

Zuwendungsempfänger:  Dr. Jürg Huber / Dr. G.-A. Langenbruch Julius Kühn-Institut Institut für Biologischen Pflanzenschutz Heinrichstraße 243 64287 Darmstadt Tel. 06151 407-220 Fax 06151 407-290	Förderkennzeichen:  0313279D
--	------------------------------------

**Forschungsverbund:**

Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung transgener Maissorten mit neuen *Bt*-Genen:  
Entwicklung und Validierung von Monitoringmethoden

**Vorhabenbezeichnung:**

Freisetzungsbegleitende Untersuchungen zur Aktivität von *Bt*-Toxinen bei Ziel- und Nicht-Ziel-Organismen, sowie im Boden

Teilprojekt: Untersuchungen zu Nebenwirkungen von Cry3Bb-Mais auf epigäische Nicht-Ziel-Organismen

**Laufzeit des Vorhabens:**

01.04.2005 – 30.09.2008

**Berichtszeitraum:**

01.04.2005 – 30.09.2008

## Schlussbericht

### Teil I: Kurzdarstellung des Forschungsvorhabens

#### 1 Aufgabenstellung

Im Rahmen des Projektes sollten Nebenwirkungen des *Bt*-toxinhaltigen Pollens von transgenem, insektenresistentem Cry3Bb1-Mais der *Bt*-Maislinie MON88017 auf Nichtziel-Insekten untersucht werden, die in an Maisfeldern angrenzenden Habitaten vorkommen. Das Hauptaugenmerk lag auf herbivoren Insekten, die im Zuge der intensiven Pollenausschüttung der Maispflanzen durch eine Kontamination ihrer Nahrungspflanzen mit *Bt*-Pollen gefährdet sein könnten. Es waren Laboruntersuchungen an Nicht-Ziel-Chrysomeliden (Blattkäfern), Lepidopteren (Schmetterlingen) sowie ggf. an Coccinelliden (Marienkäfern) und Chrysopiden (Florfliegen) beabsichtigt. Außerdem sollen im Rahmen einer Literaturstudie einheimische Blattkäferarten erfasst werden, für die eine hohe Expositionswahrscheinlichkeit für Maispollen besteht.

#### 2 Rahmenbedingungen für die Durchführung des Vorhabens

Das BMBF finanziert im Rahmen der Förderrichtlinie "Biologische Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen", die im Rahmenprogramm "Biotechnologie – Chancen nutzen und gestalten",

die im Dezember 2003 vom BMBF veröffentlicht wurde, Projekte der ökologischen Begleit- und Sicherheitsforschung zum Anbau gentechnisch veränderter Kulturpflanzen.

### 3 Planung und Ablauf des Vorhabens

Dieses Projekt war Teil des Forschungsverbundes „Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung transgener Maissorten mit neuen *Bt*-Genen: Entwicklung und Validierung von Monitoringmethoden“, der durch Prof. Dr. I. Schuphan und Dr. Sabine Eber (RWTH Aachen) koordiniert wurde. Innerhalb des Julius Kühn-Instituts wurde es dem aus drei Einzelprojekten bestehenden Teilprojekt „Freisetzungsbegleitende Untersuchungen zur Aktivität von *Bt*-Toxinen bei Ziel- und Nicht-Ziel-Organismen, sowie im Boden“ zugeordnet, das von Dr. G.-A. Langenbruch (BBA Darmstadt, bis April 2007) und PD Dr. W. Büchs (JKI Braunschweig, ab Mai 2007) verwaltet wurde. Das Forschungsvorhaben wurde zunächst im Zeitraum 01.04.2005 bis zum 31.03.2008 gefördert. Im Zuge einer kostenneutralen Verlängerung wurde der Förderzeitraum bis zum 30.09.2008 verlängert. Die wissenschaftliche Bearbeitung des an dieser Stelle vorgestellten Teilsprojekts erfolgte bis zum 16.07.2007 zunächst durch Dr. Martin Felke (JKI Darmstadt). Danach wurde das Forschungsvorhaben durch Dr. Jörg Leopold (JKI Darmstadt) weitergeführt.

### 4 Wissenschaftlicher und technischer Stand

Der zu den Blattkäfern gehörende Westliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*) stammt ursprünglich aus Mittelamerika und hat sich über Mexiko in die USA und Kanada ausgebreitet. Er tritt in den USA in zwei Unterarten auf (*D. virgifera zea* im Süden, *D. virgifera virgifera* mittlere USA bis zum Norden) und gilt als bedeutender Maisschädling. Der Maiswurzelbohrer verursacht dort jährlich Schäden von einer Mrd. US \$ (METCALF 1986). In Europa entstehen jährlich Kosten in einer Höhe von ca. 300 Millionen €. Weltweit sind ca. 20 Millionen ha Mais von verschiedenen *Diabrotica*-Arten befallen, davon 13,5 Millionen ha in den USA. In Deutschland sind mittelfristig etwa 350.000 ha der insgesamt 1,8 Millionen ha Maisanbauflächen mit Anbau von Mais nach Mais gefährdet bei einem zu erwartenden ökonomischen Schaden von jährlich mindestens 25 Millionen € (Quelle: <http://www.jki.bund.de>).

Die Käfer des Maiswurzelbohrers sind von Mitte Juli bis in den Spätherbst aktiv und ernähren sich am Mais von Narbenfäden, Pollen und jungen Blättern. Die Weibchen legen im August bis zu 500 Eier in den Boden. Die Larven schlüpfen von Ende Mai bis Anfang Juli und ernähren sich von den Maiswurzeln. Die Junglarven fressen zunächst an den feinen Wurzelhärchen, bevor die älteren Larvenstadien sich in die Wurzeln einbohren. Durch den Wurzelfraß fallen die Maispflanzen schon bei leichtem Wind um. Über das geschädigte Wurzelsystem ist eine ausreichende Wasser- und Nährstoffversorgung der Pflanze nicht möglich. Der Fraß der Käfer an den Narbenfäden kann zudem dazu führen, dass die Kolben deutlich weniger Körner ausbilden. Ertragsausfälle bis zu 30 % sind möglich. Zur Bekämpfung des Maiswurzelbohrers werden meist Insektizide gegen die Larven eingesetzt (als Saatgutinkrustierung oder Bodengranulat). Ein Viertel der weltweit betroffenen Anbaufläche wird jährlich mit Insektiziden gegen den Schädling behandelt. Die Einhaltung einer Fruchtfolge, bei der Mais nur alle 2 bis 3 Jahre auf der gleichen Fläche angebaut wird, gilt als das probateste Mittel zur Verhinderung von Kalamitäten. In Regionen mit intensivem Maisanbau wird davon jedoch in der Regel kein Gebrauch gemacht. Allerdings liegen aus den USA Berichte vor, dass sich ein bestimmter Biotyp des Maiswurzelbohrers mittlerweile auf eine zweigliedrige Fruchtfolge eingestellt hat und seine Eier auch in Sojafeldern abzulegen vermag. Ein geringer Prozentsatz dieser Eier überdauert als Überlieger bis ins nächste Jahr. Wird auf den ehemaligen Soja-Flächen im Folgejahr Mais angebaut, können sich die Larven entwickeln (LEVINE et al. 2002).

Anfang der 90er Jahre wurde *Diabrotica v. virgifera* vermutlich im Zuge des Balkankonflikts durch Versorgungsflüge der US-Armee zunächst ins ehemalige Jugoslawien eingeschleppt und breitet sich seitdem in Europa aus. Der Erstnachweis erfolgte 1992 in der Nähe des Belgrader Flughafens. Die Käfer besitzen ein gutes Flugvermögen, die natürliche Verbreitungsgeschwindigkeit der Art

beträgt 40 bis 80 km pro Jahr (maximal 100 km). Zusätzlich kommt es im Rahmen des internationalen Warenaustauschs zu einer Verbreitung entlang von Hauptverkehrswegen wie Autobahnen und Flussschiffsstraßen. Mehrmals erwiesen sich auch Flughäfen als Ausgangspunkte neuer Befallsherde (z. B. Belgrad, Venedig, Paris, München).

1995 wurden die Käfer in Ungarn und Kroatien nachgewiesen. In Rumänien trat der Schädling erstmals 1996 auf. 1997 wurde er in Bosnien-Herzegowina festgestellt. Ein Jahr später wurde die Art in Montenegro, Bulgarien und Italien gefunden. Im Jahr 2000 erreichte der Maiswurzelbohrer die Schweiz, sowie die Slowakei und im darauf folgenden Jahr die Ukraine. Im Jahr 2002 gelangen Nachweise für Österreich, Tschechien und Frankreich. 2003 folgten Belgien, Großbritannien und Slowenien. 2005 wurde der Maiswurzelbohrer zum ersten Mal in den Niederlanden beobachtet. Im Jahr 2007 trat der Schädling auch in Deutschland in Baden-Württemberg (Ortenau- und Bodenseekreis) und Bayern (Raum Freising, Innzig, Passau) auf. Die Höhe der während des Befallsmonitorings erzielten Fangzahlen deutet daraufhin, dass die Immigration in einigen Einschleppungsgebieten jedoch bereits 2-3 Jahre zurückliegt (Quelle: <http://www.jki.bund.de>). Zum Projektbeginn war der Maiswurzelbohrer demnach bereits in Deutschland angekommen.

Seit einigen Jahren steht mit transgenem Mais, der ein speziell gegen Chrysomeliden wirkendes *Bt*-Toxin exprimiert, eine neue Bekämpfungsmöglichkeit gegen *Diabrotica virgifera virgifera* zur Verfügung. Eine erste von der Firma MONSANTO entwickelte *Diabrotica*-resistente Maislinie (Yieldguard rootworm®) wurde im Februar 2003 in den USA unter Auflagen zugelassen. Mittlerweile besteht auch innerhalb der EU eine Genehmigung zum Inverkehrbringen als Lebens- und Futtermittel. Die Maislinie mit der Bezeichnung MON863 exprimiert ein synthetisches Cry3Bb1-Gen, das dem Cry3Bb1-Gen aus der *Bacillus thuringiensis*-Unterart *B. t. ssp. kumamotoensis* ähnelt. Es verfügt über eine 8-fach höhere insektizide Aktivität als das Wildtyp-Gen. Im Insekten-darm wird das von der Pflanze produzierte 74 kDa-Protoxin enzymatisch zu dem Trypsin-resistenten insektiziden Toxin umgewandelt.

Ihr folgte die ebenfalls von MONSANTO stammende *Bt*-Maislinie MON88017, die im Rahmen des vorliegenden Forschungsvorhabens untersucht wurde. Auch sie verfügt durch das *Bt*-Toxin Cry3Bb1, das sich ebenfalls von dem Cry3Bb1-Gen der *Bacillus thuringiensis*-Unterart *B. t. ssp. kumamotoensis* ableitet, über eine Resistenz gegen den Maiswurzelbohrer. Die *Bt*-Toxine der beiden Maislinien sind nahezu identisch. Die Aminosäuresequenz der Proteine weicht lediglich an einer Stelle voneinander ab (agbios GM Database, Stand: 02/2008). Das Cry3Bb1-Toxin von MON88017 hat mit 77 kDa ein geringfügig höheres Molekulargewicht. Der Wirkungsmechanismus ist jedoch identisch. Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, wird das Cry3Bb1-Toxin der Linie MON88017 in den Blättern, im Korn, im Pollen, in den Wurzeln sowie in den Narbenfäden gebildet. Außerdem besitzt diese Maislinie durch die Einführung des cp4 epsps- Gen des Bodenbakteriums *Agrobacterium* ssp. Stamm CP4 eine Resistenz gegen Herbizide mit dem Wirkstoff Glyphosat (Markenname: Roundup). Im Gegensatz dazu hat MON863 als Selektionsmarker ein Antibiotika-resistenzgen.

Die für Cry3Bb1-Mais bekannt gewordenen *Bt*-Toxin-Konzentrationen sind, verglichen mit den im Rahmen der Sicherheitsforschung bislang untersuchten Maiszüchler resistenten Linien wie MON810 und *Bt*176, um ein Vielfaches höher (Tab.1). Im Rahmen einer ökologischen Risikoabschätzung erschien es daher notwendig, umfangreiche Tests zu Nicht-Ziel-Effekten von MON88017-Mais durchzuführen. Die vergleichsweise hohen Toxinmengen im Pollen dieser *Bt*-Maislinie (Tab. 1) machten es erforderlich, diese auch auf durch Pollen vermittelte Effekte hin zu überprüfen. Frühere Untersuchungen zu Auswirkungen auf Nicht-Ziel-Herbivoren haben am Beispiel verschiedener Tagfalterarten gezeigt, dass eine Gefährdung von Nicht-Ziel-Herbivoren durch das im Pollen enthaltene Toxin grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden kann (FELKE et al. 2002, HELLMICH et al. 2001). Die Untersuchung von herbivoren Nicht-Ziel-Organismen hatte daher besondere Bedeutung.

Aufgrund der zu erwartenden Spezifität der Cry3-Toxine sollten dabei Koleopteren im Mittelpunkt des Interesses stehen (ROMEIS et al. 2008). Bei einem Anbau der Maiswurzelbohrer-resistenten Linie MON 88017 sind negative Auswirkungen auf Nicht-Ziel-Organismen aufgrund ihrer Verwandtschaft zu *Diabrotica* vor allem für Blattkäfer (Chrysomeliden) zu erwarten, die in Maisfeldern oder deren unmittelbarer Nähe anzutreffen sind und dort dem Toxin ausgesetzt sein könnten. Wie schon bei den Versuchen zu Nebenwirkungen von *Bt*-Maislinien mit Cry1Ab-Expression kommt auch hier dem toxinhaltigem Pollen eine entscheidende Bedeutung zu, da Maispollen mit dem Wind verdriftet wird und Futterpflanzen von Nicht-Ziel-Organismen auch in angrenzenden Biotopen kontaminieren könnte.

Tab. 1: Vergleich der Toxin-Expression für verschiedene *Bt*-Maislinien

<i>Bt</i> -Toxin	Maislinie (Hersteller)	mittlere Toxin-Konzentration [µg/g Frischgewicht]	Entwicklungsstadium/ Tage nach Pflanzung	Quelle
Cry1Ab	<i>Bt</i> -176 (Syngenta)	ca. 3 (Blätter) ca. 2,4 (Pollen)	Blüte Blüte	FEARING et al. (1997)
Cry1Ab	<i>Bt</i> -11 (Syngenta)	1,55 – 4,83 (Blätter)	5 –6 Blattstadium	RAPS et al. (2001)
Cry1Ab	MON810 (Monsanto)	10,34 (Blätter) 0,05 (Pollen) 0,3 (Maiskörner)	Blüte Erntereife Pflanze	US EPA (2000)
Cry9C	StarLink (Aventis)	44 (Blätter) 0,24 (Pollen) 18,6 (Korn) 25,6 (Wurzeln)	Blüte Erntereife Pflanze	US EPA (2000)
Cry3Bb1	MON863 (Monsanto)	81 (Blätter) 70 (Korn) 62 (Pollen) 41 (Wurzel)	21 Tage 125 Tage 60 Tage 90 Tage	Monsanto Dokument MSL Nummer 17181 (2001)
Cry3Bb1	MON88017 (Monsanto)	10 (Narbenfäden) 76 (Blätter) 13 (Korn) 14 (Pollen) 21 (Wurzel) 37 (Narbenfäden)	58 Tage 14-22 133–146 62-69 97-124 62-69	Monsanto Petition 04-CR-108U (2004)

Es lagen zum Zeitpunkt der Antragstellung kaum Daten zur Wirksamkeit von Cry3Bb1 und der Toxizität gegenüber Nicht-Ziel-Arthropoden und insbesondere Nicht-Ziel-Blattkäfern vor. DONOVAN et al. (1992) konnten eine toxische Wirkung von Cry3B und Cry3B2 beim Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) belegen. Die Larven des *cottonwood leaf beetle* (*Chrysomela scripta*) sind gegenüber Cry3B empfindlich (FEDERICI & BAUER 1999, JAMES et al. 1999, COYLE et al. 2000).

Es war jedoch bekannt, dass eine ganze Reihe von Chrysomeliden gegenüber Cry3A anfällig ist, das Cry3Bb1 sehr ähnlich ist. Hier sei z. B. auf den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*), den Johanneskrautblattkäfer (*Chrysolina varians*), den Minzenblattkäfer (*Chrysolina herbacea*), den Ampferblattkäfer (*Gastrophysa viridula*), den Meerrettichblattkäfer (*Phaedon cochleariae*), den Breiten Weidenblattkäfer (*Plagioderia versicolor*) oder den Erlenblattkäfer (*Agelastica alni*) verwiesen (LANGENBRUCH 1993, LANGENBRUCH & RIETHMÜLLER 1993, LORENZ & SPIEß 2000, MACINTOSH et al. 2000, RIETHMÜLLER 1990; MEYER 1989). Auch der Pappelblattkäfer (*Chrysomela tremulae*) wird in allen Entwicklungsstadien durch eine Cry3Aa-Expression in transgenen Pappeln geschädigt (GÉNISSEL et al. 2003). Darüber hinaus sind auch der Schneeballblattkäfer (*Pyrrhalta viburni*) und der Gefleckte Weidenblattkäfer (*Chrysomela vigintipunctata*) mit Cry3-Toxinen von *B. t. v. tenebrionis*-Stämmen bekämpfbar (RIETHMÜLLER 1987).

In anderen Coleopteren taxa fanden sich keine Befunde, die auf eine Beeinträchtigung durch Cry3Bb1 oder Cry3A hinweisen. Die Fitness der Larven und Imagines des zoophag-pollenophagen Coccinelliden *Coleomegilla maculata*, dem häufigsten Prädator in den Maisanbaugebieten des Mittleren Westens der USA, wird in Labortests nicht durch Cry3Bb1-haltigen Pollen des Events MON863 verringert (LUNDGREN & WIEDEMANN 2002, DUAN et al. 2002). Auch eine indirekte Intoxikation über die Nahrungskette durch den Fraß von Blattläusen von transgenen MON863-Maispflanzen oder Cry3A-haltigen *L. decemlineata*-Larven konnte für *C. maculata* ausgeschlossen werden (RIDDICK & BARBOSA 1998, LUNDGREN & WIEDEMANN 2005). Dementsprechend war auch bei Felderhebungen kein Einfluss von Cry3Bb1 (aus MON863) auf die Aktivitätsdichte und Abundanz der Art erkennbar (AL-DEEB & WILDE 2003, MCMANUS et al. 2005).

Nach KÖHLER & KLAUSNITZER (1998) sind neben *Diabrotica virgifera virgifera* 518 Blattkäferarten für Deutschland nachgewiesen (Stand 2008). FRITZ-KÖHLER (1996) stellt ein Beziehungsgefüge zwischen den im Rheinland beheimateten Ackerwildkräutern und den dort bekannten Blattkäferspezies her. An 237 Ackerwildkräutern werden 134 Blattkäferarten aufgeführt. Weitere Studien zum Auftreten und zur Biologie der Blattkäfer in der Agrarlandschaft sind, von wenigen Ausnahmen (LETHMAYER et al. 1997, STEINHAUSEN 1950) abgesehen, nicht vorhanden oder sind als „graue“ Literatur nur schwer zugänglich. Die Situation der Blattkäferfauna in der Agrarlandschaft wird aufgrund der zunehmenden Intensivierung der landwirtschaftlichen Produktion als dramatisch bewertet (KÖHLER 1998). Die Rote Liste gefährdeter Tiere Deutschland ordnet 244 Blattkäferarten einer Rote Liste-Kategorie zu (GEISER 1998), darunter auch 34 in der Agrarlandschaft vorkommende Spezies. Naturschutzmaßnahmen wie etwa Ackerrandstreifenprogramme, die eine Erhöhung der floristischen und faunistischen Artenvielfalt in der Agrarlandschaft zum Ziel haben, benötigen viel Zeit, um die Lebensbedingungen der Chrysomelidenfauna zu verbessern. Viele Blattkäferarten erobern verlorene Lebensräume aufgrund ihres geringen Ausbreitungsvermögens nur sehr langsam zurück (FRITZ-KÖHLER 1996). Zusätzliche Gefährdungen, etwa durch den Anbau Cry3Bb1 produzierender transgener Maispflanzen, könnten die Rahmenbedingungen für das Überleben einer artenreichen Chrysomelidenfauna in der Agrarlandschaft weiter verschlechtern.

## **5 Für die Durchführung des Vorhabens benutzte Schutzrechte**

Es wurden keine Erfindungen, Schutzrechtsanmeldungen oder Schutzrechte gemacht oder unbefugt in Anspruch genommen. Mit der Firma MONSANTO bestanden Vereinbarungen über die uneingeschränkte Nutzung transgenen Maissaatguts und die Verwendung des gelieferten *Bt*-Toxins zu Forschungszwecken.

## **6 Zusammenarbeit mit anderen Stellen.**

Während der gesamten Dauer des Projektes erfolgte eine enge Kooperation mit Dr. Hang Nguyen Thu und Dr. Johannes Jehle (DLR Neustadt), die Cry3Bb1-Toxin für Laboruntersuchungen zur Verfügung stellten und Hinweise zur Optimierung des Toxinbiotests gaben. Dipl.-Ing. Frank Schaarschmidt (AG Prof. Dr. L. A. Hothorn, Institut für Biostatistik, Universität Hannover) entwickelte die statistischen Verfahren zur Auswertung der gesammelten Datensätze.

## **Teil II: Eingehende Darstellung der Forschungsergebnisse**

Im Rahmen der Laboruntersuchungen wurden die Larvenstadien verschiedener Blattkäferarten mithilfe eines Biotests hinsichtlich ihrer Reaktion auf hochkonzentrierte *Bt*-Pollensuspensionen und verschiedene Konzentrationen von Cry3Bb1-Lösungen untersucht. Beide Biotests wurden als *no*

*choice tests* (Fütterungsversuche ohne Auswahlmöglichkeit) konzipiert. Durch eine einmalige Pollen- bzw. Toxingabe wurde die akute Toxizität von Cry3Bb1 für verschiedene Larvenstadien der untersuchten Blattkäferspezies bestimmt. Pollenbiotests wurden mit *Gastrophysa viridula* (Ampferblattkäfer) und *Phaedon cochleariae* (Krenblattkäfer) durchgeführt. Toxinbiotests wurden für *G. viridula*, *Leptinotarsa decemlineata* (Kartoffelkäfer), *P. cochleariae* und *Chrysolina varians* (Johanneskrautblattkäfer) vorgenommen.

In einem weiteren Experiment wurde die chronische Toxizität von Cry3Bb1 auf die Larvenentwicklung sowie Lebensdauer und Fekundität der Imagines von *G. viridula* untersucht. Dazu wurde eine stark verdünnte Toxinlösung über die gesamte Dauer der Larvenentwicklung verabreicht. In einem weiteren Laborversuch wurde die im Laufe der Larvalentwicklung von *G. viridula* gefressene Blattfläche ermittelt, um daraus mithilfe von Literaturdaten zur *Bt*-Maispollendichte auf Ackerbeikräutern die Menge des im Freiland aufgenommenen Pollens schätzen und mit den Labordaten vergleichen zu können.

Darüber hinaus wurde in Biotests die Reaktion der neonaten Larven von *Ostrinia nubilalis* (Maiszünsler) und *Plutella xylostella* (Kohlmotte, beide Lepidoptera) auf Cry3Bb1-Toxin geprüft.

Abschließend wurde anhand von Literaturdaten eine Gefährdungsanalyse für die Blattkäferfauna von Ackerbiotopen vorgenommen

## **1 Laborversuche mit den Larven verschiedener Blattkäferarten**

Die für die Labortests benötigten Larven wurden in eigens etablierten Laborzuchten vermehrt (*G. viridula* auf *Rumex obtusifolius* - Stumpfbältriger Ampfer, *L. decemlineata* auf *Solanum tuberosum* - Kartoffel, *P. cochleariae* auf *Brassica rapa ssp. pekinensis* - Chinakohl, *C. varians* auf *Hypericum spp.* – Johanniskraut). Die für die Zucht benötigten Pflanzen wurden ganzjährig im Gewächshaus herangezogen.

### **1.1 Material und Methode**

#### **1.1.1 Biotests mit Pollensuspensionen**

Die Pollentests wurden mit den L<sub>1</sub>- und L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* und den L<sub>2</sub>-Larven von *P. cochleariae* durchgeführt.

##### 1.1.1.1 Herkunft des Pollens

Der für die Untersuchungen verwendete Pollen stammte von Maisfahnen, die am 5.8.2005 und 13.08.2006 auf der Feldversuchsfläche des BMBF-Verbundprojekts im unterfränkischen Münster-Schwarzach gesammelt wurden.

Dazu wurden Maisfahnen, die kurz vor der Blüte standen, abgeschnitten, in Tüten verpackt und in den zur Maisanzucht verwendete S1-Bereich des Gewächshauses am Institut für Biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt überführt. Dort wurden die Maisfahnen ins Wasser gestellt. Im Verlauf des darauf folgenden Tages wurden die Antheren bei den Pflanzen sichtbar und die Pollenproduktion setzte ein. Der Pollen wurde zweimal täglich durch Abklopfen in einer Plastikschaale geerntet. Etwaige Verunreinigungen wie abgefallene Antheren oder Thripse wurden ausgesiebt. Anschließend wurde der Pollen bei –20°C bis zum Gebrauch tief gefroren.

Bei einigen Versuchen mit den L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* wurde frischer Pollen verwendet, der direkt von im Gewächshaus angezogenen Pflanzen gewonnen wurde. Für alle übrigen Pollenbiotests mit Ausnahme der Untersuchung der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* wurde der im Jahr 2005 gesammelte Pollen verwendet. Für letztere wurde die im Jahr 2006 gesammelte Pollenprobe genutzt.

##### 1.1.1.2 Herstellung und Applikation der Pollensuspension

Da bei ersten Vorversuchen die Verfütterung von rund 50 Pollenkörnern pro Junglarve von *G. viridula* mit der transgenen Sorte MON88017 keinen negativen Effekt auf Überlebensrate und Fraßleistung der Larven hatte, wurde die Pollenmenge im weiteren Verlauf der Untersuchungen für die Tests mit den Larven von *G. viridula* und *P. cochleariae* deutlich erhöht.

Dies wurde erreicht, indem 0,5 µl Pollen, der sich aus einer Pollensuspension abgesetzt hatte, direkt vom Boden des Eppendorfgefäßes aufgenommen und auf ein Blattstück von 0,9 cm Durchmesser appliziert wurde. Durch mehrmaliges Auszählen dieser Menge mithilfe eines Mikroskops wurde ein Durchschnittswert von  $752 \pm 37,58$  Pollenkörnern ermittelt. Diese Menge wurde 10-mal auf das Blattstück appliziert (insgesamt ca. 7.500 Pollenkörner). Da je Testansatz 10 Larven verwendet wurden, ergab sich pro Larve eine Pollenmenge von 752 Pollen. Um ein vorzeitiges Verwelken der Blätter zu vermeiden, wurde die Pollenlösung auf Blättchen appliziert, die sich noch an der Pflanze befanden. Erst nach Antrocknung der Pollensuspension wurden daraus die Blattscheiben ausgeschnitten und in eine Petrischale überführt.

Für die Versuche mit den L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* wurde das Verfahren geringfügig verändert. Dazu wurden 20 mg Pollen in 1 ml demineralisiertem Wasser aufgenommen und 10 µl dieser Suspension auf eine Ampferblattscheibe appliziert. Die verwendete Pollenmenge pro Larve betrug im Durchschnitt  $466 \pm 97$  Pollenkörner. Auch dieser Wert wurde ermittelt, indem aus den Pollensuspensionen Stichproben entnommen wurden und die darin enthaltene Pollenanzahl unter dem Mikroskop mithilfe einer Zählkammer bestimmt wurde. Abweichend von den zuvor beschriebenen Tests wurden die Blattstücke bereits vor der Applikation des Pollens ausgeschnitten und in die später genutzten Petrischalen verbracht. Erst dann erfolgte das Auftragen der Pollensuspension.

#### 1.1.1.3 Durchführung der Biotests (Petrischalen-Methode)

Die Versuche wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm (L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* 10 cm), auf deren Boden sich eine ca. 10 mm dicke, verfestigte Schicht einer 3 %igen Agarlösung befand, mit je 10 Larven eines Entwicklungsstadiums angesetzt. Als Nahrung erhielten die Larven zu Versuchsbeginn ein ausgestanztes Blattstück ihrer Nahrungspflanze mit einem Durchmesser von 0,9 cm. Den Larven der Testvarianten wurde eine Pollenlösung der Maissorten MON 88017 (*Bt*-Mais) und DKC 5143 (isogene Linie) auf die Blattstücke appliziert. Die Larven der Kontrollgruppe erhielten ein gleichgroßes Blattstück ohne Pollen. Die Petrischalen wurden abgedichtet, indem in den Deckel ein Stück Handtuchpapier gelegt wurde, dessen Ränder beim Verschließen der Petrischalen zwischen Deckel und Unterteil eingeklemmt wurden. Pro Einzeltest wurde jede der 3 Varianten 5mal wiederholt, so dass pro Variante jeweils 50 Tiere verwendet wurden.

Die Dauer des Biotests betrug eine Woche. Für die gesamte Testdauer verblieben die Petrischalen mit den Larven in einem Klimaschrank mit Hell-Dunkel-Rhythmus (16 h hell/ 8 h dunkel) bei durchschnittlich 26,5°C. 24 Stunden nach Versuchsbeginn wurde in den einzelnen Wiederholungen der prozentuale Anteil der gefressenen Blattfläche geschätzt und überlebende Larven in größere Petrischalen umgesetzt (10 cm Durchmesser), sofern diese nicht bereits schon von Versuchsbeginn an verwendet wurden. Außerdem wurde von diesem Zeitpunkt an täglich mit einem unbehandelten Blattstück nachgefüttert, dass dem jeweiligen Nahrungsbedarf beständig angepasst wurde.

Vor Beginn des Biotests und nach Ablauf von zwei Tagen wurden die Larven gewogen (Ausnahme *P. cochleariae*, 2. Wägung nach 4 Tagen). Aufgrund des sehr geringen Körpergewichts wurden neonate Larven stets als Gruppen von 10 Tieren gewogen. Die weiteren Berechnungen erfolgten dann mit dem so bestimmten Mittelwert. Aus der Differenz der Körpergewichte zwischen den beiden Messungen wurde später der prozentuale Gewichtszuwachs der Testtiere errechnet.

Bei allen Bonituren wurden tote Larven, Reste angefressener Blattstücke und Kot entfernt. Als Versuchsparameter wurden die Mortalitätsrate (Anzahl toter Larven nach 7 Tagen), die Gewichtszunahme (nach 2 bzw. 4 Tagen) sowie die Verpuppungsrate (Anteil von Vorpuppen und Puppen nach 7 Tagen) bestimmt.

### 1.1.2 Biotests mit *Bt*-Toxin-Lösungen

#### 1.1.2.1 Herkunft des Cry3Bb1-Toxins

Das Cry3Bb1-Toxin wurde von der Firma MONSANTO zur Verfügung gestellt (Proteingehalt 4,7 mg/ml, Reinheit 87 %, Toxingehalt 4,089 µg/µl). Das Toxin wurde in Einheiten von 5 µl aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80°C tief gefroren.

### 1.1.2.2 Durchführung der Biotests

#### 1.1.2.2.1 Petrischalen-Methode

Die ebenfalls einwöchigen Biotests mit Cry3Bb1-Toxin waren in Versuchsdesign und Durchführung den Pollentests sehr ähnlich. Auch sie wurden in der Regel mit je 10 Larven in einer 3%igem Agar ausgegossenen Petrischale (Durchmesser 6 oder 10 cm, Stärke der Agar-Schicht 10 mm) durchgeführt.

Im Rahmen von Vorversuchen wurden zunächst fünf verschiedene Toxinkonzentrationen ermittelt, deren Aufnahme bei den betroffenen Larven Mortalitätsraten zwischen 20 und 80 % zur Folge hatten. Die Verdünnungen der Toxin-Stammlösung wurden mit demineralisiertem Wasser hergestellt. Je nach Empfindlichkeit der einzelnen Arten waren verschiedenen Toxinkonzentrationen erforderlich. Die verwendeten Verdünnungen und Toxinkonzentrationen sind in Tab. 2 dargestellt.

Tab. 2: Verwendete Verdünnungen und Toxinkonzentrationen in Abhängigkeit von der untersuchten Blattkäferart und deren Entwicklungsstadium

Verdünnung	Toxinmenge [µg/Larve]	Art			
		<i>L. decemlineata</i>	<i>G. viridula</i>	<i>P. cochleariae</i>	<i>C. varians</i>
unverdünnt	4,089		L <sub>3</sub>		
1:6	0,6815				L <sub>1</sub>
1:8	0,5111				L <sub>1</sub>
1:10	0,4089		L <sub>2</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>
1:15	0,2726		L <sub>2</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>
1:20	0,2044		L <sub>2</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>
1:25	0,1636		L <sub>2</sub>	L <sub>1</sub>	
1:30	0,1363		L <sub>2</sub>	L <sub>1</sub>	
1:50	0,0818	L <sub>2</sub>			
1:100	0,0409	L <sub>2</sub> / L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>		
1:200	0,0205	L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>		
1:300	0,0136	L <sub>2</sub> / L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>		
1:400	0,0102	L <sub>2</sub> / L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>		
1:500	0,0082	L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>		

In der Regel wurden bei den Biotests 5 verschiedene Toxinkonzentrationen in je einer Wiederholung gegen 5 Kontrollen mit unbehandeltem Blattmaterial getestet. Da je Wiederholung bzw. Petrischalen 10 Tiere eingesetzt wurden, betrug die Anzahl der in einem Einzelvergleich untersuchten Individuen 100. Abweichungen sind den entsprechenden Tabellen im Ergebnisteil zu entnehmen.

Die Größe des zu Beginn eingesetzten Blattstücks war jeweils so gewählt, dass es innerhalb eines Tages verzehrt werden konnte und variierte je nach Art, Entwicklungsstadium und Individuenzahl im Testansatz (Tab. 3).

Zur Applikation der 10µl Toxinlösung wurde die Blattscheibe zunächst noch nicht vollständig aus der Blattspreite ausgestanzt. Ein Teil der Verbindung zum umgebenden Blattgewebe wurde erhalten, damit die Blattscheibe während des Antrocknens der Toxinlösung weniger schnell welkte. Im späteren Verlauf der Untersuchungen mit *L. decemlineata* wurde dazu übergegangen, das Blattstück vollständig auszustechen und die Petrischale zu überführen, bevor die Toxinlösung aufgetragen wurde, da dies das Auftragen des Toxins erleichterte. Nach dem Antrocknen der Toxinlösung wurden die Larven zu der Blattscheibe in die Petrischale gesetzt.

Wie auch bei den Pollentests wurden die Tiere vor Versuchsbeginn gewogen, um den Gewichtszuwachs zu ermitteln. Der weitere Ablauf war wie bei den oben beschriebenen Pollentests. Als Versuchsparameter wurden ebenfalls die Mortalitätsrate (nach einer Woche), die Gewichtszunahme (nach 2 Tagen) sowie die Verpuppungsrate (nach 7 Tagen) bestimmt. Darüber hinaus



wurde als ökotoxikologische Kenngröße der LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Wert für die einzelnen Arten und Larvenstadien ermittelt, soweit dies möglich war.

Tab. 3: Größe des zu Beginn des Toxinbiotests angebotenen Blattstücks in Abhängigkeit von der untersuchten Blattkäferart, ihres Entwicklungsstadiums und der Individuenanzahl im Testansatz (N)

Art	N	Larvenstadium	Größe des Blattstücks	
			Durchmesser [cm]	Fläche [cm <sup>2</sup> ]
<i>L. decemlineata</i>	10	L <sub>1</sub>	0,9	0,64
	10	L <sub>2</sub>	0,9	0,64
<i>G. viridula</i>	10	L <sub>1</sub>	0,5	0,20
	10	L <sub>2</sub>	1,6	2,00
	1	L <sub>3</sub>	0,5	0,20
<i>P. cochleariae</i>	10	L <sub>1</sub>	0,7	0,38
<i>C. varians</i>	1	L <sub>1</sub>	0,5	0,20

#### 1.1.2.2 Einzeldosen-Methode

Das Testverfahren für die L<sub>3</sub>-Larven von *G. viridula* und die L<sub>1</sub>-Larven von *C. varians* wich geringfügig von den übrigen Biotestansätzen ab.

Um Kannibalismus zu vermeiden, wurden die Tests der Ampferblattkäferlarven mit Einzeltieren in Kunststoffwürfeln mit abnehmbaren Deckeln (2cm x 2 cm x 2 cm) durchgeführt, deren Boden zuvor ebenfalls eine dünne Beschichtung mit Wasser-Agar erhalten hatte. Auf ein Blattstück von 0,5 cm Durchmesser wurde 1µl der unverdünnten Toxinlösung aufgetragen. Dies entspricht einer Toxinmenge von 4,09 µg/Larve. Diese hohe Toxinkonzentration war nötig, da die L<sub>3</sub>-Larven von *G. viridula* in Vorversuchen auf niedrigere Dosen nicht reagierten.

Auch bei den Versuchen mit *C. varians* wurde dieser Ansatz verwendet, da es in den Petrischalen-Ansätzen mit je 10 Tieren häufig zur Schimmelbildung in den Petrischalen kam, die zu einer Erhöhung der Mortalität in den betroffenen Wiederholungen führte. Auf ein Blattstück von 0,5 cm Durchmesser wurde 1µl verschiedener Toxinverdünnungen aufgetragen (s. Tab. 2).

#### 1.1.2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe des SAS-Programmpakets (Version 9.1).

##### 1.1.2.3.1 Auswertung von Datensätzen mit approximativer Binominalverteilung

Da die Voraussetzungen für eine klassische ANOVA (kontinuierliches Skalenniveau, Varianzhomogenität, Normalverteilung) bei den meisten Datensätzen nicht gegeben waren, wurde diese Daten mithilfe des generalisierten linearen Modells PROC GENMOD in SAS verrechnet. Dieses Verfahren legt eine Binomialverteilung zugrunde. Es beinhaltet ein logistisches Regressionsmodul und analysiert die Daten auf der Skala der logit-Transformation  $yt = \log(y/n/(1-y/n))$ . Die Überprüfung der Anpassungsgüte an die Binominalverteilung ist im Modell implementiert.

Die in den Pollen- und Toxinbiotests ermittelten Mortalitäts- und Verpuppungsraten wurden mittels PROC GENMOD analysiert.

##### 1.1.2.3.2 Auswertung der Mortalitätsraten aus Toxinbiotests

Zur Beschreibung des Effektes der steigenden Dosen von Cry3Bb1-Toxin auf die Mortalitätsrate T/N in den Toxinbiotests wurde ein Logit-Modell mit Regressionsansatz formuliert, in die die Toxinmenge als numerische Variable eingeht. Die Modellgleichung hat die Form

$$\log(T/N / (1-T/N)) = a + date + b * Toxin,$$

wobei *date* die mittleren Unterschiede der Sterberate zwischen den Teilversuchen und *b* den Anstieg der Sterberate in Abhängigkeit von der Toxinmenge (*Toxin*) modelliert. *T* ist die Anzahl der im Test gestorbenen Individuen, *N* die Anzahl der im Versuch getesteten Individuen. *a* ist eine modell-spezifische Konstante.  $\log$  kennzeichnet den natürlichen Logarithmus zur Basis *e*.

In einigen Fällen war die Beziehung  $\log(T/N / (1-T/N)) = b \cdot \text{Toxin}$  nicht linear, wie in der Regression angenommen, sondern wich deutlich von der Linearität ab. Für diese Fälle wurde ein Logit-Modell zur Beschreibung des Effektes der steigenden Toxindosen ohne Regressionsgerade, sondern mit Mittelwertsschätzung für jede Gruppe formuliert. Das Toxin geht dabei als faktorielle Variable in die Kalkulationen qualitativ ein. Die Modellgleichung hat die Form

$$\log(T/N / (1-T/N)) = a + \text{date}_i + \text{Toxin}_j,$$

wobei *date<sub>i</sub>* die mittleren Unterschiede der Sterberate zwischen den Teilversuchen modelliert und *Toxin<sub>j</sub>* den Mittelwert der Sterberate für die *j*-te Toxinmenge (Toxin) schätzt. Die Analyse erfolgt ähnlich wie bei einer ANOVA.

Darüber hinaus wurde ein Modell zur Analyse der Mortalitätsrate *T/N* in Abhängigkeit der Varianten (*Var*), der Versuchswiederholungen (*date*) und der individuellen Anfangsgewichte (*AG*) der Form

$$\log(T/N / (1-T/N)) = \text{date} + \text{AG} + \text{Var} + \text{AG} * \text{Var} \quad \text{erstellt.}$$

Bei allen Modellen werden die Effekte der Variablen auf der Skala der Logits geschätzt. Ein Logitwert ist der Logarithmus eines Odds (Wahrscheinlichkeit *p* durch Gegenwahrscheinlichkeit (1-*p*)). Große Schätzer heißt viele Individuen sterben, kleine Schätzer bedeutet wenige sterben. Es gilt:

Logit = 0 heißt	$T/N = 1-T/N$	Sterberate = Überlebensrate, Sterberisiko 50 : 50
Logit < 0 heißt	$T/N < 1-T/N$	Verhältnis Sterberate zu Überlebensrate < 50 : 50
Logit > 0 heißt	$T/N > 1-T/N$	Verhältnis Sterberate zu Überlebensrate > 50 : 50

#### 1.1.2.3.3 Auswertung von Datensätzen mit approximativer Normalverteilung

Die übrigen Datensätze (relative und absolute Gewichtszunahme im Pollen- und Toxinbiotests) wurden zunächst mit PROC UNIVARIATE auf Normalverteilung überprüft und im Anschluss mithilfe der Prozedur PROC GLM einer Varianzanalyse unterzogen.

#### 1.1.3 Bestimmung der Fraßmenge (als cm<sup>2</sup> gefressene Blattfläche) des Ampferblattkäfers im Verlauf der Larvalentwicklung

Je eine neonate Larve der Art *G. viridula* wurde auf ein ausgestanztes Ampferblattstück (Durchmesser 0,9 cm, Fläche 0,64 cm<sup>2</sup>) in eine mit 3%igem Flüssig-Agar ausgegossene Petrischale (5 cm Durchmesser) gesetzt, die mit einem Stück Handtuchpapier abgedichtet wurden (s. Abschn. 1.1.1.3). Täglich wurde der prozentuale Anteil der gefressenen Blattfläche des Blattstückes visuell geschätzt und die Schale gereinigt. Zur Nachfütterung wurden je nach Bedarf 1-4 ausgestanzte Blattstücke pro Tag gegeben. Die Petrischalen wurden bis zur Verpuppung der Larven im Klimaschrank bei 25°C und Langtagbedingungen (16 h hell, 8h dunkel) verwahrt. Die Anzahl der Wiederholungen (Petrischalen) betrug 15. Die gefressene Blattfläche in cm<sup>2</sup> wurde durch Umrechnung des prozentualen, gefressenen Anteils der Blattscheiben in die entsprechende Kreisfläche näherungsweise bestimmt.

#### 1.1.4 Untersuchungen zur chronischen Toxizität und möglichen subletalen Effekten von Cry3Bb1 auf den Ampferblattkäfer

Das Versuchsdesign war an das der Toxinbiotests angelehnt und wird daher nur verkürzt dargestellt. Je 30 neonate Larven der Art *G. viridula* wurden einzeln in Petrischalen (Durchmesser 10

cm) mit Agar-Beschichtung gesetzt und täglich bis zum Erreichen des Vorpuppenstadiums mit ausgestanzten Blattstücken (Durchmesser 9 mm) gefüttert, auf die zuvor 10 µl einer stark verdünnten Toxinlösung (0,0041 µg/µl, 1:1000 Verdünnung der Stammlösung) appliziert wurde. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils eine gleiche Anzahl unbehandelter Blattstücke. Die zugeführte Nahrungsmenge wurde sukzessive mit fortschreitender Entwicklung der Larven erhöht, indem die Anzahl der behandelten Blattstücke auf bis zu drei im Verlauf des Versuches gesteigert wurde. Der zu erwartende Nahrungsbedarf der Larven wurde in einem Vorversuch ermittelt (s. Abschn. 1.1.3). Die Nahrungsmenge von Tag 1 bis Tag 4 sowie Tag 8 betrug je 1 Blattstück und steigerte sich an Tag 5 auf 2 und schließlich an Tag 6 und 7 auf 3 Blattstücke. Die aufgenommene Nahrungsmenge wurde visuell als prozentualer Anteil der gefressenen Blattfläche bestimmt. Als Versuchsparameter wurden außerdem das Gewicht der Larven nach drei Tagen und das Gewicht der Puppe bestimmt. Ferner wurden der Zeitpunkt der Verpuppung erfasst und die Mortalitätsraten während der Larvalentwicklung und der Puppenphase ermittelt. Für die Dauer des Versuches wurden die Versuchstiere im Klimaschrank bei  $25,5 \pm 0,4$  °C und  $43,4 \pm 4,7$  % relativer Luftfeuchte unter Langtagbedingungen (16 h hell, 8 h dunkel) verwahrt.

Die Imagines wurden unmittelbar nach dem Schlupf noch vor der ersten Nahrungsaufnahme gewogen. Alle geschlüpften Imagines einer Versuchsvariante wurden zunächst für die Dauer ihres Reifungsfraßes zusammen in einer Gerda-Schalen (5 cm x 5 cm x 10 cm) gehalten, deren Deckel zwei kreisrunde mit Gaze bespannte Öffnungen von 3 cm Durchmesser besaß. Die Tiere wurden täglich mit einem frischen Ampferblatt gefüttert, deren Stiele in ein mit Wasser gefülltes und mit Parafilm abgedichtetes 50ml-Schnappdeckelgefäß gestellt wurden, um die Blätter frisch zu halten. Zusätzlich sorgte ein nasser Wattebausch in einer kleinen Petrischale (Durchmesser 2,5 cm) für Feuchtigkeit. Da sich das Geschlecht von *G. viridula* anhand äußerer Merkmale nicht sicher bestimmen lässt, wurde die Paarbildung den Tieren selbst überlassen. Einmal gebildete Paare wurden durch Umsetzen in eine gesonderte Gerda-Schale von der Gruppe separiert und wie zuvor beschriebenen versorgt. Um die Fekundität der Weibchen zu ermitteln, wurde das Blatt täglich ausgetauscht und die darauf abgelegten Eier ausgezählt. Darüber hinaus wurde die Lebensdauer der Imagines bestimmt. Tiere, die sich nicht verpaarten, verblieben bis zum Lebensende zusammen in der Gerda-Schale. Die Lebensdauer der Imagines wurde erfasst.

Für die Dauer des Versuches wurden die Imagines im Klimaschrank bei 25 °C und 80 % relativer Luftfeuchte unter Langtagbedingungen (16 h hell, 8 h dunkel) gehalten.

Die statistische Auswertung erfolgte mit SAS 9.1 (PROC UNIVARIATE, PROC NPAR1WAY). Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

## 1.2 Ergebnisse

### 1.2.1 Biotests mit Pollensuspensionen

Der mittlere Anteil der durch die L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* gefressenen Blattfläche lag bei den Tests mit dem im Feld gesammelten und tief gefrorenen Pollen bei durchschnittlich 78,9 (MON88017), 85,1 (DKC1543) und 86,0 % (Kontrolle). Die mit frischem Pollen aus dem Gewächshaus behandelten Blattstücke wurden ebenso wie die unbehandelten Blattstücke der Kontrolle dagegen zu fast 100 % gefressen (Tab. 4). Demgegenüber war der Anteil der gefressenen Blattfläche bei den L<sub>1</sub>-Larven in den Pollenvarianten mit 78,5 % (MON88017) und 74 % (DKC1543) deutlich niedriger als bei den L<sub>2</sub>-Larven. In der Kontrolle war mit 93 % ein erheblich höherer Wert zu beobachten. Bei den Biotests mit den L<sub>1</sub>-Larven von *P. cochleariae* wurden die behandelten China-kohl-Blattstücke zu 96 bzw. 99 % gefressen, während in der Kontrolle lediglich ein Wert von 85,8 % erreicht wurde.

Tab. 4: Akzeptanz des mit Pollensuspensionen von Feld- und Gewächshausproben behandelten Blattstücks im Biotest (in % gefressene Blattfläche) durch die Larven von *G. viridula* und *P. cochleariae* (SE Standardfehler)

	Variante	Larvenstadium	Herkunft des Pollens	mittlere gefressene Blattfläche [%] ± SE
<i>G. viridula</i>	Kontrolle	L <sub>1</sub>	-	93,0 ± 1,4
	MON88017	L <sub>1</sub>	gefroren, Feld	78,5 ± 7,8
	DKC1543	L <sub>1</sub>	gefroren, Feld	74,0 ± 8,5
	Kontrolle	L <sub>2</sub>	-	86,0 ± 12,5
	MON88017	L <sub>2</sub>	gefroren, Feld	78,9 ± 21,1
	DKC1543	L <sub>2</sub>	gefroren, Feld	85,1 ± 15,8
	Kontrolle	L <sub>2</sub>	-	99,8 ± 0,2
	MON88017	L <sub>2</sub>	frisch, GWH	99,6 ± 0,4
	DKC1543	L <sub>2</sub>	frisch, GWH	100,0 ± 0,0
<i>P. cochleariae</i>	Kontrolle	L <sub>1</sub>	-	85,8 ± 21,7
	MON88017	L <sub>1</sub>	gefroren, Feld	96,0 ± 5,5
	DKC1543	L <sub>1</sub>	gefroren, Feld	99,0 ± 2,2

#### 1.2.1.1 *G. viridula*

##### 1.2.1.1.1 L<sub>1</sub>-Larven

Die Mortalitätsraten in MON88017 und DKC1543 erreichten mit 50 % und 54 % signifikant höhere Werte als in der Kontrolle mit nur 7 % ( $p = 0,0002$  und  $p < 0,0001$ , Abb. 1, Tab. 5). Zwischen den beiden Pollenvarianten bestand kein signifikanter Unterschied. Darüber hinaus lagen Unterschiede zwischen den zwei Teilversuchen vor ( $p = 0,047$ ).

Die relative Gewichtszunahme in der Kontrolle übertraf mit 307 % deutlich die Werte in den Pollenvarianten. In der Variante mit *Bt*-Pollen (MON88017) betrug der Gewichtszuwachs nur 200%, in der isogenen Variante (DKC1543) lediglich 151% (Abb. 2, Tab. 5). Bedeutende Anteile der Variabilität der Versuchseinheiten können durch Mittelwertsunterschiede zwischen den einzelnen zeitlichen Wiederholungen der Versuche erklärt werden. Es bestehen signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und MON88017 sowie zwischen der Kontrolle und DKC1543 ( $p=0.0067$ ).

Die Verpuppungsrate in der Kontrolle war mit 66 % signifikant höher als in den Varianten MON88017 und DKC1543 mit 35 und 16 %. Die Unterschiede zwischen MON88017 und der Kontrolle sowie DKC1543 und der Kontrolle sind hochsignifikant ( $p = 0.0007$  sowie  $p < 0.0001$ ). Die Abweichungen zwischen MON88017 und DKC1543 sind schwach signifikant ( $p = 0.0273$ ).

Da die Werte der Untersuchungsparameter in den Varianten mit transgenem und isogenen Pollen gleichermaßen von der Kontrolle abweichen und dies in der isogenen Variante sogar noch deutlicher ist, ist ein *Bt*-Effekt auszuschließen.

Wie die mikroskopische Kontrolluntersuchung des Pollens aus dem Jahr 2006 zeigte, war dieser sehr stark von Pilzmyzel und Bakterien durchsetzt. Aufgrund einer längeren Schlechtwetterphase im Sommer 2006 waren die Maisfahnen während der Blüte für eine längere Zeit hoher Feuchtigkeit ausgesetzt, was vermutlich einem Befall durch Mikroorganismen begünstigt hat (siehe Diskussion).

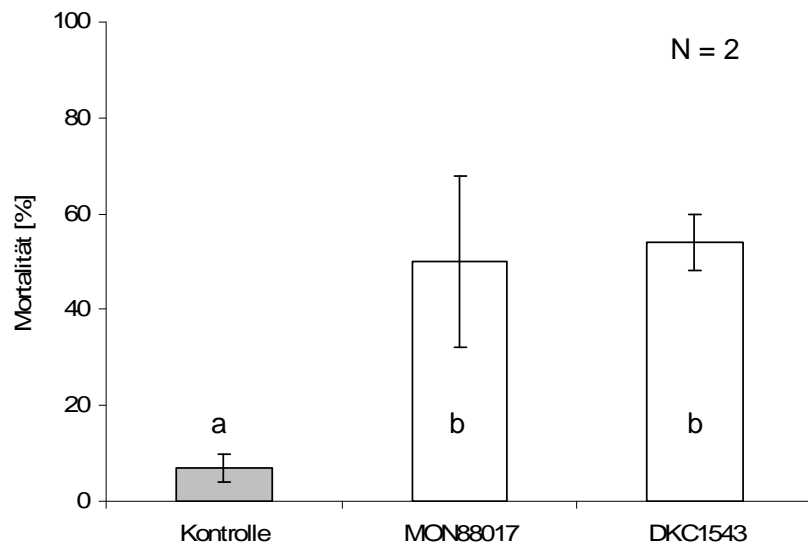


Abb. 1: Mortalität (in %,  $\pm$  SE) der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Pollenbiotest mit tief gefrorenen Pollen von Feldproben. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p < 0,0001$ ).

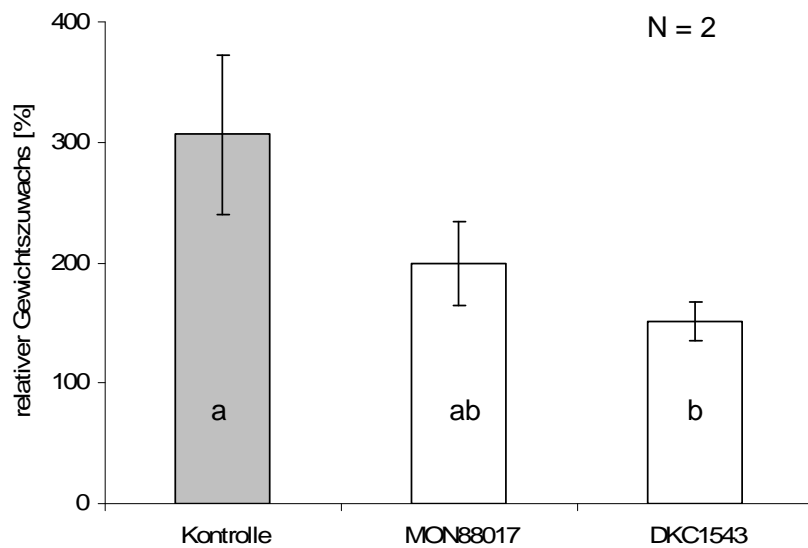


Abb. 2: relative Gewichtszunahme (in %,  $\pm$  SE) der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Pollenbiotest mit tief gefrorenen Pollen von Feldproben. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GLM,  $p = 0,0067$ ).

Tab. 5: Mortalitätsrate und Verpuppungsrate (jeweils nach 7 Tagen) und Gewichtszuwachs (nach 2 Tagen) der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* im Pollenbiotest mit im Feld gesammeltem, tief gefrorenem Pollen

	Kontrolle	± SE	MON88017	± SE	DKC1543	± SE
Anzahl Einzeltests	2		2		2	
Pollen/Larve	466	97	466	97	466	97
Anzahl Wiederholungen je Test	5		5		5	
Anzahl Einzeltiere je Test	50		50		50	
Gesamtindividuenzahl	100		100		100	
Anzahl toter Larven	7		50		54	
Anzahl überlebender Larven	93		50		46	
Mortalität [%]	7,0 a	3,0	50,0 b	18,0	54,0 b	6,0
mittleres Anfangsgewicht [mg/Larve]	0,20	0,01	0,23	0,01	0,21	0,04
mittleres Gewicht nach 2 Tagen [mg/Larve]	0,77	0,21	0,77	0,13	0,64	0,19
absoluter Gewichtszuwachs [mg]	0,58	0,23	0,54	0,11	0,43	0,23
relativer Gewichtszuwachs [%]	306,6 a	131,9	199,3 b	1,9	151,7 b	70,0
Verpuppungsrate nach 7 Tagen [%]	66,0 a	4,0	35,0 b	13,0	16,0 c	2,0

Mittelwerte innerhalb einer Zeile mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD / PROC GLM,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SE = Standardfehler.

#### 1.2.1.1.2 L<sub>2</sub>-Larven

Die Mortalitätsrate war in allen Varianten mit 6-7 % sehr gering. Es liegen deutliche Unterschiede zwischen den Teilversuchen vor ( $p = 0,0018$ ). Die statistische Auswertung zeigte jedoch keine signifikanten Abweichungen zwischen den Varianten ( $p = 0,7035$ , Abb. 3).

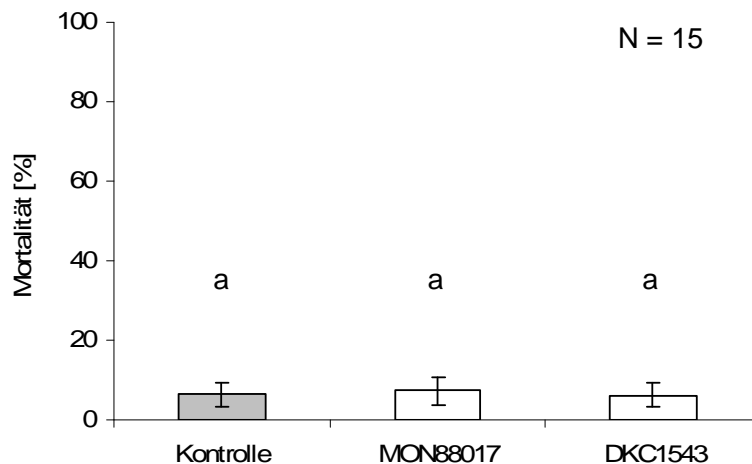


Abb. 3: Mortalität (in %, ± SE) der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Pollenbiotest mit tief gefrorenen Pollen von Feldproben. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p = 0,7035$ ).

Die Larven der unbehandelten Kontrollgruppe hatten in den Biotests mit dem in Feld gesammeltem und tief gefroren gelagerten Pollen zwei Tage nach Biotestbeginn durchschnittlich 587 % an Ge-

wicht zugenommen und somit ihr Ausgangsgewicht fast um das sechsfache gesteigert (Tab. 6, Abb. 4). Damit war die Gewichtszunahme in der Kontrollgruppe signifikant höher als in den Varianten mit Pollen ( $p = 0,0003$  bzw.  $p = 0,0005$ ). Der geringe Unterschied zwischen der Variante MON88017 (424 %) und DKC1543 (407 %) war statistisch nicht signifikant ( $p = 0,912$ ). Außerdem ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Teilversuchen ( $p < 0,0001$ ). Zum Zeitpunkt der siebten Bonitur war in allen Varianten der größte Teil der Larven im Vorpuppen- oder Puppenstadium (Abb. 5, Tab. 6). Der Anteil lag in allen Varianten bei 91-92%. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten festgestellt werden ( $p = 0,699$ ).

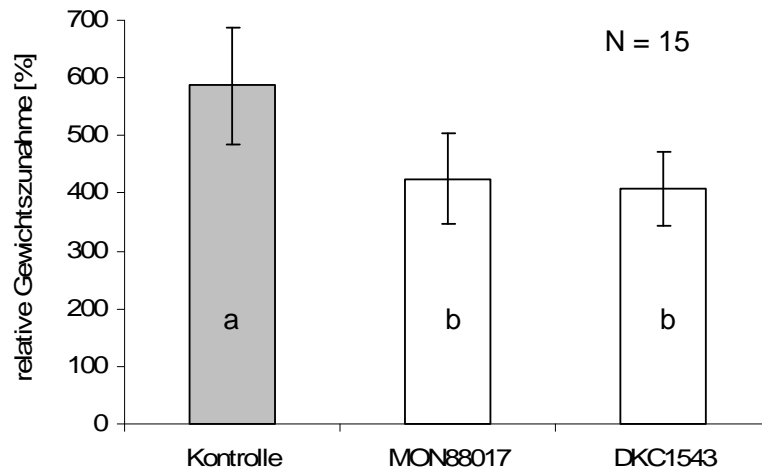


Abb. 4: relative Gewichtszunahme (in %,  $\pm$  SE) der  $L_2$ -Larven von *G. viridula* nach zwei Tagen im Pollenbiotest mit tief gefrorenen Pollen von Feldproben. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GLM,  $p = 0,0002$ ).

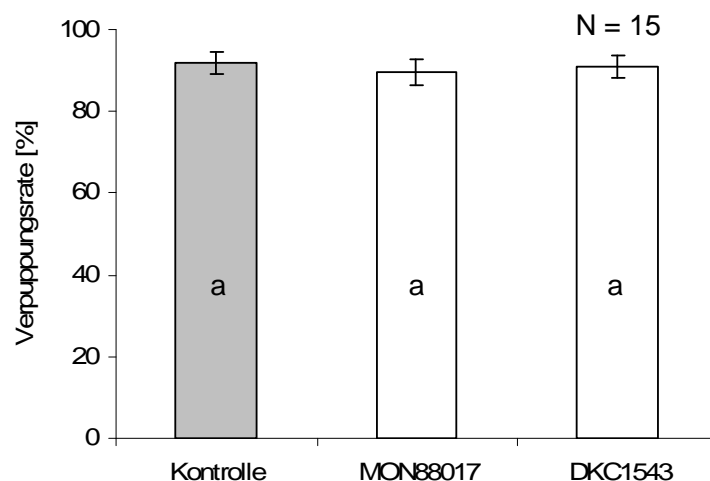


Abb. 5: Verpuppungsrate (Anteil Puppen und Vorpuppen in %,  $\pm$  SE) der  $L_2$ -Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Pollenbiotest mit tief gefrorenen Pollen von Feldproben. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p = 0,699$ ).

Tab. 6: Mortalitätsrate, Verpuppungsrate (jeweils nach 7 Tagen) und Gewichtszuwachs (nach 2 Tagen) der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* im Pollenbiotest mit im Feld gesammeltem, tief gefrorenem Pollen

	Kontrolle	± SE	MON88017	± SE	DKC1543	± SE
Anzahl Einzeltests	15		15		15	
Pollen/Larve	752	38	752	38	752	38
Anzahl Wiederholungen je Test	5		5		5	
Anzahl Einzeltiere je Test	50		50		50	
Gesamtindividuenzahl	750		740		750	
Anzahl toter Larven	47		51		46	
Anzahl überlebender Larven	702		686		698	
Anzahl fehlender Larven	1		6		3	
Mortalität [%]	6,28 a	2,91	7,23 a	3,59	6,15 a	3,11
mittleres Anfangsgewicht [mg/Larve]	0,58	0,06	0,66	0,06	0,66	0,06
mittleres Gewicht nach 2 Tagen [mg/Larve]	2,86	0,20	2,80	0,18	2,85	0,16
absoluter Gewichtszuwachs [mg]	2,28	0,18	2,14	0,17	2,19	0,15
relativer Gewichtszuwachs [%]	586,80 a	101,70	424,34 b	78,49	407,24 b	63,96
Verpuppungsrate nach 7 Tagen [%]	92,00 a	2,68	89,73 a	3,19	90,93 a	2,73

Mittelwerte innerhalb einer Zeile mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD / PROC GLM,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SE = Standardfehler.

Ein Teil der Versuche wurde mit frischem Pollen von im Gewächshaus angezogenen Pflanzen durchgeführt. Die Ergebnisse zur Mortalität und Verpuppungsrate entsprachen mit Werten von 6-7 % bzw. 91-92 % den Resultaten mit dem im Feld geernteten Pollen (Tab. 7). Weder bei der Mortalität ( $p = 0,927$ ) noch bei der Verpuppungsrate ( $p = 0,922$ ) war ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Varianten festzustellen. Nur bei der Gewichtszunahme wichen die Ergebnisse von den Versuchen mit dem im Feld gesammelten Pollen ab. Zu einem war das Niveau mit einem prozentualen Zuwachs zwischen 233 und 276 % erheblich niedriger als bei den Versuchen mit Pollen aus dem Freiland; zum anderen war der Zuwachs bei der Variante mit MON88017-Pollen im Mittel um über 30 % geringer als bei den anderen Varianten (Abb. 6). Dieser Unterschied ließ sich statistisch jedoch nicht absichern ( $p = 0,084$ ).

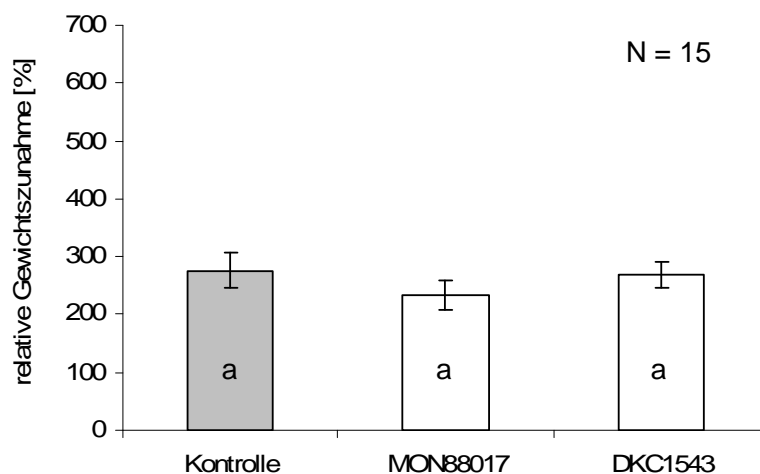


Abb. 6: relative Gewichtszunahme (in %, + SE) der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* nach zwei Tagen im Pollenbiotest mit frischem Pollen von Gewächshauspflanzen. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GLM,  $p = 0,084$ ).



Tab. 7: Mortalitätsrate, Verpuppungsrate (jeweils nach 7 Tagen) und Gewichtszuwachs (nach 2 Tagen) der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* im Pollenbiotest mit im Gewächshaus gesammeltem, frischem Pollen

	Kontrolle	± SE	MON88017	± SE	DKC1543	± SE
Anzahl Einzeltests	15		15		15	
Pollen/Larve	752	38	752	38	752	38
Anzahl Wiederholungen je Test	5		5		5	
Anzahl Einzeltiere je Test	50		50		50	
Gesamtindividuenzahl	250		240		250	
Anzahl toter Larven	17		15		16	
Anzahl überlebender Larven	229		220		231	
Anzahl fehlender Larven	4		5		3	
Mortalität [%]	6,9	2,7	6,2	2,9	6,5	2,9
mittleres Anfangsgewicht [mg/Larve]	0,70	0,04	0,73	0,05	0,78	0,04
mittleres Gewicht nach 2 Tagen [mg/Larve]	2,31	0,12	2,19	0,10	2,59	0,11
absoluter Gewichtszuwachs [mg]	1,61	0,13	1,46	0,10	1,81	0,11
relativer Gewichtszuwachs [%]	276,1	29,5	233,6	26,5	268,5	21,2
Verpuppungsrate nach 7 Tagen [%]	91,6 a	1,9	92,0 a	2,7	91,6 a	2,0

Mittelwerte innerhalb einer Zeile mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD / PROC GLM,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SE = Standardfehler.

#### 1.2.1.2 *P. cochleariae* (L<sub>2</sub>-Larven)

Die Mortalität war mit 4% in der Kontrolle und der isogenen Variante bzw. 2 % in der *Bt*-Variante sehr niedrig (Tab. 8, Abb. 7). Der Gewichtszuwachs betrug bei der Kontrolle und MON88017 303%, während bei der „isogenen“ Variante nur 253% erreicht wurden. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten traten bei beiden Untersuchungsparametern nicht auf ( $p = 0,78$  bzw.  $p = 0,313$ ). Die Verpuppungsrate betrug 48 % (Kontrolle), 42 % (MON88017) und 64 % (DKC1543), und zeigte damit größere Unterschiede zwischen den Varianten als bei den übrigen Pollenbiotests. Sie unterschied sich in allen Varianten signifikant ( $p < 0,0001$ ).

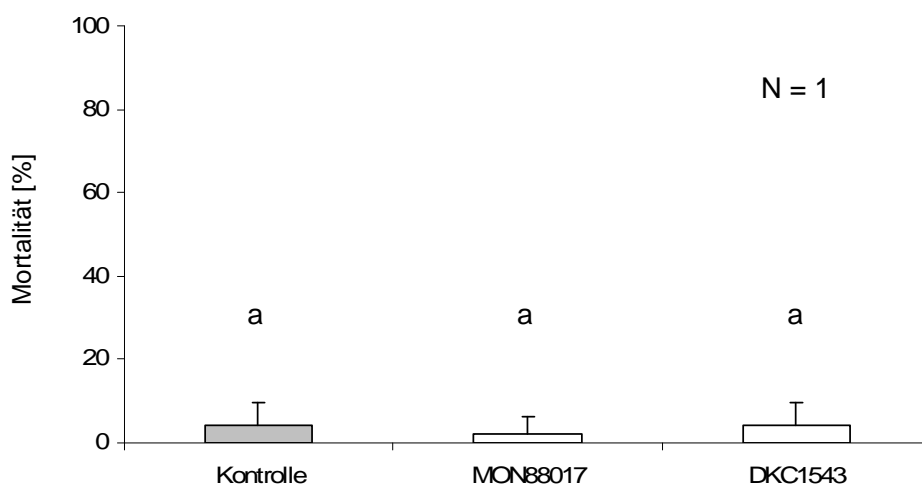


Abb. 7: Mortalität (in %, + SE) der L<sub>2</sub>-Larven von *P. cochleariae* nach sieben Tagen im Pollenbiotest mit tief gefrorenen Pollen von Feldproben. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p = 0,78$ )

Tab. 8: Mortalitätsrate, Verpuppungsrate (nach jeweils 7 Tagen) und Gewichtszuwachs (nach 4 Tagen) der L<sub>2</sub>-Larven von *P. cochleariae* im Pollenbiotest mit im Feld gesammeltem, tief gefrorenem gelagertem Pollen

	Kontrolle	± SE	MON88017	± SE	DKC1543	± SE
Anzahl Einzeltests	1		1		1	
Pollen/Larve	752		752		752	
Anzahl Wiederholungen je Test	5		5		5	
Anzahl Einzeltiere je Test	50		50		50	
Anzahl toter Larven	2		1		2	
Anzahl überlebender Larven	48		49		48	
Mortalität [%]	4,0 a	2,45	2,0 a	2	4,0 a	2,45
mittleres Anfangsgewicht [mg/Larve]	1,97	0,15	2,04	0,11	2,31	0,11
mittleres Gewicht nach 4 Tagen [mg/Larve]	7,74	0,14	8,11	0,15	8,09	0,14
absoluter Gewichtszuwachs [mg]	5,77	0,17	6,08	0,17	5,78	0,24
relativer Gewichtszuwachs [%]	302,5 a	30,57	303,3 a	23,21	253,56 a	20,65
Verpuppungsrate nach 7 Tagen [%]	48 a	4,12	42 b	4,12	64 c	5,74

Mittelwerte innerhalb einer Zeile mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD / PROC GLM,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SE = Standardfehler

### 1.2.2 Biotests mit Bt-Toxin-Lösungen

Da sich trotz der Verwendung von hochkonzentrierten Pollensuspensionen kein Effekt auf die untersuchten Parameter zeigen ließ, wurden für die weiteren Biotests verschiedene Verdünnungen einer Bt-Toxinlösung genutzt. Dies ermöglichte die Generierung ausreichend hoher Mortalitätsraten, um LD<sub>50</sub> und LD<sub>90</sub>-Werten bestimmen zu können. Die für die jeweiligen Arten geeigneten Verdünnungen wurden in Vorversuchen bestimmt.

In den Kontrollen der verschiedenen Biotestansätze wurden die unbehandelten Blattscheiben zu einem Prozentsatz von 84,8 bis 99,8 % gefressen (Tab. 9). Vor allem bei höheren Toxinkonzentrationen führten die frühzeitige Schädigung der Larven und ein damit verbundener Fraßstopp zu erheblich geringeren Werten. In den Toxinvarianten war die Spannbreite insgesamt größer und erreichte Werte zwischen 40,5 und 100 %.

#### 1.2.2.1 *G. viridula* (Ampfer-Blattkäfer)

##### 1.2.2.1.1 L<sub>1</sub>-Larven

Mit Anstieg der je Einzellarve applizierten Toxinmenge war auch eine signifikante Zunahme der Mortalität der neonaten Larven von *G. viridula* festzustellen ( $p < 0,0001$ , Abb. 8). Während bei der Kontrolle im Mittel lediglich eine Mortalität von 5,1 % zu beobachten war, stieg die Sterblichkeit bei den Toxinvarianten auf bis zu 67 % (bei 0,041 µg/Larve) an. Signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und den Toxinvarianten ergaben sich ab einer Toxinmenge von 0,01 µg.

Zwischen der Kontrolle und einzelnen Toxinvarianten konnten signifikante Unterschiede zwischen den Verpuppungsraten festgestellt werden (0,008 µg/Larve, 0,020-0,041 µg/Larve,  $p < 0,0001$ , Abb. 9, Tab. 13). Außerdem traten signifikante Abweichungen in der Verpuppungsrate zwischen der höchsten in den Versuchen eingesetzten Toxinmenge (0,041 µg/Larve) und den Toxindosen unterhalb von 0,020 µg/Larve auf. Ein deutlicher Trend für einen Abfall oder Anstieg der Verpuppungsrate mit zunehmender Toxinkonzentration war nicht zu beobachten. Außerdem konnte ein erheblicher Teil der ermittelten Varianzen durch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Teilversuchen erklärt werden ( $p < 0,0001$ ).

Ein signifikanter Einfluss der applizierten Toxinmenge auf den innerhalb der Varianten stark variierenden relativen Gewichtszuwachs der L<sub>1</sub>-Larven war nur für die beiden höchsten Toxinkon-

zentrationen erkennbar ( $p = 0,008$ , Tab. 10). Darüber hinaus traten signifikante Unterschiede zwischen den Teilversuchen auf ( $p < 0,0001$ ).

Tab. 9: Akzeptanz des mit Toxin behandelten Blattstücks im Biotest durch die Larven verschiedener Blattkäferarten (in % gefressener Blattfläche)

Art	Larvenstadium	Toxinmenge [ $\mu\text{g}/\text{Larve}$ ]	mittlere gefressene Blattfläche [%] $\pm$ SE
<i>G. viridula</i>	L <sub>1</sub>	0	84,8 $\pm$ 23,1
	L <sub>1</sub>	0,0409	40,5 $\pm$ 28,8
	L <sub>1</sub>	0,0205	58,5 $\pm$ 32,8
	L <sub>1</sub>	0,0136	69,5 $\pm$ 33,0
	L <sub>1</sub>	0,0102	74,5 $\pm$ 34,7
	L <sub>1</sub>	0,0082	76,5 $\pm$ 31,8
	L <sub>2</sub>	0	96,3 $\pm$ 13,4
	L <sub>2</sub>	0,4089	68,5 $\pm$ 30,5
	L <sub>2</sub>	0,2726	67,5 $\pm$ 32,3
	L <sub>2</sub>	0,2044	72,5 $\pm$ 25,5
	L <sub>2</sub>	0,1636	74,0 $\pm$ 31,3
	L <sub>2</sub>	0,1363	85,0 $\pm$ 20,1
	L <sub>3</sub>	0	97,9 $\pm$ 12,5
	L <sub>3</sub>	4,089	78,0 $\pm$ 30,9
<i>L. decemlineata</i>	L <sub>1</sub>	0	87,7 $\pm$ 18,78
	L <sub>1</sub>	0,0409	49,0 $\pm$ 11,40
	L <sub>1</sub>	0,0205	84,0 $\pm$ 6,52
	L <sub>1</sub>	0,0136	76,7 $\pm$ 25,50
	L <sub>1</sub>	0,0102	91,2 $\pm$ 6,29
	L <sub>1</sub>	0,0082	96,0 $\pm$ 2,24
	L <sub>2</sub>	0	99,8 $\pm$ 0,6
	L <sub>2</sub>	0,0818	89,0 $\pm$ 16,6
	L <sub>2</sub>	0,0409	82,6 $\pm$ 21,6
	L <sub>2</sub>	0,0136	100,0 $\pm$ 0,0
L <sub>2</sub>	0,0102	96,0 $\pm$ 8,9	
<i>P. cochleariae</i>	L <sub>1</sub>	0	89,7 $\pm$ 15,6
	L <sub>1</sub>	0,4089	44,5 $\pm$ 27,5
	L <sub>1</sub>	0,2726	66,0 $\pm$ 27,0
	L <sub>1</sub>	0,2044	70,5 $\pm$ 26,7
	L <sub>1</sub>	0,1636	76,5 $\pm$ 22,1
	L <sub>1</sub>	0,1363	85,0 $\pm$ 15,6

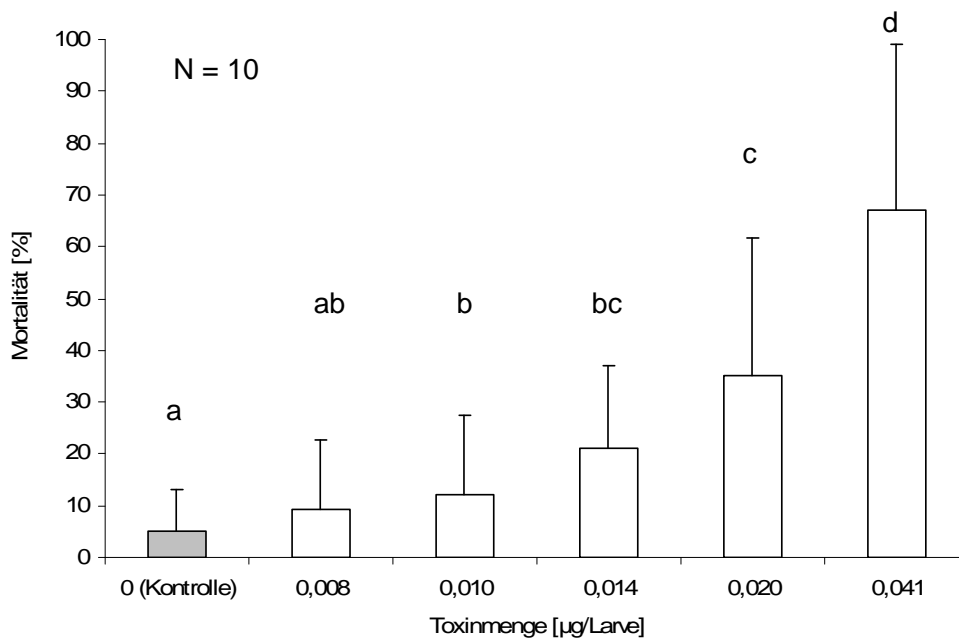


Abb. 8: Mortalität (in %, + SD) der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p < 0,0001$ ).

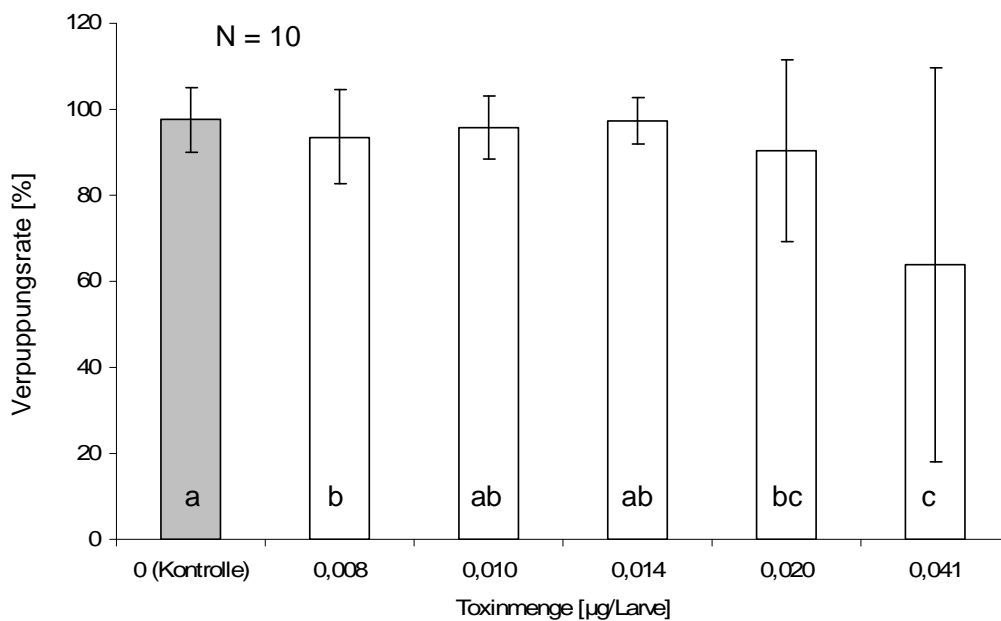


Abb. 9: Verpuppungsrate (Anteil Puppen und Vorpuppen in %, ± SD) der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GLM,  $p = 0,0034$ ).

Tab. 10: Resultate der PROC GLM: durch das Modell korrigierte Mittelwerte (LSMean), Irrtumswahrscheinlichkeit für Unterschiede der Toxinvarianten gegenüber der Kontrolle sowie einseitiges 95%iges Konfidenzintervall für die relative Gewichtszunahme der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* im Toxinbiotest ( $p = 0,008$ )

Toxinmenge [ $\mu\text{g}/\text{Larve}$ ]	LSMean	relative Gewichtszunahme [%]	
		H <sub>0</sub> : LSMean = Control/ Pr < t	95%iges Konfidenzintervall
0	551,74		509,95 - 593,54
0,008	509,82	0,6323	416,37 - 603,27
0,010	520,17	0,7304	426,71 - 613,62
0,014	503,00	0,5604	409,55 - 596,45
0,020	401,08	0,0109	307,63 - 494,53
0,041	299,10	0,0052	146,50 - 451,71

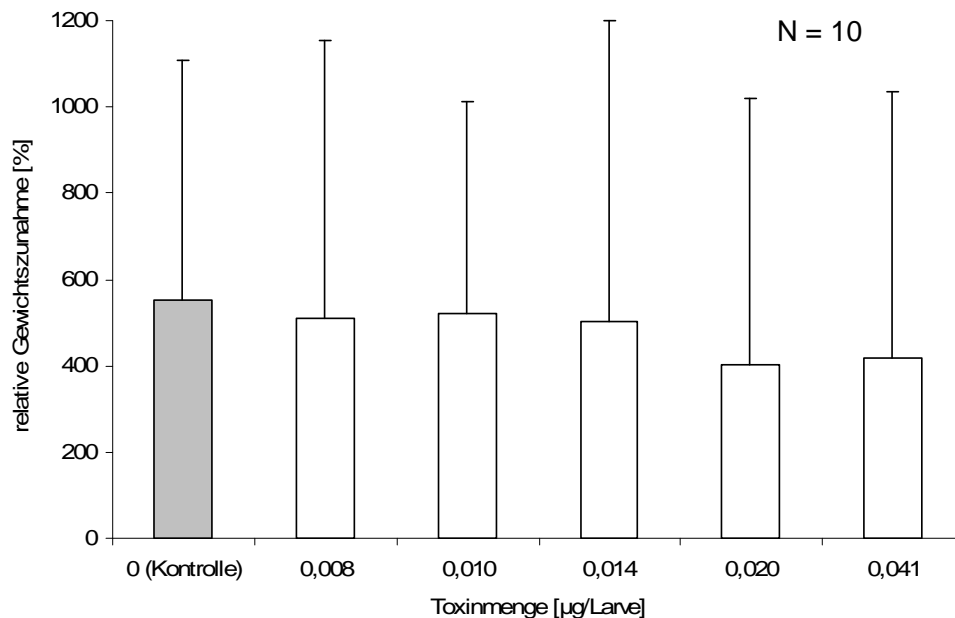


Abb. 10: relative Gewichtszunahme (in %, + SD) der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* nach zwei Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in  $\mu\text{g}$

#### 1.2.2.1.2 L<sub>2</sub>-Larven

Die Sterberate stieg mit zunehmender Toxindosis signifikant an ( $p < 0,0001$ , Abb. 11, Tab. 13). Ein nennenswerter Anteil der Streuung der Sterberate kann durch mittlere Unterschiede zwischen den Teilversuchen erklärt werden ( $p < 0,0001$ ).

Die Verpuppungsrate nahm mit zunehmender Toxindosis signifikant ab ( $p < 0,0001$ , Abb. 12). Bereits die Toxinvariante mit der niedrigsten Toxinmenge (0,136  $\mu\text{g}/\text{Larve}$ ) wies eine signifikant geringere Verpuppungsrate auf als die Kontrolle. Auch zwischen den einzelnen Toxinvarianten und den einzelnen Teilversuchen ( $p < 0,0001$ ) traten weitere signifikante Unterschiede auf.

Der relative Gewichtszuwachs in allen Toxinvarianten unterschied sich signifikant von der Kontrolle ( $p < 0,0001$ , Tab. 11, Abb. 13). Eine Reduktion der Gewichtszunahme mit zunehmender Toxinkonzentration war nicht zu beobachten. Außerdem waren zwischen den einzelnen Teilversuchen signifikante Unterschiede feststellbar ( $p < 0,0001$ ).

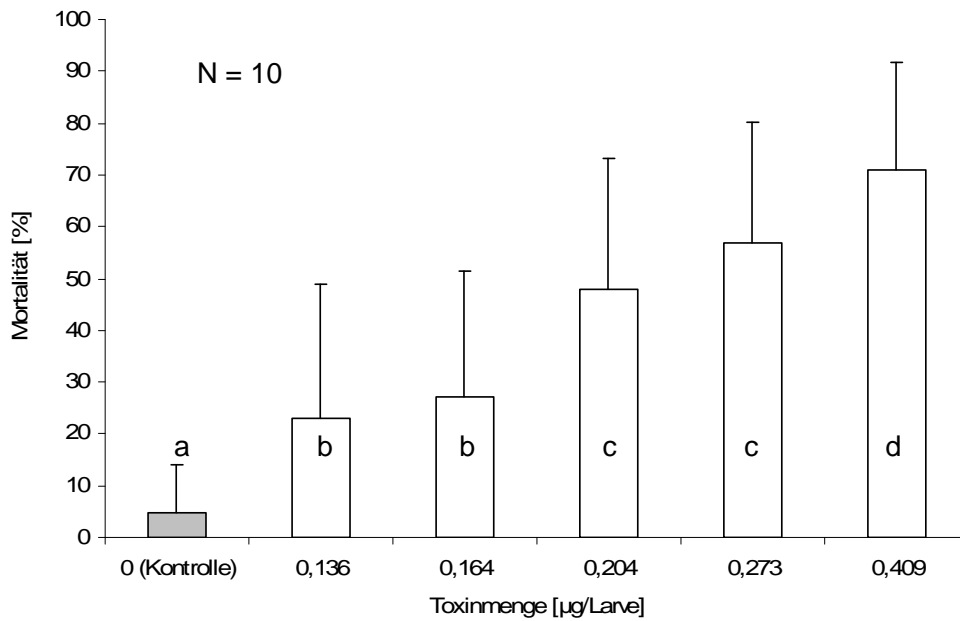


Abb.11: Mortalität (in %, + SD) der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD, p < 0,0001).

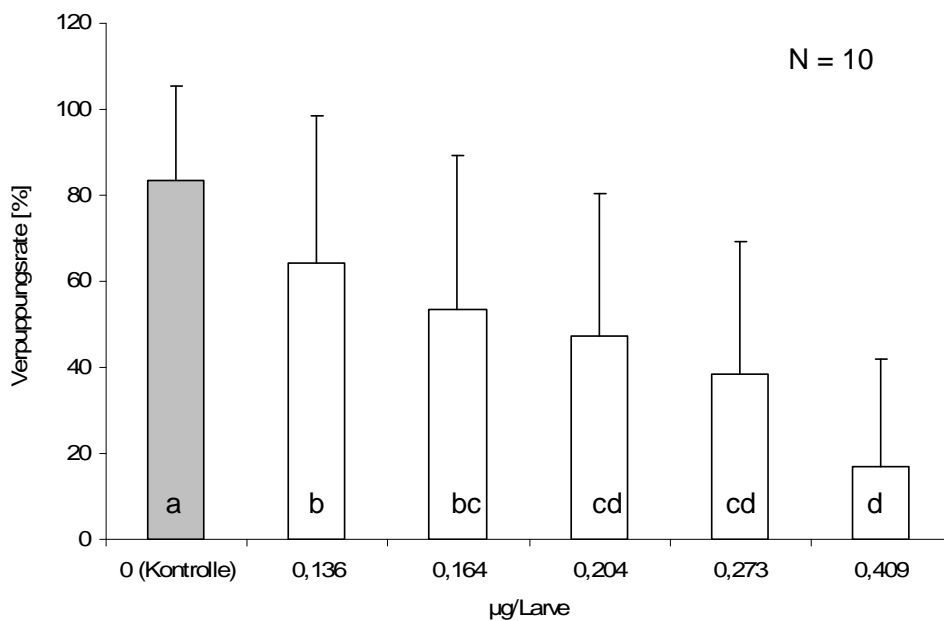


Abb. 12: Verpuppungsrate (Anteil Puppen und Vorpuppen in %, + SD) der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD, p < 0,0001).

Tab. 11: Resultate der PROC GLM: durch das Modell korrigierte Mittelwerte (LSMean), Irrtumswahrscheinlichkeit für Unterschiede der Toxinvarianten gegenüber der Kontrolle sowie einseitiges 95%iges Konfidenzintervall für die relative Gewichtszunahme der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* im Toxinbiotest ( $p < 0,0001$ )

Toxinmenge [µg/Larve]	LSMean	relative Gewichtszunahme [%]	
		H <sub>0</sub> : LSMean = Control/ Pr < t	95%iges Konfidenzintervall
0	288,55		266,22 - 310,89
0,1363	151,98	< 0,0001	102,04 - 201,93
0,1636	153,36	< 0,0001	103,41 - 203,30
0,2044	104,88	< 0,0001	54,93 - 154,82
0,2726	120,39	< 0,0001	63,93 - 176,85
0,4089	94,66	< 0,0001	38,19 - 151,12

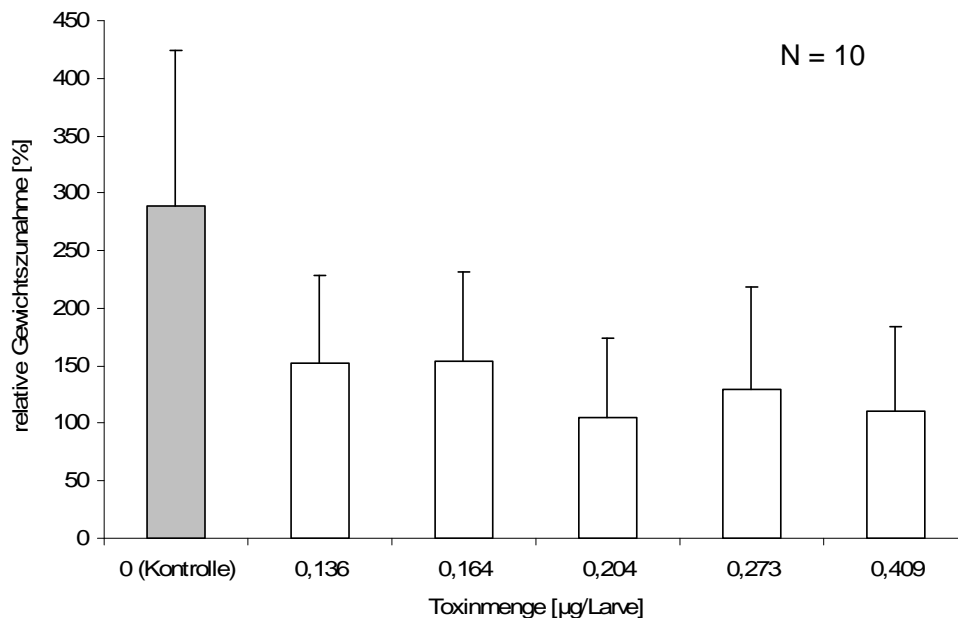


Abb. 13: relative Gewichtszunahme (in %, + SD) der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* nach zwei Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg

#### 1.2.2.1.3 L<sub>3</sub>-Larven

Die getesteten L<sub>3</sub>-Larven von *G. viridula* wiesen eine große Spannweite im Anfangsgewicht auf (3,0 – 7,6 mg). Daher wurde bei der statistischen Auswertung hinsichtlich der Untersuchungsparameter Mortalität, Verpuppungsrate und Gewichtszuwachs das Anfangsgewicht als zusätzlicher Faktor berücksichtigt.

Mit 27,8 % war die mittlere Mortalitätsrate in der Cry3Bb1-Variante erheblich höher als in der Kontrolle mit 6,9 % (Abb. 14). Deutliche Anteile der Variabilität der Sterberaten können durch mittlere Unterschiede zwischen den Teilversuchen erklärt werden ( $p < 0,0001$ ). Es traten keine signifikanten Effekte der Anfangsgewichte auf die Sterberate auf ( $p = 0,4407$ ). Ebenso ist keine deutliche Wechselwirkung zwischen dem Effekt der Anfangsgewichte und den Varianten erkennbar, d. h. der Effekt der Anfangsgewichte auf die Sterberate unterschied sich zwischen Kontrolle und Cry3Bb1 nicht ( $p = 0,8015$ ).

Es liegt ein signifikanter Unterschied in der mittleren Sterberate zwischen Cry3Bb1 und Kontrolle vor ( $p < 0,0001$ ), nachdem für die mittleren Unterschiede zwischen den Teilversuchen und die verschiedenen Anfangsgewichte adjustiert wurde.

Nach Rücktransformation der logit-Schätzer in die Skala der Sterberate [ $p = T/N = \exp(\text{logit}) / (1 + \exp(\text{logit}))$ ] ergibt sich für die Cry3Bb1-Variante eine mittlere Sterberate mit einer 95%igen Vertrauenswahrscheinlichkeit im Bereich [0,179; 0,271], also zwischen 18% und 27%. Die mittlere Sterberate in Kontrolle liegt mit 95% Vertrauenswahrscheinlichkeit im Bereich [0,028; 0,062], also zwischen 3% und 6%.

Das Sterberisiko ist in Cry3Bb1 deutlich höher als in der Kontrolle (Konfidenzintervall für die Differenz  $\text{logit}(\text{Cry3Bb1}) - \text{logit}(\text{Kontrolle})$ : [1,4475; 2,3032], nach Rücktransformation:  $\exp([1,4475; 2,3032]) = [4,2525; 10,0062]$ ). Das Konfidenzintervall für das Verhältnis der Sterberate/Überlebensrate in Cry3Bb1 zum Verhältnis Sterberate/Überlebensrate in der Kontrolle gibt an, dass mit 95%iger Vertrauenswahrscheinlichkeit die Chance zu Sterben statt zu Überleben in Cry3Bb1 mindestens 4,25 bis maximal 10 mal so hoch ist wie das Chancenverhältnis in der Kontrolle.

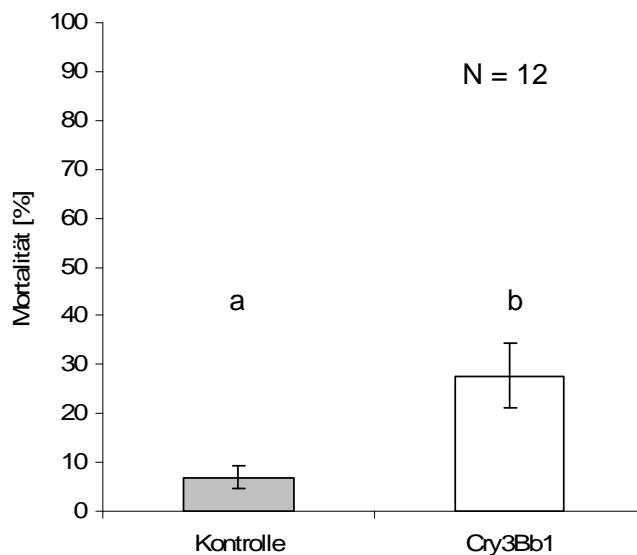


Abb. 14: Mortalität (in %,  $\pm$  SE) der  $L_3$ -Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, Toxinmenge 4,089  $\mu\text{g}/\text{Larve}$ , Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p < 0,0001$ ).

Mit 88,9 % war die mittlere Verpuppungsrate nach 7 Tagen in der Kontrolle bedeutend höher als in der Cry3Bb1-Variante mit lediglich 62,8 % (Abb. 15, Tab. 13). Wesentliche Anteile der Variabilität der Verpuppungsraten können durch mittlere Unterschiede zwischen den Teilversuchen erklärt werden ( $p < 0,0001$ ). Es traten keine signifikanten Effekte der Anfangsgewichte auf die Sterberate auf ( $p = 0,4844$ ). Auch ist keine Wechselwirkung zwischen dem Effekt der abweichenden Anfangsgewichte und den Varianten erkennbar, d. h. der Effekt der Anfangsgewichte auf die Verpuppungsrate unterschied sich, wie auch bereits bei der Mortalitätsrate, zwischen Kontrolle und Cry3Bb1 nicht ( $p = 0,7929$ ).

Es liegt ein signifikanter Unterschied in der mittleren Verpuppungsrate nach 7 Tagen zwischen Cry3Bb1 und Kontrolle vor ( $p < 0,0001$ ), nachdem für die mittleren Unterschiede zwischen den Teilversuchen und die verschiedenen Anfangsgewichte durch das Auswertungsmodell eine Anpassung vorgenommen wurde. Die Ergebnisse für die Verpuppungsrate nach 6 Tagen entsprechen denen nach 7 Tagen und werden an dieser Stelle nicht näher vorgestellt.



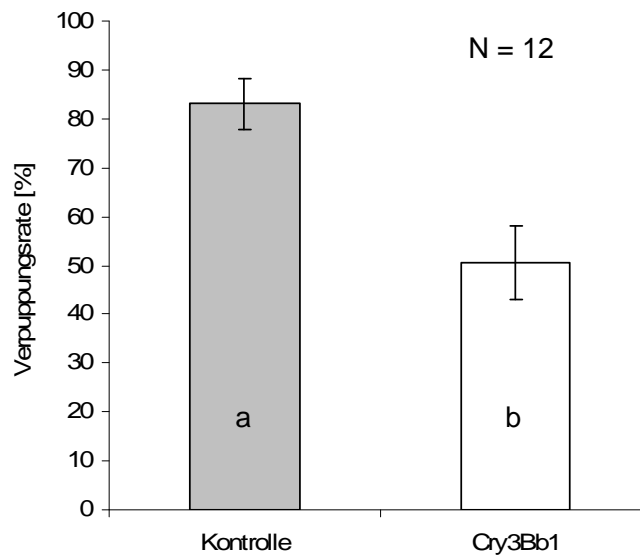


Abb. 15: Verpuppungsrate (Anteil Puppen und Vorpuppen nach 7 Tagen in %,  $\pm$  SE) der L<sub>3</sub>-Larven von *G. viridula* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, Toxinmenge 4,089  $\mu$ g/Larve. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p < 0,0001$ )

Mit 154,3 % gegenüber 78,6 % war die relative Gewichtszunahme in der Kontrolle erheblich höher als in der Toxinvariante (Abb. 16). Es zeigte sich ein deutlicher Zusammenhang zwischen den Anfangsgewichten und den erreichten prozentualen Gewichtszuwächsen ( $p < 0,0001$ ). Insgesamt können große Anteile der Streuung durch Mittelwertsunterschiede zwischen den 12 Teilversuchen erklärt werden ( $p < 0,0001$ ). Die beiden Behandlungen unterscheiden sich dennoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Im Mittel ist der prozentuale Zuwachs nach Korrektur um die Unterschiede der Anfangsgewichte in Cry3Bb1 um mindestens 54 und maximal 69 Einheiten geringer als in der Kontrolle (Tab. 14).

Es ließ sich nur ein schwacher Zusammenhang zwischen den Anfangsgewichten und dem absoluten Gewichtszuwachs erkennen. In der Gesamtschau können große Anteile der Streuung in den Daten wiederum durch Mittelwertsunterschiede zwischen den Teilversuchen erklärt werden. Die beiden Behandlungen Kontrolle und Cry3Bb1 unterscheiden sich signifikant in der absoluten Gewichtszunahme ( $p < 0,0001$ ). Im Mittel ist der Zuwachs nach Korrektur um die Unterschiede der Anfangsgewichte in Cry3Bb1 um 2 bis 2,6 Einheiten geringer als in der Kontrolle.

Die unterschiedlichen Anfangsgewichte der L<sub>3</sub>-Larven beeinflussten die Ergebnisse nicht in den wesentlichen Aussagen. Die unverdünnte Toxinlösung hatte einen deutlichen Einfluss auf alle drei Untersuchungsparameter. Die Mortalität war in der mit Cry3Bb1 behandelten Variante signifikant erhöht. Die Verpuppungsrate und der Gewichtszuwachs der L<sub>3</sub>-Larven waren in der Toxinvariante signifikant gegenüber der Kontrolle verringert (Tab. 13-14).

Tab. 12: Resultate der PROC GLM: durch das Modell korrigierte Mittelwerte (LSMean), Irrtumswahrscheinlichkeit für Unterschiede der Toxinvariante gegenüber der Kontrolle sowie einseitiges 95%iges Konfidenzintervall für die relative Gewichtszunahme der L<sub>3</sub>-Larven von *G. viridula* im Toxinbiotest ( $p < 0,0001$ )

Variante	LSMean	relative Gewichtszunahme [%]		
		H <sub>0</sub> : L <sub>S</sub> Mean = Control/ Pr < t	95%iges Konfidenzintervall	95%iges Konfidenzintervall für die Mittelwertsdifferenzen zur Kontrolle
Kontrolle	167.88		162,68 - 173,09	
Cry3Bb1	106,36	< 0,0001	100,74 - 111,98	- 69.20 - - 53.86

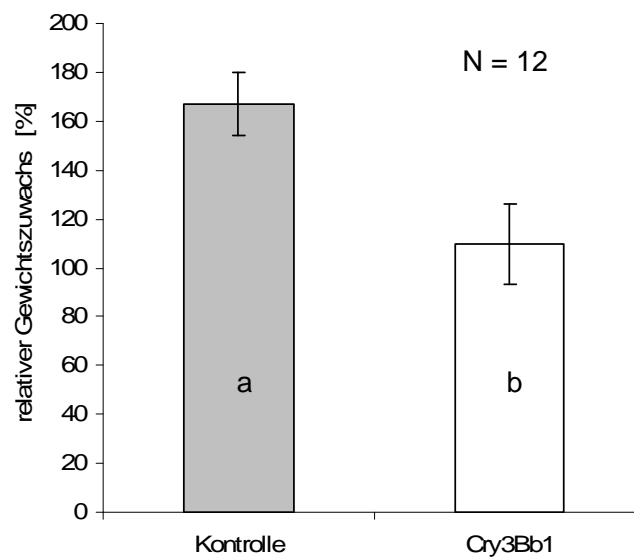


Abb. 16: relative Gewichtszunahme (in %,  $\pm$  SE) der L<sub>3</sub>-Larven von *G. viridula* nach zwei Tagen im Toxinbiotest, Toxinmenge 4,089  $\mu$ g/Larve. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GLM,  $p < 0,0001$ ).

Tab. 13: Mortalitätsrate und Verpuppungsrate (jeweils nach 7 Tagen) verschiedener Larvenstadien von *G. viridula* im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge

Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [µg]	Anzahl Einzeltests	Anzahl Wiederholungen je Test	Individuen je Test	Anzahl getesteter Einzeltiere	Anzahl überlebender Tiere	Anzahl gestorbener Tiere	mittlere Mortalität [%]	SD	mittlere Verpuppungsrate nach 7 Tagen [%]	SD
L <sub>1</sub>	0 (Kontrolle)	10	5	50	495	470	25	5,1 a	7,9	97,5 a	7,5
L <sub>1</sub>	0,008		1	10	97	88	9	9,3 ab	13,5	93,6 b	11,0
L <sub>1</sub>	0,010		1	10	100	88	12	12,0 b	15,5	95,8 ab	7,3
L <sub>1</sub>	0,014		1	10	100	79	21	21,0 bc	16,0	97,5 ab	5,4
L <sub>1</sub>	0,020		1	10	100	65	35	35,0 c	26,8	90,3 bc	21,1
L <sub>1</sub>	0,041		1	10	100	33	67	67,0 d	32,0	63,8 c	45,7
L <sub>2</sub>	0 (Kontrolle)	10	5	50	494	471	23	4,8 a	9,2	91,0 a	26,7
L <sub>2</sub>	0,136		1	10	99	76	23	23,0 b	25,8	99,0 b	3,2
L <sub>2</sub>	0,164		1	10	100	73	27	27,0 b	24,5	85,1 bc	31,1
L <sub>2</sub>	0,204		1	10	100	52	48	48,0 c	25,3	89,6 cd	11,5
L <sub>2</sub>	0,273		1	10	100	43	57	57,0 c	23,1	93,5 cd	13,0
L <sub>2</sub>	0,409		1	10	100	29	71	71,0 d	20,8	82,5 d	20,4
									SE		SE
L <sub>3</sub>	0 (Kontrolle)	12	30	30	360	335	25	6,9 a	2,3	88,9 a	2,8
L <sub>3</sub>	4,089	12	30	30	360	260	100	27,8 b	6,8	62,8 b	7,3

Mittelwerte innerhalb einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SD = Standardabweichung, SE= Standardfehler.

Tab. 14: relativer Gewichtszuwachs (nach 2 Tagen) verschiedener Larvenstadien von *G. viridula* im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge

Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [ $\mu\text{g}$ ]	Anzahl Biotests	Anzahl Wiederholungen je Test	Individuen je Einzeltest	Gesamtzahl getesteter Einzeltiere	mittleres Anfangsgewicht mg/Larve	SD	mittleres Gewicht nach 2 Tagen[mg/Larve]	SD	Gewichtszuwachs [mg]	SD	relativer Gewichtszuwachs [%]	SD
L <sub>1</sub>	0 (Kontrolle)	10	5	50	495	0,18	0,06	0,89	0,28	0,71	0,27	551,7	557,7
	0,008		1	10	97	0,15	0,06	0,68	0,28	0,53	0,26	509,8	643,3
	0,010		1	10	100	0,15	0,06	0,70	0,29	0,54	0,27	520,2	490,6
	0,014		1	10	100	0,15	0,06	0,64	0,22	0,48	0,22	503,0	697,4
	0,020		1	10	100	0,15	0,06	0,57	0,22	0,42	0,19	401,1	618,6
	0,041		1	10	100	0,15	0,06	0,52	0,29	0,36	0,25	416,1	618,1
L <sub>2</sub>	0 (Kontrolle)	10	5	50	494	0,72	0,16	2,67	0,71	1,95	0,71	288,5	135,3
	0,136		1	10	99	0,74	0,10	1,84	0,51	1,10	0,50	152,0	76,8
	0,164		1	10	100	0,74	0,15	1,81	0,49	1,07	0,50	153,4	78,5
	0,204		1	10	100	0,72	0,10	1,46	0,50	0,74	0,50	104,9	68,9
	0,273		1	10	100	0,71	0,13	1,55	0,44	0,84	0,53	129,8	88,9
	0,409		1	10	100	0,69	0,13	1,39	0,35	0,69	0,41	110,2	73,3
							SE		SE		SE		SE
L <sub>3</sub>	0 (Kontrolle)	12	30	30	360	4,07	0,18	10,58	0,67	6,04	0,89	167,2 a	12,9
L <sub>3</sub>	4,089	12	30	30	360	4,01	0,22	8,41	0,90	3,09	1,20	110,0 b	16,5

Mittelwerte innerhalb einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GLM,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SD = Standardabweichung, SE= Standardfehler.

### 1.2.2.2 *L. decemlineata* (Kartoffelkäfer)

#### 1.2.2.2.1 L<sub>1</sub>-Larven

Ein nennenswerter Anteil der Streuung der Sterberate kann durch mittlere Unterschiede zwischen den Teilversuchen erklärt werden ( $p < 0,0001$ ). Die Sterberate erhöhte sich mit ansteigender Toxindosis von 24 % (bei 0,008  $\mu\text{g}$  Toxin/Larve) auf bis zu 84 % (bei 0,04  $\mu\text{g}$  Toxin/Larve) (Abb. 17, Tab. 16). Dieser Anstieg war signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die Mortalität in der Kontrolle betrug 21 %. Alle Versuche mit den Larven des Kartoffelkäfers waren durch hohe Mortalitätsraten in der Kontrolle gekennzeichnet ( $> 20\%$ ). In besonderem Maße galt dies auch für die Tests mit dem L<sub>2</sub>-Larven, die im nächsten Abschnitt dargestellt werden. Häufig mussten die betreffenden Testdurchgänge daher abgebrochen werden. Während der Versuche kam es nicht zur Bildung von Vorpuppen oder Puppen. Entsprechende Darstellungen fehlen daher.

In fast allen Toxinbehandlungen war das Wachstum der Larven gegenüber der Kontrolle reduziert. Nur in der Variante mit 0,010  $\mu\text{g}$  Cry3Bb1/Larve entsprach der Zuwachs mit 165,8 % dem der Kontrolle (172,1 %, Abb. 18): Die niedrigste applizierte Toxinmenge (0,004  $\mu\text{g}$ /Larve) bewirkte überraschenderweise auch die niedrigste Zuwachsrate (30,8 %). Es ließ sich keine reziproke Beziehung zwischen der eingesetzten Toxinmenge und dem Larvenwachstum herstellen. Die Datenbasis war für eine statistische Auswertung mit den gegebenen Verfahren nicht ausreichend.

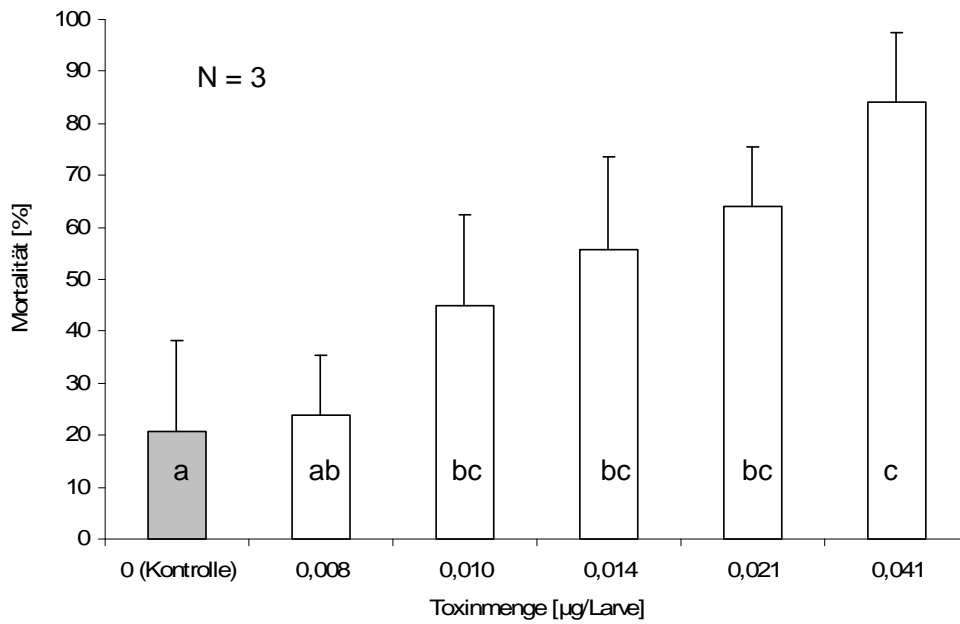


Abb.17: Mortalität (in %, + SD) der L<sub>1</sub>-Larven von *L. decemlineata* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p < 0,0001$ ).

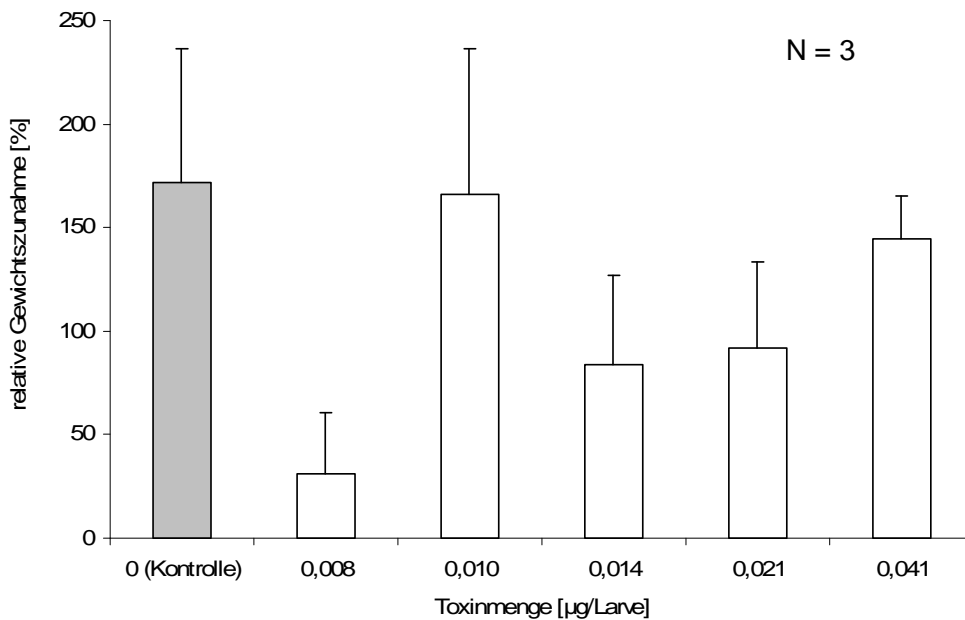


Abb. 18: relative Gewichtszunahme (in %, ± SD) der L<sub>1</sub>-Larven von *L. decemlineata* nach zwei Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg

### 1.2.2.2.2 L<sub>2</sub>-Larven

Die Sterberate stieg mit zunehmender Toxindosis signifikant an ( $p < 0,0001$ , Abb. 19, Tab. 16). Für alle Vergleiche der Toxingruppen ist die Sterberate im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht. Zwischen den beiden niedrigeren Toxinkonzentrationen einerseits (0,008 und 0,010 µg Cry3Bb1/Larve) und den beiden höheren Konzentrationen (0,021 und 0,041 µg/Larve) andererseits bestanden jeweils keine signifikanten Unterschiede. Während des Versuchs kam es nicht zur Bildung von Vorpuppen oder Puppen. Entsprechende Auswertungen fehlen daher.

In allen Toxinvarianten war die prozentuale Gewichtszunahme signifikant geringer als in der unbehandelten Kontrolle (Tab. 15). Dabei war mit steigender Toxinkonzentration eine Verringerung des relativen Gewichtszuwachses erkennbar (Abb. 20). Unterbrochen wurde dieser Trend nur durch die Variante mit 0,014 µg Cry3Bb1/Larve, deren Zuwachs von 65,1 % dem der Kontrolle (85,0 %) am nächsten kam (Tab. 17).

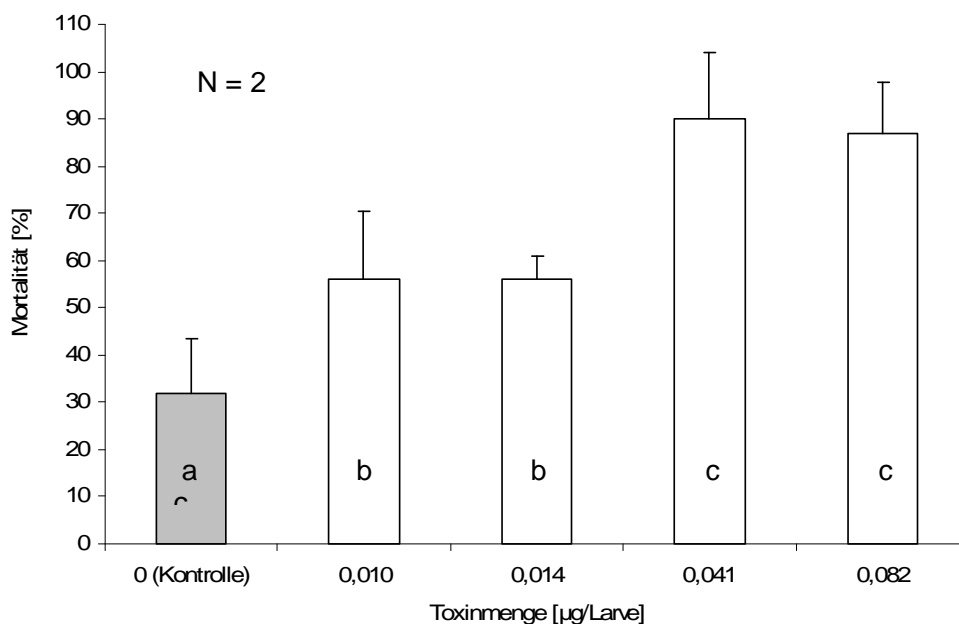


Abb.19: Mortalität (in %, + SD) der L<sub>2</sub>-Larven von *L. decemlineata* nach sieben Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg. Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p < 0,0001$ ).

Tab. 15: Resultate der PROC GLM: durch das Modell korrigierte Mittelwerte (LSMean), Irrtumswahrscheinlichkeit für Unterschiede der Toxinvarianten gegenüber der Kontrolle sowie einseitiges 95%iges Konfidenzintervall für die relative Gewichtszunahme der L<sub>2</sub>-Larven von *L. decemlineata* im Toxinbiotest ( $p < 0,0001$ )

Toxinmenge [µg/Larve]	LSMean	relative Gewichtszunahme [%]	
		H <sub>0</sub> : LSMean = Control/ Pr < t	95%iges Konfidenzintervall
0	84,99		68,52 - 101,47
0,0102	5,88	< 0,0001	- 11,54 - 23,30
0,0136	- 7,39	< 0,0001	- 36,07 - 21,28
0,0409	38,30	0,0084	12,10 - 64,51
0,0818	14,79	0,0002	- 11,41 - 40,99

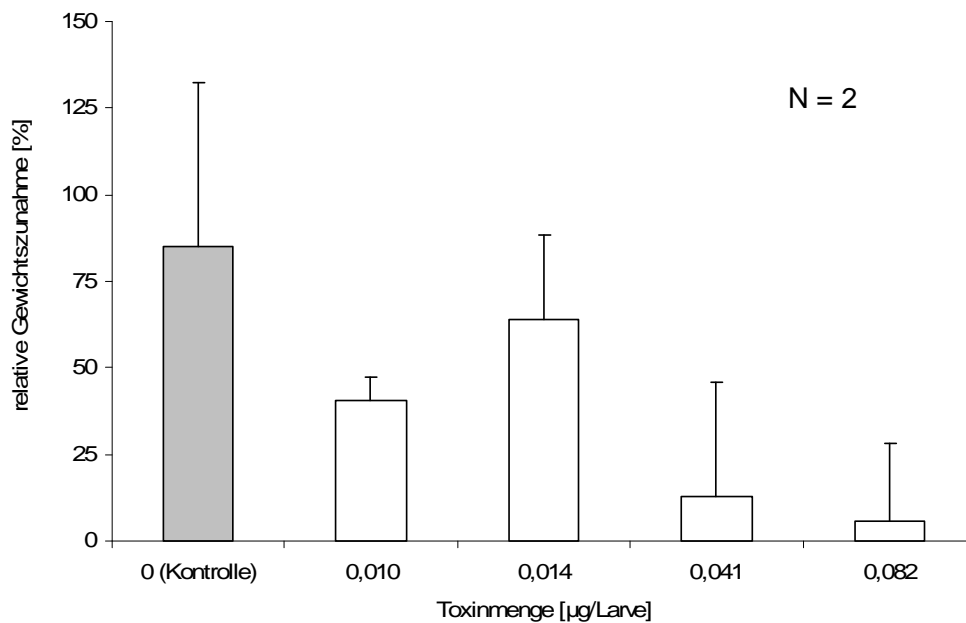


Abb. 20: relative Gewichtszunahme (in %,  $\pm$  SD) der L<sub>2</sub>-Larven von *L. decemlineata* nach zwei Tagen im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg

Tab. 16: Mortalitätsrate (nach 7 Tagen) der L<sub>1</sub>- und L<sub>2</sub>-Larven von *L. decemlineata* im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge

Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [µg]	Anzahl Einzeltests	Anzahl Wiederholungen je Test	Individuen je Wiederholung	Anzahl getesteter Einzeltiere	Anzahl überlebender Tiere	Anzahl gestorbener Tiere	mittlere Mortalität [%]	SD
L <sub>1</sub>	0 (Kontrolle)	3	3/5	10	130	103	27	20,7	a 17,5
L <sub>1</sub>	0,0082		5	10	50	38	12	24,0	ab 11,4
L <sub>1</sub>	0,0102		4	10	40	22	18	45,0	bc 17,3
L <sub>1</sub>	0,0136		4/5	10	90	40	50	55,6	bc 18,1
L <sub>1</sub>	0,0205		5	10	50	18	32	64,0	bc 11,4
L <sub>1</sub>	0,0409		5	10	50	8	42	84,0	c 13,4
L <sub>2</sub>	0 (Kontrolle)	2	5	10	100	67	33	31,8	a 11,5
L <sub>2</sub>	0,0102		5	10	50	22	28	56,0	b 14,4
L <sub>2</sub>	0,0136		5	10	50	22	28	56,0	b 5,1
L <sub>2</sub>	0,0409		5	10	50	5	45	90,0	c 14,1
L <sub>2</sub>	0,0818		5	10	100	13	37	87,0	c 10,6

Mittelwerte innerhalb einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SD = Standardabweichung.

Tab. 17: relativer Gewichtszuwachs (nach 2 Tagen) der L<sub>1</sub>- und L<sub>2</sub>-Larven von *L. decemlineata* im Toxinbiotest, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge

Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [µg]	Anzahl Biotests	Anzahl Wiederholungen je Test	Individuen je Wiederholung	Gesamtzahl getesteter Einzeltiere	mittleres Anfangsgewicht mg/Larve]	SD	mittleres Gewicht nach 2 Tagen[mg/Larve]	SD	Gewichtszuwachs [mg]	SD	relativer Gewichtszuwachs [%]	SE
L <sub>1</sub>	0 (Kontrolle)	3	3/5	10	130	0,59	0,16	1,64	0,52	0,79	0,55	172,1	64,3
	0,0409		5	10	50	0,66	0,13	0,88	0,32	0,18	0,23	30,8	29,8
	0,0205		5	10	50	0,61	0,10	1,58	0,19	0,97	0,26	165,8	70,6
	0,0136		4/5	10	90	0,60	0,14	1,11	0,33	0,50	0,25	83,9	43,4
	0,0102		4	10	40	0,74	0,03	1,51	0,37	0,70	0,29	92,1	41,1
	0,0082		5	10	50	0,50	0,04	1,23	0,19	0,73	0,15	144,6	20,8
L <sub>2</sub>	0 (Kontrolle)	2	5	10	100	1,84	0,28	3,53	1,35	1,65	1,09	85,0	47,1
	0,0102		5	10	50	1,91	0,24	2,04	0,56	0,13	0,44	40,6	6,5
	0,0136		5	10	50	1,60	0,08	1,83	0,62	0,23	0,55	64,1	24,2
	0,0409		5	10	50	2,02	0,07	3,31	0,38	1,28	0,44	12,9	32,9
	0,0818		5	10	100	1,70	0,05	2,39	0,11	0,69	0,11	5,9	22,5

SD = Standardabweichung, SE= Standardfehler.

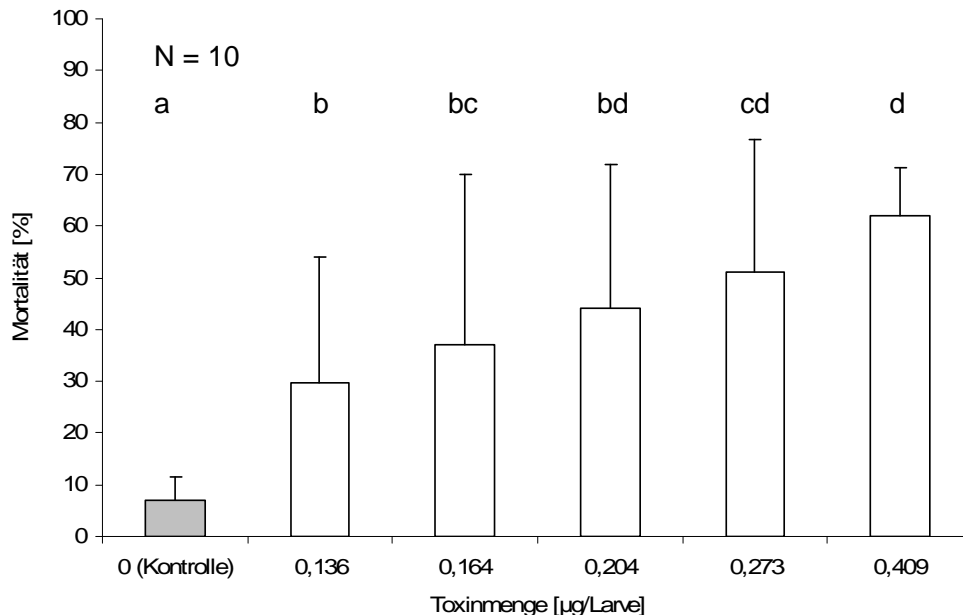


Abb. 21: Mortalität [%; + SD] der L<sub>1</sub>-Larven von *P. cochleariae* im Toxin-Biotest (7 Tage nach Beginn des Biotests), bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg, Unterschiede zwischen Säulen mit demselben Buchstaben sind nicht signifikant (PROC GENMOD, p < 0,0001).



### 1.2.2.3 *P. cochleariae* (Krenblattkäfer, L<sub>1</sub>-Larven)

Ein nennenswerter Anteil der Streuung der Sterberate kann durch mittlere Unterschiede zwischen den Teilversuchen erklärt werden. Die Sterberate steigt mit ansteigender Toxindosis signifikant an ( $p < 0,0001$ , Abb. 21, Tab. 18). Für alle Vergleiche der Toxingruppen ist die Sterberate signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht ( $p < 0,0001$ ). Zu einer Verpuppung kam es bei den L<sub>1</sub>-Larven nur vereinzelt, da die Larvalentwicklung von *P. cochleariae* unter den Testbedingungen meist mehr als eine Woche erfordert (Tab. 18). Auf eine entsprechende Darstellung wird daher verzichtet.

Tab. 18: Mortalitätsrate (nach 7 Tagen) und Verpuppungsrate (an Tag 6 und 7) der L<sub>1</sub>-Larven von *P. cochleariae*, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge

Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [µg]	Anzahl Biotests	Individuen je Einzeltest	Anzahl getesteter Individuen	Anzahl fehlender Tiere	Anzahl überlebender Tiere	Anzahl gestorbener Tiere	mittlere Mortalität [%]	SE	mittlere Verpuppungsrate nach 7 Tagen [%]	SE
L <sub>1</sub>	0 (Kontrolle)	10	50	492	8	457	35	7,1 a	4,5	0,3	0,8
L <sub>1</sub>	0,136		10	96	4	67	29	29,8 b	24,1	0,1	0,3
L <sub>1</sub>	0,164		10	89	1	62	37	37,1 bc	32,9	0,3	0,9
L <sub>1</sub>	0,204		10	100	0	56	44	44,0 bd	28,0	0,0	0,0
L <sub>1</sub>	0,273		10	98	2	48	50	51,0 cd	25,6	0,0	0,0
L <sub>1</sub>	0,409		10	96	4	36	60	62,0 d	9,2	0,0	0,0

Mittelwerte innerhalb einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SD = Standardabweichung, SE= Standardfehler.

Tab. 19: Gewichtszunahme (nach 2 Versuchstagen) der L<sub>1</sub>-Larven von *P. cochleariae*, bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge

Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [µg]	Anzahl Biotests	Individuen je Einzeltest	Anzahl Einzeltiere	mittleres Anfangsgewicht [mg/Larve]	SE	mittleres Gewicht nach 2 Tagen [mg/Larve]	SE	absoluter Gewichtszuwachs [mg]	SE	relativer Gewichtszuwachs [%]	SE
L <sub>1</sub>	0 (Kontrolle)	10	50	492	0,188	0,047	0,529	0,105	0,337	0,177	203,2 a	85,6
L <sub>1</sub>	0,136		10	96	0,202	0,042	0,352	0,136	0,127	0,139	71,7 b	85,7
L <sub>1</sub>	0,164		10	89	0,202	0,042	0,361	0,158	0,136	0,157	74,9 b	96,4
L <sub>1</sub>	0,204		10	100	0,202	0,042	0,392	0,162	0,210	0,176	124,4 ab	78,3
L <sub>1</sub>	0,273		10	98	0,202	0,042	0,269	0,082	0,059	0,091	36,5 b	66,6
L <sub>1</sub>	0,409		10	96	0,202	0,042	0,309	0,085	0,112	0,103	74,0 b	64,6

Mittelwerte innerhalb einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GLM / PROC GENMOD,  $p < 0,05$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SD = Standardabweichung, SE= Standardfehler.

In fast allen Toxinvarianten (Ausnahme 0,204 µg/Larve) war die prozentuale Gewichtszunahme signifikant geringer als in der unbehandelten Kontrolle (Abb. 22, Tab. 20). In dieser Toxinvariante ist die prozentuale Gewichtszunahme zwar im Mittel um 78 Einheiten abgesenkt, man kann aber bei einem Signifikanzniveau von 5% nicht auf eine Reduktion schließen. Ein deutlicher Trend steigender oder zunehmender Werte mit zunehmender Toxinkonzentration ist nicht ersichtlich (Abb. 22, Tab. 19). Darüber hinaus bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Teilversuchen ( $p < 0,0001$ ).

Tab. 20: Resultate der PROC GLM: durch das Modell korrigierte Mittelwerte (LSMean), Irrtumswahrscheinlichkeit, 95%iges Konfidenzintervall sowie mittlere Differenzen der LSMean zur Kontrolle für die relative Gewichtszunahme der L<sub>1</sub>-Larven von *P. cochleariae* im Toxinbiotest ( $p < 0,0001$ )

Toxinmenge [µg/Larve]	LSMean	relative Gewichtszunahme [%]		Differenz der Mittelwerte zur Kontrolle
		H <sub>0</sub> : LSMean = Control/ Pr < t	95%iges Konfidenzintervall	
0	203,20		174,91 – 231,48	
0,136	71,70	0,0009	8,44 – 134,95	- 131,49
0,164	62,88	< 0,0001	- 4,16 – 129,93	- 140,31
0,204	124,41	0,0611	61,16 – 187,67	- 78,78
0,274	62,88	0,0006	- 26,72 – 99,79	- 129,22
0,409	73,97	0,0009	10,72 – 137,23	- 166,65

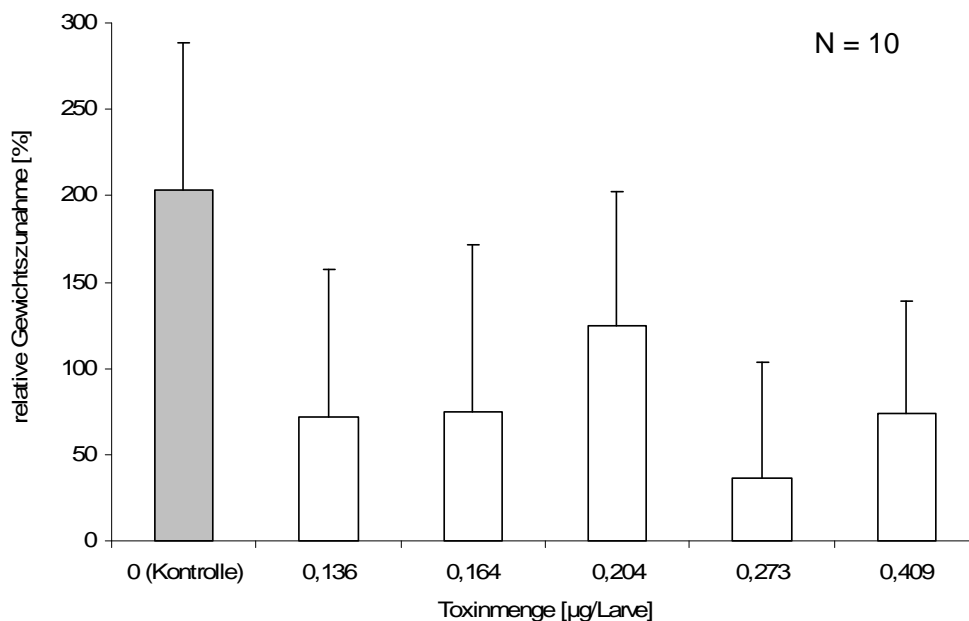


Abb. 22: relative Gewichtszunahme [%; + SD] der L<sub>1</sub>-Larven von *P. cochleariae* im Toxin-Biotest (zwei Tage nach Beginn des Biotests), bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge in µg

#### 1.2.2.4 *Chrysolina varians* (Johanniskrautblattkäfer)

Die Ergebnisse des Biotests mit *C. varians* sind nur schwer zu interpretieren. Aufgrund der geringen Fruchtbarkeit der Art standen für die einzelnen Biotests nur sehr wenige Individuen zur

Verfügung. Außerdem war die Mortalität in der unbehandelten Kontrolle mit 21,7 % vergleichsweise hoch (Tab. 21). Die Art reagierte zwar auf hohe Konzentrationen des Toxins (0,68 – 0,20 µg/µl) empfindlich und zeigte eine erhöhte Sterblichkeit, es war jedoch keine Abstufung der Mortalität oder eines anderen Untersuchungsparameters mit zu- oder abnehmender Toxinkonzentration erkennbar. Stattdessen schwankten die Einzelwerte von Verdünnung zu Verdünnung stark. Die relative Gewichtszunahme lag bei 4 der 5 Toxinverdünnungen deutlich unterhalb der Kontrolle. Wie auch bei der Mortalität schwankten die Werte erheblich ohne eine klare Abstufung mit steigender Toxinmenge aufzuzeigen. Zu einer Verpuppung der Larven kam es im Verlauf der Biotests nicht. Auf eine statistische Auswertung der Daten wurde verzichtet.

Tab. 21: Mortalitätsrate (nach 7 Tagen) und relative Gewichtszunahme der L<sub>1</sub>-Larven von *C. varians* (in %), bezogen auf die pro Larve applizierte Toxinmenge

	Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [µg]	Anzahl Biotests	Individuen je Einzeltest	Anzahl getesteter Individuen	Anzahl überlebender Tiere	Anzahl gestorbener Tiere	mittlere Mortalität [%]	SD	relative Gewichtszunahme [%]	SD
<i>C. varians</i>	L1	0 (Kontrolle)	2	5/30	35	27	8	21,7	2,4	130,1	55,3
	L1	0,2045		6	12	8	4	33,3	47,1	90,0	28,5
	L1	0,2726		6	12	3	9	75,0	11,8	42,9	37,28
	L1	0,4089		6	12	6	6	50,0	23,6	66,8	81,4
	L1	0,5111		6	12	5	7	58,3	11,8	130,8	122,3
	L1	0,6815		6	12	6	6	50,0	0,0	88,0	69,5

#### 1.2.2.5 LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Werte

Für drei der untersuchten Arten konnten LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Werte bestimmt werden (Tab. 22). Dabei handelt es sich um die Dosis eines Stoffes, die zum Tode von 50 bzw. 90 % der exponierten Versuchstiere führt.

Gemessen an den LD<sub>50</sub>-Werten der L<sub>1</sub>-Larven war *P. cochleariae* mit 0,296 µg/Larve die Art mit der geringsten Suszeptibilität gegenüber Cry3Bb1. Die größte Empfindlichkeit wiesen die L<sub>1</sub>-Larven von *L. decemlineata* mit 0,018 µg/Larve auf. Die L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* lagen mit 0,03 µg/Larve zwischen den oben genannten Arten.

Mit folgenden Angaben lassen sich die oben dargestellten LD<sub>50</sub>-Werte näherungsweise in die entsprechende Pollenmenge umrechnen, die eine Larve aufnehmen müsste, um diese Toxindosis zu erhalten:

Toxingehalt MON88017-Pollen:  
pro g Frischgewicht (FG)

14 ± 2,5 µg Toxin (Monsanto Petition  
04-CR-108U 2004)

Spannweite  
Gewicht eines einzelnen Pollenkorns (FG):

11 - 20 µg Toxin  
0,247 µg (HOFMANN 2007)

→ Anzahl Maispollen pro g

4.048.583 Pollenkörner

→ Toxingehalt pro Pollenkorn:

3,45 x 10<sup>-6</sup> µg Toxin bei 14 µg Toxin/g FG

2,72 x 10<sup>-6</sup> µg Toxin bei 11 µg Toxin/g FG

4,94 x 10<sup>-6</sup> µg Toxin bei 20 µg Toxin/g FG

Durch Umrechnung ergeben sich folgende LD<sub>50</sub>-Werte, bezogen auf Pollen von MON88017-Mais:

<i>L. decemlineata</i> (L <sub>1</sub> )	5.217 Pollenkörner (3.644 – 6.618)
<i>G. viridula</i> (L <sub>1</sub> )	8.696 Pollenkörner (6.073 – 11.029)
<i>G. viridula</i> (L <sub>2</sub> )	74.493 Pollenkörner (52.024 – 94.485)
<i>P. cochleariae</i> (L <sub>1</sub> )	85.797 Pollenkörner (59.919 – 108.824)

Tab. 22: LD<sub>50</sub> und LD<sub>90</sub>-Werte der untersuchten Blattkäfer, bezogen auf die pro Larve applizierte Cry3Bb1-Toxinmenge in µg sowie die dazugehörigen 95-prozentigen Vertrauensbereiche

Art	Larvenstadium		µg Toxin/Larve	95 %iger Vertrauensbereich
<i>G. viridula</i>	L <sub>1</sub>	LD <sub>50</sub>	0,030	0,026 - 0,035
		LD <sub>90</sub>	0,081	0,062 - 0,121
	L <sub>2</sub>	LD <sub>50</sub>	0,257	0,233 - 0,288
		LD <sub>90</sub>	0,699	0,548 - 1,040
	L <sub>3</sub>	LD <sub>50</sub>	> 6,0 *	-
		LD <sub>90</sub>	- *	-
<i>L. decemlineata</i>	L <sub>1</sub>	LD <sub>50</sub>	0,018	0,014 - 0,022
		LD <sub>90</sub>	0,055	0,039 - 0,107
	L <sub>2</sub>	LD <sub>50</sub>	- **	-
		LD <sub>90</sub>	- **	-
<i>P. cochleariae</i>	L <sub>1</sub>	LD <sub>50</sub>	0,296	0,251 - 0,387
		LD <sub>90</sub>	1,455	0,839 - 5,207

\* Schätzwert: Aufgrund der geringen Empfindlichkeit gegenüber Cry3Bb1 konnten für die L<sub>3</sub>-Larven von *G. viridula* keine LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Werte bestimmt werden. Gemessen an der mit der unverdünnten Toxinlösung erzielten Mortalitätsrate sollte der LD<sub>50</sub>-Wert für dieses Larvenstadium deutlich oberhalb von 6,0 µg/Larve liegen.

\*\* Die verfügbare Datenbasis war für die Berechnung von LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Werten nicht ausreichend.

### 1.2.3 Bestimmung der Fraßmenge (in cm<sup>2</sup> gefressene Blattfläche) des Ampferblattkäfers im Verlauf der Larvalentwicklung

Die von einer *G. viridula*-Larve gefressene Blattfläche betrug im L<sub>1</sub>-Stadium (Tag 1 und 2) 0,20 bzw. 0,21 cm<sup>2</sup> (Tab. 23). Die Fraßmenge stieg bis zum 5. Tag kontinuierlich an. Am 6. und 7. Tag war ein steiler Anstieg der Fraßmenge zu beobachten, die am 8. Tag beim Übergang ins Vorpuppenstadium wieder stark abnahm (Abb. 23). Im Verlauf der gesamten Larvalentwicklung wurde eine Blattfläche von 5,53 cm<sup>2</sup> gefressen. Die Literaturangaben für den Nahrungsbedarf von *G. viridula* während der gesamten Larvenentwicklung unter Freilandbedingungen liegen etwas unterhalb der ermittelten Werte bei 4,5 – 5 cm<sup>2</sup> (RENNER 1970).

Tab. 23: Tägliche Fraßmenge der Larven von *G. viridula* in cm<sup>2</sup> im Verlauf der Larvalentwicklung (L<sub>1</sub>-L<sub>4</sub>: 1. bis 4. Larvenstadium, VP: Vorpuppe)

	gefressene Blattfläche in cm <sup>2</sup>							
	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7	Tag 8
Stadium	L <sub>1</sub>	L <sub>1</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>2</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>3</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>4</sub> /VP
Mittelwert	0,20	0,21	0,36	0,48	0,63	1,27	1,89	0,48
SD	0,03	0,04	0,09	0,11	0,01	0,02	0,03	0,32
Summe	5,53							

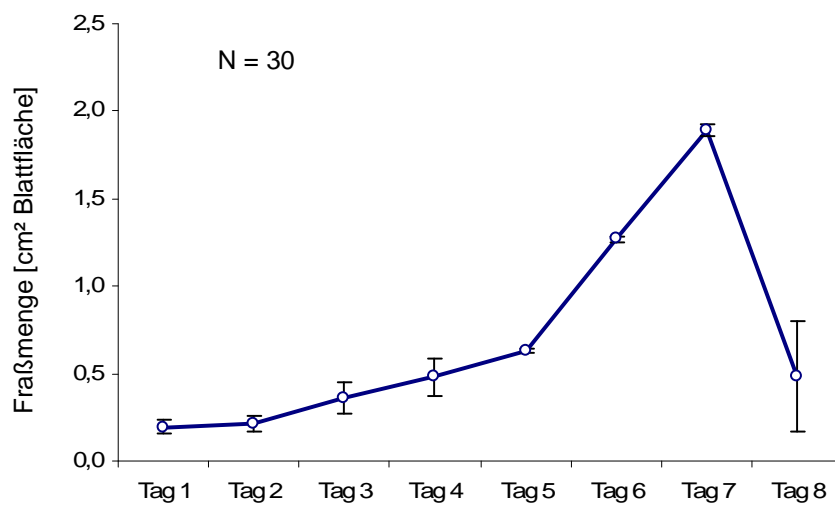


Abb. 23: Tägliche Fraßmenge der Larven von *G. viridula* in cm<sup>2</sup> im Verlauf der Larvalentwicklung

#### 1.2.4 Untersuchungen am Ampferblattkäfer zur chronischen Toxizität und möglichen suble-talen Effekten von Cry3Bb1

Eine akute Mortalität infolge der kontinuierlichen Toxingabe war in der Cry3Bb1-Variante nicht fest-zustellen. Alle Tiere überlebten die Larvenphase. Bei der Kontrolle betrug die Mortalitätsrate während der Larvalentwicklung 7 % (2 von 30 Tieren). Während der Puppenphase verendete lediglich ein Tier in der Toxinvariante, so dass in der Kontrolle 28 (93 %) und in der Cry3BB1-Variante 29 Individuen (97 %) das Adultstadium erreichten. Das Geschlechterverhältnis war mit 1 : 1 in der Kontrolle und 1 : 0,93 der Cry3Bb1-Variante sehr ausgeglichen (Kontrolle: 14 ♀ / 14 ♂, Cry3Bb1: 15 ♀ / 14 ♂).

Das Körpergewicht der Larven am dritten Versuchstag war in der Cry3Bb1-Variante mit durchschnittlich 1,29 mg deutlich höher als in der Kontrolle mit 0,92 mg. Diese Differenz war jedoch statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,17$ , Tab. 24). Das Anfangsgewicht der neonaten Larven wurde zu Versuchsbeginn nicht ermittelt. Daher kann dieser Unterschied auch auf geringfügig zwischen den Varianten abweichenden Anfangsgewichten beruhen.

Das Puppen- und Adultgewicht beider Varianten war mit 10,74 und 10,78 mg bzw. mit 10,48 und 10,41 mg nahezu identisch (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,74$  bzw.  $p = 0,91$ ).

Nachdem die Larven am 14.04.08 geschlüpft waren, setzte die Verpuppung in beiden Varianten am 22.04.08 nach Ablauf von 8 Tagen ein (Tab. 25). Zu diesem Zeitpunkt traten in der Kontrolle 22 Individuen, und in der Cry3Bb1-Variante 29 Individuen in die Puppenruhe ein. Am 23.4.08 hatten

alle überlebenden Tiere die Puppenphase erreicht. Der Schlupf der Käfer erfolgte zwischen dem 27.04. und 29.04.08. Die Dauer der Puppenphase betrug in beiden Varianten 5 Tage (Tab. 25).

Tab. 24: Mittleres Gewicht (in mg,  $\pm$  SD) der Larve (3 Tage nach Schlupf), der Puppe und des Imago von *G. viridula* bei chronischer Cry3Bb1-Intoxikation während der gesamten Larvalentwicklung (Mann-Whitney-U-Test,  $p < 0,05$ )

Gewicht [mg]	Kontrolle	Cry3Bb1
Larve (3 Tage nach Schlupf)	0,92 $\pm$ 0,38 a	1,29 $\pm$ 1,48 a
Puppe	10,74 $\pm$ 0,87 a	10,78 $\pm$ 0,96 a
Imago (frisch geschlüpft)	10,48 $\pm$ 1,23 a	10,41 $\pm$ 1,06 a

Die Lebensdauer der Käfer ließ sich im Rahmen des Versuches nicht exakt ermitteln, da bei dieser Spezies eine Geschlechtsdifferenzierung anhand äußerer Merkmale unmittelbar nach dem Schlupf nicht möglich ist. Eine kontrollierte Paarbildung wurde dadurch verhindert. Erst nach dem Aufsitzen der Männchen und der Begattung wurden die Tiere paarweise vereinzelt. Damit war es nicht mehr möglich, die im ersten Teil des Experimentes vorgenommene Individualisierung der Tiere weiterzuführen und eine Aussage zum genauen Schlupfzeitpunkt und somit zur Lebensdauer einzelner Individuen vorzunehmen. Es ergibt sich eine Ungenauigkeit von  $\pm 2$  Tagen.

Die mittlere Lebensdauer der Weibchen in der Kontrollgruppe war mit 38-40 Tagen geringfügig höher als in der Toxinvariante mit 36-38 Tagen (Tab. 25). Die durchschnittliche Lebensspanne der Männchen war mit 39-41 (Kontrolle) bzw. 40-42 Tagen (Cry3Bb1) in beiden Varianten fast gleich. Sie lag etwas höher als bei den Weibchen, da trotz einer höheren Sterblichkeit zu Versuchsbeginn unter den überlebenden Männchen erheblich höhere Maximalwerte als bei den Weibchen erreicht wurden. Dies wird an der Überlebenskurve beider Geschlechter deutlich (Abb. 25).

Tab. 25: Dauer einzelner Entwicklungsphasen von *G. viridula* bei chronischer Cry3Bb1-Intoxikation während der gesamten Larvalentwicklung

Dauer [in Tagen, $\pm$ SD]		Kontrolle	Cry3Bb1
Larvalentwicklung		8,21 $\pm$ 0,42	8,03 $\pm$ 0,18
Puppenphase		4,96 $\pm$ 0,64	5,00 $\pm$ 0,27
mittlere Lebensdauer der Imagines	♀	38 – 40 (47 – 49)	36 -38 (49 - 51)
(Maxima in Klammern)	♂	39 – 41 (78 – 80)	40 - 42 (74 - 76)

Die Fekundität beider Gruppen war mit insgesamt 11225 abgelegten Eiern in der Kontrolle und 12438 Eiern in der Toxinvariante sehr ähnlich (Tab. 26). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass in der Toxinvariante ein Weibchen mehr vorhanden war. Im Zeitraum von 7 Tagen nach dem Schlupf der Weibchen und ihrem Tod wurden in der Kontrollvariante im Mittel 33 Eier mehr pro Weibchen abgelegt (Tab. 26). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (PROC GLM,  $p = 0,71$ ). Wird die Gesamtzahl der in den jeweiligen Gruppen produzierten Eier in Relation zu den Lebenstagen der Weibchen in dieser Gruppe gesetzt, ergibt sich in der Toxinvariante mit 22,9 zu 20,9 Eiern/Tag ein höherer Wert als in der Kontrolle.

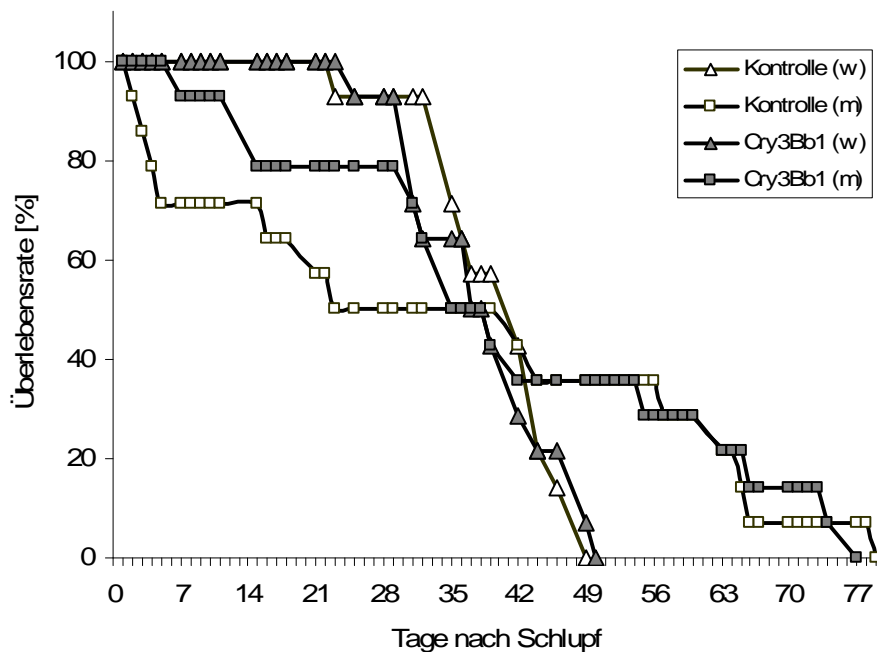


Abb. 24: Überlebenskurve der Geschlechter von *G. viridula* im Laborversuch bei chronischer Cry3Bb1-Intoxikation während der gesamten Larvalentwicklung

Tab. 26: Fekundität von *G. viridula* bei chronischer Cry3Bb1-Intoxikation während der gesamten Larvalentwicklung (Mann-Whitney-U-Test,  $p = 0,535$ )

	Kontrolle	Cry3Bb1
Anzahl der abgelegten Eier	11225	12438
pro ♀ abgelegten Eier * [ $\pm$ SD]	604,4 $\pm$ 221,3 a	571,1 $\pm$ 159,4 a
pro Lebensstag der Weibchen abgelegten Eier	20,9	22,9

\* im Zeitraum 7 Tage nach dem Schlupf bis zum Tod der Weibchen

### 1.2.4.1 Diskussion

Im Rahmen dieses ersten Ansatzes zur Untersuchung möglicher chronischer Effekte einer niedrig dosierten Toxingabe auf die Entwicklung der Larven, die Lebensdauer der Imagines oder die Fruchtbarkeit der Weibchen von *G. viridula* konnte kein negativer Effekt des Cry3Bb1-Toxins auf die untersuchten Parameter beobachtet werden.

## 1.3 Diskussion und Schlussfolgerungen

### 1.3.1 Auswahl der untersuchten Blattkäferarten

Die Auswahl der untersuchten Arten richtete sich nach folgenden Kriterien:

- gute Züchtbarkeit unter Laborbedingungen
- hohes Reproduktionsvermögen / ausreichende Anzahl von Nachkommen für Biotests
- Vorkommen in der Agrarlandschaft / potentielle Gefährdung
- Oviparie / Bildung von gut sichtbaren Eigelegen.

Eine Reihe von Spezies ließ sich unter Laborbedingungen gar nicht vermehren oder entwickelte eine so geringe Fekundität, dass keine ausreichende Anzahl von Larven für die Versuche produziert werden konnten (Tab. 27). Die Ursachen für das Scheitern der Zuchtbemühungen lagen z. T. in den komplizierten Lebenszyklen der Arten begründet, die wie im Falle von *Oulema melanopus* eine obligate Aestival- und Hiberna-Diapause der Käfer einschließt (HENNECKE 1987).

Tab. 27: Arten, die im Rahmen des Projektes erfolglos untersucht wurden

Art	Problematik
<i>Oulema melanopus</i> (LINNAEUS 1758)	zu geringe Fekundität unter den Zuchtbedingungen
<i>Chrysolina herbacea</i> (DUFTSCHMID 1825)	zu geringe Fekundität unter den Zuchtbedingungen
<i>Lilioceris lillii</i> (SCOPOLI 1763)	zu geringe Fekundität unter den Zuchtbedingungen
<i>Agelastica alni</i> (LINNAEUS 1758)	Etablierung einer Zucht erfolglos
<i>Chrysolina fastuosa</i> (SCOPOLI 1763)	Etablierung einer Zucht erfolglos
<i>Dibolia depressiuscula</i> LETZNER 1846	Etablierung einer Zucht erfolglos

### 1.3.2 Pollenbiotests

Die von einer einzelnen Maispflanze produzierte Pollenmenge liegt zwischen 10-50 Millionen Pollen (BEISMANN & KUHLMANN 2006, HOFMANN 2007). Damit ergibt sich pro Hektar eine Pollenmenge im Bereich von  $10^{12}$  Pollen (HOFMANN 2007), die während der Maisblüte durch Windverdriftung anteilig auch auf benachbarte Ackerflächen und angrenzende ökologische Ausgleichsflächen gelangen kann. Untersuchungen zur Windverdriftung und Deposition von Pollen haben jedoch gezeigt, dass die Pollendichte stark negativ mit der Entfernung von der Pollenquelle korreliert ist (LANG et al. 2004, FELKE & LANGENBRUCH 2005, HOFMANN 2007 u. a.). Es gelangt zwar ein geringer Prozentsatz des Pollens auch auf kilometerweit entfernte Flächen, der größte Teil des Pollens findet sich jedoch im Nahbereich um einen Maisschlag (HOFMANN 2007). In Maisbestand selbst ist eine durchschnittliche Pollendichte von 230 Pollen/cm<sup>2</sup> zu erwarten, in einem Meter Abstand von der Maispflanze hat sich dieser Wert jedoch bereits auf 120 Pollenkörner/cm<sup>2</sup> halbiert. In 10 m Abstand sind es nur 35 Pollenkörner/cm<sup>2</sup> (HOFMANN 2007), weniger als ein Sechstel der Pollendichte des Maisbestandes. Dies sind jedoch nur Mittelwerte. Vor allem Witterungseinflüsse wie Regenfälle oder Schönwetterperioden haben Auswirkungen auf Intensität und Dauer der Pollenschütte. Während die Blüte bei günstiger Witterung bereits nach 5-8 Tagen, spätestens jedoch nach 14 Tagen, beendet ist, können ungünstige Witterungsverhältnisse diese auf bis zu 4 Wochen verlängern (ZSCHEISCHLER et al. 1990). Dies führt zu sehr starker Variabilität in der Pollenaus-schüttung. HOFMANN (2007) gibt dementsprechend für die in seiner Studie ermittelte Pollendichte von 120 Pollenkörner/cm<sup>2</sup> in 1 m Abstand von der Pollenquelle ein 99%iges Vertrauensintervall von 7 bis 2070 Pollenkörner/cm<sup>2</sup> an.

Die im Rahmen der Untersuchung verwendeten mittleren Pollenkonzentrationen von 752 bzw. 466 Pollenkörner/cm<sup>2</sup> übersteigen den von HOFMANN (2007) ermittelten Durchschnittswert deutlich. Sie liegen jedoch noch im Schwankungsbereich einer möglichen Pollendeposition in einem angrenzenden Feldrain (vgl. auch LANG et al. 2004).

Die mit der Pollensuspension behandelten Blattscheiben wurden von den L<sub>1</sub>- und L<sub>2</sub>-Larven der Art *G. viridula* häufig zu einem geringeren Prozentsatz gefressen als die unbehandelten Blattstücke



der Kontrollvariante. Die Ergebnisse der Pollenbiotests mit den L<sub>2</sub>-Larven von *P. cochleariae* zeigen hingegen, dass diese Larven eine mit Pollen bestäubte Nahrung unter Zwangsbedingungen gut akzeptieren. Hier lag der Anteil der gefressenen Blattfläche sogar deutlich über dem der Kontrolle (Tab. 4).

Die Aufnahme von Cry3Bb1-haltigem Pollen führte bei den L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* und *P. cochleariae* zu keiner Erhöhung der Mortalität. Sie war in allen Varianten gleichermaßen niedrig. Die Resultate der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* weichen davon deutlich ab. Während in der Kontrolle wiederum lediglich eine geringe Mortalitätsrate von 7 % zu beobachten war, waren in den Varianten mit Pollenapplikation Sterberaten von 50 % (MON88017) und 54 % (DKC1543) festzustellen. Da die Sterblichkeit in beiden Pollenvarianten gleichermaßen hoch ausfiel, ist ein Bt-Effekt durch den GVO-Pollen auszuschließen. Wie die mikroskopische Kontrolluntersuchung des verwendeten transgenen und isogenen Pollens ergab, war dieser stark mit Pilzmycel und Bakterien durchsetzt (s. Abschn. 1.2.1.1.1). Der beobachtete, toxische Effekt in den Pollenvarianten könnte daher auch auf die Belastung des Pollens durch Pilze und andere Mikroorganismen zurückzuführen sein. Denkbar wäre auch, dass die hohe Pollenkontamination der Blattscheiben per se zu einem Anstieg der Sterblichkeit beim sehr empfindlichen ersten Larvenstadium geführt hat, da die Pollen die Nahrungsverwertung erschwert haben könnten. Chrysolidenlarven sind anatomisch nicht an eine Verdauung von Pollen adaptiert (SAMUELSON 1994). In natura hätten die Larven eine derartig mit Pollen kontaminierte Nahrung unter Umständen abgelehnt, was ihnen unter den Zwangsbedingungen des Biotests nicht möglich war.

Die Gewichtszunahme der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* war nicht durch eine Bt-Expression im Pollen beeinflusst. Zwar blieb das Niveau des Gewichtszuwachses bei den Tests mit dem im Feld gesammelten Pollenproben in den Varianten MON88017 und DKC1543 mit 424 % und 407 % deutlich hinter dem der Kontrolle (587 %) zurück, bei den Untersuchungen mit dem Gewächshauspollen ergab sich jedoch in den verschiedenen Varianten ein ähnliches, wenn auch insgesamt niedrigeres, Niveau des Gewichtszuwachses. Auch in diesem Fall könnte eine Verunreinigung durch Mikroorganismen des im Feld gesammelten Pollens oder die hohe Pollendichte an sich für das gebremste Wachstum der Larven in den Varianten MON88017 und DKC1543 verantwortlich sein. Erkenntnisse zum Mikroorganismenbesatz der Pollenproben aus dem Jahr 2005 liegen jedoch nicht vor. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten MON88017 und DKC1543 war in keinem Fall festzustellen.

Auch bei den L<sub>1</sub>-Larven des Ampferblattkäfers wurde mit 200 % (MON88017) und 151 % (DKC1543) ein im Vergleich zur Kontrolle (303 %) signifikant geringeres, relatives Wachstum in den mit Pollen versehenen Varianten ermittelt, dessen Ursachen wiederum im Pilz- und Bakterienbefall der Pollens und/oder der erschwerten Nahrungsverwertung liegen könnten.

Die Verpuppungsrate der L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* war mit Werten von 91-92 % in allen Varianten nahezu identisch. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Varianten traten nicht auf. Die Resultate der Biotests mit im Feld und im Gewächshaus geerntetem Pollen unterschieden sich nicht. Bei den L<sub>1</sub>-Larven waren in den Varianten MON88017 und DKC1534 wiederum signifikant niedrigere Verpuppungsraten als in der Kontrolle festzustellen. Die Verpuppungsrate der isogenen Variante war mit 16 % auch signifikant geringer als in der transgenen Variante mit 35 %. Dies korrespondiert mit dem geringeren Wachstum in dieser Variante.

Bei den L<sub>2</sub>-Larven von *P. cochleariae* war der Gewichtszuwachs in der isogenen Variante gegenüber den übrigen Varianten reduziert und die Verpuppungsrate gleichzeitig deutlich erhöht. Dies lässt sich jedoch darauf zurückführen, dass diese Gruppe einen größeren Anteil älterer L<sub>2</sub>-Larven besaß. Dies wird durch das höhere mittlere Anfangsgewicht der Larven dieser Variante deutlich. Es betrug in der Varianten DKC1543 2,31 mg, während es in der Kontrolle und in MON88017 1,97 und 2,04 mg aufwies (Tab. 8). Zum Zeitpunkt der 2. Gewichtsbestimmung nach 4 Tagen hatten die Larven der isogenen Variante vermutlich bereits das Vorpuppenstadium erreicht, indem sie kein Gewicht mehr zulegten und erlangten daher einen geringeren relativen Gewichtszuwachs. Gleichzeitig war in der Kontrolle und in MON88017 der Anteil dieses Stadiums niedriger und somit mehr Wachstum möglich. Diese Abweichungen in der Altersstruktur führten zugleich zu einer erhöhten Verpuppungsrate in der isogenen Variante. Die Ursache für die beobachteten Unterschiede liegt

demnach in einer inhomogenen Alterstruktur der untersuchten Larven begründet und nicht in einem durch den Pollen hervorgerufenen Effekt auf das Larvenwachstum.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die beiden getesteten Arten *G. viridula* und *P. cochleariae* in den Pollenbiotests keine Wirkung des *Bt*-Pollens auf die Untersuchungsparameter Mortalität, Gewichtszunahme und Verpuppungsrate erkennen ließen. Die abweichenden Resultate der L<sub>1</sub>-Larven von *G. viridula* sind nicht auf eine Toxinwirkung zurückzuführen.

In der Literatur finden sich mit Ausnahme von SHIRAI (2006) keine neueren Untersuchungen, die sich mit den Auswirkungen von Cry3-haltigem Pollen auf Nichtziel-Blattkäfern beschäftigen. Diese Laborstudie zeigt, dass die Larven von *Galerucella vittaticollis* (Chrysomelidae) in Biotests, die mit denen der vorliegenden Untersuchung vergleichbar sind, nicht durch Pollenkonzentrationen von 500 und 2000 Pollenkörner/cm<sup>2</sup> geschädigt werden und kommt somit zu einem sehr ähnlichen Resultat wie die vorliegende Untersuchung.

Für die fehlende Wirkung der Pollensuspensionen lassen sich mehrere Gründe anführen. Eine wichtige Ursache liegt in der zu geringen Empfindlichkeit der untersuchten Arten gegenüber Cry3Bb1. Um eine akute Reaktion der Larven auf das Toxin auszulösen, waren vermutlich höhere Toxinmengen erforderlich als über die Pollenapplikation auf die Blattscheiben gelangten. Eine Pollendosis von 466 bzw. 752 Pollen pro Larve entspricht für *G. viridula* einer Toxinmenge von 0,001 bis 0,002 (L<sub>1</sub>) bzw. 0,002 bis 0,0037 µg pro Larve (L<sub>2</sub>, vgl. Abschn. 1.2.2.5). Die niedrigste, im Biotest mit den L<sub>1</sub>-Larven pro Einzellarve verwendete Toxinmenge betrug 0,008 µg und war damit 4 - 8 mal so hoch wie die im Pollenbiotest verwendete Dosis. Eine messbare, sich deutlich von der Kontrolle abhebende Mortalität wäre bei dieser geringen Dosis im Biotest nicht feststellbar gewesen. Für die L<sub>2</sub>-Larven gilt trotz höherer Pollendosis im Biotest aufgrund ihrer erheblich reduzierten Suszeptibilität gegenüber Cry3Bb1 Vergleichbares.

Darüber hinaus stellt sich auch die Frage nach der Bioverfügbarkeit des mit dem Pollen aufgenommenen Cry3Bb1-Toxins. Pollenophagie (Pollenfraß) konnte bisher nur sehr selten bei Blattkäfern dokumentiert werden. Die Nachweise beschränken sich ausschließlich auf die Imagines einiger Arten der Unterfamilie Orsodacninae (SAMUELSON 1994). Pollenfressende Käfer im Allgemeinen zeichnen sich durch spezielle, anatomische Adaptionen aus. Dazu gehört u. a. der Besitz eines zahnartigen Fortsatzes auf den Mandibeln, der ihnen das mechanische Aufbrechen der Pollen erlaubt (MANN & CROWSON 1981). Dieser Mandibelfortsatz fehlt jedoch bei den Larven der Chrysomeloidea (SAMUELSON 1994). Daher erscheint es fraglich, ob Chrysomelidenlarven befähigt sind, den Pollen effizient aufzuschließen und das im Pollen enthaltene Toxin in vollem Umfang aufzunehmen. Nach ROULSTON & CANE (2000) ist der Zusammenhang zwischen dem Besitz eines Mandibelzahns und der Befähigung zum Pollenfraß bei den Coleoptera jedoch noch nicht hinreichend gesichert.

### 1.3.3 Toxinbiotests

Die Toxinbiotests zeigten, dass die Larven aller vier getesteten Blattkäferarten empfindlich auf das Cry3Bb1-Toxin reagieren. Bei den Arten *G. viridula*, *L. decemlineata* und *P. cochleariae* war ein deutlicher Einfluss auf die drei Untersuchungsparameter Mortalität und Gewichtszunahme und Verpuppungsrate festzustellen. Die Larven von *C. varians* waren empfindlich; möglicherweise wurde jedoch die durch das *Bt*-Toxin hervorgerufene Sterblichkeit durch testimmanente Mortalitätsfaktoren stark überlagert.

Mit steigender Toxinmenge war bei den L<sub>1</sub>- und L<sub>2</sub>-Larven von *G. viridula* und *L. decemlineata* sowie den L<sub>1</sub>-Larven von *P. cochleariae* ein signifikanter Anstieg der Mortalitätsrate zu beobachten. Wie die innerhalb dieser drei Arten stark abweichenden LD<sub>50</sub>- und LD<sub>90</sub>-Werte zeigen, ist innerhalb der Blattkäfer mit größeren Unterschieden in der Sensibilität gegenüber Cry3Bb1 zu rechnen (vgl. Abschn. 1.2.2.4). Dies erschwert eine Verallgemeinerung und Übertragung der Ergebnisse auf die übrigen Blattkäferfauna.

Die Untersuchungen der verschiedenen Larvenstadien von *G. viridula* verdeutlichen, dass die Empfindlichkeit gegenüber Cry3Bb1 mit zunehmendem Larvenalter abnimmt. Vor allem neonate Larven werden durch eine Aufnahme von Cry3Bb1 geschädigt. Vergleichbare Resultate ergaben auch die Untersuchungen am eigentlichen Zielorganismus von Cry3Bb1 *Diabrotica v. virgifera* (JAMES et al. 1999, NOWATZKI et al. 2003). Die Untersuchungen zu Nebenwirkungen von Cry1Ab auf Nicht-Ziel-Lepidoptern zeigen, dass dies ein generelles Muster für die Wirkung von Cry-Toxinen auf Nicht-Ziel-Arthropoden ist (z. B. FELKE & LANGENBRUCH 2005).

Aus den erzielten Resultaten lassen sich Überlegungen zur Risikobewertung für die untersuchten Arten ableiten. Legt man die von HOFMANN (2007) erhobenen Daten zur Maispollendeposition und die im Labortest bestimmten täglichen Fraßmengen von *G. viridula* zugrunde, würde eine L<sub>1</sub>-Larve bei einer täglichen Fraßmenge von 0,2 cm<sup>2</sup> zwischen 1,4 und 414 Pollenkörner pro Tag aufnehmen. Im Mittel läge der Wert bei 24 Pollenkörnern und entspräche 0,27 % der LD<sub>50</sub>-Dosis. Eine Larve von *G. viridula* könnte demnach im zwei Tage andauernden ersten Larvenstadium im Durchschnitt 0,54 % der LD<sub>50</sub>-Dosis aufnehmen. Eine derartig geringe Toxinmenge hätte höchstwahrscheinlich keine akute Mortalität zur Folge. Auch für ältere Entwicklungsstadien wäre die zu erwartende akute Schädigung trotz einer erhöhten Toxinaufnahme, bedingt durch ihren größeren Nahrungsbedarf, aufgrund ihrer niedrigeren Empfindlichkeit vermutlich zu vernachlässigen. Gleiches ist für die insgesamt sogar noch unempfindlichere Art *P. cochleariae* zu vermuten, deren Verbreitungsschwerpunkt zudem außerhalb von Agrarflächen zu suchen ist. Selbst für *L. decemlineata*, die empfindlichste Art in den Biotests, ist keine nennenswerte akute Sterblichkeit zu erwarten. Bei einer täglichen Fraßmenge von 0,24 cm<sup>2</sup> einer neonaten Kartoffelkäferlarve (eigene Daten) würde lediglich etwa 1,6 % der LD<sub>50</sub>-Dosis aufgenommen.

Einschränkend ist jedoch festzuhalten, dass im Rahmen des vorliegenden Projektes vornehmlich die akute Toxizität von Cry3Bb1 für die untersuchten Blattkäferlarven bestimmt wurde. Die chronische Toxizität des Bt-Toxins und damit einhergehende subletale Effekte blieben weitgehend unberücksichtigt. Der hierzu durchgeführte Versuch mit *G. viridula* ließ jedoch keine toxischen Wirkungen einer über die ganze Dauer der Larvalentwicklung erfolgten Toxingabe erkennen. Obwohl die verwendete Cry3BB1-Konzentration der Testlösung die unter natürlichen Bedingungen zu erwartenden Toxinmengen bei weitem übertraf, war kein Effekt auf die Mortalität, von Larven, Puppen und Imagines sowie die Fraßmenge und Gewichtszunahme der Larven erkennbar. Auch die Lebensdauer der Adulten und ihre Fekundität wurden nicht beeinflusst.

## **2 Laborversuche mit Lepidopteren**

In weiteren Laborversuchen wurde die Wirkung von Cry3Bb1 auf neonate Larven des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* (HÜBNER, 1796)) und der Kohlmotte (*Plutella xylostella* (LINNEAUS, 1758)) untersucht. Die Larven von *P. xylostella* entstammten einer Laborzucht auf Markstammkohl (*Brassica oleracea* convar. *acephala* var. *medullosa*). Die Larven von *O. nubilalis* wurden aus der institutseigenen Zucht auf Mais-Sender-Medium bereit gestellt.

### **2.1 Material und Methode**

#### **2.1.1 *O. nubilalis***

Je 5 neonate Larven des Maiszünslers wurden auf ein Blattstück von 76 mm Länge der Maislinien MON88017 und DKC 1543 gesetzt, aus dem zuvor die Blattmittelrippe ausgeschnitten wurde und für 3 Tage bei 25 °C und Langtagbedingungen in Schnappdeckelgläser (30 x 100 mm) mit einem angefeuchteten Filterpapier (Durchmesser 50 mm) gehalten. Jede Variante wurde achtfach wiederholt. Die verwendeten Maispflanzen befanden sich im 5-Blattstadium. Es wurde jeweils die untere Hälfte des ersten voll entfalteten Blattes verwendet. Nach Ablauf von drei Tagen wurde die Anzahl der toten und lebenden Larven erfasst.

### 2.1.2 *P. xylostella*

Es wurden je 5 neonate Larven der Kohlmotte in Einzeldöschen (Kantenlänge 1 cm), die mit einer ca. 3 mm dicken Schicht aus 3%igem Wasser-Agar bedeckt waren, gesetzt. Die Tiere der Toxin-Variante erhielten am ersten Versuchstag eine mit Cry3Bb1-Toxin behandelte Blattscheibe von Markstammkohl mit einem Durchmesser von 3 mm. Dazu wurde 1 µl einer unverdünnten Toxinlösung aufgetragen (Quelle: DLR Rheinland-Pfalz, 1,8 µg Toxin/µl, trypinisiert). Die Kontrollvariante erhielt ein gleichgroßes, unbehandeltes Blattstück. Jede Variante wurde achtfach wiederholt. Am zweiten Tag wurde die gefressene Blattfläche notiert und ein unbehandeltes Blattstück von 9 mm Durchmesser nachgefüttert. Nach Ablauf von drei Tagen wurde die Anzahl der toten und lebenden Larven erfasst.

## 2.2 Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte gemäß Abschnitt 1.1.2.3.

### 2.2.1 *O. nubilalis*

In der Variante isogen überlebten 38 der 40 Larven (Tab. 28). Die mittlere Mortalität betrug 5 %. In der Variante MON88017 betrug die Mortalität 15 % (34 überlebende Larven) und war damit höher als in der isogenen Variante. Beide Varianten unterschieden sich jedoch nicht signifikant (PROC GENMOD,  $p = 0,17$ ).

Tab. 28: Mittlere Mortalität (in %, + SD) der L<sub>1</sub>-Larven von *O. nubilalis* im Biotest auf isogenem und transgenem Maisblattmaterial

Varianten	Larvenstadium	Wiederholungen	Individuen je Wiederholung	Anzahl getesteter Individuen	Anzahl überlebender Tiere	Anzahl gestorbener Tiere	mittlere Mortalität [%]	SD
isogen	L1	8	5	40	38	2	5,0 a	9,3
Cry3Bb1	L1	8	5	40	34	6	15,0 a	20,7

Mittelwerte innerhalb einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD,  $p = 0,17$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SD = Standardabweichung.

### 2.2.2 *P. xylostella*

Die Mortalität betrug in beiden Varianten 2,5 % (Tab. 29). Jeweils 39 der 40 Larven überlebten. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Varianten (PROC GENMOD,  $p = 1,0$ ). Auch die Akzeptanz der behandelten und nicht behandelten Blattscheiben unterschied sich zwischen den Varianten nicht. Sowohl in der Kontrolle als in der Toxinvarianten wurden nahezu 100 % der angebotenen Blattfläche gefressen.

Tab. 29: Mortalität (in %, + SD) der L<sub>1</sub>-Larven von *P. xylostella* im Biotest mit unverdünnter Cry3Bb1-Lösung

	Larvenstadium	mittlere Toxinmenge je Einzeltier [µg]	Wiederholungen	Individuen je Wiederholung	Anzahl getesteter Individuen	Anzahl überlebender Tiere	Anzahl gestorbener Tiere	mittlere Mortalität [%]	SD	gefressene Blattfläche [%]	SD
<i>P. xylostella</i>	L1	0 (Kontrolle)	8	5	40	39	1	2,5 a	7,1	98,3	2,2
	L1	0,36	8	5	40	39	1	2,5 a	7,1	99,1	1,8

Mittelwerte innerhalb einer Spalte mit dem gleichen Buchstaben sind nicht signifikant verschieden (PROC GENMOD,  $p = 1,0$ ; LSMEANS, SAS Institute 2003), SD = Standardabweichung.

### 2.3 Diskussion

Bei beiden untersuchten Arten war im Biotest keine durch das Toxin ausgelöste akute Mortalität festzustellen. Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen auch die Untersuchungen von MATTILA et al. (2005), bei denen neonate Monarchfalter-Larven (*Danaus plexippus*) in verschiedenen gestalteten Biotests mit reinem Cry3Bb1-Toxin sowie mit Pollen und Antheren von MON863 gefüttert wurden. Es ließ sich kein Effekt auf die Mortalität und die erfassten Entwicklungsparameter nachweisen. ROMEIS et al. (2008) folgern aus diesen und anderen Studien, dass sich Untersuchungen zu Nebenwirkungen von Cry3Bb1 auf Nichtzielorganismen aufgrund der Spezifität der untersuchten Cry3-Toxine auf Blattkäfer und andere Coleopteren konzentrieren sollten. Nebenwirkungen auf Lepidopteren oder Chrysopiden seien kaum zu erwarten. Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen diese Auffassung.

### 3 Risikoanalyse: Gefährdung der heimischen Blattkäferfauna durch den Anbau Cry3Bb1-Toxin exprimierender transgener Maislinien

Die Identifikation potentiell gefährdeter Blattkäferspezies erfolgt in der Risikoanalyse durch ein Ausschlussverfahren. Die im Zuge der Risikoanalyse angewandten Ausschluss- und Auswahlkriterien zielen darauf ab, die Arten zu ermitteln, für die die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens zwischen den Larven als dem vermutlich empfindlichsten Entwicklungsstadium und dem Toxin am größten ist.

#### 3.1 Szenario für die Aufnahme von Bt-Toxin durch Blattkäfer

Die Maispflanze selbst dient nur sehr wenigen Arten als larvale Futterpflanze (*Oulema gallaeciana*, *O. melanopus*, möglicherweise einigen *Phyllotreta*- und *Chaetocnema*-Arten). Darüber hinaus sind einige Arten innerhalb der Gattungen *Phyllotreta* und *Cryptocephalus* sowie innerhalb der Unterfamilie Galerucinae bekannt, deren Imagines an Pollen und Narbenfäden von Poaceen fressen. Dies ist bedeutsam, da der Pollen und die Narbenfäden des Events MON88017 einen relativ großen Toxingehalt aufweist (vgl. Teil I, Abschn. 4). Die bisherigen Untersuchungen zur Toxizität von Cry3Bb1 und anderer Cry3-Toxine lassen jedoch keine Wirkung auf adulte Blattkäfer erkennen (JAMES et al. 1999, NOWATZKI et al. 2003). Darüber hinaus sind auf Maispflanzen nur sehr geringe Dichten adulter Blattkäfer festzustellen (mündliche Mitteilung Stefan Rauschen/RWTH Aachen, ECKERT 2006). Eine direkte Intoxikation durch den Fraß an Toxin produzierenden Pflanzenorganen des Mais selbst scheidet somit als Gefährdungsursache für die Blattkäferfauna von Ackerbioto-

pen de facto aus. Die Aufnahme des Toxins erfolgt in erster Linie, wenn transgener Maispollen während der starken Pollenausschüttung im Verlauf der Maisblüte windverdriftet wird und die Ackerbegleitflora im Maisbestand oder in angrenzenden Feldrainen kontaminiert, die für zahlreiche Blattkäferlarven als Nahrungsressource fungiert (Abb. 26). Eine potentielle Gefährdung besteht vor allem für Arten, die mit der Ackerbegleitflora vergesellschaftet sind.

Nach derzeitigem Kenntnistand kommen in Deutschland neben *Diabrotica virgifera virgifera* 518 Blattkäferarten vor (KÖHLER & KLAUSNITZER 1998, Stand 02/2008). FRITZ-KÖHLER (1996) listet 134 Blattkäferarten auf, deren Entwicklungspflanzen zu den Ackerwildkräutern zu rechnen sind. 124 dieser Spezies sind derzeit für Deutschland nachgewiesen (vgl. KÖHLER & KLAUSNITZER 1998). Die Lebensbedingungen für Chrysomeliden sind in Maiskulturen im Allgemeinen als ungünstig zu beurteilen. Aufgrund der ausgeprägten Konkurrenzschwäche des Maises in seiner Jugendentwicklung wird die Ackerbegleitflora in dieser Phase intensiv mit Herbiziden bekämpft. Der sehr wüchsige Maisbestand schließt sich relativ schnell und nimmt den nach der Bekämpfungsmaßnahme ggf. neu aufkeimenden Ackerbeikräutern das überlebensnotwendige Licht, so dass es auch im weiteren Verlauf der Vegetationsperiode im Idealfall kaum mehr zu einer nennenswerten Verunkrautung des Bestandes kommt. Dies schafft im Maisbestand für Blattkäfer sehr ungünstige Entwicklungsbedingungen. Verstärkt wird dies noch durch den Einsatz von lang wirksamen Bodenherbiziden, die ein neuerliches Aufkeimen von Ackerbeikräutern über einen längeren Zeitraum verhindern. Die Blattkäferfauna in Gebieten mit intensivem Maisanbau sollte sich demzufolge fast ausschließlich auf angrenzende Feldrandstrukturen und Kleinbiotope konzentrieren. Entsprechende Freilandstudien, die dies belegen, sind nicht bekannt.

### 3.3 Merkmale potentiell durch *Cry3Bb1*-Toxin gefährdeter Blattkäferarten

Um aus dem Artenpool der 518 in Deutschland beheimateten Spezies diejenigen zu selektieren, die durch eine *Cry3Bb1*-Expression gefährdet sein könnten, wurden folgende Auswahlkriterien definiert:

#### 1) Biotopbindung und Nahrungspflanzenspektrum

Eine potentielle Gefährdungslage durch eine *Cry3Bb1*-Expression im Pollen von *Bt*-Maispflanzen ist nur für solche Arten gegeben, für die eine räumliche Überlappung zwischen ihren bevorzugten Lebensraum und dem *Bt*-Maisanbau besteht. Aus Literaturangaben zur Biotopbindung und zum Spektrum der larvalen Entwicklungspflanzen der Chrysomeliden wurde eine 142 Arten umfassende Liste erarbeitet, die alle Spezies aufführt, die in Ackerbiotopen zu erwarten sind und ackerbaulich genutzte Fläche und angrenzende Feldrandstrukturen wie Ackerrandstreifen und Feldraine als Lebensraum nutzen können. Dabei wurden fast ausschließlich eurytope Arten berücksichtigt, die sich an Ackerbeikräutern und -gräsern entwickeln, da hier der räumliche Bezug zum Maisanbau erheblich enger ist als bei arborikolen Arten, die in den verschiedensten Biototypen verbreitet sind. Mit Ausnahme der Art *Lochmaea crataegi*, die an Weißdorn (*Crataegus* spp.) lebt und regelmäßig auf Feldrandstrukturen anzutreffen ist, wurden daher keine weiteren Spezies der Feldgehölze und Hecken berücksichtigt.

Eine Gruppe von 8 Arten weist eine sehr hohe Affinität zu bestimmten Feldkulturen auf und ist daher selten auf Feldrainen oder im Mais selbst anzutreffen (*Crioceris duodecimpunctata*, *C. asparagi* [beide Spargel], *Leptinotarsa decemlineata* [Kartoffel], *Cassida nebulosa*, *C. nobilis*, *C. vittata* [alle Zuckerrübe], *Oulema gallaeciana*, *O. melanopus* [Getreide]). Diese Arten wurden daher im Verlauf der Risikoanalyse nicht weiter berücksichtigt. Es resultiert eine Zahl von 134 Arten mit Bindung an die Ackerbegleitflora (Tab. 30).

40 dieser Spezies können potentiell in der 204 Pflanzenarten umfassenden Ackerbegleitflora von Maiskulturen auftreten, da ihre larvalen Nahrungspflanzen mit hoher Stetigkeit in Maiskulturen (> 20%) anzutreffen sind (BÖHME 2001, MERTENS et al. 2005). Wie viele dieser Spezies tatsächlich Maisbestände als Lebensraum dienen, ist nicht bekannt, da dies bisher noch nie untersucht wurde.

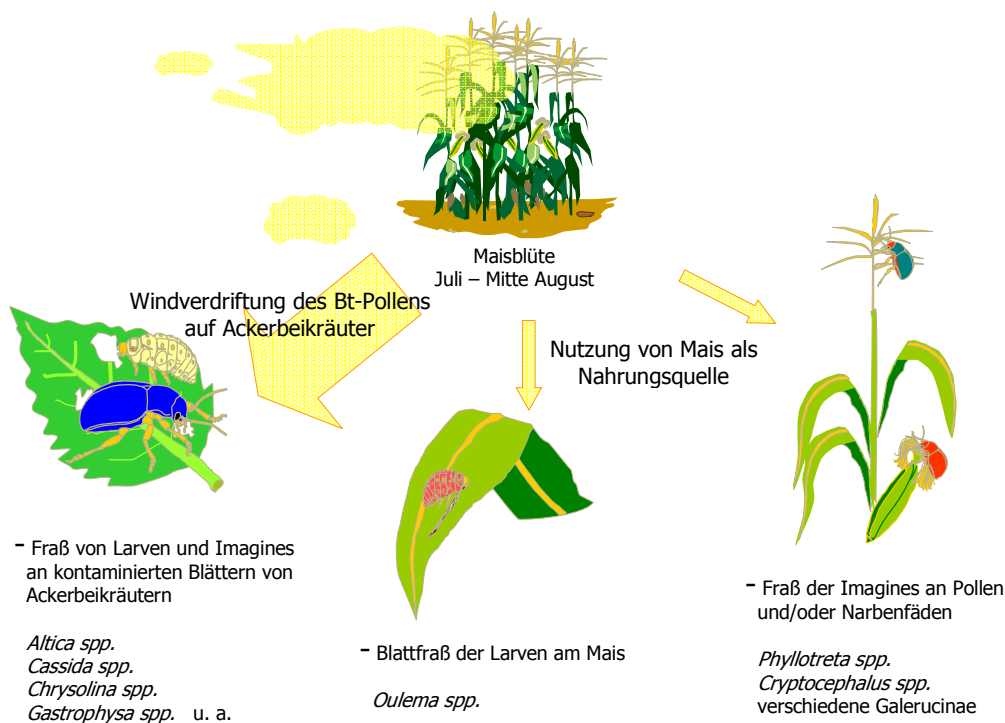


Abb. 25: Szenarien für die Aufnahme von Bt-Toxin durch Blattkäfer

Tab. 30: In Ackerbiotopen zu erwartende Blattkäferfauna

EDV-CODE	Art	EDV-CODE	Art
88-.004-.001-.	<i>Orsodacne cerasi</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.017-.	<i>Longitarsus melanocephalus</i> (DeGeer 1775)
88-.006-.0011.	<i>Lema cyanella</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.0171.	<i>Longitarsus kutscherae</i> Rye 1872
88-.0061.003-.	<i>Oulema gallaeciana</i> (Heyden 1870)	88-.051-.018-.	<i>Longitarsus curtus</i> (Allard 1860)
88-.0061.005-.	<i>Oulema melanopus</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.019-.	<i>Longitarsus exoletus</i> (Linnaeus 1758)
88-.007-.001-.	<i>Crioceris duodecimpunctata</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.022-.	<i>Longitarsus longipennis</i> Kutschera 1863
88-.007-.004-.	<i>Crioceris asparagi</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.023-.	<i>Longitarsus lewisii</i> (Baly 1874)
88-.008-.002-.	<i>Lilioceris merdigera</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.024-.	<i>Longitarsus pratensis</i> (Panzer 1794)
88-.017-.021-.	<i>Cryptocephalus laetus</i> Fabricius 1792	88-.051-.026-.	<i>Longitarsus gracilis</i> Kutschera 1864
88-.017-.025-.a	<i>Cryptocephalus aureolus aureolus</i> Suffrian 1847	88-.051-.028-.	<i>Longitarsus ganglbaueri</i> Heikertinger 1912
88-.017-.027-.a	<i>Cryptocephalus hypochaeridis hypochaeridis</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.031-.	<i>Longitarsus atricillus</i> (Linnaeus 1761)
88-.017-.044-.	<i>Cryptocephalus moraei</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.032-.	<i>Longitarsus suturellus</i> (Duftschmid 1825)
88-.017-.051-.	<i>Cryptocephalus vittatus</i> Fabricius 1775	88-.051-.033-.	<i>Longitarsus nasturtii</i> (Fabricius 1792)
88-.022-.001-.	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Say 1824)	88-.051-.035-.	<i>Longitarsus dorsalis</i> (Fabricius 1781)
88-.023-.004-.	<i>Chrysolina herbacea</i> (Duftschmid 1825)	88-.051-.036-.	<i>Longitarsus quadriguttatus</i> (Pontopiddan 1765)
88-.023-.005-.	<i>Chrysolina coerulans</i> (Scriba 1791)	88-.051-.037-.	<i>Longitarsus apicalis</i> (Beck 1817)
88-.023-.0061.	<i>Chrysolina fastuosa</i> (Scopoli 1763)	88-.051-.039-.	<i>Longitarsus luridus</i> (Scopoli 1763)
88-.023-.011-.	<i>Chrysolina staphylaea</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.048-.	<i>Longitarsus fuscoaeneus</i> Redtner 1849
88-.023-.026-.	<i>Chrysolina haemoptera</i> (Linnaeus 1758)	88-.051-.053-.	<i>Longitarsus parvulus</i> (Paykull 1799)
88-.023-.028-.	<i>Chrysolina sturmi</i> (Bedell 1892)	88-.051-.054-.	<i>Longitarsus anchlussae</i> (Paykull 1799)
88-.023-.029-.	<i>Chrysolina sanguinolenta</i> (Linnaeus 1758)	88-.052-.003-.	<i>Altica lythri</i> Aubé 1843
88-.023-.031-.	<i>Chrysolina gypsophilae</i> (Küster 1845)	88-.052-.007-.	<i>Altica oleracea oleracea</i> (Linnaeus 1758)
88-.023-.033-.	<i>Chrysolina kuesteri</i> (Helliesen 1911)	88-.052-.009-.	<i>Altica carduorum</i> (Guérin-Méneville 1858)
88-.023-.036-.	<i>Chrysolina varians</i> (Schaller 1783)	88-.053-.001-.	<i>Hermaeophaga cicatrix</i> (Illiger 1807)
88-.023-.038-.	<i>Chrysolina hyperici</i> (Forster 1771)	88-.056-.001-.	<i>Ochrosis ventralis</i> (Illiger 1807)
88-.023-.040-.	<i>Chrysolina geminata</i> (Paykull 1799)	88-.057-.002-.	<i>Neocrepidodera transversa</i> (Marshall 1802)
88-.023-.043-.	<i>Chrysolina analis</i> (Linnaeus 1767)	88-.057-.004-.	<i>Neocrepidodera ferruginea</i> (Scopoli 1763)

EDV-CODE	Art	EDV-CODE	Art
88-.023-.044-.	<i>Chrysolina marginata</i> (Linnaeus 1758)	88-.057-.012-.	<i>Neocrepidodera melanostoma</i> (Redtner 1849)
88-.023-.045-.	<i>Chrysolina limbata</i> (Suffrian 1851)	88-.059-.001-.	<i>Derocephala rufipes</i> (Linnaeus 1758)
88-.026-.002-.	<i>Oreina caerulea</i> (Olivier 1807)	88-.060-.001-.	<i>Hippuriphila modeeri</i> (Linnaeus 1761)
88-.027-.001-.	<i>Colaphus sophiae</i> (Schaller 1783)	88-.062-.002-.	<i>Epitrix pubescens</i> (Koch 1803)
88-.028-.001-.	<i>Gastrophysa polygoni</i> (Linnaeus 1758)	88-.064-.001-.	<i>Podagrica fuscicornis</i> (Linnaeus 1767)
88-.028-.002-.	<i>Gastrophysa viridula</i> (DeGeer 1775)	88-.064-.002-.	<i>Podagrica malvae</i> (Illiger 1807)
88-.029-.001-.	<i>Phaedon laevigatus</i> (Duftschmid 1825)	88-.065-.001-.	<i>Mantura chrysanthemii</i> (Koch 1803)
88-.0291.001-.	<i>Neophaedon pyritosus</i> (Rossi 1792)	88-.065-.002-.	<i>Mantura obtusata</i> (Gyllenhal 1813)
88-.032-.003-.	<i>Prasocuris glabra</i> (Herbst 1783)	88-.065-.003-.	<i>Mantura ambigua</i> (Kutschera 1862)
88-.032-.004-.	<i>Prasocuris marginella</i> (Linnaeus 1758)	88-.065-.005-.	<i>Mantura rustica</i> (Linnaeus 1767)
88-.037-.001-.a	<i>Timarcha tenebricosa tenebricosa</i> (Fabricius 1775)	88-.066-.003-.	<i>Chaetocnema concinna</i> (Marsham 1802)
88-.037-.002-.	<i>Timarcha goettingensis</i> (Linnaeus 1758)	88-.066-.004-.	<i>Chaetocnema picipes</i> Stephens 1831
88-.041-.001-.	<i>Galeruca tanacetii</i> (Linnaeus 1758)	88-.066-.006-.	<i>Chaetocnema tibialis</i> (Illiger 1864)
88-.041-.002-.a	<i>Galeruca interrupta interrupta</i> Illiger 1802	88-.066-.009-.	<i>Chaetocnema obesa</i> (Boieldieu 1859)
88-.041-.003-.	<i>Galeruca pomonae</i> (Scopoli 1763)	88-.066-.011-.	<i>Chaetocnema aridula</i> (Gyllenhal 1827)
88-.041-.007-.	<i>Galeruca melanocephala</i> Ponza 1805	88-.066-.017-.	<i>Chaetocnema hortensis</i> (Fourcroy 1785)
88-.042-.003-.	<i>Lochmaea crataegi</i> (Forster 1771)	88-.067-.001-.	<i>Sphaeroderma testaceum</i> (Fabricius 1775)
88-.044-.001-.	<i>Exosoma lusitanica</i> (Linnaeus 1767)	88-.067-.002-.	<i>Sphaeroderma rubidum</i> (Graells 1858)
88-.047-.001-.	<i>Sermylassa halensis</i> (Linnaeus 1767)	88-.069-.001-.	<i>Apteropeda splendida</i> Allard 1860
88-.049-.002-.	<i>Phyllotreta vittula</i> (Redtner 1849)	88-.069-.002-.	<i>Apteropeda globosa</i> (Illiger 1794)
88-.049-.003-.	<i>Phyllotreta armoraciae</i> (Koch 1803)	88-.069-.003-.	<i>Apteropeda orbiculata</i> (Marsham 1802)
88-.049-.004-.	<i>Phyllotreta nemorum</i> (Linnaeus 1758)	88-.070-.001-.	<i>Mniophila muscorum</i> (Koch 1803)
88-.049-.005-.	<i>Phyllotreta undulata</i> (Kutschera 1860)	88-.071-.004-.	<i>Dibolia depressiuscula</i> Letzner 1846
88-.049-.010-.	<i>Phyllotreta striolata</i> (Fabricius 1803)	88-.071-.007-.	<i>Dibolia occultans</i> (Koch 1803)
88-.049-.014-.	<i>Phyllotreta atra</i> (Fabricius 1775)	88-.072-.002-.	<i>Psylliodes affinis</i> (Paykull 1799)
88-.049-.015-.	<i>Phyllotreta cruciferae</i> (Goeze 1777)	88-.072-.007-.	<i>Psylliodes chrysocephalus</i> (Linnaeus 1758)
88-.049-.0171.	<i>Phyllotreta astrachanica</i> Lopatin 1977	88-.072-.013-.	<i>Psylliodes thlaspis</i> Foudras 1860
88-.049-.018-.	<i>Phyllotreta aerea</i> Allard 1859	88-.072-.015-.	<i>Psylliodes cupreus</i> (Koch 1803)
88-.049-.020-.	<i>Phyllotreta consobrina</i> (Curtis 1837)	88-.072-.017-.	<i>Psylliodes cupreatus</i> (Duftschmid 1825)
88-.049-.021-.	<i>Phyllotreta nigripes</i> (Fabricius 1775)	88-.072-.018-.	<i>Psylliodes instabilis</i> Foudras 1860
88-.049-.024-.	<i>Phyllotreta nodicornis</i> (Marsham 1802)	88-.072-.026-.	<i>Psylliodes cucullatus</i> (Illiger 1807)
88-.050-.001-.	<i>Aphthona cyparissiae</i> (Koch 1803)	88-.073-.001-.	<i>Hispa atra</i> Linnaeus 1767
88-.050-.003-.	<i>Aphthona illigeri</i> Bedell 1898	88-.075-.001-.	<i>Hypocassida subferruginea</i> (Schrank 1776)
88-.050-.010-.	<i>Aphthona czwalinai</i> Weise 1888	88-.076-.001-.	<i>Cassida viridis</i> Linnaeus 1758
88-.050-.012-.	<i>Aphthona pygmaea</i> (Kutschera 1861)	88-.076-.005-.	<i>Cassida nebulosa</i> Linnaeus 1758
88-.050-.013-.	<i>Aphthona atrocoerulea</i> (Stephens 1831)	88-.076-.006-.	<i>Cassida flaveola</i> Thunberg 1794
88-.050-.014-.	<i>Aphthona venustula</i> (Kutschera 1861)	88-.076-.011-.	<i>Cassida vibex</i> Linnaeus 1767
88-.050-.022-.	<i>Aphthona ovata</i> Foudras 1860	88-.076-.015-.	<i>Cassida rubiginosa</i> Müller 1776
88-.051-.001-.	<i>Longitarsus pellucidus</i> (Foudras 1860)	88-.076-.019-.	<i>Cassida rufovirens</i> Suffrian 1844
88-.051-.002-.	<i>Longitarsus ochroleucus</i> (Marsham 1802)	88-.076-.021-.	<i>Cassida denticollis</i> Suffrian 1844
88-.051-.003-.	<i>Longitarsus jacobaeae</i> (Waterhouse 1858)	88-.076-.024-.	<i>Cassida azurea</i> Fabricius 1801
88-.051-.005-.	<i>Longitarsus succineus</i> (Foudras 1860)	88-.076-.025-.	<i>Cassida subreticulata</i> Suffrian 1844
88-.051-.012-.	<i>Longitarsus lycopi</i> (Foudras 1860)	88-.076-.026-.	<i>Cassida margaritacea</i> Schaller 1783
88-.051-.014-.	<i>Longitarsus ferrugineus</i> Foudras 1863	88-.076-.027-.	<i>Cassida nobilis</i> Linnaeus 1758
88-.051-.016-.	<i>Longitarsus nanus</i> (Foudras 1860)	88-.076-.028-.	<i>Cassida vittata</i> Villers 1789

Quellen: BÖHME (2001, 2005), FRITZ-KÖHLER (1996), MEIER & HILBECK (2002), KOCH (1993, 1995, 1996), LETHMEYER et al. (1997), STEINHAUSEN (1950) - Nomenklatur nach BÖHME (2005)

## 2) Ernährung der Larven

Innerhalb der Chrysomelidenfauna finden sich verschiedene larvale Ernährungsformen, die wesentlich das Risiko der Larven bestimmen, mit dem *Bt*-Toxin im Lauf ihrer Entwicklung in Kontakt zu kommen. Bei nur etwa 30% aller in Mitteleuropa heimischen Blattkäferarten leben alle Stadien frei auf den Blättern ihrer Wirtspflanzen (phyllophag-ektophag, SCHÖLLER 1996). Für diese Arten besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit *Bt*-Pollen bei der Nahrungsaufnahme aufzunehmen, wenn dieser ihre Wirtspflanzen bedeckt hat. 70% der Arten entwickeln sich jedoch unterirdisch an Wurzeln (rhizophag), in Blatt- und Stängelminen (endophag) oder im Laubstreu (phytosaprophag, SCHÖLLER 1996). Dieser Teil der Blattkäferfauna kommt nicht oder nur in sehr geringem Maße mit dem toxischen Pollen in Berührung.



Quellen: BÖHME (2005), JOLIVET & VERMA (2002), KLAUSNITZER (1994), KRAUSE (1981), SCHÖLLER (1996)

### 3) zeitliche Koinzidenz zwischen der Aktivität der Larven und dem Pollenflug

Ein weiteres, wichtiges Kriterium zur Bestimmung der Expositionswahrscheinlichkeit gegenüber Cry3Bb1-Toxin besteht in der zeitlichen Überlappung zwischen der Aktivität der Larven als dem empfindlichen Entwicklungsstadium der Blattkäfer und der Maisblüte. Die Maisblüte erfolgt in Deutschland meist zwischen Mitte Juli und Anfang August. Im Allgemeinen dauert sie 7-14Tage. Unter ungünstigen Witterungsbedingungen kann sie sich jedoch auch über bis zu 4 Wochen erstrecken. Arten, deren Larvalentwicklung in diesen Zeitraum fällt, sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Bt-Toxin ausgesetzt. Dabei ist das Ausmaß der Exposition umso höher je größer die Überlappung mit der Frühphase der Larvenentwicklung ausfällt, da frühe Larvenstadien gegenüber Cry3Bb1 sensibler sind (vgl. Abschn. 1.3.3). Bei oligo- und polyvoltinen Arten steigt die Wahrscheinlichkeit, dass zumindest eine Generation betroffen ist.

Berücksichtigt man den Zeitbedarf für die Embryonalentwicklung, ein witterungsbedingtes oder regional früheres Einsetzen der Blüte und den Umstand, dass die Kontamination durch den Pollen auch nach der Blüte für einige Tage erhalten bleibt, ergibt sich ein kritischer Zeitraum von Mitte Juni bis Mitte August. In diesen Abschnitt der Vegetationsperiode fällt vor allem das Fortpflanzungsgeschehen von Spätfrühlings- und Sommerbrütern. Frühlings- und Herbstbrüter weisen hingegen keine zeitliche Überlappung mit dieser Phase auf.

Quellen: ALI et al. (1980), CAGAN et al. (2006), CHEVIN (1994), COX (1994), GASSMANN et al. (1995), HAYE & KENIS (2004), HEYER (1977), KAPLIN & ANTONOV (2004), KRAUSE (1981), REITTER (1912), SCHABER et al. (1975), STEINHAUSEN (2005), VIG (1998, 2000, 2001), WINDIG (1991), ZWÖLFER & PATULLO (1970) u. a.

### 4) Detailanalyse

Zielsetzung der Detailanalyse ist es zum einem, zu klären wie eng die Bindung der Arten an Ackerbiotop ist, d. h. ob es für diese Spezies eine ausreichende Anzahl von Alternativbiotopen existiert. Als Bewertungskriterien fungierten dabei Literaturangaben zum Vorkommen außerhalb von Ackerbiotopen sowie das Nahrungspflanzenspektrum und der Phagiegrad, der Rückschlüsse auf die Intensität der Biotopbindung erlaubt.

Darüber hinaus soll die Listung der Arten in einer Roten Liste Hinweise auf den Grad der momentanen Gefährdung geben. Neben der Roten Liste gefährdeter Blattkäferarten Deutschlands (GEISER 1998), die aufgrund ihres Alters kaum noch die aktuelle Gefährdungslage der Blattkäferfauna widerspiegeln dürfte, gibt es bundesweit nur noch zwei weitere, aktuellere Rote Listen für die Bundesländer Bayern (KIPPENBERG et al. 2003) und Thüringen (FRITZLAR 2001). Während der Freistaat Bayern mit über 400.000 ha jährlicher Anbaufläche zu den wichtigsten Maisproduzenten der Bundesrepublik zählt und daher die Gefährdungseinschätzungen für dieses Bundesland besondere Relevanz besitzen, ist im Bundesland Thüringen der Maisanbau mit unter 50.000 ha von geringer Bedeutung (Quelle: Deutsches Maiskomitee). Dennoch kann diese Liste den Gesamteindruck über die Gefährdungslage der Blattkäfer in Agrarbiotopen komplettieren. Insgesamt sind 12 der ausgewählten Arten in den verschiedenen Roten Listen aufgeführt.

Quellen: BÖHME (2001, 2005), FRITZLAR (2001), GEISER (1998), KIPPENBERG et al. (2003)

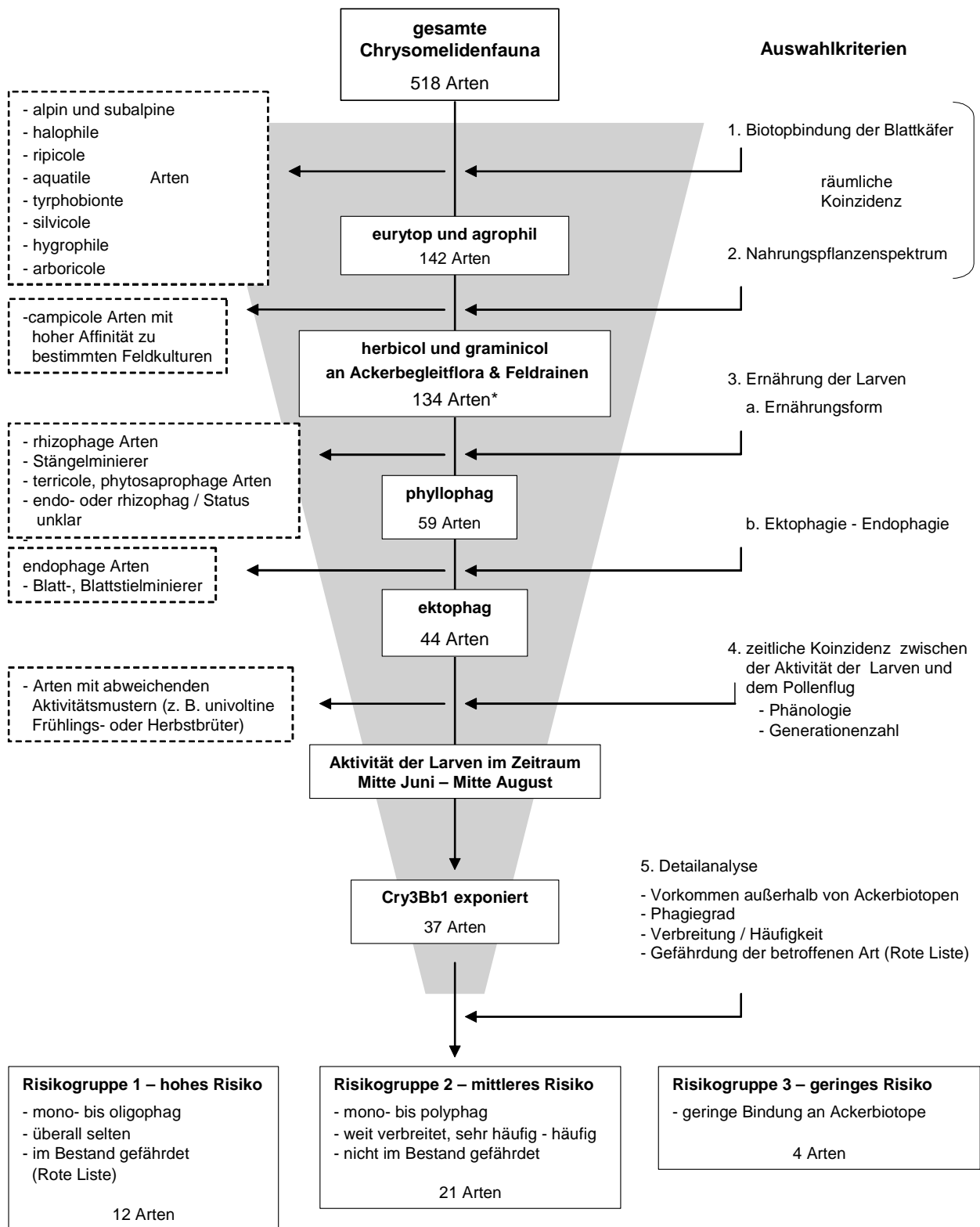


Abb. 26: Auswahl der potentiell durch eine Cry3Bb1-Expression in MON88017-Mais gefährdeten Blattkäferarten

### 2.3.1 Risikogruppen

Die Risikoanalyse zeigt 37 Blattkäferarten auf, für die eine Gefährdung durch CryBb1 nicht ausgeschlossen werden kann. Innerhalb dieser Gruppe haben jedoch nicht alle Arten das gleiche Gefährdungsrisiko. Sie werden daher verschiedenen Risikogruppen zugeordnet.

Die im Ausschlussverfahren ermittelten Blattkäferarten wurden in drei Risikokategorien eingeteilt. Die Kriterien für die Risikobewertung sind Abb. 26 zu entnehmen. Im Detail erfolgt die Einteilung der verschiedenen Arten folgendermaßen:

#### Risikogruppe 1 – hohes, potentielles Risiko (12 Spezies),

<i>Altica carduorum</i>	<i>Chrysolina marginata</i>
<i>Cassida azurea</i>	<i>Colaphus sophiae</i>
<i>Cassida rufovirens</i>	<i>Galeruca interrupta interrupta</i>
<i>Cassida subreticulata</i>	<i>Galeruca melanocephala</i>
<i>Chrysolina analis</i>	<i>Neophaedon pyritosus</i>
<i>Chrysolina gypsophilae</i>	<i>Oreina caerulea</i>

#### Risikogruppe 2 – mittleres, potentielles Risiko (21 Spezies):

<i>Altica lythri</i>	<i>Chrysolina herbacea</i>
<i>Altica oleracea oleracea</i>	<i>Chrysolina kuesteri</i>
<i>Cassida denticollis</i>	<i>Chrysolina sanguinolenta</i>
<i>Cassida flaveola</i>	<i>Chrysolina staphylaea</i>
<i>Cassida margaritacea</i>	<i>Chrysolina sturmi</i>
<i>Cassida rubiginosa</i>	<i>Chrysolina varians</i>
<i>Cassida vibex</i>	<i>Galeruca pomonae</i>
<i>Cassida viridis</i>	<i>Gastrophysa polygoni</i>
<i>Chrysolina coerulans</i>	<i>Hypocassida subferruginea</i>
<i>Chrysolina fastuosa</i>	<i>Lochmaea crataegi</i>
<i>Chrysolina geminata</i>	

#### Risikogruppe 3 – geringes, potentielles Risiko (4 Spezies):

<i>Gastrophysa viridula</i>	<i>Lilioceris merdigera</i>
<i>Lema cyanella</i>	<i>Phaedon laevigatus</i>

### 3.4 Diskussion

Die angestrebte Risikoanalyse wird vor allem durch das Fehlen ausreichender Daten zur Bionomie der Blattkäferfauna der Agrarlandschaft erschwert. Insbesondere die verfügbaren Daten zur Verbreitung, Biotopbindung und Larvalbiologie vieler Arten sind äußerst lückenhaft und nur schwer zugänglich. Mit Ausnahme von FRITZ-KÖHLER (1996) gibt es keine neueren Untersuchungen zum Auftreten von Blattkäfern in der Agrarlandschaft. Zu einigen Blattkäferarten existieren Daten zum Erscheinen der Jung- und überwinterten Altkäfergeneration, nicht jedoch zu den für die Risikobewertung besonders bedeutsamen Aktivitätsphasen der Larven innerhalb der Vegetationsperiode. Eine systematische Zusammenstellung phänologischer Daten der Blattkäfer existiert nicht. Stattdessen muss auf wenige Einzelpublikationen zurückgegriffen werden, die jedoch nur einen Bruchteil der Arten behandeln. Aussagen zur räumlich-zeitlichen Koinzidenz zwischen den Blattkäferlarven und der Pollenproduktion der Maispflanzen sind auf Basis dieser Daten daher nur sehr eingeschränkt möglich. Darüber hinaus ist innerhalb der Imagines der Blattkäfer das Auftreten einer Sommerruhe weit verbreitet (COX 1994, JOLIVET & VERMA 2002). Die Kopulation und Eiablage erfolgt bei den betroffenen Arten meist erst nach Beendigung der Sommerruhe im Spätsommer und Herbst, so dass keine zeitliche Überlappung zwischen der Maisblüte und der Larvenaktivität besteht. Dies Phänomen ist insbesondere innerhalb der Gattung *Chrysolina* häufig. Es war im Rahmen dieser Studie nicht möglich, für alle in Frage kommenden Arten zu klären, ob sie eine Sommerruhe einlegen oder nicht.

Die vorliegende Risikoanalyse zeigt, dass ein Spektrum von 37 Blattkäferarten durch eine Expression von Cry3Bb1-Toxinen in transgenen Maispflanzen möglicherweise gefährdet wird. Es handelt sich um ektophage, eurytope Arten an der Ackerbegleitflora, deren Phänologie eine zeitliche Koinzidenz zwischen Maisblüte und Larvenentwicklung wahrscheinlich werden lässt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass für diese Arten mit Ausnahme von *G. viridula* keine Daten zur Empfindlichkeit insbesondere ihrer Larvenstadien gegenüber Cry3Bb1 vorliegen. Angesichts der wenigen bisher untersuchten Arten, und der dabei offenbaren Unterschiede in der Suszeptibilität gegenüber Cry3Bb1, ist es unmöglich, eine fundierte Prognose über die zu erwartenden Auswirkungen auf die nicht untersuchten Spezies abzugeben. Hier sind zuvor weitere Untersuchungen erforderlich. Die Resultate der Biotests der bisher untersuchten Arten lassen vermuten, dass mögliche Effekte auf Blattkäferlarven eher im Bereich subletaler Wirkungen zu suchen sein dürften. Es erscheint nach bisherigem Kenntnisstand unwahrscheinlich, dass Blattkäferlarven bei der Nahrungsaufnahme über den Pollen eine ausreichende Toxinmenge aufnehmen können, die eine akute Mortalität zur Folge hätte. Zwar sind die absoluten Toxingehalte in Cry3Bb1-Mais verglichen mit Cry1Ab in MON810 hoch, die relative Toxizität von Cry3Bb1 für Ziel- und Nicht-Ziel-Chysomeliden ist jedoch wesentlich geringer. Nicht ausreichend untersucht sind chronische Effekte, die durch die länger andauernde Aufnahme niedriger Toxindosen verursacht werden könnten, auch wenn das in diesem Forschungsprojekt durchgeführte Laborexperiment keinerlei chronische Toxizität oder subletale Effekte erkennen ließ.

Die vorgenommene Risikobewertung erhält damit eher den Charakter eines worst case scenario und kann lediglich aus der gesamten Blattkäferfauna diejenigen Arten herausfiltern, für die eine Gefährdung beim Vorliegen einer hinreichenden Suszeptibilität gegenüber *Bt*-Toxinen bestehen könnte und eine grobe Einschätzung der Gefährdungslage vornehmen. Für konkretere Aussagen und eine genauere Analyse fehlt eine Vielzahl von erforderlichen Basisdaten.

Das Merkmal der durch Cry3Bb1-Expression vermittelten Insektenresistenz sollte im Rahmen der Sicherheitsbewertung jedoch nicht isoliert betrachtet werden. Der Anbau transgener Maislinien, die lediglich für ein oder zwei künstlich eingeführte Merkmale kodieren, ist kein realistisches und zeitgemäßes Risikoszenario mehr. Vielmehr ist der Anbau multiresistenten GVO-Maislinien zu erwarten, die neben verschiedenen Insektenresistenzen auch über mehrere Herbizidresistenzen verfügen (MÖSER 2006). Diese multiresistenten Maislinien sind bereits Gegenstand der aktuellen BMBF-Sicherheitsforschung und könnten schwer wiegende Auswirkungen auf Flora und Fauna haben als bisherige *Bt*-Maislinien, insbesondere wenn der zu erwartende Wandel der ackerbaulichen Praxis berücksichtigt wird (engere Maisfruchtfolgen, vermehrter Totalherbizideinsatz, vgl. Meier & Hilbeck (2005)).

#### 4 Literatur

- AL-DEEB, M. A. & WILDE, G. E. (2003): Effect of *Bt* corn expressing the Cry3Bb1 toxin for corn root-worm control on aboveground nontarget arthropods. *Environmental Entomology*, 32, 1164-1170.
- ALI, A.-W. M., WETZEL, T.; HEYER, W. (1980): Untersuchungen zur Dormanz des Blauen Getreidehähnchens (*Oulema lichenis* Voet). *Archiv Phytopathologie und Pflanzenschutz* 16, 199–207.
- BEISMANN, H., KUHLMANN, M. (2006): Raumrepräsentativität technischer Pollensammler für ein Langzeitmonitoring von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP). BfN-Skripten 169, 84 S.. [http://www.bfn.de/0301\\_veroe.html](http://www.bfn.de/0301_veroe.html)
- BÖHME, J. (2001): Phytophage Käfer und ihre Wirtspflanzen in Mitteleuropa. bioform, Heroldsberg, 132 S..
- BÖHME, J. (2005): Die Käfer Mitteleuropas. Band K, Katalog (Faunistische Übersicht). Elsevier, München, 2. Auflage, 515 S..
- CAGAN, L., TOTH, P. & TOTHOVA, M. (2006): Population dynamics of *Chaetocnema tibialis* Illiger and *Phyllotreta vittula* (Redtenbacher) on the weed *Amaranthus retroflexus* L. and cultivated *Amaranthus caudatus* L.. *Plant Protection Science* 42 (2), 73-80.

- CHEVIN, H. (1994): Food selection and life-cycle of the Old World *Timarcha* Latreille, 1829 (Col. Chrysomelidae). In: JOLIVET, P.H., COX, M. L. & PETITPIERRE, E. (1994): Novel aspects of the biology of Chrysomelidae, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, 533-539.
- COX, M. L. (1994): Diapause in Chrysomelidae. In: JOLIVET, P.H., COX, M. L. & PETITPIERRE, E. (1994): Novel aspects of the biology of Chrysomelidae, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, 469-502.
- COYLE, D. R., MCMILLIN, J. D., KRAUSE, S. C. & HART, E. R. (2000): Laboratory and field evaluations of two *Bacillus thuringiensis* formulations, Novodor and Raven, for control of Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 93(3), 713-720.
- DONOVAN, W. P., RUPAR, M. J., SLANEY, A. C., MALVAR, T., GAWRON-BURKE, M. C. & JOHNSON, T. B. (1992): Characterization of two genes encoding *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins toxic to Coleoptera species. *Applied Environmental Microbiology* 58, 3921-3927.
- DUAN, J. J., HEAD, G., MCKEE, M. J., NICKSON, T. E., MARTIN, J. W. & SAYEGH, F. S. (2002). Evaluation of dietary effects of transgenic corn pollen expressing Cry3Bb1 protein on a non-target ladybird beetle, *Coleomegilla maculata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 104, 271-280.
- DUDIN Y. A., TONNU B. P., ALBEE L. D., LIRETTE R. P. (2001): NPTII protein levels in tissue samples collected from corn event MON 863 grown in 1999 field trials. Report No. MSL-17181; an unpublished study conducted by Monsanto Company. Submitted to EPA on May 21, 2001, MRID 454240-01.
- ECKERT, E. (2006): Effekte des Anbaus von *Bt*-Mais auf Nichtzielarthropoden der Krautschichtfauna – Monitoringorganismen und praktikable Erfassungsmethoden. Dissertation an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, 164 S..
- FEARING, P. L., BROWN, D., VLACHOS, D., MEGHJI, M. & PRIVALLE, L. (1997): Quantitative analysis of Cry1A(b) expression in *Bt* maize plants, tissues, and silage and stability of expression over successive generations. *Molecular Breeding* 3, 169-176.
- FEDERICI, B. A. & BAUER, L.S. (1998): Cyt1Aa Protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the Cottonwood Leaf Beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (11), 4368–4371.
- FELKE, M. & LANGENBRUCH, G.-A. (2005): Auswirkungen des Pollens von transgenen *Bt*-Mais auf ausgewählte Schmetterlingslarven. *BfN-Sprichte* 157, 143 S.. [www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/script157.pdf](http://www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/script157.pdf)
- 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.
- FRITZ-KÖHLER, W. (1996): Blatt- und Rüsselkäfer an Ackerunkräutern, Ökologie und Biogeographie in Mitteleuropa und Untersuchungen an ungespritzten Ackerrandstreifen. P. Haupt : (Agrarökologie 19), Bern / Stuttgart / Wien, 138 S..
- FRITZ-KÖHLER, W. (1996): Blatt- und Rüsselkäfer an Ackerunkräutern. Ökologie und Biogeographie in Mitteleuropa und Untersuchungen an ungespritzten Ackerrandstreifen.
- FRITZLAR, F. (2001): Rote Liste der Blattkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae) Thüringens. *Naturschutzreport* 18, 171-178.
- GEISER, R. (1998): Rote Liste der Käfer (Coleoptera). Chrysomelidae (Blattkäfer). In: BINOT, M., BLESS, R., BOYE, P., GRUTTKE, H. & PRETSCHER, P.: Rote Liste gefährdeter Tiere Deutschlands. *Schriftenreihe für Landschaftspflege und Naturschutz* 55, 217-221.
- GÉNISSEL, A., LEPLÉ, J.-C., MILLET, N., AUGUSTIN, S., JOUANIN, L. & PILATE, G. (2003): High tolerance against *Chrysomela tremulae* of transgenic poplar plants expressing a synthetic cry3Aa gene from *Bacillus thuringiensis* ssp *tenebrionis*. *Molecular Breeding* 11, 103–110.
- 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.

- HENNECKE, V. (1987): Blattflächenverzehr durch Larven des Blauen Getreidehähnchens *Oulema lichenis* (Voet.) (Col., Chrysomelidae) auf Gerste und Weizen. Zeitschrift für angewandte Entomologie 103, 477-483.
- HEYER, W. (1977): Biologie und Schadwirkung der Getreidehähnchen *Lema (Oulema) spp.* in der industriemäßigen Getreideproduktion. Nachrichtenblatt des Pflanzenschutzdienstes der DDR 31, 167–169.
- HOFMANN, F. (2007): Kurzgutachten zur Abschätzung der Pollendesposition in Relation zur Entfernung von Maispollenquellen mittels technischem Pollensammler PMF. Ökologiebüro, Auftraggeber: Bundesamt für Naturschutz, Bremen, Mai 2007.
- JAMES, R. R., CROFT, B. A. & STRAUSS, S.H. (1999): Susceptibility of the Cottonwood Leaf Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) to different strains and transgenic toxins of *Bacillus thuringiensis*. Environmental Entomology 28 (1), 108-115.
- JOLIVET, P. & VERMA K. K. (2002): Biology of leaf beetles. Intercept, Andover, 332 S..
- KAPLIN, V. G. & ANTONOV P.V. (2004): The biology, and harmfulness of the flea-beetle *Chaetocnema aridula* Gill (Coleoptera, Chrysomelidae) in the Forest-Steppe of the Middle Volga Area. DOI:10.1134/S0013873806020060
- KIPPENBERG, H., DÖBERL, M., SCHMIDT, J. & SPRICK, P. (2003): Rote Liste der gefährdeten Blatt- und Samenkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae et Bruchidae) Bayerns. Landesamt für Umweltschutz, 391 S..
- KLAUSNITZER, B. (1994): Die Larven der Käfer Mitteleuropas. 2. Band. Myxophaga, Polyphaga Teil I. Goecke & Evers, Krefeld, 325 S..
- KOCH, K. (1992): Die Käfer Mitteleuropas. Ökologie, Band 3. Goecke & Evers, Krefeld, 389 S..
- KOCH, K. (1995): Die Käfer Mitteleuropas. Ökologie, Band 6. Artenassoziationen in Makrohabitaten. Terrestrischer Bereich II. Goecke & Evers, Krefeld, 268 S..
- KOCH, K. (1996): Die Käfer Mitteleuropas. Ökologie, Band 8 Artenassoziationen in Makrohabitaten. Terrestrischer Bereich IV. Goecke & Evers, Gustav Fischer, Krefeld, Jena, Stuttgart, 295 S..
- KÖHLER & KLAUSNITZER (1998): Verzeichnis der Käfer Deutschlands. - Entomologische Nachrichten und Berichte (Dresden) Beiheft 4, 1-185.
- KÖHLER, F. (1998): Zur Bestandssituation an Ackerunkräutern lebender Blatt- und Rüsselkäfer in Deutschland (Coleoptera, Chrysomelidae, Curculionidae s.l.). - Schriftenreihe der Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz Rheinland-Pfalz 6, 243-254.
- KRAUSE, R. (1981): Zur Faunistik, Ökologie und Phänologie der Blattkäfer der Sächsischen Schweiz. Faunistische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde in Dresden 9 (1), 1-55.
- LANG, A., LUDY, C., VOJTECH, E. (2004): Dispersion and deposition of *Bt* maize pollen in field margins, Journal of Plant Disease and Protection 111 (5), 417-428.
- LANGENBRUCH, G. A. (1993): Erfahrungen bei der Bekämpfung des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata*) mit *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie 8, 193-195.
- LETHMAYER, C., NENTWIG, W. & FRANK, T. (1997): Effects of weed strips on the occurrence of noxious coleopteran species (Nitidulidae, Chrysomelidae, Curculionidae). Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz 104 (1), 75-92.
- LEVINE, E., SPENCER, J. L., ISARD, S. A., ONSTAD, D. W. & GRAY, M. E. (2002): Adaptation of the Western Corn Rootworm to Crop Rotation: Evolution of a New Strain in Response to a Management Practice. American Entomologist 48 (2), 94-107.
- LI, Y., MEISSE, M., ROMEIS, J. (2008): Consumption of Bt Maize Pollen Expressing Cry1Ab or Cry3Bb1 Does Not Harm Adult Green Lacewings, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). PLoS ONE 3(8): e2909. doi:10.1371/journal.pone.0002909.
- LORENZ, N. & SPIEB, H. (2000): Labor- und Freilandversuche zur Schließung von Indikationslücken mit *Bacillus thuringiensis*-Präparaten (insbesondere bei Arznei- und Gewürzpflanzen sowie frischen Kräutern). Abschlußbericht für das Projekt 14/96 HS 054 der Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (Frankfurt). 83 Seiten.

- LUNDGREN, J. & WIEDENMANN, R. (2005): Tritrophic interactions among *Bt* (Cry3Bb1) corn, aphid prey, and the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 34, 1621-1625.
- LUNDGREN, J. G. & WIEDENMANN, R. N. (2002): Coleopteran-specific Cry3Bb toxin from transgenic corn pollen does not affect the fitness of a nontarget species, *Coleomegilla maculata* DeGeer (Coleoptera : Coccinellidae). *Environmental Entomology* 31, 1213-1218.
- 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.
- MANN J. S. & CROWSON, R. A. (1981): The systematic positions of *Orsodacne* Latr. and *Syneta* Lac. (Coleoptera-Chrysomelidae), in relation to characters of larvae, internal anatomy and tarsal vestiture. *Journal of Natural History* 15 (5), 727-749.
- MATTILA, H. R., SEARS, M. K. & DUAN, J. J. (2005): Response of *Danaus plexippus* to pollen of two new Bt corn events via laboratory bioassay. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 116 (1), 31-41.
- MCMANUS, B., FULLER, B., BOETEL, M., FRENCH, B., ELLSBURY, M. & HEAD, G. (2005): Abundance of *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae) in corn rootworm-resistant Cry3Bb1 maize. *Journal of Economic Entomology* 98, 1992-1998.
- MEHRTENS, J., SCHULTE, M. & HURLE, K. (2005): Unkrautflora in Mais. Ergebnisse eines Monitorings in Deutschland. *Gesunde Pflanzen* 57, 206-218.
- MEIER, M. S. & HILBECK, A. (2005): Faunistische Indikatoren für das Monitoring der Umweltwirkungen gentechnisch veränderter Organismen (GVO). Verfahren zur Beurteilung und Auswahl. Ergebnisse der F+ E-Vorhabens 802 85 020 „Biotische Wirkungsakkumulatoren und Erhebungsmethoden für das GVO-Monitoring (Phase I)“ des Bundesamtes für Naturschutz von 2002-2005. *Naturschutz und Biologische Vielfalt* 29, 1-137.
- METCALF, R. L. (1986): Forward, pp. vii-xv. In: J. L. KRYSAN and T. A. MILLER (eds.): *Methods for the study of pest Diabrotica*. Springer, New York.
- MEYER, A. (1989): Untersuchungen zum Wirkungsspektrum und Wirkungsmechanismus von *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis*. Dissertation Universität Heidelberg, 133 S..
- Monsanto Petition 04-CR-108U (2004): Petition for the Determination of nonregulated Status for MON 88017 Corn., submitted to USDA April 30 2004 by SIDHU, R. S. & BROWN, S..
- MÖSER, J. (2006): Insektenresistente transgene Nutzpflanzen in Westeuropa: Status und Perspektiven. *Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft* 8, 69-79.
- NOWATZKI, T. M., ZHOU, X., MEINKE, L. J., VAUGHN, T. & SIEGFRIED, B. D. (2006): Effect of *Bacillus thuringiensis* Cry3Bb1 protein on the feeding behaviour and longevity of adult Western Corn Rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* 99 (3), 927-930.
- RAPS, A., KEHR, J., GUGERLI, P., MOAR, W. J., BIGLER, F. & HILBECK, A. (2001): Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for presence of Cry1Ab. *Molecular Ecology* 10, 525-534.
- REITTER, E. (1912): *Fauna Germanica "Käfer. Band IV.* Stuttgart.
- RENNER, K. (1970): Beziehungen zwischen Nahrungsmenge, Körpergewicht und Entwicklungsalter bei *Gastroidea viridula* Deg. (Col. Chrysomelidae). *Anzeiger für Schädlingskunde* 43 (8), 119-122.
- RIDDICK, E. W. & BARBOSA, P. (1998): Impact of Cry3A-intoxicated *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) and pollen on consumption, development, and fecundity of *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 91, 303-307.
- RIETHMÜLLER, U. (1987): *Bacillus thuringiensis* jetzt auch gegen Käferlarven. *TASPO magazin* 14 (10), 11-12.
- RIETHMÜLLER, U. (1990): Labor- und Freilanduntersuchungen über den Einsatz von *Bacillus thuringiensis* subspecies *tenebrionis* gegen Coleopteren unter besonderer Berücksichtigung der

- Larven des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* SAY). Dissertation, TU Darmstadt, 140 S..
- ROMEIS, J., BARTSCH, D., BIGLER, F., CANDOLFI, M. P., GIELKENS, M. M. C., HARTLEY, S. E., HELLMICH, R. L., HUESING, J. E., JEPSON, P. C., LAYTON, R., QUEMADA, H., RAYBOULD, A., ROSE, R. I., SCHIEMANN, J., SEARS, M. K., SHELTON, A. M., SWEET, J., VAITUZIS, Z. & WOLT, J. D. (2008): Assessment of risk of insect-resistant transgenic crops to nontarget arthropods. *Nature Biotechnology* 26 (2), 203-2008.
- ROULSTON, T. H. & CANE, J. H. (2000): Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222, 187-209.
- SAMUELSON, G. A. (1994): Pollen consumption and digestion by leaf beetles. In: JOLIVET, P.H., COX, M. L. & PETITPIERRE, E. (1994): *Novel aspects of the biology of Chrysomelidae*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht ; Boston, 179-183.
- SCHABER, B. C., BALSBAUGH, E. U., JR. & KANTACK, B. H. (1975): Biology of the flea beetle *Altica carduorum* [Col.: Chrysomelidae] on Canada thistle (*Cirsium arvense*) in South Dakota. *Entomophaga* 20, 325–335.
- SCHÖLLER, M. (1996): Ökologie mitteleuropäischer Blattkäfer, Samenkäfer und Breitrüssler (Coleoptera: Chrysomelidae einschließlich Bruchinae, Anthribidae). *Schriften aus den Aktivitäten des Ersten Vorarlberger Coleopterologischen Vereins* 9, 1-65 S..
- SHIRAI, Y. (2006): Laboratory evaluation of effects of transgenic *Bt* corn pollen on two non-target herbivorous beetles, *Epilachna vigintioctopunctata* (Coccinellidae) and *Galerucella vittaticollis* (Chrysomelidae). *Applied Entomology and Zoology* 41 (4), 607-611.
- SIDHU, R. S. & BROWN, S. (2004): Petition for the Determination of Nonregulated Status for MON 88017 Corn. Monsanto Petition 04-CR-108U, submitted to USDA April 30, 2004.
- STEINHAUSEN, W. R. (1950): Vergleichende Morphologie, Biologie, Ökologie der Entwicklungsstadien der in Niedersachsen heimischen Schildkäfer (Cassidinae, Chrysomelidae, Coleoptera) und deren Bedeutung für die Landwirtschaft. Dissertation TU Braunschweig, 69 S..
- STEINHAUSEN, W. R. (2005): Phänologie mitteleuropäischer Blattflohkäfer (Coleoptera: Chrysomelidae : Alticinae). *Berichte des naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins Innsbruck* 92, 221-232.
- U.S. EPA (2000): *Bt* plant-pesticides. Biopesticides registration action document, chap. 2, "Science Assessment" Page IIA5, Document prepared as background for the Oct. 18-20, 2000 meeting of the Scientific Advisory Panel, Washington, D. C.
- VIG, K. (1998): Data on the biology of *Phyllotreta vittula* (REDTENBACHER, 1849) (Coleoptera: Chrysomelidae: Alticinae). *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent* 63, 357-363.
- VIG, K. (2000): Data on the biology of the turnip flea beetle, *Phyllotreta nemorum* (LINNAEUS, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Universiteit Gent* 65, 201-212.
- VIG, K. (2003): Data on the biology of cabbage stem flea beetle, *Psylliodes chrysocephalus* (LINNAEUS, 1758) (Coleoptera, Chrysomelidae, Alticinae). *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences* 68, 231-237.
- ZSCHEISCHLER, J., ESTLER, M. C., STAUDACHER, W., GROß, F., BURGSTALLER, G., STREYL, H. & RECHMANN, T. (1990): *Handbuch Mais, Umweltgerechter Anbau, wirtschaftliche Verwertung*. 4. Auflage, Frankfurt (Main), München, Münster-Hiltrup, Wien, Wabern-Bern, 320 S..



## 5 Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Die Angaben zu den Ausgaben im vorliegenden Teilprojekt stellen Überschlagszahlen dar (Tab. 31). Die endgültigen Beträge sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbar.

Tab. 31: Verwendung der Zuwendung

	Zuwendung [€]	Ausgaben [€] Stand: 30.09.08	Differenz [€]
Personalmittel gesamt Wissenschaftler technisches Personal	229.785	228.439,58	1.345,42
Hilfskräfte	4.000	4.083,63	83,63
Sachmittel	6.000	5.829,77	170,23
Reisekosten	7.600	1.831,85	5.768,15

Tab. 32: Gegenüberstellung der vorgegebenen und erreichten Ziele

Vorgegebene Ziele	Status
Entwicklung eines geeigneten Biotestverfahrens zur Untersuchung von Nichtzielorganismen	erreicht
Untersuchungen zur akuten Toxizität von Cry3Bb1 für Nichtzielorganismen	
- Chrysomlidae (Blattkäfer)	erreicht
- Lepidoptera (Schmetterlinge)	erreicht
- Coccinellidae (Marienkäfer)	entfallen*
- Chrysopidae (Florfliegen)	Vorversuche durchgeführt *
Literaturrecherche und Risikobewertung für die Blattkäferzönose von Ackerbiotopen	erreicht

\* zur Begründung siehe Abschnitt 7

Die geleistete Arbeit war notwendig und die entstandenen Kosten angemessen.

## 6 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse, insbesondere im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Mit dem im Rahmen dieser Studie verwendeten Biotest wird eine geeignete, einfach und kostengünstig durchzuführende Methode zum Nachweis der akuten Toxizität von Cry-Toxinen und *Bt*-Pollen auf Nicht-Ziel-Blattkäfer vorgestellt, die für ein Monitoring im Rahmen der Sicherheitsforschung oder der anbaubegleitenden Untersuchungen von gentechnisch veränderter Kulturpflanzen mit

Expression von Toxinen im Pollen geeignet ist. Diese Methode wurde bereits leicht modifiziert im Rahmen der Sicherheitsbewertung von *Bt176* und *MON810* bei Lepidopteren erfolgreich eingesetzt (FELKE & LANGENBRUCH 2005) und kam möglicherweise auch noch an andere herbivore Insekten adaptiert werden.

## 7 Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordene Fortschritte auf dem Gebiet des Vorhabens

Neuere Studien an *Nebria brevicollis*, *Poecilus chalcites* (beide Carabidae), *Harmonia axyridis* und *Epilachna vigintioctopunctata* (beide Coccinellidae) konnten keine sensitive Reaktion auf das Bt-Toxin Cry3Bb1 außerhalb der Familie der Blattkäfer zeigen (DUAN et al. 2006, SHIRAI 2006, FERRY et al. 2007). Coccinelliden gelten im Agrarökosystem vorrangig als Blattlausprädatoren, auch wenn einige Arten wie *Coleomegilla maculata* zusätzlich Pollen als Nahrungsquelle nutzen (LUNDGREN et al. & WIEDEMANN 2005). In *Bt*-Maisfeldern stellen jedoch Getreideblattläuse, die dort sehr hohe Dichten erreichen können (über 20.000 Individuen/Pflanze, pers. Mitteil. J. Leopold), die Hauptnahrungsressource dar. Auch die Larven der Florfliegen gelten in der Kultur Mais als aphidophag. Da Blattläuse jedoch keine nennenswerten *Bt*-Toxinmengen aufnehmen (HEAD et al. 2001, RAPS et al. 2001, DUTTON et al. 2002), ist eine indirekte Intoxikation über die Nahrungskette bei diesen Prädatoren ausgeschlossen. Dies wurde auch durch eigene Vorversuche mit den Larven von *Chrysoperla carnea* (Chrysopidae) bestätigt, die mit Thripsen gefüttert wurden, die zuvor auf transgenem und isogenem Mais gehalten wurden. Unterschiede in der Sterblichkeit waren nicht zu erkennen. Neuere Untersuchungen von LI et al. (2008) zeigen, dass auch die Pollen fressenden Imagines der Florfliege *Carnea chrysoperla* in Laborbiotests nicht durch die Aufnahme von Cry3Bb1-haltigem Maispollen oder durch die Beimischung des Toxins in ihre Futterlösung geschädigt werden. Angesichts dieser Erkenntnisse wurde auf eine weitere Untersuchung von Coccinelliden und Chrysopiden im Rahmen des Projektes verzichtet.

### 7.1 Literatur

- DUAN J. J., PARADISE M. S., LUNDGREN J. G., BOOKOUT J. T., JIANG C. J. & WIEDENMANN R. N. (2006): Assessing nontarget impacts of *Bt* corn resistant to corn rootworms: Tier-1 testing with larvae of *Poecilus chalcites* (Coleoptera : Carabidae). *Environmental Entomology* 35 (1), 135-142.
- DUTTON, A., KLEIN, H., ROMEIS, J. & BIGLER, F. (2002): Uptake of *Bt*-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology* 27, 441-447.
- FERRY, N., MULLIGAN, E. A., MAJERUS, M. E. N. & GATEHOUSE, A. M. R. (2007): Bitrophic and tritrophic effects of *Bt* Cry3A transgenic potato on beneficial, non-target, beetles. *Transgenic Research* 16, 795-812.
- HEAD, G., BROWN, C. R., GROTH, M. E. & DUAN, J. J. (2001): Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99, 37-45.
- LUNDGREN, J. & WIEDENMANN, R. (2005): Tritrophic interactions among *Bt* (Cry3Bb1) corn, aphid prey, and the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* 34, 1621-1625.
- RAPS, A., KEHR, J., GUGERLI, P., MOAR, W. J., BIGLER, F. & HILBECK, A. (2001): Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for presence of Cry1Ab. *Molecular Ecology* 10, 525-534.
- SHIRAI, Y. (2006): Laboratory evaluation of effects of transgenic *Bt* corn pollen on two non-target herbivorous beetles, *Epilachna vigintioctopunctata* (Coccinellidae) and *Galerucella vittaticollis* (Chrysomelidae). *Applied Entomology and Zoology* 41 (4), 607-611.

## 8 Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen

Das Projekt wurde im Rahmen der Posterdemonstration auf der 55. und 56. Pflanzenschutztagung in 2006 und 2008 vorgestellt.

FELKE, M. (2006): Untersuchungen zu Nebenwirkungen der *Diabrotica*-resistenten, transgenen Maislinie MON88017 auf Nicht-Ziel-Chrysomeliden. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 400, 362.

LEOPOLD, J. & FELKE, M. (2008): Auswirkungen von *Diabrotica*-resistentem Bt-Mais auf Nicht-Ziel-Chrysomeliden. Mitteilungen aus dem Kühn-Institut 417, 452.

## 9 Zusammenfassung

Der Westliche Maiswurzelbohrer (*Diabrotica virgifera virgifera*) gilt in den USA – seinem Ursprungsland – als einer der wichtigsten Maisschädlinge. Die Entwicklung gentechnisch veränderter Maispflanzen, die das gegen den Maiswurzelbohrer wirksame Bt-Toxin Cry3Bb1 produzieren, eröffnet neue Möglichkeiten zur Regulation des zu den Chrysomeliden (Blattkäfern) zählenden Schädlings. Wie jedoch frühere Befunde der Sicherheitsforschung im Rahmen des Bt-Maisanbaus aufgezeigt haben, können neben den eigentlichen Zielorganismen auch nah verwandte Nicht-Ziel-Arten durch das Bt-Toxin geschädigt werden. Das Toxin gelangt durch Windverdriftung des toxinhaltigen Pollens in angrenzende Lebensräume, wo es die Nahrungspflanzen blattfressender Chrysomeliden kontaminiert.

Im Rahmen eines vom BMBF geförderten Projektes wurde daher untersucht, ob der Anbau Cry3Bb1 produzierender Bt-Maislinien des Events 88017 die 139 in Ackerbiotopen auftretenden Chrysomelidenarten beeinträchtigt. In Laborbiotests wurden die Larven dreier Blattkäferarten (*Gastrophysa viridula*, *Phaedon cochleariae*, *Leptinotarsa decemlineata*) mit verschiedenen Konzentrationen einer Pollensuspension und einer Bt-Toxin-Lösung gefüttert. Es wurden die Mortalität, Gewichtszunahme und Verpuppungsrate der Larven bestimmt. Die verwendete Pollensuspension hatte keine signifikanten Effekte auf die untersuchten Parameter. Die Verfütterung hochkonzentrierter Bt-Toxinlösungen hingegen beeinflusste Mortalität, Wachstum und Entwicklung der Larven signifikant. Junge Larvenstadien waren empfindlicher als ältere. Die untersuchten Arten unterschieden sich sehr deutlich in ihrer Suszeptibilität gegenüber Cry3Bb1. Die ermittelten LD<sub>50</sub>-Werte sind jedoch so hoch, dass bei den untersuchten Arten in natura nur eine geringe akute Mortalität als Folge des Pollenfraßes zu erwarten ist.

Darüber hinaus wurden in einem Laborversuch mit *G. viridula* mögliche chronische Effekte einer anhaltenden Cry3Bb1-Toxin-Belastung auf die Entwicklung des Blattkäfers untersucht. Dazu wurden die Larven bis zur Verpuppung mit Blattmaterial gefüttert, das zuvor mit einer gering konzentrierten Toxinlösung behandelt wurde. Nachfolgend wurde die geschlüpften Adulten verpaart und ihre Fruchtbarkeit und Lebensdauer erfasst. Es konnte keine Wirkung auf die Entwicklung der Larven, die Fertilität der Weibchen oder die Lebensdauer der Imagines beobachtet werden.

Im Rahmen einer sich hauptsächlich auf Literatur stützenden Risikoanalyse wurden abschließend die Merkmale potential gefährdeter Chrysomelidenarten definiert und eine Gruppe von 37 Arten benannt, für die sich, bei hinreichender Empfindlichkeit gegenüber Cry3Bb1, eine Verringerung ihrer Überlebenschancen in der Agrarlandschaft ergeben könnte. In einem zweiten Schritt der als worst case-Szenario zu verstehenden Analyse wurde 3 Gefährdungsstufen definiert und eine Liste von 12 als besonders gefährdet zu erachtenden Arten erstellt.

In weiteren Biotests wurde die Wirkung von Cry3Bb1 auf die Lepidopteren *Plutella xylostella* und *Ostrinia nubilalis* untersucht. Es zeigte sich keine toxische Reaktion nach Gabe einer hochkonzentrierten Toxinlösung bzw. von MON88017-Pflanzenmaterial.