisten der überlebenden Larven nach

wie vor auf der mit Pollen von PACTOL CB-Mais (Bt+) bedeckten Chinakohl-Pflanze. Auf den benachbarten, unbehandelten Kohlpflanzen waren dagegen nur rund 14 bzw. 23 % der Raupen zu finden.

Diskussion

Insgesamt war die Mortalitätsrate nach einer Woche in den *Pieris rapae*-Wahlversuchen mit 37,5 % relativ hoch. Dies deutet darauf hin, dass die applizierte Pollenmenge von PACTOL CB-Mais (Bt+) im allgemeinen hoch genug war um die Raupen massiv zu schädigen so dass auch eine Vermeidungsreaktion der Larven denkbar gewesen wäre. Zwischen den einzelnen Wiederholungen variierte die Mortalitätsrate mit 10 bis 70 % recht deutlich, was damit erklärt werden kann, dass die Anzahl der Pollenkörner auf den Blättern nicht einheitlich war. Ein vermehrtes Überlaufen der Larven von der behandelten auf eine der unbehandelten Kohlpflanzen und somit eine eindeutige Vermeidungsreaktion gegenüber dem applizierten Maispollen konnte nicht festgestellt werden. Durchschnittlich befanden sich nach einer Woche rund 63 % der überlebenden Larven immer noch auf der mit Pollen von PACTOL CB-Mais (Bt+) bedeckten Chinakohl-Pflanze. Auf den direkt daneben stehenden, unbehandelten Kohlpflanzen waren dagegen mit ca. 14 bzw. 23 % weitaus weniger Raupen zu finden.

Die Untersuchungen mit Kohlweißlingslarven bestätigen die unter 2.2.1. aufgeführten Ergebnisse zum Fraßverhalten von *Plutella xylostella*-Raupen unter Wahlbedingungen. Es gibt keine Anzeichen dafür, dass *Pieris rapae*-Larven in der Lage sind den für sie toxischen Maispollen der Linie Bt-176 zu erkennen und dessen Aufnahme zu meiden, da ein Verlassen der mit Maispollen kontaminierten Futterpflanze kaum stattfand. Zum gleichen Ergebnis kamen auch FELKE & LANGENBRUCH (2001), die ähnliche Wahlversuche mit zwei Kohlweißlingsarten durchführten. Hier unterschieden *Pieris brassicae*- und *P. rapae*-Raupen des dritten und vierten Larvalstadiums in ihrem Fraßverhalten nicht zwischen transgenem und nicht-transgenem Maispollen. Unter Freilandbedingungen bedeutet dies, dass die Larven des Kleinen Kohlweißlings Pollen von transgenem Bt-Mais aufnehmen, falls sich dieser auf ihrer Futterpflanze befindet. Je nach der dabei aufgenommenen Toxin-Dosis können die Larven mehr oder weniger stark geschädigt werden. Die hier für *Pieris rapae* gemachten Beobachtungen lassen sich vermutlich nicht nur auf andere Vertreter der Familie Pieridae, sondern auch auf weitere Lepidopterenfamilien übertragen.

2.2.3. Wahlversuche zum Eiablageverhalten von *Plutella xylostella*-Faltern

Material & Methoden

Es sollte untersucht werden, ob das Vorhandensein von Maispollen auf der Raupenfutterpflanze das Eiablage-Verhalten von *Plutella xylostella*-Faltern beeinflusst. Hierzu wurden den Kohlmotten zwei Blätter von Markstammkohl zur Eiablage angeboten, von denen das eine mit Maispollen bedeckt war. Das zweite Blatt fungierte als unbehandelte Kontrolle. Die Versuche fanden in Flugkäfigen mit den Abmessungen 30 × 30 × 35 cm statt,

wie sie auch für die Zucht verwendet wurden. In diesen Käfig wurden jeweils zwei Erlenmeyerkolben gegeben, in denen sich die Kohlblätter befanden. Um zu verhindern, dass die Falter bei der Eiablage in den Erlenmeyerkolben ertrinken, wurden die Blattstiele mit Handtuchpapier umwickelt, so dass zwischen Blattstiel und Kolbenwand kein Zwischenraum mehr übrig blieb.

Beide Blätter wurden zunächst mit Leitungswasser benetzt. Dann wurde eines der Blätter unter eine blühende Maisfahne gehalten, die leicht angetippt wurde. Auf diese Weise wurde entweder Pollen der Sorte PACTOL CB (Bt-176-Mais), oder aber Pollen der isogenen, konventionellen Sorte PACTOL (Bt-) auf die Blattoberseite appliziert. Pro Quadratzentimeter lag die Pollenzahl hier zwischen 200 und 700. Auf der Blattunterseite, sowie auf dem Papier, befand sich dagegen kein Pollen. Ein direkter Vergleich zwischen Blättern, die entweder mit Pollen von Bt-Mais (PACTOL CB (BT+)) oder mit Pollen von konventionellem Mais (PACTOL (BT-)) bedeckt waren, fand nicht statt. Nach dem Antrocknen des Wassers wurden beide Blätter in den Flugkäfig gestellt, in dem sich bereits die Kohlmotten befanden. Der Flugkäfig stand ca. 50 cm von einem Fenster entfernt. Um Positionseffekte bei der Eiablage auszuschließen, wurde der Standort der beiden Blätter jeden Tag vertauscht. Versuchsbeginn war jeweils 12 Uhr. Am darauf folgenden Tag wurden die Blätter um 9 Uhr aus den Käfigen entfernt und die bis dahin abgelegten Eier unter Verwendung eines Binokulars gezählt. Hierbei wurden die Eizahlen auf Blattoberseite, Blattunterseite und Handtuchpapier getrennt ermittelt.

Die Wahlversuche zum Eiablageverhalten von *Plutella xylostella* fanden im Rahmen der Laborzucht statt. Aus diesem Grund kann die Zahl der sich im Käfig befindlichen Individuen nicht angegeben werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es zwischen einzelnen Versuchen z. T. beträchtliche Unterschiede in den Individuenzahlen gab. Auch bezüglich der Pollenbedeckung des Kohlblattes konnten keine einheitlichen Bedingungen geschaffen werden. Erstens waren die Pollenkörner nicht gleichmäßig auf der Blattoberseite verteilt und zweitens variierte die Menge des applizierten Pollens in Abhängigkeit von der Qualität der blühenden Maispflanzen. Aus diesen Gründen ist jede Wiederholung getrennt zu betrachten. Da die Wiederholungen nicht zusammengefasst werden konnten, fand auch kein statistischer Vergleich von durchschnittlichen Eizahlen für Blattoberseite, Blattunterseite und Handtuchpapier statt.

Ergebnisse

Tabelle 6: Eiablage von Faltern der Kohlmotte im Wahlversuch. Angeboten wurden stets ein unbehandeltes Kontrollblatt, sowie ein Blatt, das mit Maispollen bedeckt war (PACTOL CB (Bt+) oder PACTOL (Bt-)). Nach 21 Stunden wurden die auf Blattoberseite, Blattunterseite und Handtuchpapier abgelegten Eier gezählt. Aufgrund nicht standardisierter Versuchsbedingungen wurden weder Durchschnittswerte, noch Standardfehler berechnet.

Variante	Standort im Käfig	Eiablage insgesamt bzw. pro Abschnitt (%)			
		Insgesamt	Blatt-Oberseite	Blatt-Unterseite	Papier
PACTOL (Bt-)	links	292	77 (26,37)	95 (32,53)	120 (41,10)
Kontrolle (ub)	rechts	300	35 (11,67)	97 (32,33)	168 (56,00)
PACTOL (Bt-)	rechts	188	80 (42,55)	24 (12,77)	84 (44,68)
Kontrolle (ub)	links	147	40 (27,21)	27 (18,37)	40 (27,21)
PACTOL (Bt-)	links	363	134 (36,91)	75 (20,66)	154 (42,42)
Kontrolle (ub)	rechts	437	133 (30,43)	73 (16,70)	231 (52,86)
PACTOL (Bt-)	rechts	893	169 (18,92)	350 (39,19)	374 (41,88)
Kontrolle (ub)	links	523	196 (37,48)	167 (31,93)	160 (30,59)
PACTOL CB (Bt+)	links	176	68 (38,64)	34 (19,32)	74 (42,05)
Kontrolle (ub)	rechts	297	54 (18,18)	5 (1,68)	238 (80,13)
PACTOL CB (Bt+)	rechts	254	95 (37,40)	138 (54,33)	121 (47,64)
Kontrolle (ub)	links	371	95 (25,61)	77 (20,75)	199 (53,64)
PACTOL CB (Bt+)	links	400	129 (32,25)	21 (5,25)	250 (62,50)
Kontrolle (ub)	rechts	398	56 (14,07)	47 (11,81)	295 (74,12)
PACTOL CB (Bt+)	rechts	248	101 (40,73)	52 (20,97)	95 (38,31)
Kontrolle (ub)	links	387	27 (6,98)	28 (7,24)	332 (85,79)
PACTOL CB (Bt+)	links	317	178 (56,15)	108 (34,07)	31 (9,78)
Kontrolle (ub)	rechts	312	176 (56,41)	66 (21,15)	70 (22,44)

Ein Vergleich der beiden Varianten PACTOL (Bt-) und Kontrolle zeigt, dass die Falter in 2 Fällen insgesamt mehr Eier auf dem mit PACTOL-Pollen (Bt-) bedeckten Blatt ablegten, als auf dem unbehandelten Kontrollblatt. Bei den anderen beiden Wiederholungen war das Verhältnis umgekehrt. Beim Vergleich der beiden Varianten PACTOL CB (Bt+) und Kontrolle wurden in 2 Wiederholungen mehr Eier auf dem mit PACTOL CB-Pollen (Bt+) bedeckten Blatt abgelegt, als auf dem Kontrollblatt. Bei den restlichen 3 Wiederholungen wurden mehr Eier auf dem unbehandelten Kohlblatt registriert. Allgemein wurde das um den

Blattstiel gewickelte Handtuchpapier ganz eindeutig zur Eiablage präferiert. In 13 von 18 Fällen wurden die meisten Eier am Handtuchpapier gezählt. Dagegen wurden auf der Blattoberseite nur 4 mal und auf der Blattunterseite lediglich in einem Fall die meisten Eier registriert.

Im Zusammenhang mit der hier bearbeiteten Fragestellung ist besonders ein Vergleich zwischen Blattober- und Blattunterseite der mit Pollen kontaminierten Kohlblätter interessant. Waren die Blätter mit Pollen der konventionellen Maissorte PACTOL (Bt-) bedeckt, legten die Falter in zwei Fällen mehr Eier auf der Blattoberseite und in den anderen beiden Wiederholungen mehr Eier auf der Blattunterseite ab. Bei einer Bedeckung des Blattes mit Pollen der transgenen Maissorte PACTOL CB (Bt+) wurden in vier Wiederholungen mehr Eier auf der Blattoberseite abgelegt, während die pollenfreie Blattunterseite nur in einem einzigen Fall gegenüber der mit Pollen bedeckten Oberseite bevorzugt wurde.

Diskussion

Durch ihr Eiablageverhalten können adulte Insekten entscheidenden Einfluss darauf nehmen, in welchem Maße ihre Nachkommen natürlichen (z. B. Pflanzeninhaltsstoffe) oder künstlichen Toxinen (z. B. Pflanzenschutzmittel) ausgesetzt sind. Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Frage, ob eine Kontamination der Raupenfutterpflanze mit einer für die Larven toxischen Substanz Änderungen im Eiablageverhalten der Imagines bewirken kann. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung ließen sich keine Hinweise darauf erbringen, dass die Falter der Kohlmotte bei der Eiablage solche Pflanzen meiden, die mit Maispollen bedeckt waren. Hierfür spricht insbesondere die Beobachtung, dass bei einer Bedeckung des Kohlblattes mit Pollen von PACTOL CB-Mais (Bt+), der nachgewiesenermaßen für die Kohlmottenlarven toxisch wirkt, in vier Wiederholungen mehr Eier auf der kontaminierten Blattoberseite abgelegt wurden, während die pollenfreie Blattunterseite nur in einem einzigen Fall bevorzugt wurde. Auch beim Vergleich zwischen einem mit Pollen bedeckten Blatt und einem unbehandelten Kontrollblatt konnte bezüglich der Eiablage keine Präferenz für das nicht behandelte Kohlblatt festgestellt werden. Generell wurde das um den Blattstiel gewickelte Handtuchpapier zur Eiablage bevorzugt. Dies könnte eventuell mit der Struktur des Materials zusammenhängen. Bei genauer Betrachtung des Papiers wurde deutlich, dass die Eier hauptsächlich in kleine Vertiefungen abgelegt wurden. An der Pflanze selbst werden die meisten Kohlmotten-Eier in der Regel auf dem Stiel des Kohlblattes gefunden was dafür spricht, dass diese Art die unteren Pflanzenteile gegenüber den oberen Pflanzenteilen bei der Eiablage bevorzugt.

TSCHEHN et al. (2001) führten eine ähnliche Studie über das Eiablageverhalten des Monarchfalters (*Danaus plexippus*) durch. In Flugkäfig-Versuchen wurde festgestellt, dass die Weibchen eindeutig mehr Eier auf *Asclepias syriaca*-Pflanzen ablegten, die nicht mit Maispollen bedeckt waren, wobei das Verhältnis bei 72 % zu 28 % (ub/Pollen) lag. Wurde dieser Versuch in deutlich kleineren Käfigen wiederholt, so ließen sich zwischen den einzelnen Varianten (Pollen von BT-176-Mais, Pollen von konventionellem Mais, Straßenstaub und unbehandelte Kontrolle) keine signifikanten Unterschiede finden. Auch die direkte Umgebung der Raupenfutterpflanze scheint einen Einfluss auf das Eiablageverhalten

des Weibchens auszuüben. TSCHENN et al. stellten in Flugkäfig-Versuchen fest, dass *D. plexippus*-Weibchen wesentlich weniger Eier ablegten, wenn *Asclepias syriaca* von Maispflanzen umgeben waren.

Somit widersprechen die von TSCHENN et al. veröffentlichten Ergebnisse zumindest z. T. den hier erzielten Resultaten. Eine Vergleichbarkeit war allerdings auch nicht unbedingt zu erwarten, da mit zwei verschiedenen Spezies gearbeitet wurde, die sich v. a. hinsichtlich der Körpergröße deutlich unterscheiden. Auch muss betont werden, dass bei den Kohlmottenversuchen die Rahmenbedingungen der einzelnen Wiederholungen nicht identisch waren, so dass ein Vergleich zwischen den Wiederholungen nicht möglich war. Es wäre wünschenswert, derartige Versuche unter standardisierten Bedingungen wiederholen zu können um eventuelle Unterschiede zwischen den Varianten statistisch untersuchen zu können. Darüber hinaus sollten ähnliche Versuche mit solchen Arten wiederholt werden, die möglicherweise durch den Anbau von transgenem Bt-Mais in ihrem Bestand gefährdet sein könnten. Hiefür werden die Nymphaliden Kleiner Fuchs (*Aglais urticae*) und Tagpfauenauge (*Inachis io*) vorgeschlagen.

3. Laborversuche mit Pollen und Antheren der Linie MON810

Neben der transgenen Maislinie Bt-176 der Firma Syngenta Seeds befindet sich in Europa auch die Linie MON810 (Firma Monsanto) im Zulassungsverfahren. Beide Linien exprimieren in verschiedenen Pflanzenteilen das Cry1Ab-Toxin. Allerdings gibt es z. T. deutliche Unterschiede bezüglich des Expressionsmusters, die auf die Verwendung unterschiedlicher Promotoren zurückzuführen sind. Der für die hier durchgeführte Studie wichtigste Unterschied bezieht sich auf die Toxinexpression im Pollen. Während Mais der Linie Bt-176 bis zu 7,1 µg Toxin pro Gramm Pollen-Trockengewicht enthalten kann, liegt dieser Wert für die Linie MON810 bei weniger als 0,09 µg (STANLEY-HORN et al, 2001). Dagegen können andere Pflanzenteile von Mais dieser Linie relativ hohe Toxingehalte aufweisen. Wie HELLMICH et al. (2001) durch Laborversuche nachweisen konnten, enthalten auch die Antheren von Maispflanzen der Linie MON810 eine so hohe Toxinmenge, dass neonate Monarchfalter-Larven nach Aufnahme von Antheren-Material signifikant geschädigt wurden.

In der hier durchgeführten Studie wurden Fütterungsversuche ohne Auswahlmöglichkeit sowohl mit Pollen, als auch mit Antheren von Mais der Linie MON810 durchgeführt. Als Testorganismus wurde die Kohlmotte (*Plutella xylostella*) verwendet, da sich diese Art bei Versuchen mit Pollen der Linie Bt-176 am empfindlichsten gezeigt hatte.

3.1. Wirkung von Pollen auf *Plutella xylostella*-Raupen (L₄)

Material & Methoden

Für die Biotests wurden frisch gehäutete Raupen des vierten Larvalstadiums verwendet. Die verwendete Methodik ist die gleiche wie bei den unter 2.1.3. geschilderten Tests mit Maispollen der Linie Bt-176. Der Pollen wurde in Form einer Suspension auf die Kohlblattstückchen aufgetragen, wobei nur eine einzige Dosis getestet wurde. Da bekannt ist, dass der Pollen von MON810-Mais nur eine geringe Toxin-Konzentration aufweist, wurde die pro Larve applizierte Dosis mit 80 Pollenkörnern recht hoch gewählt. Jede Wiederholung bestand aus den drei Varianten unbehandelte Kontrolle, Pollen der Sorte NOVELIS (MON810-Mais) und Pollen der Sorte NOBILIS (isogene, konventionelle Sorte). Die Biotests wurden insgesamt 10 mal wiederholt, wobei pro Wiederholung und Variante 20 Larven verwendet wurden. Es wurde ausschließlich frischer Pollen getestet.

Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Nahrungsaufnahme von *Plutella xylostella*-Raupen (L₄) in den 3 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

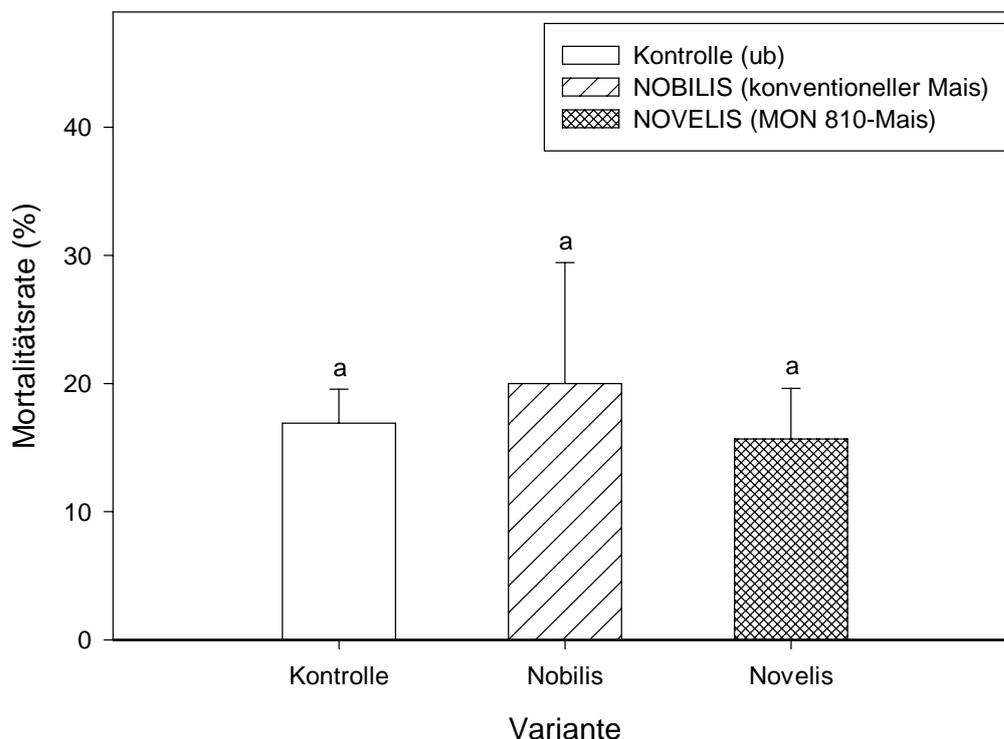


Abbildung 50: Durchschnittliche Mortalitätsrate nach einer Woche (% ± SF) für *Plutella xylostella*-Raupen (L₄) im Bezug zu der pro Larve applizierten Menge von 80 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Für alle Wiederholungen wurde frischer Pollen verwendet. Zwischen den 3 Varianten ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (F (2 FG) = 0,14; p = 0,8697; Tukey-Test).

Wie Abbildung 50 zeigt, traten bezüglich der Mortalitätsrate keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei getesteten Varianten auf. Am höchsten war die Sterblichkeit in der NOBILIS-Variante (Bt-) mit 20 %, am niedrigsten in der NOVELIS-Variante (Bt+) mit 15,67 %.

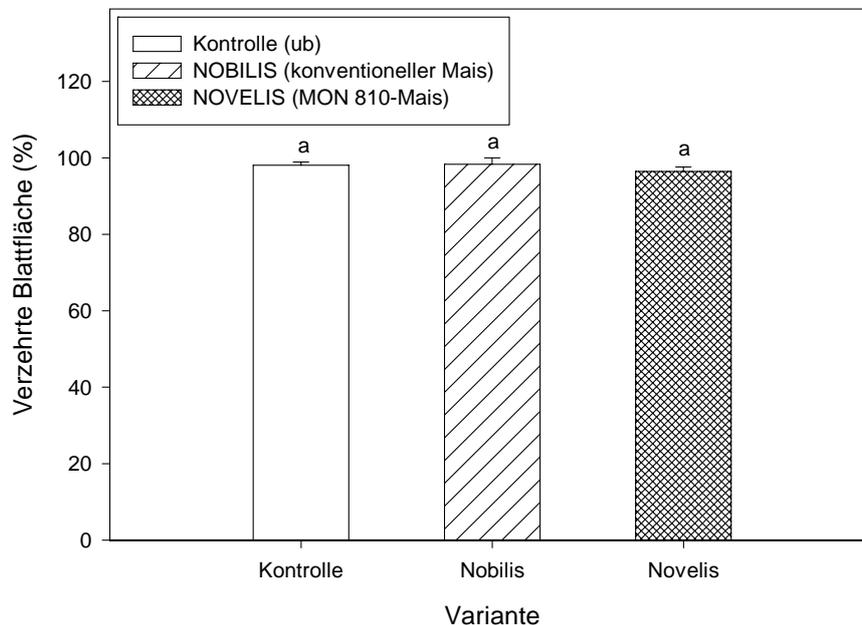


Abbildung 51: Durchschnittlich verzehrte Blattfläche nach 24 Stunden (% \pm SF) für *Plutella xylostella* - Raupen (L₄) im Bezug zu der pro Larve applizierten Menge von 80 Pollenkörnern (empirisch ermittelter Durchschnittswert). Für alle Wiederholungen wurde frischer Pollen verwendet. Zwischen den 3 Varianten ließen sich keine signifikanten Unterschiede feststellen (F (2 FG) = 0,80; p = 0,4502; Tukey-Test).

Wie Abbildung 51 zeigt, hatten die Larven in allen drei Varianten das ursprüngliche Kohlblattstückchen nach 24 Stunden fast vollständig verzehrt. Die beobachteten geringen Unterschiede zwischen den Durchschnittswerten erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

Diskussion

In der hier durchgeführten Untersuchung konnten bei Verfütterung von Pollen der transgenen Maislinie MON810 keine negativen Auswirkungen hinsichtlich Nahrungsaufnahme oder Mortalitätsrate von Kohlmottenraupen des vierten Larvalstadiums beobachtet werden. Die geringen Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. In Vergleichsuntersuchungen mit Maispollen der Linie Bt-176 wurde für *P. xylostella* (L₄) ein LD₅₀-Wert von knapp 8 Pollenkörnern ermittelt. Bereits eine Verfütterung von 40 Pollenkörnern der transgenen Sorte PACTOL CB (Bt-176-Mais) an die Raupen hatte eine 100-prozentige Mortalitätsrate zur Folge.

Auch Untersuchungen mit anderen Schmetterlingsarten wiesen keine negativen Effekte auf Raupen durch die Aufnahme von Pollen der transgenen Maislinie MON810 nach. HELLMICH et al. (2001) stellten bei Laborversuchen mit neonaten Monarchfalter-Larven selbst bei Verfütterung von Futterpflanzen, die mit mehr als 1.000 Pollenkörnern pro cm² bedeckt waren, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Mortalität, Nahrungsaufnahme oder

Gewichtszunahme gegenüber einer Kontroll- bzw. einer konventionellen Pollenvariante fest. Darüber hinaus fanden STANLEY-HORN et al. (2001) auch im Rahmen von Freilandversuchen keinen Hinweis darauf, dass neonate *D. plexippus*-Larven durch Pollen der transgenen Sorten Bt-11 und MON810 geschädigt werden. Nach Untersuchungen von WRAIGHT et al. (2000) zeigten neonate *Papilio polyxenes*-Larven sogar bei einer Konzentration von 10.000 Pollenkörnern der Linie MON810 pro Quadratzentimeter keine erhöhte Mortalitätsrate. Durch einen ELISA-Test wurde hier ein Cry1Ab-Toxingehalt im Pollen von $2,125 \pm 0,289$ ng/g festgestellt.

Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Pollen von transgenem Bt-Mais der Linie MON810 in der Regel eine so geringe Toxin-Konzentration aufweist, dass *B. t.*-empfindliche Larven selbst durch Verzehr größerer Pollenmengen nicht erkennbar geschädigt werden.

3.2. Wirkung von Antheren auf *Plutella xylostella*-Raupen (L_4)

Material & Methoden

Auch für diese Tests wurden frisch gehäutete Raupen des vierten Larvalstadiums verwendet. Die für die Versuche benötigten Antheren wurden abgeerntet nachdem die Blühperiode vorbei war. Somit war sichergestellt, dass die Antheren keinen Pollen mehr enthielten. Jeweils 15 Antheren wurden mit Hilfe eines Mörsers fein zerrieben und in 200 μ l deionisiertem Wasser gelöst. Anschließend wurde die Suspension in einem Zentrifugenröhrchen (Fassungsvermögen: 12 ml) mit Hilfe eines Magnetrührers (300 Umdrehungen pro Minute) für 5 bis 10 Minuten gerührt. Nachdem sich das Material abgesetzt hatte, wurden 0,5 μ l Suspension vom Boden des Zentrifugenröhrchens aufgenommen, wozu eine Eppendorf-Pipette mit einer Auftrags-Bandbreite von 0,5 - 10 μ l verwendet wurde. Anschließend wurde die Suspension auf Kohlblattstückchen von 3 mm Durchmesser appliziert. Nach dem Trocknen wurden die Larven hinzugegeben. Der weitere Verlauf des Biotests entspricht der unter 3.1.2. beschriebenen Methodik (no choice-Tests mit Maispollen der Linie Bt-176).

Die Biotests wurden insgesamt 10 mal wiederholt, wobei pro Wiederholung und Variante 20 Larven verwendet wurden. Jede Wiederholung bestand aus den drei Varianten unbehandelte Kontrolle, Antheren der Sorte NOVELIS (MON810-Mais) und Antheren der Sorte NOBILIS (isogene, konventionelle Sorte). Um Unterschiede bezüglich Mortalitätsrate und Nahrungsaufnahme von *Plutella xylostella*-Raupen (L_4) in den 3 verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

Die Mortalitätsrate der Larven, die mit Antherenmaterial der Sorte NOVELIS (MON810) gefüttert wurden, lag mit 72,53 % deutlich höher als in den anderen beiden Varianten mit 10,20 % (unbehandelte Kontrolle) bzw. 8,37 % (NOBILIS). Dieser Unterschied erwies sich als statistisch hoch signifikant.

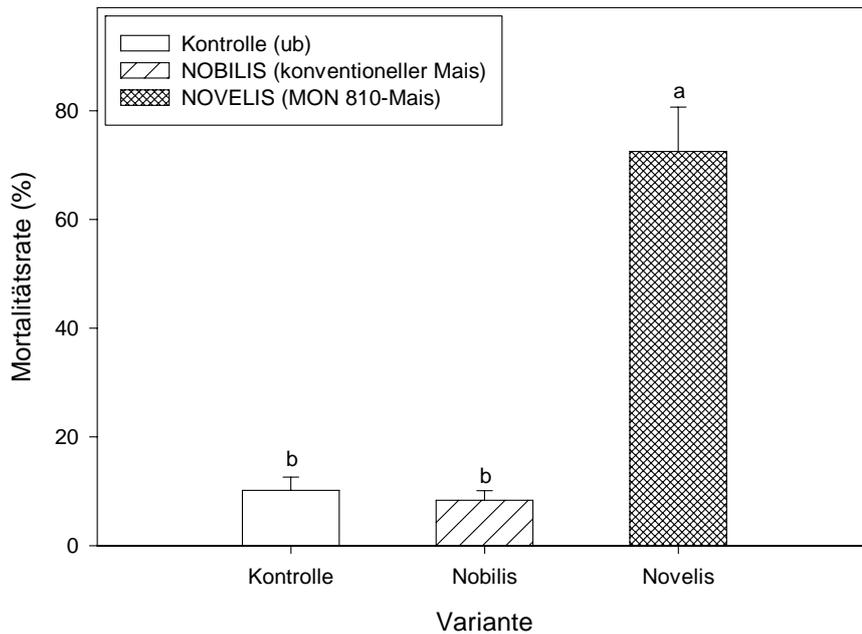


Abbildung 52: Durchschnittliche Mortalitätsrate nach einer Woche (% \pm SF) für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die z. T. mit auf Kohlblattstückchen appliziertem Mais-Antherenmaterial gefüttert worden waren. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 26,97$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

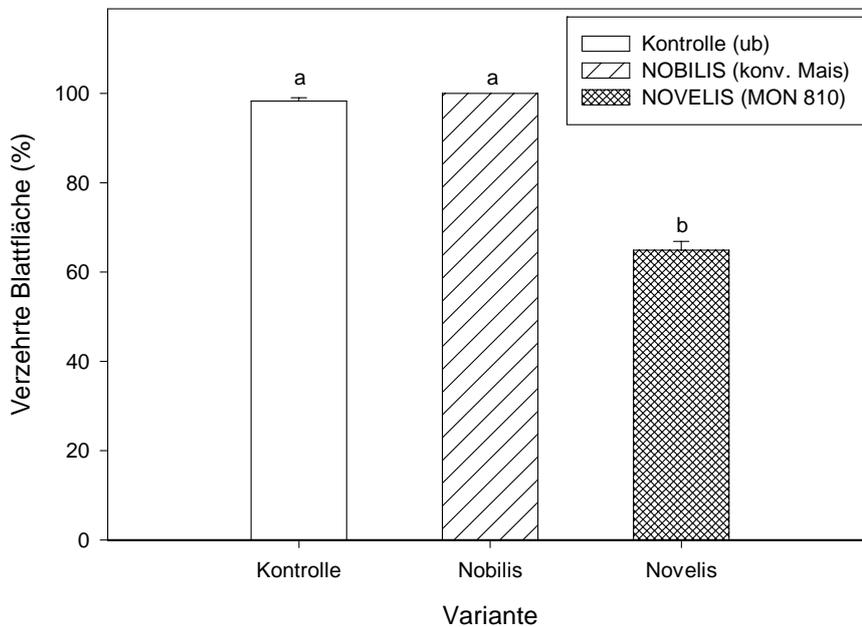


Abbildung 53: Durchschnittlich verzehrte Blattfläche nach 24 Stunden (% \pm SF) für *Plutella xylostella*-Raupen (L_4), die z. T. mit auf Kohlblattstückchen appliziertem Mais-Antherenmaterial gefüttert worden waren. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(2 \text{ FG}) = 192,96$; $p < 0,0001$; Tukey-Test).

Die im Laufe von 24 Stunden verzehrte Blattfläche der Larven, die mit Antherenmaterial der Sorte NOVELIS (MON810) gefüttert wurden, lag mit 64,93 % deutlich niedriger als in den anderen beiden Varianten mit 98,30 % (unbehandelte Kontrolle) bzw. 100 % (NOBILIS (Bt-)). Dieser Unterschied erwies sich als statistisch hoch signifikant.

Diskussion

Die hier vorgelegten Daten zeigen eindeutig, dass Antheren von transgenem MON810-Mais eine toxische Wirkung auf *B.t.*-empfindliche Schmetterlingslarven haben. Wie aus Abbildung 52 hervorgeht, zeigten Kohlmottenlarven, die mit bereits abgeblühten Antherenbruchstücken der Maissorte NOVELIS (MON810-Mais) gefüttert worden waren gegenüber den beiden Vergleichsvarianten eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate von mehr als 72 %. Darüber hinaus fraßen derartig behandelte Larven in den ersten 24 Stunden des Biotests signifikant weniger, als Tiere der übrigen beiden Varianten. Sterblichkeit und Nahrungsaufnahme zwischen unbehandelter Kontrolle und einer Variante, in der Antherenbruchstücke der konventionellen Maissorte NOBILIS gefüttert worden waren, unterschieden sich dagegen nicht signifikant. Wie oben erwähnt, wurden für die Untersuchungen abgeblühte Antheren verwendet. Es ist anzunehmen, dass blühende Antheren höhere Cry1Ab-Konzentrationen aufweisen als bereits ältere Staubgefäße und daher eine noch toxischere Wirkung auf die Larven entfalten können. HELLMICH et al. (2001) stellten ähnliche Laborversuche mit neonaten Monarchfalter-Larven an, die allerdings mit Antherenbruchstücken der transgenen Maislinie Bt-11 gefüttert wurden. Solche Tiere zeigten gegenüber drei verschiedenen Vergleichsvarianten (unbehandelte Kontrolle, Pollen einer konventionellen Vergleichssorte vermischt mit Antherenbruchstücken und fein ausgesiebter Pollen von Bt-11-Mais ohne Antherenbruchstücke) eine signifikant verringerte Gewichtszunahme. Spätere Tests, in denen ausschließlich ausgesiebtes Antherenmaterial verfüttert wurde bestätigten, dass die Schädigung der Larven durch Antherenbruchstücke hervorgerufen wurden, die im Vergleich zu Pollen der Linie Bt-11 eine deutlich höhere Konzentration des Cry1Ab-Toxins aufweisen. Wie auch bei Sorten der Linie MON810 enthält der Pollen von Bt-11-Mais nur eine sehr geringe Menge an Bt-Toxin.

Die hier referierten Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass der Anbau der Bt-Maislinie MON810 aus Sicht des Schmetterlingsschutzes eher zu tolerieren ist als ein Anbau der Linie Bt-176. Die meisten Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Toxinkonzentration in Pollen von MON810- wesentlich geringer ist, als in Pollen von Bt-176-Mais. Demgegenüber stehen allerdings Ergebnisse von NGUYEN et al. (2002) die einen Toxingehalt im Pollen zwischen 0,32 und 6,6 µg pro g Frischgewicht nachweisen konnten, wobei allerdings unklar ist, ob hierbei nicht gleichzeitig die Staubgefäße mit untersucht wurden. Dieser Wert erreicht fast die bei STANLEY-HORN et al. (2001) für Bt-176 Mais angegebene Toxinkonzentration von 7,1 µg Toxin pro Gramm Pollen-Frischgewicht. Die starken Schwankungen der Toxin-Expression im Pollen von MON810 Mais könnten sowohl auf abiotische Faktoren, als auch auf Unterschiede zwischen verschiedenen Maissorten zurückzuführen sein. Weitere Biotests mit Pollen von MON810-Mais sollten demnach unbedingt noch folgen. Hierbei sollte geklärt werden, ob die verschiedenen MON810-Sorten unterschiedlich hohe Toxin-Konzentrationen

im Pollen zeigen und ob es zwischen sortengleichen Pflanzen individuelle Unterschiede in der Toxinexpression gibt. Auch stehen Untersuchungen zu subletalen Effekten (z. B. Einfluss auf Entwicklungsgeschwindigkeit oder Fekundität der Weibchen) noch aus. Darüberhinaus muss geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß Antheren bzw. Antherenbruchstücke verdriftet werden, da die Toxinkonzentration hier deutlich höher liegt.

4. Freilanduntersuchungen

4.1. Untersuchungen zur Verdriftung von Maispollen

Material & Methoden

Ein entscheidender Punkt um die Expositionswahrscheinlichkeit von Raupen für Pollen von Bt-Mais abschätzen zu können war die Frage, wie weit Maispollen fliegen kann und welche Pollen-Mengen in bestimmten Abständen zum Maisfeld zu finden sind. Um dies zu klären, wurden Objektträger, die mit doppelseitigem Klebeband versehen waren, in den Jahren 2001 und 2002 zum Zeitpunkt der Maisblüte in bestimmten Abständen zum Rand des 40 mal 40 Meter großen Versuchsfeldes ausgebracht. Hierzu wurden die Objektträger auf ca. 20 cm hohe, umgedrehte Blumentöpfe platziert. Die Blumentöpfe wurden stets so aufgestellt, dass sie in der Hauptwindrichtung standen. In beiden Versuchsjahren wurde Bt-176-Mais verwendet. Im Jahr 2001 wurde die Sorte PACTOL CB (Bt+) und im Jahr 2002 die Sorte VALMONT (Bt+) angebaut. Ein Teil der Objektträger wurde innerhalb des Feldes ausgebracht und zwar 5 Meter vom Feldrand entfernt. Die restlichen Objektträger befanden sich 1, 2, 4, 8, 16 und 32 Meter außerhalb des Feldes. Im Versuchszeitraum 2001 betrug die Expositionszeit 4 Stunden, 18 Stunden oder 7 Tage. Im Folgejahr betrug die Expositionszeit für alle Objektträger 24 Stunden. Die Auszählung der anhaftenden Pollenkörner erfolgte unter Verwendung eines Stereo-Zoom-Mikroskops (Olympus SZ 6045) bei 60-facher Vergrößerung, wobei pro Objektträger 3 Sektoren von je 1 cm² Fläche ausgezählt wurden.

Um Unterschiede bezüglich der Pollenmenge pro Quadratzentimeter zwischen den verschiedenen Abständen vom Feldrand zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Student-Newman-Keuls-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

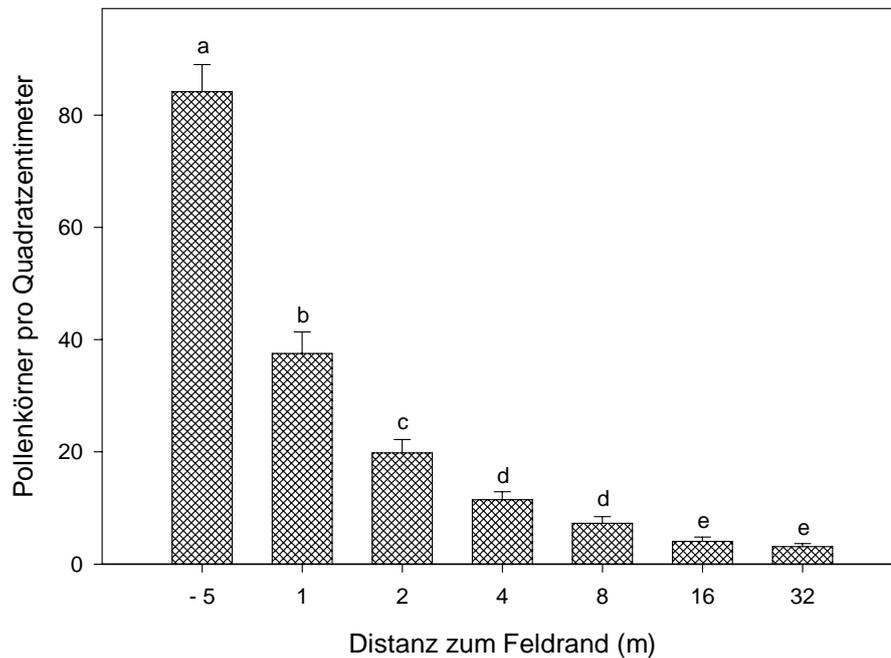


Abbildung 54: Pollenmenge pro Quadratzentimeter \pm SF nach einer Expositionszeit von 4 Stunden in Abhängigkeit von der Entfernung zum Maisfeld (Sorte: PACTOL CB (Bt+)) im Jahr 2001. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(20 \text{ FG}) = 16,38$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test). - 5: Der Messpunkt befand sich 5 m innerhalb des Maisfelds.

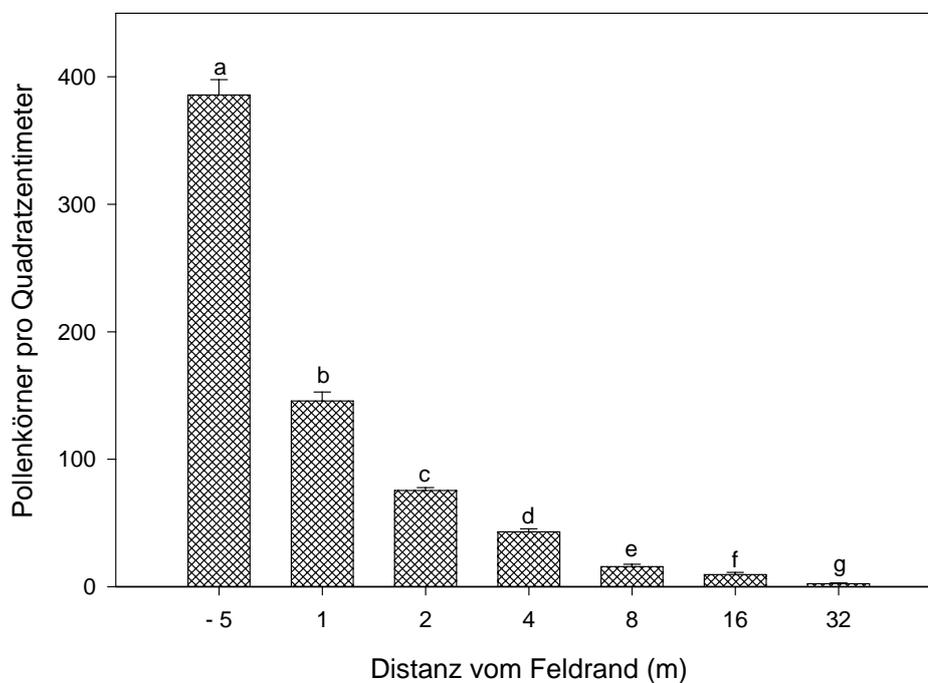


Abbildung 55: Pollenmenge pro Quadratzentimeter \pm SF nach einer Expositionszeit von 18 Stunden in Abhängigkeit von der Entfernung zum Maisfeld (Sorte: PACTOL CB (Bt+)) im Jahr 2001. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(20 \text{ FG}) = 99,63$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test). - 5: Der Messpunkt befand sich 5 m innerhalb des Maisfelds.

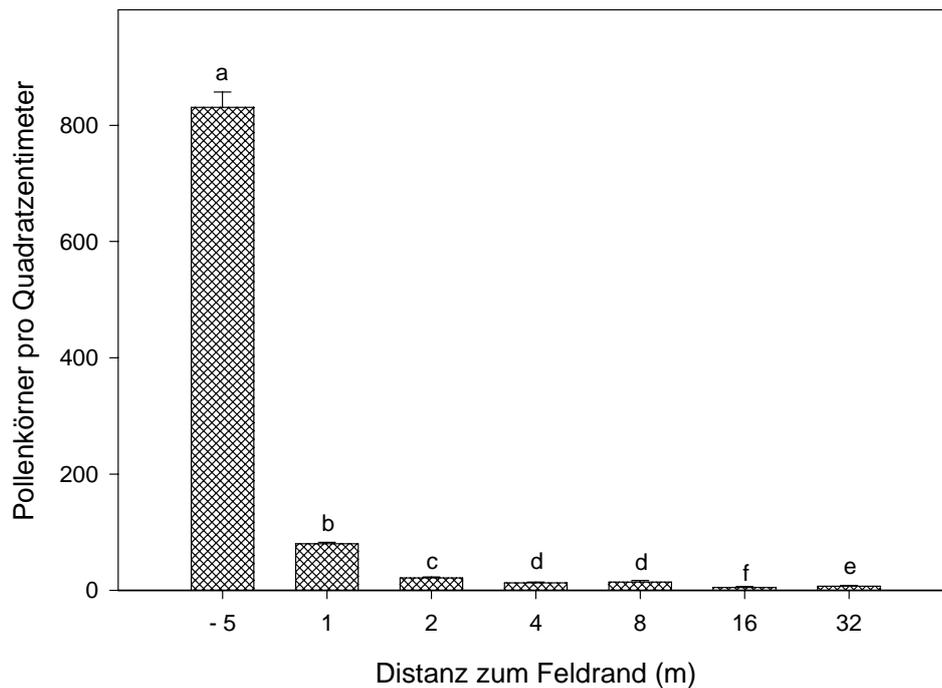


Abbildung 56: Pollenmenge pro Quadratcentimeter \pm SF nach einer Expositionszeit von 7 Tagen in Abhängigkeit von der Entfernung zum Maisfeld (Sorte: PACTOL CB (Bt+)) im Jahr 2001. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(20 \text{ FG}) = 79,93$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test). - 5: Der Messpunkt befand sich 5 m innerhalb des Maisfelds.

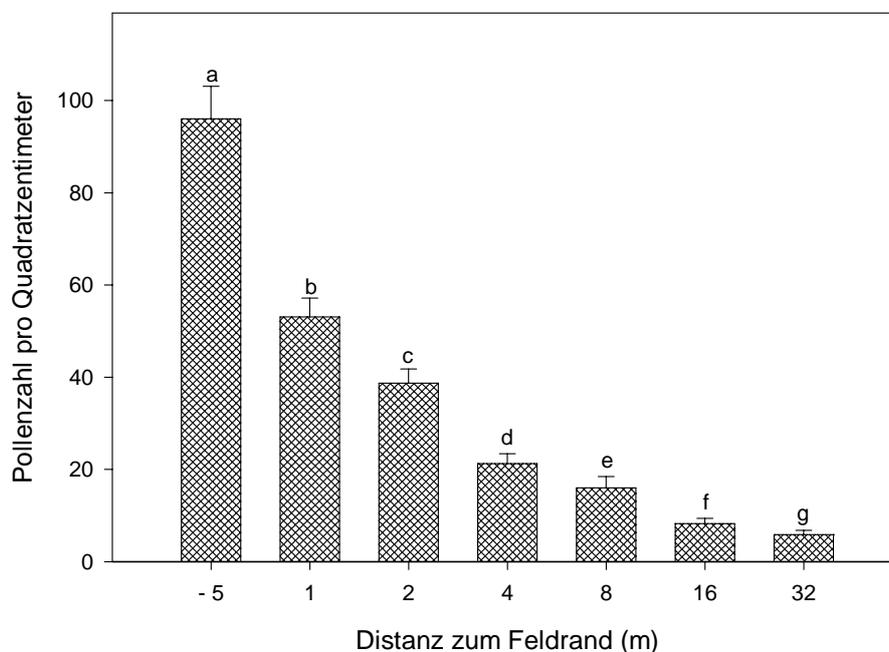


Abbildung 57: Pollenmenge pro Quadratcentimeter \pm SF nach einer Expositionszeit von 24 Stunden in Abhängigkeit von der Entfernung zum Maisfeld (Sorte: VALMONT (Bt+)) im Jahr 2002. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(20 \text{ FG}) = 39,12$; $p < 0,0001$; Student-Newman-Keuls-Test). - 5: Der Messpunkt befand sich 5 m innerhalb des Felds.

Diskussion

Da der Pollen im hier gewählten Versuchsansatz auf dem doppelseitigen Klebeband haften blieb, konnte sehr exakt die mit dem Wind verdriftete Pollenmenge bestimmt werden. Es ist aber zu vermuten, dass auf Raupenfutterpflanzen teilweise auch weniger Pollen pro Quadratzentimeter liegen bleibt. Das Ausmaß der Pollenakkumulation hängt wesentlich von Wuchsform, Höhe der Pflanzen und Form bzw. Oberflächenbeschaffenheit der Blätter ab. Beispielsweise können auf breiten, behaarten Blättern wesentlich mehr Pollen aufgefangen und zurückgehalten werden als auf schmalen, unbehaarten Blättern. Ebenso dürfte die Pollenakkumulation auf niedrig wachsenden, krautigen Pflanzen höher sein als auf höher wachsenden Pflanzen, die in viel stärkerem Maß dem Wind ausgesetzt sind.

In allen Versuchsansätzen konnte beobachtet werden, dass die von den Objektträgern aufgefangene Pollenmenge innerhalb des Feldes wesentlich größer war als außerhalb und mit zunehmender Entfernung zum Feldrand rasch abnahm. Im Jahr 2001 betrug die durchschnittliche Pollendichte pro Quadratzentimeter nach einer Expositionszeit von 4 Stunden 5 Meter innerhalb des Feldes rund 84 Pollenkörner, während sie 32 Meter vom Feld entfernt nur noch bei etwas mehr als 3 Pollenkörnern lag. Verblieben die Objektträger für längere Zeit im Feld, so wurden nur z. T. höhere Pollenmengen festgestellt. Nach 18-stündiger Expositionszeit wurden an allen Messpunkten bis auf einen (32 m) meist deutlich höhere Pollenwerte ermittelt, die um den Faktor 2 bis 4 über den Werten nach 4-stündiger Expositionszeit lagen. Wurde die Expositionszeit dagegen auf 7 Tage ausgedehnt, nahm die aufgefangene Pollenmenge lediglich innerhalb des Feldes, sowie in 32 Meter Entfernung weiter zu. Ansonsten lagen die Werte teilweise deutlich unter denen der 18-stündigen Expositionszeit. Dies liegt vermutlich daran, dass durch mehrere Regenschauer im Verlauf dieser Woche ein Teil des Pollens abgewaschen wurde. PLEASANTS et al. (2001) gaben an, dass die Pollenbedeckung von *Asclepias syriaca*, die dem Monarchfalter als Futterpflanze dient, am Ende von Perioden ohne Niederschlag am höchsten war, was auf eine Akkumulation der Pollenkörner hindeutet. Einzelne Regenschauer sorgten jedoch dafür, dass zwischen 54 und 86 % des Pollens von den Pflanzen abgewaschen wurde. Nach eigenen Beobachtungen an Storchschnabel, der direkt auf einem Maisfeld wuchs, kann ein heftiger Regenschauer den Pollen sogar komplett von Pflanzenblättern entfernen.

Im Jahr 2002 wurden Pollendichten lediglich für eine Expositionszeit von 24 Stunden festgestellt. Innerhalb des Maisfeldes lag der Wert bei 96 und 32 Meter außerhalb noch bei knapp 6 Pollenkörnern pro Quadratzentimeter. Eine Reihe weiterer Untersuchungen bestätigen, dass die Pollenmenge, die außerhalb von Maisfeldern deponiert wird mit zunehmender Entfernung zum Feldrand rapide abnimmt. WRAIGHT et al. (2000) führten Versuche mit Objektträgern durch, die mit Vaseline bestrichen waren. Hierbei nahm die aufgefangene Pollenmenge von durchschnittlich 210 bzw. 100 im Abstand von einem halben Meter zum Feldrand auf 26 bzw. 11 Pollenkörner in einer Entfernung von 7 Metern zum Feldrand ab. Eine ähnlich starke Abnahme der Pollendichte mit zunehmender Entfernung zu einem blühenden Maisfeld konnten STANLEY-HORN et al. (2001) sowie PLEASANTS et al. (2001) auch direkt auf den Blättern von eingepflanzten *Asclepias syriaca*-Blättern

nachweisen. Verglichen mit der Pollenkonzentration in einem Abstand von einem Meter zu einem stäubenden Maisfeld errechneten EMBERLIN et al. (1999) durchschnittlich 2 % dieser Menge in 60, 1,1 % in 200 und 0,5 - 0,75 % in 500 m Entfernung. RAYNOR et al. (1972) stellten in einer Entfernung von 60 m zum Maisfeld nur noch 1 % des Vergleichswertes fest, und HANSEN & OBRZYCKI (1999) konnten schon in einem Abstand von 5 Metern zum Feldrand keinen Pollen auf den Blättern von Schwalbenwurz-Gewächsen mehr nachweisen. Wie Auskreuzungs-Ereignisse belegen ist es möglich, dass einzelne Maispollen u.U. mehrere hundert Meter weit verdriftet werden können, was jedoch toxikologisch für Schmetterlinge unbedenklich sein dürfte.

Die Ergebnisse zur Pollenexposition in bestimmten Entfernungen zum Maisfeld stellen eine Ergänzung zu den für einzelne Schmetterlingsarten im Labor ermittelten LD₅₀-Werten dar. Werden diese Daten miteinander verknüpft, so lässt sich das Gefährdungsrisiko der einzelnen Arten durch Bt-176-Mais abschätzen. Auf diesen Aspekt wird in der abschließenden Diskussion näher eingegangen.

4.2. Biotests unter freilandnahen Bedingungen

Material & Methoden

Um zu überprüfen, welche Effekte der Anbau von Bt-Mais auf Schmetterlingslarven unter Freilandbedingungen haben kann, wurden in den Jahren 2000, 2001 und 2002 Freilandversuche in der Nähe von Niedernberg (Kreis Miltenberg, Bayern) durchgeführt. Hierzu wurden Maisparzellen mit einer Größe von 40 mal 40 Metern praxisnah ausgesät. Die Parzellen lagen mindestens 150 Meter auseinander und waren von Wiesen umgeben. In den Jahren 2000 und 2001 standen 3 Parzellen zur Verfügung. Auf 2 Parzellen wurde die Sorte PACTOL CB (Bt-176-Mais) angebaut, auf dem dritten Feld wuchs die isogene Linie PACTOL (Bt-). Im Jahr 2002 wurde auf zwei Parzellen die Sorte VALMONT (Bt-176-Mais) und auf zwei weiteren Flächen die konventionelle Sorte PRELUDE (isogene Linie) angebaut. Mit Beginn der Maisblüte wurden getopfte Kohl- (Variante: Chinakohl) und Brennesselpflanzen in verschiedenen Entfernungen zum Feldrand aufgestellt, um so eine möglichst praxisnahe Kontamination der Raupenfutterpflanzen mit Pollen zu gewährleisten. Im Jahr 2002 wurde ein Teil der Pflanzen innerhalb des Feldes platziert und zwar mit einem Abstand von 5 Metern zum Feldrand. Der größte Teil stand allerdings außerhalb des Feldes. Die ersten Pflanzen befanden sich in einem Meter Entfernung zum Maisfeld, die zweite Gruppe wurde in einem Abstand von 2 Metern aufgestellt, die dritte Gruppe in 4, die vierte in 8, die fünfte in 16 und die letzte Gruppe in 32 Metern Entfernung zum Feldrand. Die gleichen Abstände wurden auch im Jahr 2001 gewählt. Im Jahr 2000 betrug die Distanzen zum Feldrand 1,5, 3, 6, 12, 24, 48 und 90 Meter. Innerhalb vom Maisfeld wurden keine Pflanzen aufgestellt.

Zur Simulation eines worst-case-szenarios wurden die Pflanzen stets so aufgestellt, dass sie sich in der Hauptwindrichtung befanden. Um neben der Entfernung als weiteren Faktor die (Expositions)zeit untersuchen zu können, verblieben die Pflanzen unterschiedlich lange auf

dem Feld. Anschließend wurden sie in das Labor überführt, wo einzeln abgewogene Larven von *Aglais urticae*, *Inachis io*, *Pieris rapae* und *Pieris brassicae* auf die Pflanzen gesetzt wurden. Um zu verhindern, dass die Raupen z. B. Spinnen oder Florfliegenlarven zum Opfer fielen, waren zuvor alle Prädatoren abgesammelt worden. Um ein Entweichen der Raupen zu verhindern, wurden die Pflanzen in 40 cm hohe Plexiglaszylinder mit einem Durchmesser von 25 cm gestellt, die mit einer feinen Fliegengaze verschlossen waren. Nach ein bzw. 2 Wochen wurden alle überlebenden Larven gewogen und somit Gewichtszunahme und Überlebensrate bestimmt. Im Gegensatz zu den Laborbiotests wird bei den Freilandbiotests bewusst nicht von Mortalitätsrate gesprochen, da tote Larven fast nie festgestellt werden konnten. In den Jahren 2000 und 2001 wurde die Entwicklung der überlebenden Larven als prozentuale Gewichtszunahme ermittelt. Eine Gewichtszunahme von 100 % entspricht dabei stets einer Verdopplung des Ausgangsgewichts. Im Jahr 2002 wurde das Larvalgewicht am Ende des Biotests festgehalten, da hier ausschließlich neonate Raupen verwendet wurden, die zu Biotestbeginn nicht gewogen worden waren. In den Jahren 2000 und 2001 verblieben die Larven jeweils eine Woche auf den Pflanzen. Im Jahr 2002 betrug die Dauer des Biotests 14 Tage, da hier mit frisch geschlüpften Individuen gearbeitet wurde. Falls einzelne Larvengruppen ihre Futterpflanze bereits vor Ablauf der Frist komplett verzehrt hatten, so wurden sie bis Ende des Biotests mit unbehandeltem Futter nachgefüttert. Als Kontrollvariante fungierten ebenfalls eingetopfte Pflanzen, die aber nicht auf dem Feld gestanden hatten. Mit Hilfe der unbehandelten Kontrolle sollte die Vitalität der im Biotest verwendeten Larven überprüft werden. Analog zu den Laborversuchen wurden bei den Freilandbiotests solche Wiederholungen nicht gewertet, in denen die Kontrollmortalität über 20 % lag.

Um Unterschiede bezüglich Überlebensrate und Gewichtszunahme in den verschiedenen Varianten zu untersuchen, wurden Varianzanalyse (ANOVA, PROC GLM), sowie Student-Newman-Keuls- und Tukey-Test zum Vergleich der Mittelwerte, verwendet (SAS-Programm 8.01).

Ergebnisse

Im Verlauf der Freilandversuche tauchten eine Reihe von methodischen Schwierigkeiten auf, auf die in der anschließenden Diskussion noch näher eingegangen wird. Einige der Probleme konnten zwar in der zweiten und dritten Freilandsaison gelöst werden, dennoch ließ sich für die BT-Varianten keine statistisch signifikante Relation zwischen durchschnittlicher Gewichtszunahme bzw. Überlebensrate der Larven und der Entfernung ihrer Futterpflanzen zum Maisfeld feststellen. Aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede zwischen den Varianten werden hier nur Ergebnisse der dritten Freilandsaison (Jahr 2002) wiedergegeben, in der zumindest einige methodische Probleme ausgeräumt werden konnten.

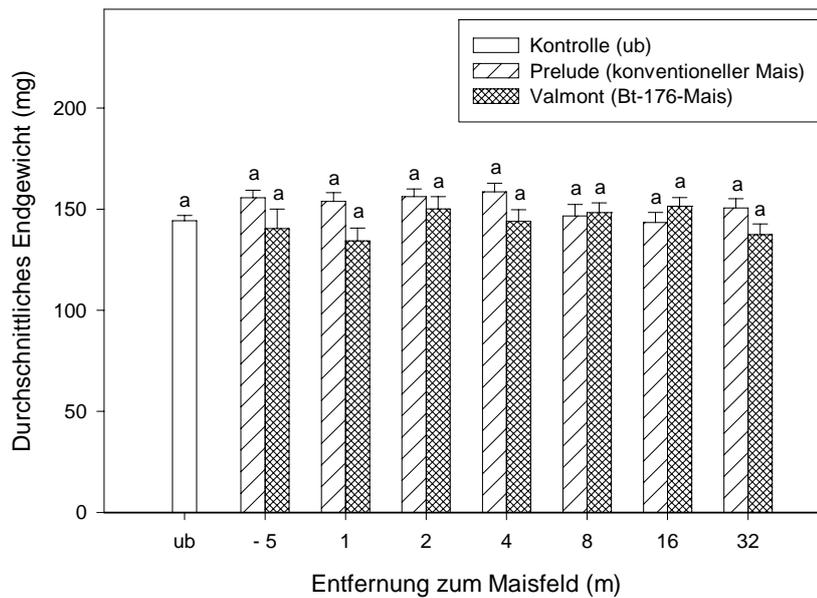


Abbildung 58: Durchschnittliches Endgewicht (mg \pm SF) von neonaten *Pieris rapae*-Raupen (L_1) auf getopften Kohlpflanzen, die im Freilandversuch 2002 für 24 Stunden in verschiedenen Entfernungen zum Rand eines blühenden Maisfeldes standen (PRELUDE (Bt-) oder VALMONT (Bt+)). Die Dauer des Biotests betrug 14 Tage. Die Kontrollpflanzen (ub) befanden sich zu keinem Zeitpunkt im Freiland. Es traten keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (F (14 FG) = 1,96; p = 0,0191; Student-Newman-Keuls-Test).

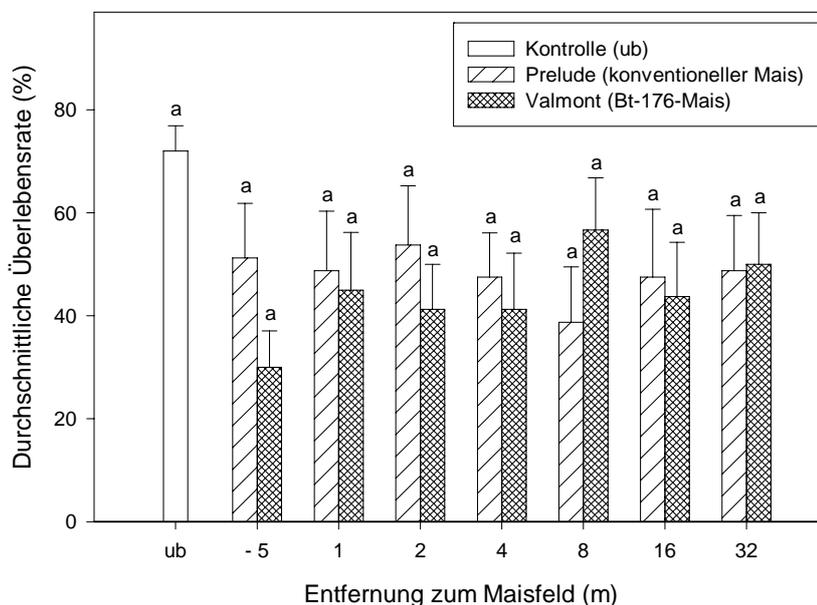


Abbildung 59: Durchschnittliche Überlebensrate (% \pm SF) von neonaten *Pieris rapae*-Raupen (L_1) auf getopften Kohlpflanzen, die im Freilandversuch 2002 für 24 Stunden in verschiedenen Entfernungen zum Rand eines blühenden Maisfeldes standen (PRELUDE (Bt-) oder VALMONT (Bt+)). Die Dauer des Biotests betrug 14 Tage. Die Kontrollpflanzen (ub) befanden sich zu keinem Zeitpunkt im Freiland. Es traten keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (F (14 FG) = 1,20; p = 0,2851; Student-Newman-Keuls-Test).

Zwischen dem durchschnittlichen Endgewicht der Kontrolltiere und aller übrigen Varianten gab es nur sehr geringe Unterschiede, die sich als statistisch nicht signifikant herausstellten. Bei den BT-Varianten gab es keine Relation zwischen durchschnittlichem Endgewicht der Larven und der Entfernung ihrer Futterpflanze zum Maisfeld.

Bezüglich der Überlebensrate von neonaten *Pieris rapae*-Larven traten im Freilandversuch 2002 deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten auf, die sich aber als statistisch nicht signifikant erwiesen. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war die Überlebensrate in allen anderen Varianten geringer, was auf die Anwesenheit von Prädatoren zurückzuführen ist. In der am stärksten pollenexponierten BT-Variante (VALMONT; - 5m) war mit nur 30 % die geringste Überlebensrate aller Varianten zu verzeichnen. In der vergleichbaren konventionellen Variante (PRELUDE; - 5 m) war die Überlebensrate mit 51,25 % deutlich höher. In der unbehandelten Kontrolle betrug sie 72 %. Während in den PRELUDE-Varianten (Bt-) keine Relation zwischen Überlebensrate und Entfernung der Pflanzen zum Maisfeld zu erkennen war, gab es in den BT-Varianten mit zunehmender Entfernung zum Feldrand einen schwachen Trend zu einer höheren Überlebensrate.

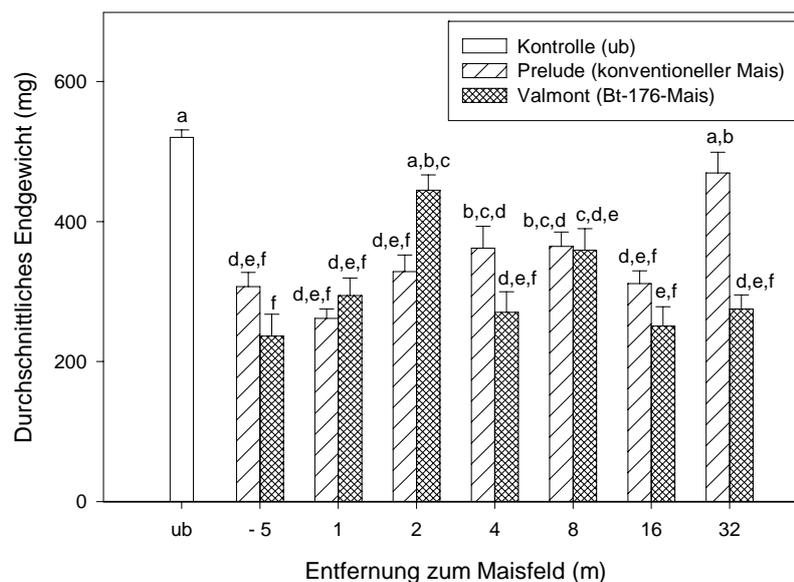


Abbildung 60: Durchschnittliches Endgewicht (mg \pm SF) von neonaten *Inachis io*-Raupen (L_1) auf getopften Brennnesselpflanzen, die im Freilandversuch 2002 für 24 Stunden in verschiedenen Entfernungen zum Rand eines blühenden Maisfeldes standen (PRELUDE (Bt-) oder VALMONT (Bt+)). Die Dauer des Biotests betrug 14 Tage. Die Kontrollpflanzen (ub) befanden sich zu keinem Zeitpunkt im Freiland. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind statistisch nicht signifikant ($F(14 \text{ FG}) = 18,06$; $p < 0,0001$, Tukey-Test).

Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle war das durchschnittliche Endgewicht von *Inachis io*-Raupen in fast allen anderen Varianten niedriger, was vermutlich auf die geringe Qualität der Brennnessel-Pflanzen aus dem Freiland zurückzuführen ist. Diese Unterschiede waren fast immer hoch signifikant. Dagegen waren die Differenzen zwischen BT- und konventioneller

Variante derselben Entfernung statistisch meist nicht abzusichern. Am geringsten war das Gewicht für die am stärksten pollenexponierte BT-Variante (VALMONT; - 5 m). Dies weist darauf hin, dass *Inachis io*-Raupen zumindest in direkter Umgebung von Bt-176-Maisfeldern geschädigt werden könnten.

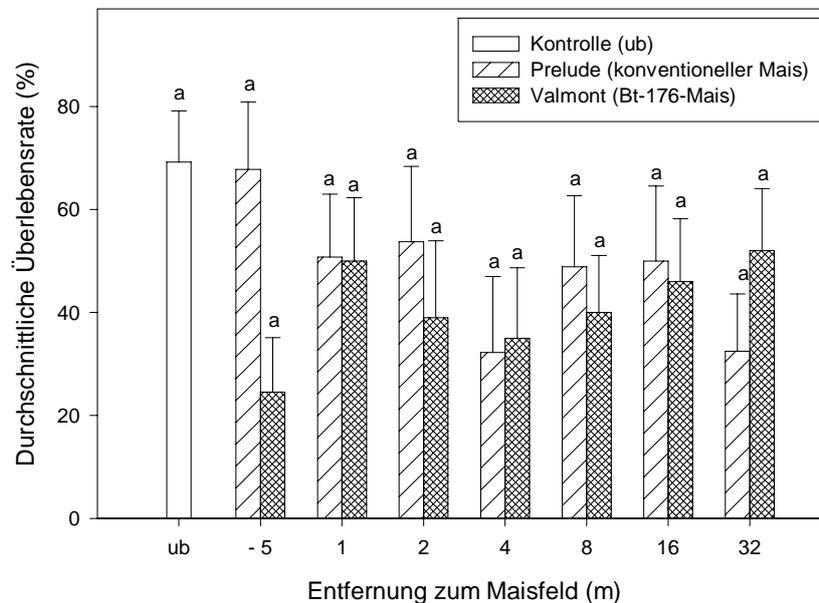


Abbildung 61: Durchschnittliche Überlebensrate (% \pm SF) von neonaten *Inachis io*-Raupen (L₁) auf getopften Brennnesselpflanzen, die im Freilandversuch 2002 für 24 Stunden in verschiedenen Entfernungen zum Rand eines blühenden Maisfeldes standen (PRELUDE (Bt-) oder VALMONT (Bt+)). Die Dauer des Biotests betrug 14 Tage. Die Kontrollpflanzen (ub) befanden sich zu keinem Zeitpunkt im Freiland. Es traten keine statistisch signifikanten Unterschiede auf (F (14 FG) = 0,86; p = 0,6081, Student-Newman-Keuls-Test).

Bezüglich der Überlebensrate gab es zwischen den Varianten z. T. große Unterschiede, die aber statistisch nicht signifikant waren. Am höchsten lag die Überlebensrate mit fast 70 % in der Kontrolle (ub). In fast allen übrigen Varianten war sie deutlich niedriger. Der geringste Wert trat mit knapp 25 % in der am stärksten pollenexponierten BT-Variante (VALMONT; - 5 m) auf. In der vergleichbaren konventionellen Variante lag die Überlebensrate dagegen bei fast 70 %. Tendenziell überlebten in den BT-Varianten mit zunehmender Distanz zum Feldrand mehr Larven. Die fehlende statistische Signifikanz für die beträchtlichen Unterschiede der Überlebensraten könnte damit erklärt werden, dass in vielen Varianten bei einzelnen Wiederholungen (Pflanzen) keine Larven überlebten. Z. T. ist dies sicherlich auf Prädatoren zurückzuführen. Im Falle der BT-Varianten ist es aber auch möglich, dass Brennnessel-Pflanzen in nächster Nachbarschaft bzw. innerhalb des Maisfeldes so stark mit Pollen bedeckt waren, dass die sehr empfindlichen neonaten Larven daran starben.

Diskussion

Aus den Laborbiotests war bekannt, dass alle im Freilandversuch getesteten Arten gegenüber dem Pollen der transgenen Maislinie Bt-176 empfindlich reagieren. Negative Effekte durch

die Verfütterung von konventionellem Maispollen ließen sich dagegen nie beobachten. Es wäre daher bei den Larven der BT-Varianten im Vergleich zu unbehandelter Kontrolle, sowie den Nicht-BT-Varianten eine höhere Mortalitätsrate bzw. eine geringere Gewichtszunahme zu erwarten gewesen, falls Pollen auf den ausgebrachten Raupen-Futterpflanzen vorhanden war. Durch optische Kontrolle konnte Maispollen auf den Blättern beider Versuchspflanzen (Chinakohl und Brennesseln) nachgewiesen werden. Im Fall von *Urtica dioica* lagerte sich der Pollen hauptsächlich in den Blattadern ab. Auf den Chinakohlpflanzen fing sich der Pollen zum einen in Vertiefungen der grünen Blattteile und zum anderen in Längsrillen des Stängels. Eine Quantifizierung des Pollens auf den Versuchspflanzen fand nicht statt. Generell nahm die Pollenmenge auf den Pflanzen mit zunehmender Entfernung zum Maisfeld stark ab. Aus diesem Grund wäre zu erwarten gewesen, dass pollenbedingte Effekte am stärksten innerhalb des Bt-Maisfeldes auftreten und mit zunehmender Entfernung zum Feldrand geringer werden. Diese Annahmen konnten jedoch im Rahmen der hier durchgeführten Freilandversuche nicht bestätigt werden. Eine eindeutige Relation zwischen Variante und Mortalitätsrate bzw. Gewichtszunahme der Larven ließ sich nicht nachweisen. Mögliche Ursachen hierfür sollen anschließend diskutiert werden.

Im Laufe der Freilandversuche traten eine Reihe von Problemen auf, die durch Änderungen im Versuchsdesign aber nur z. T. behoben werden konnten. Oftmals konnte nur ein Teil der Larven zum Ende des Versuchs wiedergefunden werden. Dabei ließen sich tote Individuen fast nie nachweisen. Aus diesem Grund wird statt der üblicherweise angegebenen Mortalitätsrate die durchschnittliche Überlebensrate pro Variante genannt. Wie anhand verschiedener Beobachtungen bestätigt werden konnte, gehen Verluste von Larven z. T. auf das Konto von Prädatoren wie Spinnen, Wanzen oder Florfliegenlarven. Zwar wurden die aus dem Freiland geholten Pflanzen vor dem Aufsetzen der Schmetterlingslarven 2 bis dreimal nach Prädatoren abgesucht, es ließen sich aber nicht immer alle unbetenen Gäste finden. Auch ZANGERL et al. (2001) berichten im Rahmen ihrer Freilandversuche mit 2 Schmetterlingsarten von Problemen, die durch Prädatoren hervorgerufen wurden. Ein weiteres Problem bei den hier durchgeführten Arbeiten war, dass Larven durch Ritzen zwischen Tontopf und Zylinder entkamen oder im Wasser des Untersetzers ertranken. Besonders große Probleme traten in der ersten Freilandsaison auf (Jahr 2000).

Hier waren die Larven zu Beginn der Biotests häufig schon so groß, dass sie sich noch vor Ablauf des Tests verpuppten. Da Raupen vor der Verpuppung meist eine zeitlang herumlaufen, entkamen viele Tiere oder ertranken wie oben geschildert. Wurden verschieden schwere Larven verwendet, so konnte nur die prozentuale Gewichtszunahme verglichen werden. Dennoch kann auch ein solcher Vergleich zu Verzerrungen führen, da jüngere Larven im Vergleich zu älteren Tieren im gleichen Zeitraum stärker an Gewicht zulegen können. Im Jahr 2002 wurden dann ausschließlich Tests mit neonaten Larven durchgeführt, so dass Probleme im Zusammenhang mit Verpuppung oder unterschiedlicher Gewichtszunahme nicht mehr auftraten.

Ein generelles Problem bei den Freilandversuchen lag darin, dass zum Zeitpunkt der Maisblüte sowohl ausreichend Larven in der richtigen Größe, als auch getopfte und hinreichend an Freilandbedingungen adaptierte Pflanzen vorhanden sein mussten. Besonders

im Jahr 2001 standen nicht genügend geeignete Raupen zur Verfügung, so dass auf die Varianten mit konventionellem Mais verzichtet wurde. Darüber hinaus gab es vor allem mit den Chinakohlpflanzen immer wieder Schwierigkeiten. Zum einen wurden die Blätter von Schnecken befallen, zum anderen waren die Wurzeln von diversen Schädlingen befallen. Probleme gab es auch wenn die Pflanzen im Freiland standen. Je weiter die Entfernung vom Maisfeld war, desto stärker trockneten die Pflanzen aus. Bei heftigem Wind wurden die Blätter der Chinakohlpflanzen teilweise sogar abgerissen. Derartig geschädigte Pflanzen boten den Larven natürlich keine optimalen Entwicklungsmöglichkeiten. Problematisch war darüber hinaus, dass Pollen auf derartig exponierten Pflanzen schlecht liegen blieb, bzw. durch den Wind auch leicht wieder entfernt werden konnte. Im Jahr 2002 wurde diesen Problemen insofern Rechnung getragen, dass der Mähzeitpunkt für die Wiese, auf der die Pflanzen standen, so gewählt wurde, dass die getopften Versuchspflanzen ungefähr dieselbe Höhe aufwiesen wie die umgebende Vegetation.

Bei den BT-Varianten gab es keine statistisch signifikante Relation zwischen durchschnittlicher Gewichtszunahme bzw. Überlebensrate der Larven und der Entfernung ihrer Futterpflanzen zum Maisfeld. Dennoch weisen die im Jahr 2002 mit *Inachis io* und *Pieris rapae* durchgeführten Versuche darauf hin, dass auch unter Freilandbedingungen ein negativer Einfluss (höhere Mortalitätsrate, verringertes Wachstum) in direkter Nachbarschaft zu Bt-176-Maisfeldern nicht auszuschließen ist (s. Abb. 59, 60 und 61). Im Jahr 2002 war der Trend zu beobachten, dass Larven der BT-Varianten mit zunehmender Entfernung vom Feldrand eine höhere Überlebensrate zeigten. Dass sich dieser Trend als statistisch nicht signifikant herausstellte kann damit erklärt werden, dass in vielen Varianten einige Wiederholungen (Pflanzen) ohne überlebende Larven registriert wurden.

Die Ergebnisse der 2002 durchgeführten Freiland-Biotests deuten darauf hin, dass durch die von 2001 auf 2002 durchgeführten methodischen Änderungen (Verwendung neonater Larven und angepasster Mahdtermin) bestimmte Probleme vermieden werden konnten. Allerdings ließ sich immer noch keine eindeutige Dosis (hier: Entfernung)-Wirkungs-Relation herstellen. Dies bedeutet, dass die hier entwickelten Testmethoden zur Abschätzung der Effekte von Bt-Mais unter natürlichen Bedingungen noch nicht praxistauglich sind und verbessert werden müssten. In den hier durchgeführten Versuchen wurden aus Platzgründen lediglich 40 mal 40 m große Maisfelder angelegt. Getopfte Pflanzen wurden in bis zu 32 Meter (2001, 2002) oder sogar 90 Meter (2000) Entfernung zum Rand des Maisfeldes aufgestellt. In der Praxis sind die Abmessungen der Felder oft wesentlich größer. Probleme mit Pollen von verdriftetem Bt-Mais könnten v.a. dort auftreten, wo ein solches Feld direkt an einer Hecke oder einem z. B. mit Brennesseln bewachsenen Graben steht. Es wird angeregt die hier geschilderten Versuche mit weitaus größeren Maisfeldern zu wiederholen, da unter diesen Voraussetzungen eine vermehrte Pollendrift und somit auch eine höhere Pollenbedeckung der Versuchspflanzen möglich erscheint. Ferner sollten die getopften Versuchspflanzen lediglich bis in einer Entfernung von 4 m zum Rand des Maisfeldes aufgestellt werden, da mit zunehmender Entfernung zum Feld das Problem der Austrocknung immer gravierender wird. Um einem Austrocknen der getopften Pflanzen entgegen zu wirken, erscheint es sinnvoll die Pflanzen einzugraben. Ferner sollte die umgebende Vegetation mindestens die gleiche Höhe

haben. Wiederholt ließ sich die Beobachtung machen, dass sich Maispollen vor allem auf niedrigen, krautigen Pflanzen akkumulieren kann. Es ist zu vermuten, dass Pollen mit dem Wind zwar relativ gut auf diese Pflanzen gelangen kann, allerdings nicht wieder von diesem fortgetragen wird. Prädatoren könnten von getopften Pflanzen statt durch Absammeln auch durch Verwendung von CO₂ entfernt werden.

Alternativ zu den Versuchen mit getopften Pflanzen erscheint auch ein reiner Freilandansatz sinnvoll. Es wird vorgeschlagen im Abstand von einem, zwei und vier Metern vom Rand eines blühenden Maisfeldes Brennesseln anzupflanzen oder einzusäen und auf diese Pflanzen zu Beginn der Maisblüte eine große Zahl von Tagpfauenaugenlarven (L₁) zu platzieren. Die Tiere könnten dort für ca. 2 Wochen bis zum Ende der Maisblüte belassen werden. Mit Sicherheit gäbe es auch hier Probleme mit Prädatoren, beim Einsatz von mehreren hundert Larven pro Entfernung könnten solche Effekte aber vermutlich vernachlässigt werden. Um Vögel von den Raupen fernzuhalten könnten Netze verwendet werden, die aber den Pollenflug nicht behindern dürften. Die vorgeschlagenen Entfernungen zum Maisfeld von einem, zwei und vier Metern ergeben sich aus den vorliegenden Erkenntnissen zur Pollendeposition. Da mit Hilfe von Laborversuchen der LD₅₀-Wert für Tagpfauenaugen-Raupen ermittelt werden konnte, ist ein direkter, d. h. letaler Einfluss auf die Larven nur in unmittelbarer Nähe zum Maisfeld zu erwarten.

Nur bei wenigen Freilandversuchen ließen sich bisher eindeutige Hinweise darauf finden, dass Schmetterlingslarven durch den Anbau von transgenem Bt-Mais geschädigt werden können. WRIGHT et al. (2000) berichten bei Untersuchungen mit der transgenen Linie MON810 zwar von einer hohen Sterblichkeit der untersuchten *Papilio polyxenes*-Larven, allerdings war keine Relation zwischen Mortalitätsrate und Entfernung zum Feldrand bzw. Pollenbedeckung zu beobachten. STANLEY-HORN et al. (2001) verglichen im Rahmen einer Feldstudie Überlebensrate und Gewichtszunahme neonater *Danaus plexippus*-Larven unter dem Einfluss des Pollens von 3 verschiedenen Maislinien (Bt-11, MON810 und Bt-176) bzw. des Insektizids λ -cyhalothrin. Im Gegensatz zu Versuchen mit den Linien Bt-11 und MON810 waren bei Tests mit der Linie Bt-176 eindeutige Effekte nachweisbar. Hier lag die Überlebensrate der Larven 6 Tage nach Beginn der Maisblüte 10 Meter innerhalb des Feldes bei etwas über 10 %. 10 Meter außerhalb des Maisfeldes überlebten dagegen mehr als 70 % der Tiere. 9 Tage nach Beginn der Maisblüte betrug die Überlebensrate der Larven 3 Meter innerhalb 20 und 1 Meter außerhalb des Feldes 55 %. Dabei nahmen die überlebenden Individuen außerhalb des Maisfeldes jeweils wesentlich stärker an Gewicht zu als innerhalb des Feldes. ZANGERL et al. (2001) berichten aus einer Feldstudie mit neonaten Raupen von *Danaus plexippus* und *Papilio polyxenes* von sehr hoher Larvalsterblichkeit. Es ließ sich keine Beziehung zwischen Mortalitätsrate und Entfernung der Raupenfutterpflanzen zum Rand des Maisfeldes (Linie Bt-176) herstellen. Allerdings wurde zumindest für *P. polyxenes*-Larven eine signifikante Verringerung der Gewichtszunahme festgestellt, die höchstwahrscheinlich durch die Pollenexposition hervorgerufen wurde. Larven, deren Futterpflanzen (*Pastinaca sativa*) 7 Meter vom Rand des Bt-176-Maisfeldes entfernt waren, hatten nach 5 Tagen eine dreimal so hohe Biomasse erreicht wie die Tiere, deren Futterpflanzen nur 0,5 Meter vom Feldrand entfernt waren. PILCHER et al. (2001)

untersuchten die Effizienz der Pollendrift von transgenem Mais (Bt-11 und Bt-176) hinsichtlich der Bekämpfung von Maiszünslerlarven in angrenzenden Reihen von nicht-transgenem Mais. Hierbei ließ sich keine Relation zwischen befallenen konventionellen Maispflanzen und deren Entfernung zu Bt-Mais ableiten.

4.3. Kartierung zur Erfassung der in der Agrarlandschaft vorkommenden heimischen Lepidopterenfauna

In den Sommermonaten der Jahre 2001 und 2002 fand in der Nähe von Niedernberg (Kreis Miltenberg, Bayern) eine Bestandsaufnahme von in der Agrarlandschaft vorkommenden Tag- und Nachfalterarten statt. Hiermit sollte festgestellt werden, welche Lepidopterenarten als Raupen mit Maispollen in Kontakt kommen und daher möglicherweise durch den Anbau von Bt-Mais gefährdet werden könnten. Sowohl Tag- als auch Nachfalter wurden als Imagines erfasst. Später wurden für alle nachgewiesenen Arten anhand von Literaturzitate (EBERT, 1991 bis 2001; WEIDEMANN, 1988) Angaben zu Phänologie, Habitat und Verhalten der Larven ermittelt. Die Aufnahme von tagaktiven Schmetterlingen erfolgte durch eine Begehung von Wiesen und Feldrändern. Um eine Artbestimmung vornehmen zu können, wurden die Tiere zunächst mit einem Netz gefangen. Der Fang von nachaktiven Arten erfolgte mit Hilfe einer selbstgebauten Lichtfalle, die 2 Leuchtstoffröhren von jeweils 20 Watt mit unterschiedlichen Spektraleigenschaften enthielt. Zum einen handelte es sich um eine superaktinische Röhre, zum anderen um eine Schwarzlicht-Röhre mit hohem UV-Anteil. Alle Individuen, für die eine eindeutige Artdetermination nicht möglich war, wurden Herrn Dr. W. NÄSSIG vom Forschungsinstitut Senckenberg in Frankfurt am Main zu Bestimmungszwecken vorgelegt. Im Jahr 2001 dauerte die Aufnahme vom 2. Juni bis zum 14. August und im Jahr 2002 vom 5. Juni bis zum 16. August.

Insgesamt ließen sich 158 Lepidopterenarten nachweisen, die sich auf 33 tag- und 125 nachtaktive Spezies aufteilten. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Arten nach gegenwärtig gültiger Nomenklatur aufgelistet. Die Angaben zur Larvalphänologie beziehen sich auf EBERT (1991 bis 2001). Falls, wie für die erste Art in der Liste (*Carterocephalus palaemon*) eine Larvalphänologie von 6-Winter-5 angegeben wird, so bedeutet dies, dass sich die Larvalphase von Juni bis Mai des darauffolgenden Jahres erstreckt und somit die Raupe das Überwinterungsstadium darstellt. Basierend auf Angaben zu Larvalphänologie und Raupen-Habitat lässt sich für die einzelnen Arten die Wahrscheinlichkeit abschätzen, mit der die Larven mit Maispollen in Kontakt kommen dürften. Alle Arten, für die die Wahrscheinlichkeit relativ hoch ist, dass Larven Maispollen aufnehmen könnten, wurden der Kategorie III zugeordnet. Als Beispiel hierfür kann das Tagpfauenauge (*Inachis io*) genannt werden, da die Larven der zweiten Generation zeitgleich mit der Maisblüte auftreten können und *Urtica dioica*, die Raupen-Futterpflanze u. a. auch in der Agrarlandschaft anzutreffen ist. Für Spezies der Kategorie II erscheint die Möglichkeit der Pollen-Aufnahme relativ unwahrscheinlich, kann aber nicht vollkommen ausgeschlossen werden. Beispielhaft kann hier das Landkärtchen (*Araschnia levana*) genannt werden. Zwar treten Raupen dieser Art von Mai bis September auf, allerdings werden meist Brennesselfluren an Waldrändern oder

entlang von Waldwegen zur Eiablage genutzt. Für Angehörige der Kategorie I kann eine Pollen-Exposition der Larven ausgeschlossen werden (z. B. reine Waldarten). Für alle Arten, die nicht der Kategorie III zugeordnet wurden, findet sich in der Spalte A (Anmerkungen) der Hinweis ob eine Einordnung in die Kategorien I oder II aufgrund des Larvalhabitats (a), der Larvalphänologie (b) oder wegen charakteristischer Verhaltensweisen der Larven (c) (z. B. unterirdische oder minierende Lebensweise) vorgenommen wurde. Zusätzlich finden sich Angaben zum Rote Liste-Status der einzelnen Arten in Deutschland (RL-D), Hessen (RL-H) und Bayern (RL-B).

Tabelle 7: In den Jahren 2001/ 2002 nachgewiesene Schmetterlingsarten mit Angaben zur Expositions-Wahrscheinlichkeit von Larven mit Maispollen. LP = Larvalphänologie; EPW = Expositions-wahrscheinlichkeit für Maispollen; A = Anmerkungen. Erläuterung zu RL-Einträgen: x = wird in mind. einem Bundesland in der RL geführt; 1 = vom Aussterben bedroht, 2 = Stark gefährdet, 3 = Gefährdet, V = Art der Vorwarnliste. ZO: Zielorganismus

Nr.	Art	LP	EPW	A	RL-D	RL-H	RL-B
Hesperiidae							
1	<i>Carterocephalus palaemon</i>	6-Winter-5	III		x		
2	<i>Ochlodes venatus</i>	7-Winter-5	III		x		
Lycaenidae							
3	<i>Lysandra bellargus</i>	6-Winter-5	III		x	1	2
4	<i>Polyommatus icarus</i>	6-Winter-5	III		x		
5	<i>Thecla betulae</i>	4-7	II	a	x		
Nymphalidae							
6	<i>Aglais urticae</i>	4-7	III		x		
7	<i>Aphantopus hyperantus</i>	7-Winter-5	III		x		
8	<i>Araschnia levana</i>	5-9	II	a	x		
9	<i>Argynnis paphia</i>	8-Winter-6	I	a, b	x	V	
10	<i>Clossiana selene</i>	6-Winter-5	III		x	3	
11	<i>Coenonympha arcania</i>	7-Winter-5	III		x	V	
12	<i>Coenonympha pamphilus</i>	7-Winter-5	III				
13	<i>Cynthia cardui</i>	6-8	III		x		
14	<i>Inachis io</i>	5-8	III				
15	<i>Issoria lathonia</i>	9-W-4, 6-7	III		x		
16	<i>Lasiommata megera</i>	5-9	III		x	V	V
17	<i>Maniola jurtina</i>	8-Winter-5	III		x		
18	<i>Melanargia galathea</i>	8-5	III		x		
19	<i>Mellicta athalia</i>	6-Winter-5	III		x	3	
20	<i>Mesoacidalia aglaia</i>	8-Winter-6	II	b	x	3	V
21	<i>Pararge aegeria</i>	5-9	II	a	x		
22	<i>Polygonia c-album</i>	5-8	II	a	x		
23	<i>Vanessa atalanta</i>	6-10	III				
Papilionidae							
24	<i>Papilio machaon</i>	5-9	III		x	3	V
Pieridae							
25	<i>Anthocharis cardamines</i>	5-8	III		x		
26	<i>Colias hyale</i>	6-10	III		x		
27	<i>Gonepteryx rhamni</i>	5-7	II	a	x		
28	<i>Leptidea sinapis / reali</i>	5-9	III		x		
29	<i>Pieris brassicae</i>	6-10	III				
30	<i>Pieris napi</i>	5-9	III				
31	<i>Pieris rapae</i>	5-10	III				

Fortsetzung Tabelle 7

Nr.	Art	LP	EPW	A	RL-D	RL-H	RL-B
	Zygaenidae						
32	<i>Zygaena filipendulae</i>	6-Winter-5	III		x	V	
33	<i>Zygaena lonicerae</i>	7-Winter-6	III		x	3	
	Arctiidae						
34	<i>Arctia caja</i>	8-W-6	II	b	x		
35	<i>Atolmis rubricollis</i>	7-10	I	a	x		
36	<i>Diacrisia sannio</i>	8-W-5	III		x		
37	<i>Diaphora mendica</i>	7-9	III				V
38	<i>Eilema complana</i>	8-W-6	I	a			
39	<i>Euplagia quadripunctaria</i>	9-W-6	I	b	x		
40	<i>Phragmatobia fuliginosa</i>	7-W-4	III		x		
41	<i>Rhyparia purpurata</i>	9-W-5	I	b	x		3
42	<i>Spilosoma lubricipeda</i>	6-10	III		x		
43	<i>Spilosoma luteum</i>	6-10	III		x		
	Cossidae						
44	<i>Cossus cossus</i>	8-W-5, (2 – 4 mal)	I	a, c	x		
	Drepanidae						
45	<i>Drepana falcataria</i>	6-10	I	a			
46	<i>Habrosyne pyritoides</i>	7-9	II	a	x		
47	<i>Theteella fluctuosa</i>	7-9	I	a			V
48	<i>Thyatira batis</i>	6-9	II	a	x		
49	<i>Watsonalla cultraria</i>	6-10	I	a			
	Geometridae						
50	<i>Epeira syringaria</i>	8-W-6	I	a	x		
51	<i>Biston betularia</i>	7-10	III				
52	<i>Bupalus piniarius</i>	7-10	I	a			
53	<i>Cabera pusaria</i>	6-9	II	b			
54	<i>Campaea margaritata</i>	8-W-7	II	a			
55	<i>Camptogramma bilineatum</i>	8-W-7	III				
56	<i>Chiasmia clathrata</i>	5-9	III				
57	<i>Ennomos autumnaria</i>	4-6	I	b			V
58	<i>Epirrhoe alternata</i>	6-9	III				
59	<i>Eupithecia extraversaria</i>	8	III		x		
60	<i>Geometra papilionaria</i>	Herbst-W-5/6	I	a (b)			
61	<i>Idaea aversata</i>	9-W-5, 7-8	III				
62	<i>Macaria liturata</i>	6-7	I	a			
63	<i>Macaria wauaria</i>	4-6	I	b			
64	<i>Lomaspilis marginata</i>	6-9	II	a			
65	<i>Peribatodes secundaria</i>	8-W-6	I	a			

Fortsetzung Tabelle 7

Nr.	Art	LP	EPW	A	RL-D	RL-H	RL-B
66	<i>Plagodis dolabraria</i>	6-7	I	a			
67	<i>Timandra comae</i>	7-W-5	III				
68	<i>Xanthorhoe ferrugata</i>	6-7 und 8-9	III				
69	<i>Xanthorhoe fluctuata</i>	8-W-6	III				
	Hepialidae						
70	<i>Hepialus humuli</i>	6-9	I	a, c	x		
	Lasiocampidae						
71	<i>Dendrolimus pini</i>	8-W-6	I	a	x		
72	<i>Macrothylacia rubi</i>	8-W-4	III		x		
73	<i>Malacosoma neustria</i>	4-7	II	a	x		
	Limacodidae						
74	<i>Apoda limacodes</i>	7-9	I	a			
	Lymantriidae						
75	<i>Arctornis l-nigrum</i>	8-W-5	I	a, b			
76	<i>Lymantria dispar</i>	4-6	I	a, b	x		V
77	<i>Lymantria monacha</i>	4-6	I	a, b			
78	<i>Orgyia antiqua</i>	5-8	II	a	x		
	Noctuidae						
79	<i>Acronicta megacephala</i>	6-9	I	a			
80	<i>Acronicta rumicis</i>	6-10	III				
81	<i>Agrotis crassa</i>	9-W-5	I	a, b	x		
82	<i>Agrotis exclamationis</i>	7-W-5	III				
83	<i>Amphipoea oculea</i>	4-6	I	b			
84	<i>Amphipyra pyramidea</i>	4-6	I	a, b			
85	<i>Apamea illyria</i>	7-W-4	I	a			
86	<i>Apamea monoglypha</i>	8-W-5	I	a			
87	<i>Apamea ophiogramma</i>	9-W-5	I	a, b			
88	<i>Apamea sordens</i>	8-W-4	III				
89	<i>Apamea sublustri</i>	9-W-5	I	a			
90	<i>Autographa gamma</i>	6-W-5	III				
91	<i>Autographa pulchrina</i>	8-W-5	II	a, b			V
92	<i>Axylia putris</i>	6-9	III				
93	<i>Blepharita satura</i>	5-6	I	b			
94	<i>Cosmia pyralina</i>	5-6	I	a, b			
95	<i>Craniophora ligustri</i>	6-9	II	b			
96	<i>Cryphia algae</i>	9-W-6	I	a, b			
97	<i>Diachrysis chrysitis/tutti</i>	6-W-5	III				
98	<i>Emmelia trabealis</i>	6-9	III		x		
99	<i>Euplexia lucipara</i>	7-10	III				
100	<i>Hadena bicurris</i>	6-10	III				

Fortsetzung Tabelle 7

Nr.	Art	LP	EPW	A	RL-D	RL-H	RL-B
101	<i>Hoplodrina octogenaria</i>	7-W-5	III				
102	<i>Heliotis viriplaca</i>	6-9	III				
103	<i>Hydraecia micacea</i>	5-8	I	a			
104	<i>Hypena proboscidalis</i>	7-W-5	III				
105	<i>Ipimorpha subtusa</i>	4-6	I	b			
106	<i>Lacanobia oleracea</i>	7-11	III				
107	<i>Lacanobia suasa</i>	6-10	III				
108	<i>Lacanobia thalassina</i>	7-10	III				
109	<i>Lycophotia porphyrea</i>	8-W-5	II	b			
110	<i>Macdunnoughia confusa</i>	7-8	III				
111	<i>Mamestra brassicae</i>	6-10	III				
112	<i>Melanchra persicariae</i>	7-10	III				
113	<i>Mesapamea secalis</i>	9-W-5 ?	I	b			
114	<i>Mormo maura</i>	9-W-6	I	b	x		V
115	<i>Mythimna albipuncta</i>	9-W-5 und 6-8	III				
116	<i>Mythimna conigera</i>	7-W-5	III				
117	<i>Mythimna ferrago</i>	10-W-5	I	b			
118	<i>Mythimna impura</i>	9-W-5, 7-8	III				
119	<i>Mythimna l-album</i>	6-W-5	III				
120	<i>Mythimna pallens</i>	6-W-5	III				
121	<i>Mythimna straminea</i>	8-W-5	I	a, b	x		
122	<i>Noctua comes</i>	8-W-5	III				
123	<i>Noctua fimbriata</i>	7-W-5	III				
124	<i>Noctua interjecta</i>	8-W-6	III				
125	<i>Noctua janthina</i>	8-W-5	III				
126	<i>Noctua pronuba</i>	8-W-5	III				
127	<i>Ochropleura plecta</i>	5-W-9	III				
128	<i>Oligia fasciuncula</i>	8-W-5	III				
129	<i>Phlogophora meticulosa</i>	6-W-5	III		x		
130	<i>Plusia festucae</i>	6-7 und 8-W-4	II	a, b	x		V
131	<i>Polia nebulosa</i>	7-W-4	II	a	x		
132	<i>Rivela sericealis</i>	8-W-5	III				
133	<i>Scoliopteryx libatrix</i>	4-6 und 7-9	I	a			
134	<i>Thalophila matura</i>	10-W-4	I	b			3
135	<i>Trachea atriplicis</i>	7-10	III		x		3
136	<i>Xestia c-nigrum</i>	5-W-4	III				

Fortsetzung Tabelle 7

Nr.	Art	LP	EPW	A	RL-D	RL-H	RL-B
	Nolidae						
137	<i>Pseudoips prasinana</i>	6-9	I	a			
	Notodontidae						
138	<i>Clostera pigra</i>	6-10	I	a			
139	<i>Drymonia obliterata</i>	7-9	I	a	x		
140	<i>Notodonta dromedarius</i>	6-9	I	a			
141	<i>Phalera bucephala</i>	7-9	I	a	x		
142	<i>Pheosia gnoma</i>	9-W-7	I	a	x		
143	<i>Pterostoma palpina</i>	5-10	I	a			
144	<i>Ptilodon capucina</i>	8-9, 6-7	I	a	x		
145	<i>Stauropus fagi</i>	6-9	I	a	x		
	Pantheidae						
146	<i>Colocasia coryli</i>	5-10	II	a, b			
147	<i>Panthea coenobita</i>	8-10	II	a			
	Pyralidae						
148	<i>Eurrhynx hortulata</i>	8-W-6	III				
149	<i>Myelois circumvoluta</i>	7-W-5	I				
150	<i>Ostrinia nubilalis</i>	6-W-4	III	ZO			
151	<i>Pleuroptya ruralis</i>	8-W-6	III				
	Sphingidae						
152	<i>Deilephila elpenor</i>	6-9	II	a	x		
153	<i>Deilephila porcellus</i>	6-10	III		x		
154	<i>Hyles gallii</i>	6-9	II	a	x		2
155	<i>Hyoicus pinastri</i>	6-9	I	a			
156	<i>Laothoe populi</i>	7-9	II	a	x		
157	<i>Mimas tiliae</i>	6-8	I	a	x		
158	<i>Smerinthus ocellata</i>	7-10	II	a		3	

Diskussion

Ziel der im Rahmen des Projektes durchgeführten Kartierung war es, solche Lepidopterenarten zu erfassen, die in der Agrarlandschaft vorkommen, und abzuklären, ob die Larven mit Maispollen in Kontakt kommen können oder nicht. In einem zweiten Schritt galt es die Arten herauszufiltern, die zumindest auf Populationsebene durch den Anbau von transgenem Bt-Mais gefährdet sein könnten.

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, muss für die Larven von 26 tag- und 53 nachtaktiven Schmetterlingsarten aufgrund von Phänologie und Habitatpräferenzen eine hohe Expositionswahrscheinlichkeit für Mais-Pollen angenommen werden, was allerdings noch nicht zwangsläufig mit einer potenziellen Gefährdung gleichgesetzt werden darf. Unter Abschätzung verschiedener Gesichtspunkte wurde daher der Versuch unternommen die Arten

herauszufiltern, die bei flächendeckendem Anbau von Bt-176-Mais zumindest in einzelnen Populationen negativ beeinflusst werden könnten. Die meisten der aufgelisteten Schmetterlingsarten sind in ihrer Verbreitung nicht allein auf die Agrarlandschaft (z. B. Äcker, Wiesen, Hecken und Wegränder) beschränkt, sondern können auch andere Habitate besiedeln, die von Maispollenflug nicht betroffen sind. Auch muss das Auftreten von empfindlichen Larvalstadien nicht in jedem Jahr mit dem Pollenflug zusammenfallen, da dieser von Aussaattermin und Witterung abhängt. Darüber hinaus ist das Ausmaß des Maisanbaus nicht in allen Bundesländern gleich. Aus diesen Gründen gelten die Gefährdungskriterien nur auf Populations- und nicht auf Artebene.

Als Methode zur Lepidopteren-Erfassung wurde anstelle eines direkten Nachweises von Larven, der Fang von Imagines gewählt. Durch die Verwendung einer Lichtfalle mit einem geschätzten Einzugsgebiet von 1 bis 2 Kilometern wurden auch Waldarten wie *Lymantria dispar* oder *Hyloicus pinastri* mit erfasst, deren Raupen kaum mit Maispollen in Kontakt kommen dürften. Der direkte Nachweis von Larven in der Umgebung von Maisfeldern erwies sich als nicht durchführbar. Mit Hilfe von Klopfproben konnten nur sehr wenige Individuen gesammelt werden. Eine Artbestimmung war bei den meisten Tieren nicht möglich, so dass der Versuch unternommen wurde, die Larven bis zum Falterschlupf durchzuzüchten. Dies scheiterte z. T. daran, dass nicht die richtigen Futterpflanzen zur Verfügung standen oder dass die Tiere nicht das Falterstadium erreichten. Davon abgesehen erwies sich die Betreuung als zu zeitaufwändig.

Anzumerken ist, dass eine Artenliste wie sie hier veröffentlicht wurde je nach Untersuchungsgebiet und Region unterschiedlich zusammengesetzt sein dürfte. Die hier veröffentlichte Liste kann somit nicht als repräsentativ für das gesamte Bundesgebiet gelten. Dennoch ist zu vermuten, dass ein Großteil der potenziell betroffenen Schmetterlingsarten Mitteleuropas erfasst wurde, da es sich bei Arten, die in der Agrarlandschaft vorkommen in der Regel um recht euryöke Spezies mit großem Verbreitungsgebiet handelt. Vor allem Populationen solcher Arten müssen in ihrem Bestand als potenziell gefährdet angesehen werden, die nachweislich durch das Cry1Ab-Toxin geschädigt werden, deren Larvalhabitate hauptsächlich Wiesen oder andere Bereiche der Agrarlandschaft sind und die als regional gefährdet eingeschätzt werden. Insbesondere bei nur lückenhaft verbreiteten Arten kann die Schädigung einzelner Populationen Einfluss auf den Gesamtbestand einer bestimmten Region haben.

Die umfassendsten Angaben zur Empfindlichkeit von Schmetterlingen auf *B.t.*-Endotoxine und Sporen finden sich bei KRIEG & LANGENBRUCH (1981), KRIEG (1986) und GLARE & O'CALLAGHAM (2000). Allerdings sind hier nur die verschiedenen *B.t.*-Subspezies aufgeführt. Angaben über die Wirkung einzelner Toxine fehlen jedoch. Außerdem beziehen sich die dort gemachten Angaben zumindest teilweise auf Tests, in denen Sporen und Endotoxine kombiniert verfüttert wurden. Allgemein beruht die Wirkung bestimmter δ -Endotoxin-Kristalle auf Schmetterlingslarven auf dem Vorhandensein spezifischer Rezeptoren in den Zellen des Mitteldarmepithels. Sehr wichtig ist außerdem der pH-Wert des Mitteldarms, da die dort vorhandenen Proteinasen das hochmolekulare *B. t.*-Protoxin zum aktiven Toxin hydrolysieren. Da die Wirkung des *B. t.*-Toxins somit von 3 Variablen abhängt, ist eine

Reaktion im Einzelfall nur schwer abzuschätzen. Exakte Angaben zur Sensitivität einzelner Schmetterlingsarten (LD₅₀-Werte) sind somit erst nach der Durchführung umfangreicher Biotests möglich. Dennoch wurde zu klären versucht, welche der 79 o. g. Arten (hohe Expositionswahrscheinlichkeit der Larven für Maispollen) durch die Aufnahme von Pollen der Linie Bt-176 geschädigt werden können und somit zu den potenziell gefährdeten Spezies gerechnet werden müssen.

Raupen der beiden Nymphaliden *Inachis io* und *Aglais urticae* wurden, wie in dieser Studie gezeigt, durch Maispollen der Linie Bt-176 eindeutig geschädigt, wodurch eine Untersuchung von FELKE & LANGENBRUCH (2003) bestätigt werden konnte. Darüber hinaus reagieren laut KRIEG & LANGENBRUCH (1981), KRIEG (1986) und GLARE & O'CALLAGHAM (2000) weitere Nymphaliden empfindlich auf *B. t. kurstaki*-Präparate. Es ist daher anzunehmen, dass Vertreter dieser Schmetterlingsfamilie generell empfindlich auf das Cry1Ab-Toxin reagieren. Laborversuche belegen, dass *Papilio machaon*, der einzige hier aufgelistete Vertreter der Familie Papilionidae bei Aufnahme von Bt-176-Maispollen ebenfalls geschädigt wird (VOJTECH, 2002). Auch für verschiedene Weißlinge (Pieridae) gilt eine Empfindlichkeit gegen Cry1Ab-Toxin als sicher (KRIEG & LANGENBRUCH, 1981; KRIEG, 1986; FELKE, 2000). Verschiedene Arctiidae (Bärenspinner), Geometridae (Spanner) und Lasiocampidae (Glucken) erwiesen sich nach KRIEG & LANGENBRUCH (1981), KRIEG (1986) und GLARE & O'CALLAGHAM (2000) gegenüber *B. t. subsp. kurstaki* als empfindlich. Eine Empfindlichkeit gegenüber *B. t. subsp. kurstaki* wurde auch für mehrere Arten der Familien HesperIIDae (Dickkopffalter), Lycaenidae (Bläulinge), Zygaenidae (Widderchen) und Sphingidae (Schwärmer) festgestellt (GLARE & O'CALLAGHAM, 2000). Da *B. t. subsp. kurstaki* HD-1 das auch in Bt-Mais gebildete Cry1Ab-Toxin exprimiert, kann für Vertreter dieser Schmetterlingsfamilien eine Suszeptibilität gegenüber dieser Toxinklasse vermutet werden. Der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) kann effektiv mit Bt-Mais bekämpft werden. Somit ist davon auszugehen, dass auch andere Pyraliden durch das im Pollen enthaltene Cry1Ab-Toxin geschädigt werden.

Inwieweit Noctuiden durch den Anbau von Bt-Mais betroffen sein könnten, lässt sich bislang nur schwer beurteilen. Allgemein gilt, dass die Larven dieser Schmetterlingsgruppe nur selten mit *B. t. kurstaki*-Präparaten in normalen Aufwandmengen bekämpft werden können. Aus diesem Grund sind BT-Präparate, die ausschließlich Cry1Ab-Toxin enthalten gemäß dem Pflanzenschutzmittel-Verzeichnis nicht zum Einsatz gegen Eulenraupen zugelassen. Laut KRIEG (1986) sind bei Noctuiden deutliche Unterschiede in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber *Bacillus thuringiensis* bekannt, was v. a. von der Auswahl der verwendeten *B. t.*-Stämme, bzw. den hier gebildeten Toxin-Kristallen abhängt. Zur Wirkung des Cry1Ab-Toxins auf Noctuiden liegen nur wenige Untersuchungen vor. Die Gammaeule (*Autographa gamma*) wird von KRIEG & LANGENBRUCH (1981) und KRIEG (1986) gegenüber dieser Toxinklasse als schwach empfindlich eingestuft. Die Wintersaateule (*Agrotis segetum*) wurde in Fütterungsversuchen mit Pollen der Linie Bt-176 selbst durch extrem hohe Pollenmengen fast nicht geschädigt (FELKE & LANGENBRUCH, 2002). Ebenfalls nur schwach ist die Wirkung auf einen weiteren Vertreter dieser Gattung. MACINTOSH et al. (1990) untersuchten die Wirkung von trypsinisiertem Cry1Ab-Toxin auf neonate *Agrotis ipsilon*-Larven und konnten

einen LC₅₀-Wert von > 80 µg/ml feststellen. Junglarven der amerikanischen Noctuide *Euxoa messoria* erwiesen sich dagegen in Laborversuchen mit den BT-Präparaten „Thuricide 90 TS“, „Thuricide-HP“, „Biotrol BTB 183“ und „Dipel“ als recht empfindlich (CHENG, 1973). Anzumerken ist hier aber, dass in diesen Präparaten neben Toxin-Kristall-Komplexen auch lebende Sporen mit einer Konzentration von 4,0 bis 8,6 × 10⁸ pro ml Suspension vorhanden waren. Auch *Spodoptera exigua* kann effektiv mit Cry1Ab-Toxin bekämpft werden. Wie PERLAK et al. (1990) zeigen konnten, waren Blätter von transgenen Baumwollpflanzen, die eine verkürzte Form dieses Toxins produzieren, wirkungsvoll gegen Raupen dieser Art geschützt. Diese uneinheitlichen Ergebnisse erschweren eine Beurteilung der Gefährdungssituation von Noctuiden. In welchem Ausmaß die in Tabelle 8 aufgelisteten einheimischen Noctuiden durch die Aufnahme von transgenem Mais der Linie Bt-176 geschädigt werden, könnten erst Laboruntersuchungen erbringen.

Tabelle 8: Schmetterlingsarten der zweijährigen Kartierung, für die nach derzeitigem Wissenstand eine Gefährdung durch den Pollen von Bt-176-Mais zumindest auf Populations- bzw. Subpopulationsebene nicht ausgeschlossen werden kann. Einstufung des Risikos. 1: Risiko minimal, da großflächig verbreitet. Einige Arten werden für bestimmte Kulturen sogar als Schädlinge eingestuft (*). 2: Risiko erhöht, da Populationsdichte deutlich geringer als bei 1. 3: hohes Risiko, da nur lückenhaft vorkommend. ?: Risiko kann z. Zt. nicht sicher abgeschätzt werden.

Nr.	Art	Risikoeinstufung
	Hesperiidae	
1	<i>Carterocephalus palaemon</i>	2
2	<i>Ochlodes venatus</i>	2
	Lycaenidae	
3	<i>Lysandra bellargus</i>	2
4	<i>Polyommatus icarus</i>	2
	Nymphalidae	
5	<i>Aglais urticae</i>	2
6	<i>Aphantopus hyperantus</i>	2
7	<i>Clossiana selene</i>	2
8	<i>Coenonympha arcania</i>	2
9	<i>Coenonympha pamphilus</i>	2
10	<i>Cynthia cardui</i>	2
11	<i>Inachis io</i>	2
12	<i>Issoria lathonia</i>	3
13	<i>Lasiommata megera</i>	2
14	<i>Maniola jurtina</i>	2

Nr.	Art	Risikoeinstufung
15	<i>Melanargia galathea</i>	2
16	<i>Mellicta athalia</i>	3
17	<i>Vanessa atalanta</i>	2
	Papilionidae	
18	<i>Papilio machaon</i>	3
	Pieridae	
19	<i>Anthocharis cardamines</i>	2
20	<i>Colias hyale</i>	2
21	<i>Leptidea sinapis / reali</i>	1
22	<i>Pieris brassicae</i> *	1
23	<i>Pieris napi</i> *	1
24	<i>Pieris rapae</i> *	1
	Zygaenidae	
25	<i>Zygaena filipendulae</i>	3
26	<i>Zygaena lonicerae</i>	3
	Arctiidae	
27	<i>Diacrisia sannio</i>	2
28	<i>Diaphora mendica</i>	2
29	<i>Phragmatobia fuliginosa</i>	2
30	<i>Spilosoma lubricipeda</i>	2
31	<i>Spilosoma luteum</i>	2
	Geometridae	
32	<i>Biston betularia</i>	1
33	<i>Camptogramma bilineatum</i>	1
34	<i>Chiasmia clathrata</i>	1
35	<i>Epirrhoe alternata</i>	1
36	<i>Eupithecia extraversaria</i>	1
37	<i>Idaea aversata</i>	1
38	<i>Timandra comae</i>	1
39	<i>Xanthorhoe ferrugata</i>	1
40	<i>Xanthorhoe fluctuata</i>	1
	Lasiocampidae	
41	<i>Macrothylacia rubi</i>	1

Nr.	Art	Risikoeinstufung
	Noctuidae	
42	<i>Acrionicta rumicis</i>	?
43	<i>Agrotis exclamationis</i>	?
44	<i>Apamea sordens</i> *	?
45	<i>Autographa gamma</i> *	?
46	<i>Axylia putris</i>	?
47	<i>Diachrysia chrysitis/tutti</i>	?
48	<i>Emmelia trabealis</i>	?
49	<i>Euplexia lucipara</i>	?
50	<i>Hadena bicurris</i>	?
51	<i>Hoplodrina octogenaria</i>	?
52	<i>Heliotis viriplaca</i>	?
53	<i>Hypena proboscidalis</i>	?
54	<i>Lacanobia oleracea</i> *	?
55	<i>Lacanobia suasa</i>	?
56	<i>Lacanobia thalassina</i>	?
57	<i>Macdunnoughia confusa</i>	?
58	<i>Melanchra persicariae</i> *	?
59	<i>Mythimna albipuncta</i>	?
60	<i>Mythimna conifera</i>	?
61	<i>Mythimna impura</i>	?
62	<i>Mythimna l-album</i>	?
63	<i>Mythimna pallens</i>	?
64	<i>Noctua comes</i>	?
65	<i>Noctua fimbriata</i>	?
66	<i>Noctua interjecta</i>	?
67	<i>Noctua janthina</i>	?
68	<i>Noctua pronuba</i> *	?
69	<i>Ochropleura plecta</i>	?
70	<i>Oligia fasciuncula</i>	?
71	<i>Phlogophora meticulosa</i>	?

Nr.	Art	Risikoeinstufung
72	<i>Rivula sericealis</i>	?
73	<i>Trachea atriplicis</i>	?
74	<i>Xestia c-nigrum</i>	?
	Pyralidae	
75	<i>Eurrhynx hortulata</i>	1
76	<i>Pleuroptya ruralis</i>	1
	Sphingidae	
77	<i>Deilephila porcellus</i>	2

In Tabelle 8 sind alle die Schmetterlingsarten der zweijährigen Kartierung enthalten, für die eine Gefährdung zumindest auf Populationsebene zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden kann. Die meisten der genannten Arten besiedeln neben Habitaten in der Agrarlandschaft auch andere Lebensräume und kommen darüber hinaus in relativ hoher Populationsdichte vor. Andere Spezies sind dagegen nur lückenhaft verbreitet, ihre Populationen im Rückgang begriffen oder sogar, zumindest in bestimmten Bundesländern, in ihrem Bestand bedroht. Von den aufgelisteten Arten können insbesondere 5 Arten durch den Anbau von transgenem Bt-Mais betroffen sein. *Issoria lathonia* LINNAEUS, 1758, der Kleine Perlmutterfalter legt seine Eier bevorzugt an *Viola arvensis* (Acker Stiefmütterchen). Daher ist das Larvalhabitat der Art hauptsächlich auf die Agrarlandschaft (v. a. Getreideäcker, Brachen) beschränkt. Zudem ist die Art regional, wie z. B. in Baden-Württemberg stark gefährdet (EBERT, 1991).

Als ähnlich stark betroffen wird *Mellicta athalia* ROTTEMBURG, 1775 eingeschätzt. Die Larven des Wachtelweizen-Schneckenfalters ernähren sich hauptsächlich von Wiesen-Wachtelweizen. Regional gilt die Art als stark gefährdet. *Papilio machaon* LINNAEUS, 1758 wird der gleichen Gefährdungsklasse zugeordnet. Der Schwalbenschwanz ist im gesamten Bundesgebiet nur lückenhaft verbreitet. Die Raupenfutterpflanzen sind hauptsächlich auf Wiesen zu finden. Gute Entwicklungsmöglichkeiten findet die Art auf Fenchel- oder Dill-Feldern. Besonders hier ist eine Kontamination der Futterpflanzen mit Maispollen denkbar. Auch die beiden aufgeführten *Zygaena*-Arten sind nur regional verbreitet. Außerdem sind die Populationen in den letzten Jahrzehnten stark rückläufig. Um weitere in Deutschland vorkommende Arten zu erfassen, die in ihrem Bestand durch den Anbau von gentechnisch verändertem Bt-Mais gefährdet sein könnten, sollte die hier begonnene Studie durch eine Literaturrecherche ergänzt werden. SCHMITZ et al. (2003) führten eine solche Literaturrecherche durch, die auf der Makrolepidopteren-Datenbank LEPIDAT basiert. Nach ihrer Einschätzung können 96 Makrolepidopterenarten, die in Deutschland typischerweise in der Agrarlandschaft vorkommen, aufgrund von Phänologie und Habitat-Präferenzen mit Maispollen in Kontakt kommen. 38 dieser Spezies werden in der Roten Liste geführt und

gelten als selten oder gefährdet. Da keine Angaben zur Empfindlichkeit der Arten gegenüber dem Cry1Ab-Toxin gemacht werden, lässt sich allerdings nicht ableiten, inwieweit die Populationsentwicklung der aufgelisteten Arten durch den Anbau von Bt-Mais betroffen sein könnte.

Generell sind unsere einheimischen Schmetterlingsarten durch eine ganze Reihe anthropogener Einflüsse bedroht. Die größte Bedrohung geht aber von der Habitatzerstörung aus. Der Anbau von Bt-Mais-Sorten, die ähnlich dem Bt-176-Mais große Mengen Toxin im Pollen produzieren, stellt eine zusätzliche, potentielle Gefahrenquelle dar, deren Auswirkungen auf zahlreiche Arten zum jetzigen Zeitpunkt aber noch nicht abgeschätzt werden können. Deshalb empfiehlt sich nach unserer Meinung beim Anbau von Mais-Sorten, die Bt-Toxin in der genannten Höhe im Pollen exprimieren eine Mantelsaat mit konventionellem Mais. Diese prophylaktische Maßnahme war bereits früher von FELKE & LANGENBRUCH (2001) vorgeschlagen worden und würde etwa einer Abstandsauflage entsprechen, wie sie für den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln gilt. Bei der Sortenwahl ist darauf zu achten, dass die nicht-transgene Sorte zum Blühzeitpunkt mindestens die gleiche Höhe wie die Bt-Sorte haben sollte.

5. Diskussion

5.1. Allgemeine Diskussion

Im Rahmen des hier vorgestellten Projekts sollte durch eine Kombination von Labor- und Freilandstudien untersucht werden, in welchem Ausmaß die einheimische Schmetterlingsfauna durch den Anbau von insektenresistentem, transgenem Bt-Mais gefährdet wird. Es handelt sich bei dem sog. Bt-Mais um gentechnisch veränderten Mais, in dessen Genom eine DNA-Sequenz des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* BERLINER, 1911 eingebaut wurde. Schon bald erkannte man die hohe Selektivität des Bakterien-Toxins gegenüber Schmetterlingsraupen und bereits BERLINER, der die Art 1915 beschrieb, betonte die Bedeutung von *B. t.* für die biologische Bekämpfung von Schadinsekten. In den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts fanden dann auch die ersten Bekämpfungsmaßnahmen gegen Maiszünsler und Kohlweißlinge statt (KRIEG, 1986). Mittlerweile können drei *B. t.*-Pathotypen mit klar abgegrenzten Wirtsbereichen unterschieden werden: neben dem Lepidopteren-spezifischen Pathotyp A wurden später auch noch der Nematoceren-spezifische Pathotyp B, sowie der Chrysomeliden-spezifische Pathotyp C entdeckt. Die Anzahl der bislang bekannten *B. t.*-Stämme, die sich v. a. hinsichtlich der gebildeten Toxin-Klassen unterscheiden, lässt sich mittlerweile kaum noch überschauen.

Erst seit Mitte der 1990er Jahre werden *B. t.*-DNA-Sequenzen mittels biotechnologischer Verfahren auch in das Erbgut verschiedener Kulturpflanzen eingebaut, was die derart veränderten Pflanzen gegenüber Schadinsekten resistent macht. Man hofft, mit Hilfe dieser neuen Technologie effektiver und kostengünstiger gegen Schädlinge vorgehen, und auf den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln verzichten zu können. Der hier untersuchte transgene Bt-Mais exprimiert das selektiv gegen Lepidopteren wirkende kristalline Endotoxin

Cry1Ab (KOZIEL et al., 1993). Aufgrund des jahrzehntelangen Einsatzes von Bt-Präparaten im biologischen Pflanzenschutz und der bekannten Spezifität des exprimierten Cry1Ab-Toxins wurde ein negativer Einfluss auf Nicht-Ziel-Organismen zunächst nicht befürchtet (PILCHER & RICE, 1998). Allerdings war zu diesem Zeitpunkt bereits hinlänglich bekannt, dass beim Einsatz von Bt-Präparaten sehr wohl auch Populationen von Nicht-Ziel-Schmetterlingen signifikant beeinträchtigt werden können (JOHNSON et al., 1995; WAGNER et al., 1996; WHALEY et al., 1998).

Auch wusste man, dass transgene Bt-Maissorten das Cry1Ab-Toxin nicht nur in den Blättern, sondern auch in anderen Pflanzenteilen exprimieren können (FEARING et al., 1997; HUGGER, 1998). In dem hier untersuchten Kontext ist vor allem der Pollen wichtig, da dieser mit dem Wind verdriftet wird und somit auch außerhalb des Maisfeldes gelangen kann. Vor allem Pollen der von der Fa. NOVARTIS (heute: SYNGENTA SEEDS) entwickelten Linie Bt-176 weist eine extrem hohe Konzentration des Cry1Ab-Toxins auf. Da Larven aus den unterschiedlichsten Schmetterlingsfamilien empfindlich gegenüber *Bacillus thuringiensis*-Endotoxinen reagieren (KRIEG & LANGENBRUCH, 1981; KRIEG, 1986) schienen nicht beabsichtigte Effekte auf solche Nicht-Zielschmetterlinge möglich, deren Raupen zum Zeitpunkt der Pollenblüte in der Nähe von Maisfeldern vorkommen.

Ein solcher negativer Effekt auf einen Nicht-Ziel-Organismus wurde erstmals von LOSEY et al. (1999) in einer Laborstudie festgestellt. Die Raupen des in Nordamerika sehr populären Monarchfalters (*Danaus plexippus*) wurden geschädigt, wenn sie von Futterpflanzen fraßen, die mit Pollen einer transgenen Bt-Maissorte bedeckt waren. Interessanterweise handelte es sich hierbei um die Maishybride N4640 der Linie Bt-11. Von dieser Linie ist bekannt, dass der Pollen weitaus weniger Toxin enthält, als der Pollen der Linie Bt-176. Während 1 g des Pollens von Bt-176-Mais bis zu 7,1 µg Toxin enthalten kann, liegt der Vergleichswert in den Linien Bt-11 und MON810 bei weniger als 0,09 µg Toxin pro Gramm Pollen (STANLEY-HORN et al., 2001). Nachfolgende Labor- und Freilanduntersuchungen mit der Linie Bt-176 bestätigten, dass auch hier der Pollen für Raupen verschiedener Schmetterlingsarten toxisch wirkt (HANSEN & OBRYCKI, 2000; HELLMICH et al., 2001; FELKE & LANGENBRUCH, 2001).

Im Rahmen der hier veröffentlichten Studie wurde festgestellt, dass Raupen von 7 einheimischen Schmetterlingsarten gegenüber dem in Bt-176-Mais exprimierten Cry1Ab-Toxin empfindlich sind. Beim Vorhandensein von Pollen der Linie Bt-176 auf ihren Futterpflanzen, nahmen sie im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe weniger Nahrung auf und zeigten eine geringere Gewichtszunahme sowie eine erhöhte Mortalitätsrate. Tests mit Pollen von isogenem, konventionellem Mais belegten, dass der Maispollen selbst keine Toxizität für die Larven aufweist.

5.2. Laborversuche mit Maispollen der Linien Bt-176 und MON810

In Labor-Fütterungsversuchen ohne Auswahlmöglichkeit wurden Larven von Kleinem Fuchs (*Aglais urticae*), Tagpfauenauge (*Inachis io*), Kohlmotte (*Plutella xylostella*) und Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) durch die Aufnahme von Pollen des transgenen Mais-events **Bt-176**

geschädigt. Im Vergleich zu unbehandelter Kontrolle, bzw. einer Variante mit konventionellem Maispollen äußerte sich dies in verringerter Gewichtszunahme und Nahrungsaufnahme, sowie einer erhöhten Mortalitätsrate. Neonate Raupen des Kleinen Fuchs zeigten ab einer Applikation von 10 Pollenkörnern der Sorte PACTOL CB auf ihr Futterblatt eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate, sowie eine signifikant verringerte Gewichtszunahme. Auch für Raupen des Tagpfauenauges (L_1 und L_2) konnte ab einer Menge von 10 Pollenkörnern eine signifikant geringere Gewichtszunahme registriert werden. Eine statistisch abzusichernde Erhöhung der Mortalitätsrate trat bei beiden Larvalstadien ab einer Applikation von 40 Pollenkörnern der Sorte PACTOL CB auf. Ältere Tagpfauenaugen-Raupen (L_4) zeigten im Biotest zwar keine erhöhte Mortalitätsrate, es traten allerdings subletale Effekte in Form einer verringerten Gewichtszunahme auf. Ab einer Applikation von durchschnittlich 40 Pollenkörnern war die Gewichtszunahme der überlebenden Raupen signifikant verringert.

Maiszünsler-Raupen (L_2) zeigten ab einer Applikation von 20 Bt-Pollenkörnern eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate. Hinsichtlich der Gewichtszunahme erwiesen sich die Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten dagegen als statistisch nicht absicherbar. In Biotests mit Larven der Kohlmotte wurde zusätzlich der Einfluss des Pollens auf die Nahrungsaufnahme der Tiere untersucht. Bereits ab einer Zahl von 2 applizierten Pollenkörnern der Sorte PACTOL CB (Bt+) fraßen die Raupen signifikant weniger als die Tiere der unbehandelten Kontrollgruppe. Hinsichtlich der Mortalitätsrate zeigten sich signifikante Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle ab einer Dosis von 4 Pollenkörnern. Der **Vergleich zwischen Zielorganismus und Nicht-Ziel-Organismen** ergab, dass Tagpfauenaug (*Inachis io*) und Kleiner Fuchs (*Aglais urticae*) ebenso sensibel auf das in Bt-176-Mais gebildete Toxin reagieren wie der Maiszünsler. Die Kohlmotte (*Plutella xylostella*) erwies sich dagegen als weitaus empfindlicher. Die Larven der Wintersaateule (*Agrotis segetum*), die stellvertretend für andere einheimische Noctuiden getestet wurden, wurden durch den Verzehr von Bt-176-Pollen kaum geschädigt. Selbst für neonate Raupen, die mehr als 500 Pollenkörner gefressen hatten, lag die Mortalitätsrate nach einer Woche lediglich bei knapp 8 % und war damit nur rund 3 % höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dieser geringe Unterschied erwies sich als statistisch nicht signifikant.

Dagegen ließen sich hinsichtlich der Gewichtszunahme sowohl für neonate Raupen, als auch für Tiere des zweiten Larvalstadiums signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten feststellen. Für beide Larvalstadien wiesen die Individuen, die mit Pollen von PACTOL CB-Mais (Bt+) gefüttert worden waren, nach einer Woche den geringsten Gewichtszuwachs auf. Angesichts der hohen applizierten Pollenmengen, die unter Freilandbedingungen außerhalb von Maisfeldern nicht zu erwarten sind, ist davon auszugehen, dass die Art *A. segetum* durch transgenen Mais der Linie Bt-176 nicht gefährdet ist. Ob eine derartige Einschätzung auch für andere einheimische Noctuiden zulässig ist, muss vorerst offen bleiben, da diese Familie sehr artenreich ist und die Empfindlichkeit gegenüber Bt-Toxinen nicht einheitlich ist. Es wird daher angeregt Larven weiterer einheimischer Noctuidenarten zu untersuchen, die aufgrund von Phänologie und Habitatpräferenzen mit Maispollen in Kontakt kommen können. Die übrigen 4 hier vorgestellten Arten müssen dagegen gegenüber dem Pollen von Bt-176 Mais als empfindlich eingestuft werden.

Auch nordamerikanische Studien wiesen negative Effekte von Pollen zweier Bt-Maislinien auf Nicht-Ziel-Schmetterlinge nach. Verglichen mit einer unbehandelten Kontrollgruppe war die Gewichtszunahme von neonaten **Monarchfalterlarven** ab einer Pollendichte von 11-20 Pollenkörnern/cm² (Maximizer 454, Bt-176) signifikant niedriger (HELLMICH et al., 2001). Zum Teil trat dieser Effekt sogar schon ab einer Dichte von 5-10 Pollenkörnern/cm² auf. Ebenfalls ab 11-20 Pollenkörnern/cm² war ein signifikanter Anstieg der Mortalitätsrate zu beobachten. Die Überlebensrate betrug bei dieser Menge 76 % gegenüber 99 % in der unbehandelten Kontrolle. LOSEY et al. (1999) registrierten in Laborversuchen mit Pollen der Sorte N4640 (Bt-11-Mais) für neonate Monarchfalter-Raupen nach 4 Tagen eine Überlebensrate von 56 %. Diese war gegenüber den beiden Kontrollgruppen (unbehandelte Kontrolle bzw. Pollen von konventionellem Mais) statistisch absicherbar verringert. Hinsichtlich Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme wurden für die Bt-Variante signifikant niedrigere Werte beobachtet, als für die beiden übrigen Varianten. Allerdings fehlen Angaben zur applizierten Pollenmenge. Es wird lediglich mitgeteilt, dass die aufgebrauchte Pollenmenge optisch der in Maisfeldern auf milkweed-Pflanzen (*Asclepias curassavica*) vorzufindenden Menge entsprach. Für frisch geschlüpfte *Papilio polyxenes*-Larven wurde im Vergleich zu einer Kontrolle ab einer Dosis von 100 Pollenkörnern/cm² (Max 454, Bt-176) eine signifikant höhere Mortalitätsrate festgestellt (ZANGERL et al., 2001).

Bei den hier vorgestellten Laborbiotests mit Maispollen der Linie Bt-176 wurden zwischen den einzelnen Arten extreme Empfindlichkeits-Unterschiede festgestellt, die sich u. a. anhand von LD₅₀-Werten (Anzahl applizierter Pollenkörner pro Larve) ablesen lassen (s. Tab. 1). Raupen der Kohlmotte (L₄) erwiesen sich von allen getesteten Arten gegenüber dem Pollen von transgenem Mais der Sorte PACTOL CB (Bt+) am empfindlichsten. Bei Verfütterung von frischem Pollen lag der LD₅₀-Wert für diese Art bei 7,77 Pollenkörnern. Der bei FELKE & LANGENBRUCH (2001) angegebene LD₅₀-Wert für Kohlmottenraupen des vierten Larvalstadiums lag dagegen mit 19,20 applizierten Pollenkörnern deutlich höher. Dieser Unterschied könnte damit erklärt werden, dass hier Pollen verwendet wurde, der mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren wurde. Es ist zu vermuten, dass ein Teil des im Pollen enthaltenen Toxins auf diese Weise denaturiert wurde. Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, dass Unterschiede hinsichtlich der Toxinexpression im Pollen auftraten.

Im Freiland akkumuliert sich Maispollen insbesondere an windgeschützten Pflanzenteilen wie z. B. in Blattachseln. Bleiben Niederschläge aus, kann Pollen durchaus mehrere Tage oder Wochen auf Pflanzen in der Nähe von Maisfeldern liegen bleiben (PLEASANTS et al., 2001 und eigene Beobachtungen). Es wurde daher getestet, ob die Toxizität von BT-176-Pollen im Verlauf der Zeit abnimmt. Selbst nach dreiwöchiger Lagerung ließ die Toxizität des Pollens auf Kohlmottenlarven (L₄) nicht nach. Der Pollen war bei Temperaturen zwischen 20 und 30°C, sowie einer Luftfeuchtigkeit von 70 bis 80 % unter Gewächshaus-Bedingungen aufbewahrt worden. Im Freiland könnten die hier simulierten Bedingungen der Pollenlagerung (vergleichsweise geringe Schwankungen von Temperatur und Luftfeuchtigkeit, keine direkte Sonnen-Einstrahlung) beispielsweise für Pollen gelten, der sich in Blattachseln gesammelt hat. Untersuchungen ob, und wenn ja unter welchen Bedingungen, es zu einer Denaturierung des Toxins kommen kann stehen noch aus. Um

freilandnahe Bedingungen zu simulieren sollte der Pollen vor der Verwendung im Biotest stärkeren Temperatur- und Luftfeuchtigkeits-Schwankungen, sowie direktem Sonnenlicht ausgesetzt werden. PUSZTAI et al. (1991) stellten fest, dass gereinigte Bt-Toxin-Kristalle durch den Anteil des Sonnenlichts zerstört werden, der eine Wellenlänge von 300 bis 380 nm aufweist (UV-A- und UV-B-Strahlung). Die Inaktivierung des Toxins beruht dabei auf einer Denaturierung der Tryptophan-Anteile. Ob die Pollen-Hülle für das im Pollen befindliche Bt-Toxin einen gewissen Schutz vor UV-Strahlung bietet, müsste durch entsprechende Biotests geklärt werden.

Auch für Larven weiterer Schmetterlingsarten wurden Biotests zur Bestimmung von **LD₅₀-Werten** durchgeführt. Erneut beziehen sich die angegebenen Werte auf die pro Individuum applizierte Pollenmenge (Bt-176-Mais, Sorte: PACTOL CB). Für neonate Raupen von Kleinem Fuchs (32,04), frisch geschlüpfte Tagpfauenaugen-Larven (36,67), sowie Maiszünslerlarven des zweiten Larvalstadiums (32,43) ließen sich fast identische Empfindlichkeiten feststellen. Dagegen ließ sich für die Wintersaateule (L₁ und L₂) kein LD₅₀-Wert berechnen, da selbst die Verfütterung von mehr als 500 Pollenkörner an neonate Larven nicht zu einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate führte. Alle, im Rahmen dieser Studie veröffentlichten LD₅₀-Werte beziehen sich nicht auf die tatsächlich verzehrte, sondern auf die applizierte Pollenmenge. Da die Fraßleistung der Raupen mit zunehmender Pollenbedeckung der Futterpflanzen abnahm, und somit nicht mehr der gesamte applizierte Pollen gefressen wurde, ist davon auszugehen, dass LD₅₀-Werte, die sich auf die tatsächlich aufgenommene Pollenmenge beziehen würden, mit Sicherheit niedriger lägen als die o.g. Werte. Nach den Angaben von VOJTECH (2002) für *Papilio machaon* liegt der auf die tatsächlich gefressene Pollenmenge bezogene LD₅₀-Wert bei lediglich einem Drittel des Wertes, der sich auf die applizierte Pollenzahl bezieht.

Aus vergleichbaren Untersuchungen finden sich kaum Angaben über LD₅₀-Werte, die sich auf Bt-Pollen beziehen. FELKE et al. (2002) ermittelten für *Pieris rapae* (L₂) einen LD₅₀-Wert von 39 und für *P. brassicae* (L₂) einen Wert von 139 Pollenkörnern, wobei sich die Angaben auf die Anzahl der applizierten Pollenkörner (Bt-176-Mais, Sorte: PACTOL CB) beziehen. VOJTECH (2002) gibt für neonate Schwalbenschwanzlarven einen LD₅₀-Wert von 86 Pollenkörner (pro cm² applizierter Pollen), bzw. 28 Pollenkörner (tatsächlich verzehrter Pollen) an (Bt-176-Mais, Sorte: NAVARES). ZANGERL et al. (2001) berechneten für neonate *Papilio polyxenes*-Larven einen LD₅₀-Wert von 613 Pollenkörnern/cm² (Bt-176-Mais, Sorte: Max 454). Somit wird deutlich, dass die Empfindlichkeit von Larven verschiedener Schmetterlingsarten gegenüber dem Cry1Ab-Toxin aus Bt-176-Pollen stark differiert und allgemeine Angaben über eine eventuelle Gefährdung von Lepidopteren durch den Anbau von Bt-Mais der Linie Bt-176 nicht zulässig sind. Für gesicherte Aussagen müsste in einem ersten Schritt geklärt werden, wie wahrscheinlich eine Maispollen-Exposition für die Larven ist. Danach müssten durch Laboruntersuchungen LD₅₀-Werte für Arten mit hinreichender Expositions-Wahrscheinlichkeit ermittelt werden. Zumindest zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Larven etlicher Nicht-Ziel-Schmetterlinge durch Bt-176-Pollen mindestens in gleichem Maße geschädigt werden können, wie die Maiszünsler-Raupe.

Untersuchungen mit **verschiedenen Larvalstadien** des Tagpfauenauges ergaben, dass Jungrauen weitaus empfindlicher auf Bt-Pollen reagieren, als ältere Larven. Während für neonate Raupen ein LD₅₀-Wert von 36,7 Pollenkörnern berechnet wurde, lag der LD₅₀-Wert für Individuen des zweiten Larvalstadiums bei 61,4. Noch ältere Tiere vertrugen sogar deutlich höhere Pollenmengen. Für Individuen des vierten Larvalstadiums konnte kein LD₅₀-Wert berechnet werden, da bis zur höchsten getesteten Dosis (80 Pollenkörner pro Larve) keine signifikant erhöhte Mortalitätsrate auftrat. Dies bestätigt frühere Untersuchungen von FELKE & LANGENBRUCH (2001) mit verschieden alten Kohlweißlingsraupen (*Pieris brassicae* und *P. rapae*). Nach bisherigen Erkenntnissen muss davon ausgegangen werden, dass neonate Larven stärker durch die Aufnahme von Bt-Maispollen geschädigt werden als ältere und somit auch schwerere Raupen. Laut KRIEG & LANGENBRUCH (1981) reagieren Junglarven auf *B. t.* –Endotoxine generell empfindlicher als Altlarven.

Dagegen lässt sich im interspezifischen Vergleich nicht unbedingt vom Larvalgewicht auf die Toxin-Empfindlichkeit schließen. So waren die hier untersuchten Kohlmottenlarven (L₄) schwerer als neonate Raupen von Tagpfauenauge und Kleiner Fuchs, gleichzeitig aber wesentlich empfindlicher. Auch das Beispiel der beiden, von FELKE et al. (2002) untersuchten Kohlweißlingsarten verdeutlicht, dass phylogenetisch nah verwandte Spezies deutliche Suszeptibilitäts-Unterschiede zeigen können. Obwohl die Raupen von *P. brassicae* und *P. rapae* zu Testbeginn nahezu das gleiche Durchschnittsgewicht aufwiesen, wichen die erhaltenen LD₅₀-Werte deutlich voneinander ab. Hierfür könnten Unterschiede in der Struktur der Toxin-Rezeptoren, und/oder beim pH-Wert des Darmsafts verantwortlich sein. So gibt BERENBAUM (1980) für *Pieris rapae* einen Mitteldarm-pH-Wert von 7,3 bis 7,6 und für *P. brassicae* von 8,0 an.

Generell müssten die in dieser Studie veröffentlichten LD₅₀-Werte aus zwei Gründen deutlich nach unten korrigiert werden:

- 1.) Zumindest für einen Teil der Biotests musste eingefrorener Pollen verwendet werden. Da Bt-Pollen durch den Prozess des Einfrierens und Auftauens nachweislich an Toxizität verliert, wären die Effekte bei ausschließlicher Verwendung von frischem Pollen deutlich stärker ausgefallen.
- 2.) Die angegebenen LD₅₀-Werte beziehen sich nicht auf die tatsächlich verzehrte, sondern auf die applizierte Pollenmenge. Besonders bei hohen Pollenkonzentrationen verzehrten die Raupen nicht die gesamte Pollenmenge.

Die in dieser Studie ermittelten LD₅₀-Werte ermöglichen, zusammen mit Angaben zur Pollenexposition in bestimmten Entfernungen zum Maisfeld gute Anhaltspunkte um das Gefährdungsrisiko der einzelnen Arten durch Bt-176-Mais abschätzen zu können. Wenn man eine Sicherheitsschwelle um den Faktor 100 einrechnet, so würde dies für die Kohlmotte (*Plutella xylostella*) bedeuten, dass die Larven maximal einer Pollenmenge von 0,08 Pollenkörnern ausgesetzt werden dürften. In einer Entfernung von 32 Metern zum Rand eines blühenden Maisfeldes wurden pro Quadratzentimeter durchschnittlich 3 bis 5 Pollenkörner gezählt. Der Maximalwert lag hier bei 34. Dies bedeutet, dass negative Effekte auf Arten, die ähnlich empfindlich reagieren wie die Kohlmotte mindestens in einem Umkreis von 32

Metern von Bt-176-Maisfeldern nicht auszuschließen sind. Dies trifft auch auf neonate Larven von Tagpfauenauge und Kleiner Fuchs zu. Alle 3 Arten können daher als **Indikatororganismen** zur Risikoabschätzung verwendet werden. Die Kohlmotte stellt den geeignetsten Indikatororganismus dar, da sie unter Laborbedingungen gut zu züchten ist und die Raupen von allen getesteten Arten gegenüber dem Pollen von Bt-176-Mais am empfindlichsten reagierten.

Wesentlich wichtiger als akute, toxische Effekte dürften unter Freilandbedingungen **subletale Auswirkungen** auf die Larven sein, die durch die ein- bzw. mehrmalige Aufnahme einer sehr geringen Bt-Pollenmenge ausgelöst werden können. Es ist anzunehmen, dass negative Auswirkungen hier erst nach einiger Zeit sichtbar werden und sich beispielsweise die Mortalität durch Probleme bei Larvalhäutung, Verpuppung oder Falterschlupf akkumulieren könnte. Wie FELKE & LANGENBRUCH (2003) am Beispiel von *Inachis io* schildern, machen sich subletale Effekte u. a. in Form von geringerem Wachstum und damit als Entwicklungsverzögerung bemerkbar. Je nachhaltiger die Entwicklung des betroffenen Individuums aufgrund sublethaler Effekte verzögert wird, desto eher kann es zu Problemen hinsichtlich der Synchronisation mit Faktoren kommen, die für den Entwicklungszyklus der Art entscheidend sind. Auch können betroffene Raupen durch eine verminderte Aktivität, sowie durch Verhaltensänderungen auffallen (vgl. FELKE & LANGENBRUCH, 2001). Derartig geschädigte Larven sind vermutlich anfälliger gegenüber Krankheiten und erscheinen als leichte Beute für Prädatoren und Parasitoide.

Möglicherweise führen subletale Schädigungen während der Larvalphase auch zu geringeren Puppen- und Faltergewichten und könnten damit auch auf Eiablageleistung und Lebensdauer des Falters Einfluss nehmen. Untersuchungen an Kartoffelkäfern (*Leptinotarsa decemlineata*) ergaben, dass adulte Weibchen, die als Larven eine subletale *B.t.* δ -Endotoxin-Dosis überlebt hatten, ein signifikant geringeres Gewicht, sowie eine signifikant kürzere Lebensdauer aufwiesen. Außerdem legten diese Tiere deutlich weniger Eier als Weibchen einer Kontrollgruppe (COSTA et al., 2000). LORENZ (1993) konnte zeigen, dass relativ leichte Larven des Maiszünslers eine erhöhte Wintermortalität aufwiesen. Weibchen, die sich aus solchen leichten Larven entwickelten, legten weniger Eier ab als die Individuen aus schwereren Larven.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch die Expositionszeit der Larven gegenüber dem für sie toxischen Pollen, sowie der Zeitpunkt der Schädigung. ZANGERL et al. (2001) diskutieren die Möglichkeit, dass Raupen, die in einem frühen Entwicklungsstadium durch die Aufnahme von toxinhaltigem Pollen subletal geschädigt wurden, die daraus resultierende Entwicklungsverzögerung später ausgleichen können, wenn sie anschließend nur noch unkontaminiertes Futter fressen.

In der hier durchgeführten Untersuchung wurden zwei Versuchsreihen mit Kohlmottenlarven angesetzt, in denen den Tieren einmal, bzw. an vier aufeinanderfolgenden Tagen je 5 Bt-176-Pollen (Sorte: PACTOL CB) verfüttert wurde. Im Anschluss wurde die weitere Entwicklung der Tiere bis zum Schlupf des letzten Individuums verfolgt. Die einmalige Verfütterung von 5 Pollenkörnern verlangsamte die Entwicklung von Kohlmottenlarven im Vergleich zu einer

Variante, die mit Pollen von konventionellem Mais gefüttert worden war signifikant. Verpuppung und Falterschlupf setzten in der Bt-Pollen-Gruppe nicht nur später ein als in der nicht-transgenen Variante, auch benötigten die Individuen der BT-Variante bis zum Erreichen des Puppen- bzw. Imaginalstadiums deutlich mehr Zeit als die Tiere der konventionellen Variante. Hoch signifikant waren die Unterschiede zwischen beiden Gruppen auch hinsichtlich der Mortalitätsrate. Nach einer Woche lebten in der mit konventionellem Pollen gefütterten Gruppe noch mehr als 97 % der Tiere, während in der Bt-Pollen-Gruppe schon die Hälfte aller Larven gestorben waren. In beiden Varianten nahm die Sterblichkeit bis Versuchsende weiter zu. Während sich in der Bt-Pollen -Gruppe nur ein Drittel der Tiere bis zum Falter entwickeln konnte, waren es in der Vergleichsvariante immerhin 71 %.

Noch deutlicher waren die Unterschiede zwischen den beiden Varianten bei einer viermaligen Verfütterung von 5 Pollenkörnern. Verpuppung und Falterschlupf setzten in der Bt-Pollen-Gruppe nicht nur später ein als in der nicht-transgenen Variante, auch benötigten die Individuen der BT-Variante bis zum Erreichen des Puppen- bzw. Imaginalstadiums deutlich mehr Zeit als die Tiere der konventionellen Variante. Nach einer Woche (5. Bonitur) lag die Überlebensrate in der Vergleichs-Gruppe bei 97 %, während in der BT-Variante nur noch 31 % der Tiere am Leben waren. In beiden Varianten nahm die Sterblichkeit bis Versuchsende weiter zu. Während sich in der Bt-Pollen-Gruppe nur 17 % der Tiere bis zum Falter entwickeln konnten, waren es in der Vergleichsvariante mehr als 74 %.

Mit einer ähnlichen Methodik wurde überprüft, welche Auswirkungen die Verfütterung einer subletalen Dosis von 10 Bt-176-Pollen auf die Entwicklung von Tagpfauenaugenraupen des ersten und zweiten Larvalstadiums hat. Diese Langzeituntersuchungen belegen, dass die Aufnahme einer sehr geringen Menge Bt-Toxin-haltiger Maispollen die Larvalentwicklung zunächst deutlich verlangsamen kann, was sich eine (L_1 und L_2) bzw. zwei Wochen (L_1) nach Beginn des Biotests anhand des signifikant verringerten Durchschnittsgewichts äußerte. Kurz vor der Verpuppung hatten sich die Durchschnittsgewichte der Larven allerdings weitgehend angeglichen, was darauf hindeuten könnte, dass Larven, die durch die Aufnahme von Bt-Toxin subletal geschädigt wurden, eine zunächst geringere Gewichtszunahme im Lauf der Entwicklung wieder ausgleichen können. Dennoch können sich aber selbst bei solchen Raupen negative Langzeiteffekte in Form einer längeren Entwicklungsdauer bemerkbar machen. Es wäre wünschenswert, die hier mit dem Tagpfauenauge (*Inachis io*) durchgeführten Versuche noch einmal mit der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) zu wiederholen um so zu einer Überprüfung der Ergebnisse mit einer zweiten Art zu gelangen. In Kombination mit den Daten zur Pollenexposition am Rand von Maisfeldern belegen diese Laboruntersuchungen, dass Bt-empfindliche Schmetterlingslarven nicht nur in direkter Nachbarschaft von Bt-176-Maisfeldern geschädigt werden können, sondern das subletale Effekte, ausgelöst durch sehr geringe Pollenmengen, auch noch in Entfernungen von mehr als 10 Metern auftreten können. Larven, deren Organismus durch die Aufnahme von geringen Bt-Pollendosen gestresst ist, erscheinen in höherem Maße durch Prädatoren oder Krankheiten gefährdet zu sein. Der Vergleich zwischen Kohlmotten- und Tagpfauenaugen-Larven zeigt, dass Raupen, die in einem sehr frühen Entwicklungsstadium (L_1 oder L_2) subletal durch Pollen von Bt-Mais geschädigt wurden, den daraus resultierenden Entwicklungsrückstand im

weiteren Verlauf der Ontogenese weitaus besser ausgleichen können als bereits ältere Raupen (z. B. L₄).

In weiteren Tests wurde überprüft, ob Raupen oder Falter Maispollen auf ihren Eiablage- bzw. Futterpflanzen erkennen und durch Verhaltensänderungen vermeiden können. Bereits durch ihr **Eiablageverhalten** können Insekten beeinflussen, in welchem Maße ihre Nachkommen natürlichen (z. B. Pflanzeninhaltsstoffe) oder künstlichen Toxinen (z. B. Pflanzenschutzmittel) ausgesetzt sind. Daher wurde zunächst in Wahlversuchen mit Faltern der Kohlmotte geklärt, ob eine Kontamination der Eiablagepflanze mit Pollen von Bt-Mais Änderungen im Eiablageverhalten der Imagines bewirkt. TSCHENN et al. (2001) führten ähnliche Untersuchungen mit dem Monarchfalter (*Danaus plexippus*) durch. In Flugkäfig-Versuchen wurde festgestellt, dass die Weibchen signifikant mehr Eier auf *Asclepias syriaca*-Pflanzen ablegten, die nicht mit Maispollen bedeckt waren. Wurde dieser Versuch in deutlich kleineren Käfigen wiederholt, so ließen sich zwischen den einzelnen Varianten keine signifikanten Unterschiede finden. Weiterhin wurde festgestellt, dass *D. plexippus*-Weibchen wesentlich weniger Eier ablegten, wenn die Eiablagepflanzen von Mais umgeben waren. Dies spricht dafür, dass auch die direkte Umgebung der Raupenfutterpflanze einen Einfluss auf das Eiablageverhalten des Weibchens ausüben könnte.

Für die hier getestete Kohlmotte ließen sich keine Hinweise darauf erbringen, dass Falter solche Pflanzen bei der Eiablage meiden, die mit Maispollen (Bt-Mais und konventioneller Mais) bedeckt waren. Somit widersprechen die von TSCHENN et al. veröffentlichten Ergebnisse zumindest z. T. den hier erzielten Resultaten. Eine Vergleichbarkeit war allerdings auch nicht unbedingt zu erwarten, da mit zwei verschiedenen Spezies gearbeitet wurde, die sich v. a. hinsichtlich Körpergröße und Aktivitätsmuster deutlich unterscheiden. Es wird angeregt ähnliche Versuche mit solchen Arten zu wiederholen, die potenziell durch den Anbau von transgenem Bt-Mais in ihrem Bestand gefährdet sein könnten. Hiefür werden die Nymphaliden *Aglais urticae* und *Inachis io* vorgeschlagen.

Wahlversuche zum Fraßverhalten wurden mit Larven der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) und des Kleinen Kohlweißlings (*Pieris rapae*) durchgeführt. Es wurde eindeutig festgestellt, dass die Raupen bei der Aufnahme von für sie toxischem Bt-176-Maispollen keine direkte Vermeidungsreaktion zeigten. Allerdings kam es i. d. R. ein bis zwei Stunden nach der Aufnahme des Pollens zu einem Fraßstop. Offensichtlich muss es also erst zu Reaktionen des Toxins im Darm der Larve kommen, bevor die Nahrungsaufnahme eingestellt wird. Ähnliche Wahlversuche führten FELKE & LANGENBRUCH (2001) auch mit den Raupen von Großem und Kleinem Kohlweißling durch. Raupen des dritten und vierten Larvalstadiums unterschieden in ihrem Fraßverhalten nicht zwischen transgenem und konventionellem Maispollen. Unter der Annahme, dass die hier gemachten Erfahrungen allgemein für alle Schmetterlingslarven gelten bedeutet dies, dass Raupen Pollen von transgenem Bt-Mais aufnehmen, falls sich dieser auf ihrer Futterpflanze befindet. Je nach der dabei aufgenommenen Toxin-Dosis und der artspezifischen Empfindlichkeit gegenüber dem Cry1Ab-Toxin können die Larven mehr oder weniger stark geschädigt werden.

Aufgrund des rasch einsetzenden Fraßstops erscheint es aber unter Freilandbedingungen möglich, dass Larven eine geringe Pollendosis überleben können, falls es bei einer einmaligen Pollenaufnahme bleibt. Dies kann dadurch gewährleistet sein, dass Wind oder Regen den Maispollen bis zum Wiedereinsetzen der Nahrungsaufnahme von den Raupenfutterpflanzen entfernen könnte. Zum anderen könnte die Larve selbst durch eine nicht zielgerichtete Ortsveränderung mit Maispollen bedeckte Pflanzenbereiche verlassen.

In einer weiteren Laboruntersuchung wurde überprüft, welche Auswirkungen die Aufnahme von Pollen und Antheren der transgenen Maislinie **MON810** auf Nahrungsaufnahme und Mortalität von Larven der Kohlmotte hat. Während sich die Verfütterung von 80 Pollenkörnern an Raupen des vierten Larvalstadiums weder hinsichtlich der Nahrungsaufnahme noch der Mortalitätsrate auswirkte, zeigte die Applikation von Antheren-Material auf die Raupenfutterpflanze eine eindeutig toxische Wirkung. Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an zwei nordamerikanischen Schmetterlingsarten. HELLMICH et al. (2001) stellten bei Laborversuchen mit neonaten Raupen des Monarchfalters bei Verfütterung von Futterpflanzen, die mit mehr als 1.000 Pollenkörnern pro cm² bedeckt waren, keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Mortalität, Nahrungsaufnahme oder Gewichtszunahme gegenüber einer Kontroll- bzw. einer konventionellen Pollenvariante fest. Darüber hinaus fanden STANLEY-HORN et al. (2001) auch im Rahmen von Freilandversuchen keinen Hinweis darauf, dass neonate *D. plexippus*-Larven durch Pollen der transgenen Sorten Bt-11 und MON810 geschädigt werden. Nach Untersuchungen von WRAIGHT et al. (2000) zeigten neonate *Papilio polyxenes*-Larven sogar bei einer Konzentration von 10.000 Pollenkörnern der Linie MON810 pro Quadratzentimeter keine erhöhte Mortalitätsrate. Der Cry1Ab-Toxingehalt im Pollen wurde hier mit $2,125 \pm 0,289$ ng/g Frischgewicht angegeben.

Bei Laborversuchen von HELLMICH et al. (2001) führte die Verfütterung von **Staubgefäßbruchstücken** der transgenen Maislinie Bt-11 bei neonaten Monarchfalter-Larven zu einer signifikant verringerten Gewichtszunahme. Spätere Tests, in denen ausschließlich ausgesiebtes Antherenmaterial verfüttert wurde bestätigten, dass die Schädigung der Larven durch Antherenbruchstücke hervorgerufen wurden, die im Vergleich zu Pollen der Linie Bt-11 eine deutlich höhere Konzentration des Cry1Ab-Toxins aufweisen. Die bisher bekannten Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Anbau der Bt-Maislinie MON810 aus Sicht des Schmetterlingsschutzes eher zu tolerieren ist als ein Anbau der Linie Bt-176, da die Toxinkonzentration im Pollen wesentlich geringer ist. Allerdings stehen Untersuchungen zu subletalen Effekten (z. B. Einfluss auf Entwicklungsgeschwindigkeit oder Fekundität der Weibchen) noch aus. Auch muss geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß Antheren bzw. Antherenbruchstücke verdriftet werden, da die Toxinkonzentration hier deutlich höher liegt. Darüber hinaus sollte genauer geprüft werden, ob die verschiedenen MON810-Sorten unterschiedlich hohe Toxin-Konzentrationen im Pollen zeigen und ob es zwischen sortengleichen Pflanzen individuelle Unterschiede in der Toxinexpression gibt.

5.3. Freilandversuche

Besonders im ersten Jahr der **Freilandbiotests** traten die unterschiedlichsten Probleme auf, die durch Modifizierung der Biotestsmethodik später teilweise behoben werden konnten. Die

im Jahr 2002 durchgeführten Versuche wiesen erstmals darauf hin, dass unter Freilandbedingungen negative Auswirkungen auf Populationen Bt-empfindlicher Schmetterlingsarten möglich sind. Es war zu beobachten, dass *Inachis io* und *Pieris rapae*-Larven mit zunehmender Entfernung vom Rand des Bt-Maisfeldes eine höhere Überlebensrate zeigten. Die hierfür fehlende statistische Signifikanz ist damit zu erklären, dass in allen 3 Varianten einige Wiederholungen (Pflanzen) ohne überlebende Larven registriert wurden. Bisher ließ sich nur in 2 Freilandversuchen eindeutig belegen, dass Schmetterlingslarven durch den Anbau von transgenem Bt-Mais geschädigt werden können (STANLEY-HORN et al., 2001; ZANGERL et al., 2001).

Basierend auf den in den Jahren 2000 bis 2002 gemachten Erfahrungen lässt sich schließen, dass das hier entwickelte Konzept noch nicht praxistauglich ist und verbessert werden muss. Bisher wurden die Versuche mit relativ kleinen Maisfeldern durchgeführt, an die eine mindestens gleich große Wiesenfläche angrenzte. Ein negativer Einfluss des Pollens von Bt-Mais auf Schmetterlingslarven dürfte allerdings v. a. dort zu erwarten sein, wo ein relativ großes Maisfeld direkt an ein wesentlich kleineres Schmetterlingshabitat wie z. B. eine Hecke oder einen Randstreifen angrenzt. Um praxisnähere Bedingungen zu schaffen, sollten Freilandbiotests mit weitaus größeren Maisfeldern wiederholt werden, da unter diesen Voraussetzungen eine vermehrte Pollendrift und somit auch eine höhere Pollenbedeckung der Versuchspflanzen möglich erscheint. Ferner sollten getopfte Versuchspflanzen lediglich bis in einer Entfernung von 4 m zum Rand des Maisfeldes aufgestellt werden, da mit zunehmender Entfernung zum Feld das Problem der Austrocknung immer gravierender wird. Um einem Austrocknen der getopften Pflanzen entgegen zu wirken, erscheint es sinnvoll die Pflanzen einzugraben. Ferner sollte die umgebende Vegetation mindestens die gleiche Höhe haben. Wiederholt ließ sich die Beobachtung machen, dass sich Maispollen vor allem auf niedrigen, krautigen Pflanzen akkumulieren kann. Es ist zu vermuten, dass Pollen mit dem Wind zwar relativ gut auf diese Pflanzen gelangen kann, allerdings nicht wieder von diesem fortgetragen wird. Um Prädatoren wirkungsvoller von den Versuchspflanzen zu entfernen sollte CO₂ verwendet werden.

Alternativ zu den Versuchen mit getopften Pflanzen erscheint auch ein reiner Freilandansatz sinnvoll. Es wird vorgeschlagen im Abstand von einem, zwei und vier Metern vom Rand eines blühenden Maisfeldes Brennesseln anzupflanzen oder einzusäen und auf diese Pflanzen zu Beginn der Maisblüte eine große Zahl von Tagpfauenaugenlarven (L₁) zu platzieren. Die Tiere könnten dort für ca. 2 Wochen bis zum Ende der Maisblüte belassen werden. Mit Sicherheit gäbe es auch hier Probleme mit Prädatoren, beim Einsatz von mehreren hundert Larven pro Entfernung könnten solche Effekte aber vermutlich vernachlässigt werden. Um Vögel von den Raupen fernzuhalten sollten Netze verwendet werden, die aber den Pollenflug nicht behindern dürften. Die vorgeschlagenen Entfernungen zum Maisfeld von einem, zwei und vier Metern ergeben sich aus den vorliegenden Erkenntnissen zur Pollendeposition. Da mit Hilfe von Laborversuchen der LD₅₀-Wert für Tagpfauenaugen-Raupen ermittelt werden konnte, ist ein direkter, d. h. letaler Einfluss auf die Larven nur in unmittelbarer Nähe zum Maisfeld zu erwarten.

Für die Larven von 26 tag- und 53 nachtaktiven Schmetterlingsarten, die im Rahmen von **Kartierungsmaßnahmen** in unmittelbarer Nähe zum Versuchsstandort (Nähe Niedernberg) erfasst wurden, kann aufgrund von Phänologie und Habitatpräferenzen eine hohe Expositions-Wahrscheinlichkeit für Mais-Pollen angenommen werden. Unter Berücksichtigung verschiedener Gesichtspunkte wie Habitat-Präferenzen, Häufigkeit und v. a. Empfindlichkeit der Larven gegenüber dem Bt-Toxin wurde diskutiert, welche Risiken für die einzelnen Arten bei flächendeckendem Anbau von Bt-176-Mais bestehen könnten. Die meisten der nachgewiesenen Schmetterlingsarten sind in ihrer Verbreitung nicht allein auf die Agrarlandschaft beschränkt, sondern können auch andere Habitate besiedeln, die von Maispollenflug nicht betroffen sind. Auch muss das Auftreten von empfindlichen Larvalstadien nicht in jedem Jahr mit dem Pollenflug zusammenfallen, da dieser von Aussaattermin und Witterung abhängt. Darüber hinaus ist das Ausmaß des Maisanbaus nicht in allen Bundesländern gleich. Aus diesen Gründen gelten die genannten Gefährungskriterien nur auf Populations- und nicht auf Artebene.

Eine Artenliste wie sie hier veröffentlicht wurde, dürfte je nach Untersuchungsgebiet und Region unterschiedlich zusammengesetzt sein. Dennoch ist zu vermuten, dass ein Großteil der potenziell betroffenen Schmetterlingsarten Mitteleuropas erfasst wurde, da es sich bei Arten, die in der Agrarlandschaft vorkommen in der Regel um recht euryöke Spezies mit großem Verbreitungsgebiet handelt. Vor allem Populationen solcher Arten müssen in ihrem Bestand als potenziell gefährdet angesehen werden, die nachweislich durch das Cry1Ab-Toxin geschädigt werden, deren Larvalhabitate hauptsächlich Wiesen oder andere Bereiche der Agrarlandschaft sind und die als regional gefährdet eingeschätzt werden. Insbesondere bei nur lückenhaft verbreiteten Arten kann die Schädigung einzelner Populationen Einfluss auf den Gesamtbestand einer bestimmten Region haben.

Für 33 der aufgelisteten Arten kann das Gefährdungs-Risiko z. Zt. nicht sicher abgeschätzt werden, da die Empfindlichkeit der Larven gegenüber dem Cry1Ab-Toxin nicht bekannt ist. Bei allen Spezies handelt es sich um Noctuiden. Nach den vorliegenden Erkenntnissen reagieren Eulenraupen zwar i. d. R. nicht empfindlich auf das Cry1Ab-Toxin, allerdings ließen sich auch eine Reihe gegenteiliger Beobachtungen machen. Für 16 weitere Arten wird ein minimales Gefährdungsrisiko angenommen, da es sich um häufig anzutreffende Spezies mit großräumiger Verbreitung handelt. Einige Arten werden für bestimmte Kulturen sogar als schädlich eingestuft. Für 23 Arten wird ein leicht erhöhtes Gefährdungsrisiko angenommen, da es sich nicht um flächendeckend verbreitete Arten handelt und somit die Populationsdichten hier deutlich geringer sind als bei der Gruppe der zuvor genannten 16 Arten. Für 5 Schmetterlingsarten, die in vielen Gebieten nur lückenhaft vorkommen, wird ein hohes Gefährdungsrisiko angenommen. Es handelt sich hierbei um Arten deren Populationen im Rückgang begriffen oder sogar, zumindest in bestimmten Bundesländern, in ihrem Bestand bedroht sind. Der Kleine Perlmutterfalter (*Issoria lathonia* LINNAEUS, 1758) legt seine Eier bevorzugt an Acker Stiefmütterchen (*Viola arvensis*) ab. Daher ist das Larvalhabitat der Art hauptsächlich auf die Agrarlandschaft (v. a. Getreideäcker, Brachen) beschränkt. Zudem ist die Art regional, wie z. B. in Baden-Württemberg stark gefährdet (EBERT, 1991). Als ähnlich stark betroffen wird der Wachtelweizen-Scheckenfalter (*Mellicta athalia*

ROTTEMBERG, 1775) eingeschätzt. Die Larven des Wachtelweizen-Scheckenfalters ernähren sich hauptsächlich von Wiesen Wachtelweizen. Regional gilt die Art als stark gefährdet. Der Schwalbenschwanz (*Papilio machaon* LINNAEUS, 1758) wird der gleichen Gefährdungsklasse zugeordnet. Der Schwalbenschwanz ist im gesamten Bundesgebiet nur lückenhaft verbreitet. Die Raupenfutterpflanzen sind hauptsächlich auf Wiesen zu finden. Auch die beiden aufgeführten Widderchen (*Zygaena filipendulae* und *Zygaena lonicerae*) sind nur regional verbreitet. Außerdem sind die Populationen in den letzten Jahrzehnten stark rückläufig. Um weitere in Deutschland vorkommende Arten zu erfassen, die in ihrem Bestand durch den Anbau von gentechnisch verändertem Bt-Mais gefährdet sein könnten, sollte die hier begonnene Studie durch eine Literaturrecherche ergänzt werden.

Der Erfassung der Pollendrift kommt in der hier durchgeführten Untersuchung eine zentrale Bedeutung zu. Unter Berücksichtigung der im Laborversuch ermittelten LD₅₀-Werte lässt sich abschätzen, bis zu welcher Entfernung vom Feldrand negative Effekte auf Raupen durch den Pollen von Bt-176-Mais möglich erscheinen. Es konnte beobachtet werden, dass die von den Objektträgern aufgefangene Pollenmenge mit zunehmender Entfernung zum Rand des Maisfeldes rasch abnahm. Innerhalb des Feldes wurden stets die höchsten Pollendichten registriert. Mit Verlängerung der Expositionszeit nahm auch die Pollendichte auf den Objektträgern zu. Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen von WRAIGHT et al. (2000), STANLEY-HORN et al. (2001), PLEASANTS et al. (2001), EMBERLIN et al. (1999), RAYNOR et al. (1972) sowie HANSEN & OBRYCKI (1999). Während einer Periode ohne Niederschlag kann sich Pollen auf Pflanzenblättern akkumulieren, wie es PLEASANTS et al. (2001) für *Asclepias syriaca* beobachteten. Demgegenüber können heftige Regenschauer nach eigenen Beobachtungen den Pollen komplett von Pflanzenblättern entfernen. Im Jahr 2002 wurden 16 Meter vom Feldrand entfernt innerhalb von 24 Stunden durchschnittlich 8 Pollenkörner pro Quadratzentimeter aufgefangen. In einer Entfernung von 32 Metern lag dieser Wert bei 6 Pollenkörnern/cm². Die Maximalwerte betragen 43 (16 Meter) bzw. 34 (32 Meter) Pollenkörner. Im Laborversuch wurde für *Plutella xylostella*-Raupen (L₄) ein LD₅₀-Wert von rund 8 Pollenkörnern des events Bt-176 (Sorte PACTOL CB) ermittelt. Damit erwies sich dieser Organismus unter den getesteten 7 Arten am empfindlichsten. Eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse dieser beiden Untersuchungen lässt folgende Schlussfolgerung zu: Raupen, die gegenüber dem Cry1Ab-Toxin ähnlich empfindlich reagieren wie die Kohlmottenlarve können zum Zeitpunkt der Maisblüte beim Verzehr von einem Quadratzentimeter Blattfläche ihrer Futterpflanze eine so hohe Pollenmenge aufnehmen, dass der artspezifische LD₅₀-Wert für das Cry1Ab-Toxin erreicht werden kann.

Da der Pollen im hier gewählten Versuchsansatz auf dem doppelseitigen Klebeband haften blieb, konnte sehr exakt die mit dem Wind verdriftete Pollenmenge bestimmt werden. Auf Pflanzenblättern dürfte allerdings i. d. R. weniger Pollen pro Quadratzentimeter liegen bleiben. Das Ausmaß der Pollenakkumulation hängt wesentlich von Wuchsform, Höhe der Pflanzen und Form bzw. Oberflächenbeschaffenheit der Blätter ab. Beispielsweise können auf breiten, behaarten Blättern wesentlich mehr Pollen aufgefangen und zurückgehalten werden als auf schmalen, unbehaarten Blättern. Ebenso dürfte die Pollenakkumulation auf niedrig

wachsenden, krautigen Pflanzen höher sein als auf höher wachsenden Pflanzen, die in viel stärkerem Maß dem Wind ausgesetzt sind.

Eine abschließende Risiko-Bewertung hinsichtlich des Anbaus der transgenen Linie Bt-176 erscheint aus Sicht des Schmetterlingsschutzes aufgrund der bislang vorliegenden Ergebnisse relativ schwierig. Eine Schädigung von Raupen durch Aufnahme des Pollens dieser Linie konnte im Laborversuch zwar eindeutig nachgewiesen werden, so dass ein grundsätzliches Gefährdungsrisiko angenommen werden muss. Allerdings sind aufgrund der enormen Empfindlichkeits-Unterschiede zwischen den einzelnen Arten gesicherte Angaben über ökosystemare Auswirkungen nicht möglich. Wie Untersuchungen mit *Plutella xylostella*, dem sensitivsten aller getesteten Organismen belegten, bewirkte schon die einmalige Verfütterung von 4 Bt-Pollenkörnern an Raupen des vierten Stadiums eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe. Beim Vergleich dieser Daten mit den Erkenntnissen aus den Versuchen zur Pollendrift erscheint es möglich, dass neonate Raupen sehr empfindlicher Arten bis zu einer Entfernung von 50 Metern zum Rand eines Maisfeldes der Linie Bt-176 zumindest subletal geschädigt werden können. Welchen Einfluss ein großflächiger Anbau der Linie Bt-176 auf die Populationsentwicklung einzelner Schmetterlingsarten, bzw. auf das gesamte Ökosystem hätte, kann z. Zt. nicht prognostiziert werden. Es fehlen u. a. Untersuchungen zur Empfindlichkeit weiterer Arten, die im Larvalstadium einer hohen Expositionswahrscheinlichkeit für Maispollen ausgesetzt sind. Hier wären Angehörige der Familien Lycaenidae, Satyridae oder Hesperidae zu nennen, die häufig in der Agrarlandschaft vorkommen und unter denen eine Reihe von Arten aufgrund vielfältiger Gründe rückläufige Bestandsentwicklungen aufweisen.

Um exakte Angaben über den Einfluss von Bt-Mais auf die Populationsentwicklung einzelner Schmetterlingsarten machen zu können, werden Freilanduntersuchungen vorgeschlagen, die auf möglichst großen Flächen angelegt und einen Zeitraum von 5 bis 10 Jahren nicht unterschreiten sollten. Hierbei sollten in vergleichbaren Gebieten, die sich nur hinsichtlich der dort angebauten Mais-Variante (Bt-Mais, bzw. konventioneller Mais) unterscheiden dürfen, die natürlichen Populationsschwankungen ausgewählter Schmetterlingsarten verfolgt werden. Es wird vorgeschlagen, hierfür das gegenüber dem Cry1Ab-Toxin sensitive Tagpfauenauge (*Inachis io*) auszuwählen, da diese Art in der Agrarlandschaft vorkommt und die Larven der Sommergeneration zum Zeitpunkt der Maisblüte zu beobachten sind.

Um eine Übertragbarkeit der hier erarbeiteten Laborergebnisse auf die Situation im Freiland zu ermöglichen, müssen die Auswirkungen von Bt-Pollen auf Larven von Nicht-Ziel-Schmetterlingen im Rahmen von weiteren Freilandexperimenten untersucht werden. Dabei sollten im Abstand von einem, zwei, vier und acht Metern vom Maisfeldrand Brennesseln angepflanzt oder eingesät werden, um auf diesen Pflanzen zu Beginn der Maisblüte eine große Zahl von Tagpfauenaugenlarven (L₁) zu platzieren. Das Tagpfauenauge erscheint für diese Untersuchungen aus mehreren Gründen als geeigneter Indikatororganismus (potenzielle Nicht-Ziel-Art, sensitiv gegenüber dem Cry1Ab-Toxin, in ausreichender Menge zu züchten). Die Tiere können dort für ca. 2 Wochen bis zum Ende der Maisblüte belassen werden. Wie schon bei der hier durchgeführten Studie wird es vermutlich auch bei dieser Methodik Probleme mit Prädatoren geben. Beim Einsatz von mehreren hundert Larven pro Entfernung

können solche Effekte aber vermutlich vernachlässigt werden. Bei den vorgeschlagenen Entfernungen zum Maisfeld sind aufgrund der bisherigen Versuche (v.a. Messung der Pollendeposition) Effekte wie geringere Gewichtszunahme und höhere Mortalität zu erwarten.

Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist es nicht möglich vorherzusagen, ob einzelne Schmetterlingsarten auf Artebene durch den Anbau von transgenem Bt-Mais gefährdet sein können. Zumindest auf Populationsebene sind negative Effekte allerdings nicht auszuschließen. Einheimische Schmetterlinge sind durch eine ganze Reihe anthropogener Einflüsse bedroht. Die größte Bedrohung geht aber von der Habitatzerstörung aus. Der Anbau von Bt-Mais-Sorten stellt eine zusätzliche Gefahrenquelle dar, deren Auswirkungen auf zahlreiche Arten noch nicht geklärt ist. Deshalb empfiehlt sich beim Anbau von Bt-Mais-Sorten eine Mantelsaat mit konventionellem Mais. Diese prophylaktische Maßnahme war bereits früher von FELKE & LANGENBRUCH (2001) vorgeschlagen worden und würde etwa einer Abstandsaufgabe entsprechen, wie sie für den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln gilt. Bei der Sortenwahl ist darauf zu achten, dass die nicht-transgene Sorte zum Blühzeitpunkt mindestens die gleiche Höhe wie die Bt-Sorte haben sollte. Solange keine Erkenntnisse über Langzeitwirkungen von Bt-Mais auf Schmetterlingspopulationen vorliegen wird geraten, den Anbau von insektenresistentem Bt-Mais in der Nähe von Schutzgebieten mit seltener Lepidopterenfauna zu untersagen. Um das Risiko so klein wie möglich zu halten wird eine Distanz von einem Kilometer zwischen Schutzgebiet und Bt-Mais vorgeschlagen. Über eine solche Entfernung werden nur noch einzelne Maispollen verdriftet, so dass nicht mehr von der Schädigung einer vorhandenen Schmetterlingspopulation auszugehen ist.

6. Abschließende Empfehlungen

Die im Rahmen dieser Untersuchung entwickelte Biotest-Methode für die Untersuchung von Pollen zweier Bt-Maislinien hat sich bewährt und kann in Zukunft auch bei Untersuchungen neu entwickelter Bt-Maislinien, wie z. B. der Linie Bt-11, eingesetzt werden. Es wird vorgeschlagen als Testorganismus die Kohlmotte (*Plutella xylostella*) zu verwenden, da deren Larven von allen getesteten Arten die höchste Bt-Toxin-Empfindlichkeit aufwiesen. Ein weiterer Vorteil liegt in der problemlosen Züchtbarkeit der Art unter Laborbedingungen.

Wie die hier vorgelegten Ergebnisse eindeutig beweisen, schädigt der Pollen der transgenen Maislinie Bt-176 solche Schmetterlingslarven, die gegenüber dem in diesen Pflanzen exprimierten Cry1Ab-Toxin empfindlich sind. Für die 7 untersuchten Arten wurden im Laborversuch erhebliche Suszeptibilitäts-Unterschiede festgestellt. Daher sind allgemeine Aussagen über das Gefährdungspotential der Linie Bt-176 nicht möglich. Erstmals wurden im Rahmen dieses Projekts detaillierte Untersuchungen zu subletalen Effekten geringer Bt-Pollenmengen auf Schmetterlingslarven durchgeführt. Da kaum Daten zu subletalen Effekten und deren Wirkungen auf Biozöosen oder die Populationsdynamik von Arten vorliegen, wird in diesem Bereich weiterer Forschungsbearbeitung gesehen. Aufgrund einer Vielzahl methodisch bedingter Probleme bei den Freilandversuchen konnte auch nicht eindeutig

geklärt werden, in welchem Ausmaß die Laborresultate auf die Bedingungen im Freiland übertragbar sind. Es wird daher vorgeschlagen im Rahmen einer mehrjährigen Freilandstudie die Populationsentwicklung ausgewählter Schmetterlingsarten (z. B. *Inachis io* und *Aglais urticae*) in einem Gebiet mit großflächigem Anbau von Bt-Mais zu verfolgen. Daneben scheinen auch modifizierte Freilandversuche sinnvoll, bei denen anstelle von eingetopften Futterpflanzen mit angepflanzten Brennnesseln gearbeitet werden sollte.

Meist findet sich die Angabe, dass das Cry1Ab-Toxin im Pollen der Linie MON810 nur in sehr geringen Konzentrationen exprimiert wird. Mit dieser Aussage stimmt überein, dass in den hier durchgeführten Untersuchungen Kohlmotten-Raupen selbst bei Verfütterung von 80 Pollenkörnern der Linie MON810 nicht signifikant geschädigt wurden. Demgegenüber stehen allerdings Ergebnisse von NGUYEN et al. (2002) die einen Toxingehalt im Pollen zwischen 0,32 und 6,6 µg pro g Frischgewicht nachweisen konnten. Dieser Wert erreicht fast die bei STANLEY-HORN et al. (2001) für Bt-176 Mais angegebene Toxinkonzentration von 7,1 µg Toxin pro Gramm Pollen-Frischgewicht. Die starken Schwankungen der Toxin-Expression im Pollen von MON810 Mais könnten sowohl auf abiotische Faktoren, als auch auf Unterschiede zwischen verschiedenen Maissorten zurückzuführen sein. Weitere Biotests mit Pollen von MON810-Mais sollten demnach unbedingt noch folgen. Hierbei sollte geklärt werden, ob die verschiedenen MON810-Sorten unterschiedlich hohe Toxin-Konzentrationen im Pollen zeigen und ob es zwischen sortengleichen Pflanzen individuelle Unterschiede in der Toxinexpression gibt. Auch stehen Untersuchungen zu subletalen Effekten (z. B. Einfluss auf Entwicklungsgeschwindigkeit oder Fekundität der Weibchen) noch aus.

Die Staubgefäße dieser Linie enthalten weitaus höhere Toxinmengen. Im Laborversuch wurden *Plutella xylostella*-Larven, die mit Antheren-Bruchstücken gefüttert wurden eindeutig geschädigt. Vor einer Zulassung der Linie MON810 müsste daher geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß Antheren bzw. Antherenbruchstücke verdriftet werden und ob Larven von Nicht-Ziel-Schmetterlingen unter Freilandbedingungen Teile von Mais-Staubgefäßen aufnehmen könnten.

Die in dieser Untersuchung festgestellten enormen interspezifischen Suszeptibilitäts-Unterschiede gegenüber dem Pollen von Bt-176-Mais lassen es möglich erscheinen, dass es in der heimischen Lepidopterenfauna noch wesentlich empfindlichere Arten als die Kohlmotte gibt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass durch den Anbau dieser Maislinie Populationen einzelner Schmetterlingsarten gefährdet sein können. Unsere einheimischen Schmetterlinge sind durch eine ganze Reihe anthropogener Einflüsse bedroht, wobei die größte Gefahr sicherlich von der Habitatzerstörung ausgeht. Der Anbau von transgenen Mais-Sorten, die Bt-Toxin im Pollen produzieren, stellt eine zusätzliche, potentielle Gefahrenquelle dar, deren Auswirkungen auf zahlreiche Arten zum jetzigen Zeitpunkt aber noch nicht abgeschätzt werden können. Deshalb empfiehlt sich beim Anbau von insektenresistentem Mais eine Mantelsaat mit konventionellen Sorten. Diese prophylaktische Maßnahme entspricht einer Abstandsauflage, wie sie auch für den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln gilt. Bei der Sortenwahl ist darauf zu achten, dass die nicht-transgene Sorte zum Blühzeitpunkt mindestens die gleiche Höhe wie die Bt-Sorte haben sollte. Solange keine Erkenntnisse über Langzeitwirkungen von Bt-Mais auf Schmetterlingspopulationen

vorliegen, wird geraten, den Anbau von insektenresistentem Bt-Mais in der unmittelbaren Nähe von Gebieten mit seltener Lepidopterenfauna zu untersagen.

Danksagung

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde durch das Umweltbundesamt, Berlin im Rahmen des Umweltforschungsplans des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) gefördert. Im ersten Projektjahr erfolgte die Finanzierung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Wir danken REGINE BALKOW-DITTRICH und Dr. MATHIAS OTTO (UBA), sowie Dr. Thomas Meise (BfN) für die gute Zusammenarbeit. An der Durchführung der Untersuchungen am Institut für biologischen Pflanzenschutz waren IRENE LÖFFLER, YVONNE SCHAD und ARTHUR KROMM beteiligt. Dr. RUPERT FERSCH (Kleinwallstadt) übernahm die Kartierung der Schmetterlinge. Dr. WOLFGANG NÄSSIG (Senckenberg-Museum, Frankfurt) sei für die Artdetermination einiger schwierig zu bestimmender Lepidopterenarten gedankt. Weiterhin gebührt unser Dank FRIEDBERT HORSTMANN (Syngenta Seeds) und Dr. NORBERT MÜLLEDER (Monsanto) für die Bereitstellung von Mais-Saatgut, sowie FRIEDEL SCHMITT für das Anlegen der Versuchspartellen.

8. Literatur

- Berenbaum, M. R. (1980): ADAPTIVE SIGNIFICANCE OF MIDGUT pH IN LARVAL LEPIDOPTERA. AM. NAT. 155: 138-146.
- Cheng, H. H. (1973): LABORATORY AND FIELD TESTS WITH *BACILLUS THURINGIENSIS* AGAINST THE DARK-SIDED CUTWORM, *EUXOA MESSORIA* (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE), ON TOBACCO. CAN. ENTOMOL 105: 941-945.
- Costa, S. D., Barbercheck, M. E., Kennedy, G. G. (2000): SUBLETHAL ACUTE AND CHRONIC EXPOSURE OF COLORADO POTATO BEETLE (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) TO THE Δ -ENDOTOXIN OF *BACILLUS THURINGIENSIS*. J. ECON. ENTOMOL. **93** (3), 680-689.
- Ebert, G. (HERAUSGEBER) (1991 BIS 2001): DIE SCHMETTERLINGE BADEN-WÜRTTEMBERGS BAND 1 BIS BAND 8. ULMER-VERLAG, STUTTGART.
- Emberlin, J., B. Adams-Groom & J. Tidmarsh (1999): A REPORT ON THE DISPERSAL OF MAIZE POLLEN. NATIONAL POLLEN RESEARCH UNIT FOR THE SOIL ASSOCIATION.
- Fearing, P. L., Brown, D., Vlachos, D., Meghji, M., Privalle, L. (1997): QUANTITATIVE ANALYSIS OF CRYIA (B) EXPRESSION IN BT MAIZE PLANTS, TISSUES, AND SILAGE AND STABILITY OF EXPRESSION OVER SUCCESSIVE GENERATIONS. MOL. BREEDING **3**, 169-176.
- Felke, M. (2000): LABORUNTERSUCHUNGEN ZUR SCHÄDIGUNG VON RAUPEN DREIER SCHMETTERLINGSARTEN DURCH DIE AUFNAHME VON TRANSGENEM MAISPOLLEN. MITT. BIOL. BUNDESANST. LAND-FORSTWIRTSCHAFT 376: 154.
- Felke, M. & Langenbruch, G. A. (2001). GEFÄHRDET *BT*-POLLEN SCHMETTERLINGE? GESUNDE PFLANZEN, **53** (1): 24-28.
- Felke, M. & Langenbruch, G. A. (2002): GEFÄHRDET DER POLLEN VON *BT*-MAIS UNSERE SCHMETTERLINGE? – UNTERSUCHUNGEN AN ERDEULENRAUPEN (*AGROTIS SEGETUM*) UND TAGPFAUENAUGEN (*INACHIS IO*) MITT. BIOL. BUNDESANST. LAND-FORSTWIRTSCHAFT 390: 324-325.
- Felke, M. & Langenbruch, G. A. (2003). WIRKUNG VON *BT*-MAIS-POLLEN AUF RAUPEN DES TAGPFAUENAUGES IM LABORVERSUCH. GESUNDE PFLANZEN, 55 (1): 1-7.

- Felke, M., Lorenz, N. & Langenbruch, G. A. (2002): LABORATORY STUDIES ON THE EFFECTS OF POLLEN FROM BT-MAIZE ON LARVAE OF SOME BUTTERFLY SPECIES. *JOURNAL OF APPLIED ENTOMOLOGY* **126** (6): 320-325.
- Finney, D. J., 1971: PROBIT ANALYSIS. CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS. CAMBRIDGE. 3. AUFLAGE, 333 PP.
- Glare, T. R. & O'Callaghan, M. (2000): *BACILLUS THURINGIENSIS*: BIOLOGY, ECOLOGY AND SAFETY. JOHN WILEY & SONS, LTD., CHICHESTER. 350 S.
- Hansen, L. & J. Obrycki (1999): NON TARGET EFFECTS OF BT CORN POLLEN ON THE MONARCH BUTTERFLY (LEPIDOPTERA: DANAIIDAE). ABSTRACT D 81, ANNUAL MEETING, NORTH CENTRAL BRANCH OF THE ENTOMOLOGICAL SOCIETY OF AMERICA, 1999.
- Hansen, L. C. J., Obrycki, J. J. (2000): FIELD DEPOSITION OF BT TRANSGENIC CORN POLLEN: LETHAL EFFECTS ON THE MONARCH BUTTERFLY. *OECOLOGIA* **125**, 241-248.
- Hellmich, R. L., Siegfried, B. D., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Daniels, M. J., Mattila, H. R., Spencer, T., Bidne, K. G. & Lewis, L. C. (2001): MONARCH LARVAE SENSITIVITY TO *BACILLUS THURINGIENSIS*-PURIFIED PROTEINS AND POLLEN. *PROC. NATL. ACAD. SCI.* **98** (21): 11925-11930.
- Hugger, H. (1998): WAS IST VON TRANSGENEN MAISSORTEN ZU ERWARTEN? *MAIS* **26** (3), 112-113.
- Johnson, K. S., Scriber, J. M., Nitao, J. K., Smitley, D. R. (1995): TOXICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *KURSTAKI* TO THREE NONTARGET LEPIDOPTERA IN FIELD STUDIES. *ENVIRON. ENTOMOL.* **24** (2): 288 – 297.
- Koziel, M. G., Carozzi, N. B., Currier, T. C., Warren, G. W. & Evola, S. V. (1993): THE INSECTICIDAL CRYSTAL PROTEINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS*: PAST, PRESENT AND FUTURE USES. *BIOTECH. GENET. ENGIN. REV.* **11**: 171-228.
- Krieg, A. (1986): *BACILLUS THURINGIENSIS*, EIN MIKROBIELLES INSEKTIZID: GRUNDLAGEN UND ANWENDUNG. PAUL PAREY-VERLAG, BERLIN UND HAMBURG. 191 SEITEN.
- Krieg, A. & Langenbruch, G. A. (1981): SUSCEPTIBILITY OF ARTHROPOD SPECIES TO *BACILLUS THURINGIENSIS*. IN: (BURGES, HERAUSGEBER): MICROBIAL CONTROL OF PESTS AND PLANT DISEASES 1970-1980. ACADEMIC PRESS, LONDON. SEITEN 836-896.
- Langenbruch, G. A. (1977): VERSUCHE ZUR MÖGLICHKEIT EINER BEKÄMPFUNG VON *AGROTIS SEGETUM* MIT *BACILLUS THURINGIENSIS*. *NACHRICHTENBL. DEUT. PFLANZENSCHUTZD. (BRAUNSCHWEIG)* **29** (9), 133 – 137.
- Lorenz, N. (1993): UNTERSUCHUNGEN ZUR VERBREITUNG DES MAISZÜNSLERS (*OSTRINIA NUBILALIS* HBN.) IN BEIFUß (*ARTEMISIA VULGARIS* L.) UND MAIS (*ZEA MAYS* L.), ZU ÜBERWINTERUNG UND FALTERSCHLUPF SOWIE ZUR ÜBERWACHUNG SEINER Z-RASSE MITTELS PHEROMONFALLEN. DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES DES FACHBEREICHS AGRARWISSENSCHAFTEN (LANDWIRTSCHAFTLICHE FAKULTÄT) DER GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT ZU GÖTTINGEN. 210 SEITEN.
- Losey, J. E., Rayor, L. S., Carter, M. E. (1999): TRANSGENIC POLLEN HARMS MONARCH LARVAE. *NATURE* **339**, 214.
- MacIntosh, S. C., Stone, T. B., Sims, S. R., Hunst, P. L., Greenplate, J. T., Marrone, P. G., Perlak, F. J., Fischhoff, D. A., Fuchs, R. L. (1990): SPECIFICITY AND EFFICACY OF PURIFIED *BACILLUS THURINGIENSIS* PROTEINS AGAINST AGRONOMICALLY IMPORTANT INSECTS. *JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY* **56**: 258 – 266.
- Nguyen, T. H., Berlinghof, M. & Jehle, J. A. (2002): EXPRESSIONSMONITORING VON CRYIAB VERSCHIEDENER MAISLINIEN AN ZWEI FREISETZUNGSSTANDORTEN IN DEUTSCHLAND. *MITT. BIOL. BUNDESANST. LAND-FORSTWIRTSCHAFT* **390**: 542-543.
- Perlak, F. J., Deaton, R. W., Armstrong, T. A., Fuchs, R. L., Sims, S. R., Greenplate, J. T. & Fischhoff, D. A. (1990): INSECT RESISTANT COTTON PLANTS. *BIO/TECHNOLOGY* **8**: 939-943.
- Pleasant, J. M., Hellmich, R. L., Dively, G. P., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Mattila, H. R., Foster, J. E., Clark, P. & Jones, G. D. (2001): CORN POLLEN DEPOSITION ON MILKWEEDS IN AND NEAR CORNFIELDS. *PROC. NATL. ACAD. SCI.* **98** (21): 11919-11924.
- Pilcher, C. D., Rice, M. E. (1998): MANAGEMENT OF EUROPEAN CORN BORER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) AND CORN ROOTWORMS (COLEOPTERA: CHRYSOMELIDAE) WITH TRANSGENIC CORN: A SURVEY OF FARMERS PERCEPTIONS. *AM. ENTOMOL.* **44**, 36-44.
- Pilcher, C. D., Rice, M. E., Higgins, R. A. & Bowling, R. (2001): POLLEN DRIFT FROM *BACILLUS THURINGIENSIS* CORN: EFFICACY AGAINST EUROPEAN CORN BORER (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE) IN ADJACENT ROWS OF NON-BT CORN. *ENVIRON. ENTOMOL.* **30** (2), 409 – 414.

- Pleasants, J. M., Hellmich, R. L., Dively, G. P., Sears, M. K., Stanley-Horn, D. E., Mattila, H. R., Foster, J. E., Clark, P. & Jones, G. D. (2001): CORN POLLEN DEPOSITION ON MILKWEEDS IN AND NEAR CORNFIELDS. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA **98** (21): 11919-11924.
- Pusztai, M., Fast, P., Gringorten, L., Kaplan, H., Lessard, T. & Carey, P. R. (1991): THE MECHANISM OF SUNLIGHT-MEDIATED INACTIVATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* CRYSTALS. BIOCHEM. J. **273**, 43-47.
- Raynor, G. S., E. C. Ogden & J. V. Hayes (1972): DISPERSION AND DEPOSITION OF CORN POLLEN FROM EXPERIMENTAL SOURCES. AGRONOMY J. **64**, 420-427.
- Riethmüller, U. & G. A. Langenbruch (1989): ZWEI BIOTESTMETHODEN ZUR PRÜFUNG VON *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *TENEBRIONIS* GEGEN LARVEN DES KARTOFFELKÄPFERS (*LEPTINOTARSA DECEMLINEATA*). ENTOMOPHAGA **34** (2), 237 - 245.
- Schmitz, G., Bartsch, D. & Pretschner, P. (2003): SELECTION OF RELEVANT NON-TARGET HERBIVORES FOR MONITORING THE ENVIRONMENTAL EFFECTS OF *Bt* MAIZE POLLEN. ENVIRON. BIOSAFETY RES. **2**: 117-132.
- Stanley-Horn, D. E., Dively, G. P., Hellmich, R. L., Mattila, H. R., Sears, M. K., Rose, R., Jesse, L. C. H., Losey, J. E., Obrycki, J. J. & Lewis, L. (2001): ASSESSING THE IMPACT OF CRY1AB-EXPRESSING CORN POLLEN ON MONARCH BUTTERFLY LARVAE IN FIELD STUDIES. PROC. NATL. ACAD. SCI. **98** (21): 11931-11936.
- Tschenn, J., Losey, J. E., Hansen-Jesse, L., Obrycki, J. J., Hufbauer, R. (2001): EFFECTS OF CORN PLANTS AND CORN POLLEN ON MONARCH BUTTERFLY (LEPIDOPTERA: DANAIIDAE) OVIPOSITION BEHAVIOR. ENVIRON. ENTOMOL. **30** (3): 495-500.
- Unterstenhöfer, G. (1963): DIE GRUNDLAGE DES PFLANZENSCHUTZFREILANDVERSUCHES. PFLANZENSCH. NACHR. BAYER **16** (3), 81-164.
- Vojtech, E. (2002): AUSWIRKUNGEN DES POLLENS VON TRANSGENEN BT-MAISPFLANZEN AUF RAUPEN DES SCHWALBENSCHWANZES, *PAPILIO MACHAON* Linnaeus, 1758 (LEPIDOPTERA, PAPILIONIDAE). DIPLOMARBEIT, LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN, 99 SEITEN.
- Wagner, D. L., Peacock, J. W., Carter, J. L., Talley, S. E. (1996): FIELD ASSESSMENT OF *BACILLUS THURINGIENSIS* ON NONTARGET LEPIDOPTERA. ENVIRON. ENTOMOL. **25** (6): 1444 – 1454.
- Weidemann, H.-J. (1988): TAGFALTER. BAND 2. NEUMANN-NEUDAMM VERLAG, MELSUNGEN, 372 SEITEN.
- Whaley, W. H., Anhold, J., Schaalje, G. B. (1998): CANYON DRIFT AND DISPERSION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND ITS EFFECTS ON SELECT NONTARGET LEPIDOPTERANS IN UTAH. ENVIRON. ENTOMOL. **27** (3): 539 – 548.
- Wraight, C. L., Zangerl, A. R., Carroll, M. J. & Berenbaum, M. R. (2000): ABSENCE OF TOXICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* POLLEN TO BLACK SWALLOWTAILS UNDER FIELD CONDITIONS. PROC. NATL. ACAD. SCI. **97** (14), 7700-7703.
- Zangerl, A. R., McKenna, D., Wraight, C. L., Carroll, M., Ficarello, P., Warner, R. & Berenbaum, M. R. (2001): EFFECTS OF EXPOSURE TO EVENT 176 *BACILLUS THURINGIENSIS* CORN POLLEN ON MONARCH AND BLACK SWALLOWTAIL CATERPILLARS UNDER FIELD CONDITIONS. PROC. NATL. ACAD. SCI. **98** (21): 11908-11912.