

# Biologische Sicherheitsforschung mit Bt-Mais

## Resistenzentwicklung beim Maiszünsler und Nebenwirkungen auf Nichtzielorganismen werden untersucht

Gustav-Adolf Langenbruch und Sherif A. Hassan (Darmstadt), Wolfgang Büchs und Wolfgang Burgermeister (Braunschweig), Bernd Freier und Bernd Hommel (Kleinmachnow)

In Deutschland sind seit kurzem drei Sorten Bt-Mais für den Anbau zugelassen, nachdem bereits in den Vorjahren ein Erprobungsanbau auf einigen hundert Hektar stattgefunden hat. Als Bt-Mais wird gentechnisch veränderter (= transgener) Mais bezeichnet, der ein Gen aus dem insektenpathogenen Bakterium *Bacillus thuringiensis* besitzt und dadurch in der Lage ist, sich selbst gegen den Maiszünsler, den wichtigsten Schädling im Maisanbau, zu verteidigen. Können auch Nichtzielorganismen von Bt-Mais beeinflusst werden? Und wie sieht es mit möglichen Resistenzbildungen beim Maiszünsler aus? In mehreren Forschungsprojekten hat sich die Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) mit diesen Fragen befasst.

### B.t. – ein natürliches Insektizid

Als der Mikrobiologe Ernst Berliner Anfang des vorigen Jahrhunderts tote Mehlmotten-Larven aus einer Mühle in Thüringen untersuchte, konnte er ein bis dahin noch nicht beschriebenes Bakterium isolieren, das er – in Anlehnung an den Fundort – *Bacillus thuringiensis* (*B.t.*) nannte. Die stäbchenförmigen Bakterien bilden bei der Sporulation Eiweißkristalle, die vom Zielinsekt beim Fressen aufgenommen werden und toxisch wirken. Die Kristalle werden im Darm der Schädlinge gelöst, durch bestimmte Enzyme (Proteasen) aktiviert und schließlich durch Andocken an Darmrezeptoren wirksam.

Seit 1964 sind *B.t.*-Präparate in Deutschland als Pflanzenschutzmittel gegen Schmetterlingsraupen anerkannt bzw. zugelassen und werden im Weinbau,

Obstbau, Gartenbau, Forst sowie im öffentlichen Grün eingesetzt. Andere, später entdeckte *B.t.*-Stämme wirken selektiv gegen Mückenlarven oder gegen bestimmte Käferlarven.

In dieser Selektivität liegt der größte Vorteil der *B.t.*-Präparate: Es werden nur Angehörige einer bestimmten Insektengruppe in einem bestimmten Entwicklungsstadium in einem kurzen Zeitraum (ca. eine Woche) nach der Ausbringung geschädigt. Dadurch zählen die Produkte zu den umweltfreundlichsten Präparaten im Pflanzenschutz.

### Der Maiszünsler – Hauptschädling im Mais

In Deutschland wird auf 1,7 Mio. ha Mais angebaut, davon liegen rund 350.000 ha in den Befallsgebieten des Maiszünslers

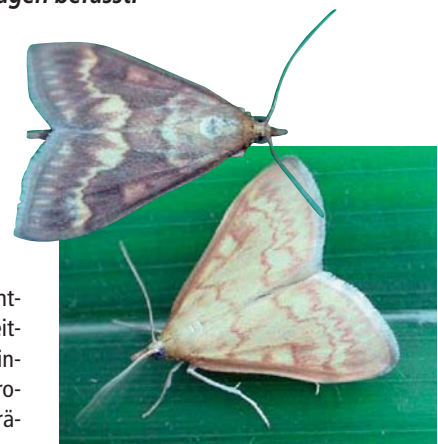


Abb. 1. Maiszünsler: Männchen (oben), Weibchen (Mitte) und Larvenstadien L1 und L5



(*Ostrinia nubilalis*, Abb. 1), des einzigen Maisschädlings, der in Deutschland alljährlich auf größeren Flächen bekämpft wird. Die Raupen dieses Kleinschmetterlings bohren sich in die Maisstängel ein, legen lange Fraßgänge an und verringern dadurch den Ertrag und die Standfestigkeit der Pflanzen (Abb. 2). Die Bohrlöcher sind zudem Eintrittspforten für schädliche Pilze.

Die Maiszünslerbekämpfung erfolgt bisher überwiegend präventiv durch Häckseln/Schlägeln der Stoppeln und sauberes Pflügen nach der Maisernte. Dadurch werden die in den Stoppeln verbleibenden Altlarven abgetötet, und es fehlt ihnen geeignetes Verpuppungsmaterial an der Bodenoberfläche. Die Ausbringung von Insektiziden (jährlich auf rund 35.000 ha) ist aufwändig, da sie aufgrund der Höhe der Pflanzen mit Stelzenschleppern erfolgen muss. Auf ca. 14.000 ha pro Jahr werden als biologische Methode auch *Trichogramma*-Schlupfwespen gegen die Eier des Schädling eingesetzt.

Der Maiszünsler wurde vor etwa 85 Jahren nach Nordamerika verschleppt und spielt im dortigen Maisanbau eine große Rolle. So kommen die aktuellen Bt-Maisarten aus den USA und werden dort jährlich auf mehreren Millionen Hektar angebaut.

## Bt-Mais

Die Selektivität der *B.t.*-Toxine und die langjährige Erfahrung mit der Wirkung und der Unbedenklichkeit derartiger Präparate waren wohl der Grund dafür, einzelne *B.t.*-Toxingene zur Abwehr von Schadinsekten ins Genom von Pflanzen zu übertragen und dadurch insektentolerante Sorten zu entwickeln. Um eine ausreichende Toxinbildung an den Fraßorten der Schädlinge zu erzielen, mussten die bakteriellen Gene den pflanzlichen Mechanismen angepasst werden; dennoch wird das von den transgenen Pflanzen produzierte Toxin als „wirkungsidentisch“ bezeichnet.

Von den transgenen Bt-Pflanzen, die seit 1996 weltweit zur Verfügung stehen, ist für Deutschland zurzeit nur der Mais aktuell. Die Europäische Sortenliste umfasst derzeit 17 Bt-Maissorten; in Deutschland sind drei Sorten zugelassen, die ein *B.t.*-Toxin wirkungsidentisch dem schmetterlingswirksamen Cry 1Ab produzieren.

Ein Anbau von Bt-Mais unterscheidet sich von einer (in der Praxis im Mais selten vorgenommenen) Spritzung von *B.t.*-Präparaten vor allem dadurch, dass die Maispflanzen permanent *B.t.*-Toxin in allen grünen Pflanzenteilen, aber auch im Pollen und in geringer Menge auch in den Wurzeln produzieren. Damit ist die Expositionszeit des Toxins wesentlich verlängert, was die Wirkung gegen den Schädling verbessert. Außerdem liegt das Toxin in den Pflanzenzellen nicht in kristalliner Form vor, sondern gelöst. Damit ist ein erster Aktivierungsschritt der Toxine (der natürlicherweise im Insektendarm erfolgen würde) bereits vorweggenommen. Das in den Pflanzen produzierte Toxin wird auch

Abb. 2: Vom Maiszünsler befallenes Feld (links) im Vergleich mit einem Bestand Bt-Mais (rechts)





durch die Wurzeln ausgeschieden und kann sich im Boden an Tonminerale anlagern. Daraus ergibt sich, dass die vorliegenden Erkenntnisse zur Wirksamkeit von *B.t.*-Präparaten nicht uneingeschränkt auf die Wirkungen der im Bt-Mais vorliegenden Toxine übertragen werden können.

Es war also nur folgerichtig, dass das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) ab 1999 Projekte zum Monitoring der ökologischen Auswirkungen von Bt-Mais förderte. An diesen Projekten waren Arbeitsgruppen der RWTH Aachen und der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) in Braunschweig, Darmstadt und Kleinmachnow beteiligt.

### Mögliche Resistenzentwicklung beim Maiszünsler?

In einigen Gegenden der Welt, in denen *B.t.*-Präparate über lange Jahre intensiv eingesetzt werden (z. B. im Vorratsschutz in den USA (Dörrobstmotte) oder im Kohl auf den Philippinen (Kohlmotte)), sind Resistenzen gegen *B.t.* bekannt gewor-

*Abb. 3: Zucht der auf den Feldern als Larven gesammelten und überwinterten Maiszünsler als Einzelpaare und Inzuchtlinien*



den. Ein großflächiger Bt-Maisanbau könnte auch beim Maiszünsler eine solche Entwicklung begünstigen. Dem muss vorgebeugt werden.

An der BBA wurde daher bei einigen Zünsler-Herkünften aus verschiedenen Maisanbaugebieten die Empfindlichkeit (LC50) der Junglarven gegenüber dem Bt-Toxin (Cry 1Ab) in umfangreichen Biotests ermittelt. Damit stehen eine Methodik und eine Datenbasis zur ständigen Überprüfung dieser Empfindlichkeit bei mehrjährigem Bt-Maisanbau zur Verfügung. Allerdings wiesen die Maiszünsler-Stämme eine große Schwankungsbreite innerhalb der Untersuchungen eines Jahres und zwischen den Jahren auf. Diese war größer als die Unterschiede zwischen den Maiszünslerpopulationen der verschiedenen Anbauregionen. Dies bedeutet für ein Resistenzmonitoring in Deutschland, dass mit einer großen Variabilität der Basisempfindlichkeit der Maiszünsler zu rechnen ist. Empfindlichkeitsunterschiede um das Zehnfache sind noch als natürliche Schwankungen und nicht als Resistenzunterschiede anzusehen. Für eine frühzeitige Entdeckung von Resistenz ist damit diese Methode nicht geeignet.

Beginnende Resistenzen im Freiland aufzuspüren ist nicht einfach. Sollten allerdings in Bt-Maispflanzen Maiszünsler-raupen auftreten, wären diese per se „verdächtig“. Im Rahmen des BMBF-Verbundvorhabens „Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden zum Anbau von Bt-

Mais“ hat die BBA ein aufwändiges

Projekt durchgeführt, in dem sie gezielt nach solchen

Raupen fahndete. Innerhalb von drei Jahren wurden insgesamt 1,8 Millionen Maispflanzen auf Bt-Maisfeldern vor der Ernte abgesucht und dabei 1.855 Maiszünslerlarven gefunden (d. h. im Schnitt eine Larve pro 1.000 Pflanzen). Vor der Maisernte sind die Raupen bereits auf Winterruhe eingestellt. Sie wurden deshalb bis zum Frühjahr bzw.

Frühsommer unter Außentemperaturen gehalten und

dann zur Verpuppung und zum Falter-schlupf gebracht. Mit den Faltern wurden Einzelpärchen gebildet und deren Nachkommen als isogene Linien weitergezüchtet (Abb. 3) und in der F2-Generation auf Resistenz getestet. Auf diese Weise wurden unter 826 untersuchten Ausgangslarven keine resistenten Tiere gefunden. Die Gründe für das Überleben dieser Larven im Bt-Maisfeld lagen wohl in einer schwankenden Toxin-Expression der Pflanzen und in den immer vorliegenden Verunreinigungen des Bt-Mais-Feldbestandes mit nicht-transgenem Mais (in denen dann empfindliche Junglarven heranwachsen und möglicherweise als wenig empfindliche Altlarven auf Bt-Mais wechseln).

Dennoch konnten wichtige Vorarbeiten für eine Aufklärung eventuell auftretender Resistenzen geleistet werden: Bei normal empfindlichen Larven wurden die im Darmsaft vorhandenen Proteasen analysiert und der Abbau des Toxins im Darmsaft untersucht. Da die meisten bisher bekannt gewordenen Resistenzen gegenüber *B.t.*-Toxinen proteasebedingt sind, lassen sich entsprechende Abweichungen milderempfindlicher Tiere nun relativ schnell durch direkten Vergleich mit den anfälligen Maiszünslern charakterisieren.

Schließlich wurde mittels RAPD-PCR untersucht, wie nah die Maiszünsler verschiedener Rassen und verschiedener Befallsgebiete in Deutschland miteinander verwandt sind. Das erlaubt Rückschlüsse auf die Bedeutung anderer Wirtspflanzen als Refugien und die Wahrscheinlichkeit, dass eine in einem Befallsgebiet vorliegende Resistenz auf andere Befallsgebiete übergreift. Unter anderem zeigte sich, dass Paarungen zwischen der an Beifuß häufigen Maiszünslerasse mit der an Mais vorherrschenden Rasse selten sind. Auch zwischen den vier großen Meta-Populationen der Zünsler an Mais besteht nur ein begrenzter genetischer Austausch, der eine Resistenzausbreitung erschwert, aber nicht sicher verhindern könnte.

### Nebenwirkungen auf Nichtzielorganismen?

#### Schmetterlinge

Vor allem eine der ersten Bt-Maislinien (Bt 176) exprimiert auch größere Mengen

Abb. 4: Kleiner Fuchs mit Larve



B.t.-Toxin im Pollen. Das ist zur Bekämpfung des Maiszünslers durchaus sinnvoll, da die jungen Zünslerraupen auch gerne Pollen an den Staubgefäßen oder in den Blattachseln fressen, doch könnten über den Pollenflug auch Raupen anderer empfindlicher Schmetterlingsarten gefährdet sein. In Amerika erregten entsprechende Versuchsergebnisse mit den Larven des Monarchfalters zunächst öffentliches Aufsehen, bis geklärt war, dass unter praktischen Verhältnissen keine Beeinträchtigung der Populationen zu befürchten ist.

An der BBA in Darmstadt wurden zu dieser Thematik Labortests mit Raupen einheimischer Schmetterlinge durchgeführt, unter anderem mit den Arten Kleiner Fuchs (*Aglais urticae*; Abb. 4), Tagpfauenauge (*Inachis io*; Abb. 5), Kohlmotte (*Plutella xylostella*, als Vertreter der Kleinschmetterlinge), Wintersaateule (*Agrotis segetum*, als Vertreter der weitgehend B.t.-unempfindlichen Noctuiden). Die LD50 (= Dosis, die für 50% der Versuchstiere letal ist) lag bei Kohlmottenlarven des vierten Stadiums (L4) bei etwa 8 frischen Pollenkörnern, für L1 des Kleinen Fuchses bei 32 Pollenkörnern und für L1 des Tagpfauenauges bei 37 Pollenkörnern. In allen Fällen bewirkten auch geringere Pollenzahlen deutliche Effekte wie Verhaltensänderungen und längere Entwicklungszeiten. Raupen der Wintersaateule zeigten – wie erwartet – keine Schäden.

Da der Maispollen schwer ist und deshalb nur selten und in geringer Zahl weiter als 10 m verdriftet wird, ist nicht zu erwarten, dass Schmetterlingsbestände durch



Abb. 5: Tagpfauenauge mit Larven

diese Bt-Maissorten gefährdet sind, doch könnten Populationen in unmittelbarer Maisnähe beeinträchtigt werden (dies gilt allerdings auch für Insektizidspritzungen mit dem Stelzenschlepper). Wenn schützenswerte Arten in den angrenzenden Biotopen zu erwarten sind, ist eine Mantel Saat mit konventionellem Mais um ein Bt-Maisfeld zu empfehlen.

#### Feldbesiedelnde Arthropoden

In einer fünfjährigen Studie an der BBA Kleinmachnow wurde das Vorkommen von über 200 Insekten- und Spinnenarten auf Bt-Maisfeldern anhand von Bonituren, Ganzpflanzenernten und Bodenfallenfängen untersucht. Die Erhebungen erfolgten auf Feldern, die aus einer Teilfläche Bt-Mais und einer Teilfläche mit einer vergleichbaren nicht-transgenen Maissorte bestanden. Eindeutig auf den Bt-Mais zurückführbare Veränderungen oder Verschiebungen bei Vorkommen, Häufigkeit oder Entwicklung der Arten konnten dabei nicht festgestellt werden. In einem Fortsetzungsprojekt wird seit dem Jahr 2005 ein anbaubegleitendes ökologisches Monitoring im Maiszünslers-Befallsgebiet Oderbruch (Brandenburg) erprobt.

#### Zersetzer

Was bewirkt das Toxin, das direkt oder bei der Zersetzung der Ernterückstände in den Boden gelangt? Werden am Abbau beteiligte Insektenarten und -stadien beeinflusst? Diesen Fragen ging im Rahmen des BMBF-Verbundes von 2001–2004 eine Braunschweiger Arbeitsgruppe am Beispiel der Sciariden (Trauermücken) nach.

Wurden in Laborversuchen Trauermücken-Larven mit Maispollen der Bt-Maislinie MON 810 gefüttert, kam es zu einer höheren Mortalität und geringeren Ver-

puppungsrate als bei Fütterung von Pollen der isogenen Partnersorte oder anderer konventioneller Maissorten.

Auch fraßen die Trauermücken-Larven mehr und zersetzten die Streu von MON 810 schneller als die Streu von anderen, herkömmlichen Sorten. Larven, die ausschließlich mit MON 810-kontaminierter Streu aus dem Freiland aufgezogen wurden, wurden im Labor von Prädatoren mehr gefressen als Larven, die ausschließlich mit Streu der isogenen Maissorte gefüttert wurden. Die ausschließliche Ernährung mit MON 810 Bt-Maisstreu verlängerte jedoch signifikant die Larvalperiode dieser Streu-abbauenden Larven und ihrer Prädatoren. Dies könnte, wenn diese Bt-Maislinie mehrjährig am gleichen Standort angebaut wird, zu Verschiebungen in der Lebensgemeinschaft der Zersetzer führen und letztendlich das Funktionieren der Streuzersetzung beeinflussen. Die Ursache für diesen Effekt liegt möglicherweise in einer verminderten Nahrungsqualität der Bt-Maisstreu für Sciariden-Larven. Nachdem im ersten Jahr signifikant höhere Artenzahlen, Schlupfdichten und Zersetzungsleistungen in der MON 810 Bt-Maisvariante festgestellt wurden, kehrte sich dieser Trend ab dem zweiten Jahr um. So ist die summarische Zersetzungsleistung (Minicontainermethode) im dritten Jahr in der MON 810-Variante deutlich geringer als in der isogenen Variante. Dieser Rückgang fiel mit einem Anstieg des Bt-Toxingehaltes der Streu um mehr als das 2,5fache zusammen.

#### Schlupfwespen

Besondere Bedeutung kommt den natürlichen Gegenspielern des Maiszünslers zu. Das gilt vor allem für *Trichogramma*-Schlupfwespen (Abb. 6). Diese Ei-Parasiten, die nicht nur in Massen gezüchtet und gezielt zur Bekämpfung des Maiszünslers ausgebracht werden, sondern auch natürlicherweise in Agrarlandschaften vorkommen, könnten durch ihre geringe Körpergröße besonders gefährdet sein, wenn sie Pollen aufnehmen. Dieser Fragestellung wurde in einem gesonderten BMBF-Teilprojekt in Darmstadt nachgegangen. In zahlreichen Laborversuchen zeigte sich,





Abb. 6: Die nur 1 mm kleine *Trichogramma*-Schlupfwespe parasitiert Eier des Maiszünslers

dass *Trichogramma* einzelne Pollenkörner an- oder auffressen. Es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Bt-Mais und konventionellen Sorten bei der Lebensdauer der Weibchen oder ihrer lebenslangen Eiablageleistung.

## Neue Entwicklungen

Im Frühjahr 2005 ist ein weiterer BMBF-Verbund zur freisetzungsbegleitenden Sicherheitsforschung an Bt-Maissorten angelaufen, in dem die BBA erneut mit einigen Teilprojekten vertreten ist. Es geht



zwar wieder um Bt-Mais, aber diesmal um eine Expression des Toxins Cry 3Bb1, das gegen den Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*, Abb. 7) wirkt – einen Blattkäfer, der von Amerika nach Europa eingeschleppt wurde und nun auch an Deutschlands Grenzen steht. Das aus einem bestimmten *B.t.*-Stamm isolierte Cry 3Bb1 ist ein Toxin, das nicht gegen Schmetterlingsraupen, sondern gegen verschiedene Käferarten – vor allem aus der Familie der Blattkäfer (Chrysomeliden) – wirkt. Dementsprechend werden am Darmstädter BBA-Institut Methoden zur Erfassung der Nebenwirkungen des Pollens auf Chrysomeliden entwickelt. Ebenso wird der Aktivierungs- und Wirkmechanismus des Toxins im Darm der *Diabrotica*-Larven untersucht, um auch hier durch eine entsprechende methodische Ausrüstung frühzeitig gegen Resistenzerscheinungen gewappnet zu sein. Am Braunschweiger Standort der BBA arbeitet man Methoden aus, um die Auswirkungen des Toxins im toten Pflanzenmaterial bzw. im Boden zu erfassen.

Für die Untersuchungen sind drei Jahre vorgesehen. Die Zeit drängt, denn der Schädling kann täglich bei uns auftauchen. Dieser Bt-Mais wäre ein wichtiges Glied in einem integrierten Bekämpfungskonzept, in dem aber auch ein streng geregelter Fruchtwechsel große Bedeutung haben sollte.



Dr. Gustav-Adolf Langenbruch<sup>1)</sup>, PD Dr. Wolfgang Büchs<sup>2)</sup>, Dr. Wolfgang Burgermeister<sup>3)</sup>, Dr. Bernd Freier<sup>4)</sup>, Dr. Sherif A. Hassan<sup>1)</sup> und Dr. Bernd Hommel<sup>4)</sup>, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft.

<sup>1)</sup> Institut für biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt

<sup>2)</sup> Institut für Pflanzenschutz im Ackerbau und Grünland, Braunschweig

<sup>3)</sup> Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit, Braunschweig

<sup>4)</sup> Institut für integrierten Pflanzenschutz, Kleinmachnow

Kontakt: [g.-a.langenbruch@bba.de](mailto:g.-a.langenbruch@bba.de)

Danksagung: Wir danken an dieser Stelle dem BMBF, dem Umweltbundesamt und dem Bundesamt für Naturschutz für die Forschungsmittel sowie dem PTJ in Jülich für die kooperative Abwicklung der Förderung. Ferner danken wir allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern sowie den zahlreichen Teilzeitkräften bei der Durchführung dieser Projekte. In den Beitrag sind Ergebnisse aus den Arbeiten von Dr. Martin Felke, Dr. Renate Kaiser-Alexnat, Dr. Danila Liebe, Dr. Thomas Meise, Andreas Müller, Dr. Sabine Prescher, Markus Schorling, Dr. Wolfgang Wagner, Dr. Guren Zhang und Dr. Olaf Zimmermann eingeflossen, die in den genannten BBA-Instituten angefertigt wurden.



Abb. 7: Der Westliche Maiswurzelbohrer – in den USA einer der wirtschaftlich wichtigsten Schädlinge – ist auch nach Europa eingeschleppt worden. Die Fotos zeigen einen Bestand in Ungarn