

HANDBUCH ZU MONITORING UND RESISTENZMANAGEMENT FÜR BT-MAIS

Werner Müller

MONOGRAPHIEN
Band 144
M-144

Wien, 2001

Projektleitung

Helmut Gaugitsch (Umweltbundesamt)

Autor

Werner Müller (Ecological Risk Research)

Satz/Layout

Manuela Kaitna

Titelphoto/-bild

Maiszünsler (*Foto: Harald Berger, BFL*)

Impressum

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt GmbH (Federal Environment Agency Ltd)
Spittelauer Lände 5, A-1090 Wien (Vienna), Austria

Druck: Riegelnik, A-1080 Wien

© Umweltbundesamt GmbH, Wien, 2001
Alle Rechte vorbehalten (all rights reserved)
ISBN 3-85457-598-X

INHALT

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	7
SUMMARY	8
Abkürzungsverzeichnis und Umrechnungstabelle	8
1 EINLEITUNG	9
1.1 „Expert Group on Monitoring for Insect Resistance to Bt toxins“	9
2 BT-GRUNDLAGEN	10
2.1 Ökologie und Taxonomie von <i>Bacillus thuringiensis</i> (Bt)	10
2.1.1 Ökologie von <i>Bacillus thuringiensis</i>	10
2.1.2 Taxonomie von <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
2.1.3 Verwandtschaft mit anderen Bakterienarten.....	11
2.2 <i>Bacillus thuringiensis</i> als Pflanzenschutzmittel	12
2.2.1 Geschichte der Nutzung von <i>Bacillus thuringiensis</i> als Pflanzenschutzmittel – Ein kurzer Überblick.....	12
2.2.2 Wirkungsweise des bakteriellen Bt-Toxins	12
2.2.3 Mögliche Unterschiede in der Wirkungsweise von Bt-Präparaten und Bt-Pflanzen....	13
3 INSEKTENRESISTENZ GEGEN BT	14
3.1 Begriffsdefinition	14
3.2 Theorie der genetischen Resistenzentwicklung	14
3.2.1 Genetische Faktoren	15
3.2.2 Umwelt- bzw. biologische Faktoren.....	15
3.2.3 Toxin Level in der Bt-Pflanze	16
3.2.4 Abschließende Bemerkung.....	16
3.2.5 Überblick über resistente Labor- und Freilandpopulationen unterschiedlicher Insekten gegen diverse Bt-Toxine.....	17
3.3 Mechanismen der Insektenresistenz gegen Bt	18
4 DARSTELLUNG VON MONITORING-PLÄNEN UND RESISTENZMANAGEMENTPLÄNEN	19
4.1 Monitoring	19
4.1.1 „Dose-Response“ Test	19
4.1.2 „Diagnostic or discriminating concentration“	19
4.1.3 Kreuzung mit einem Teststamm	20
4.1.4 „F ₂ -screen“	20
4.2 Resistenzmanagement-Pläne am Beispiel von Bt-Mais	20

4.3	„Refuge/high-dose“ Strategie	21
4.3.1	Ziel und Voraussetzungen der refuge/high-dose Strategie.....	21
4.3.2	Limitierende Faktoren der refuge/high-dose Strategie	22
4.3.2.1	Dominante Vererbung der Resistenz	22
4.3.2.2	Nicht zufällige Paarung.....	22
4.3.2.3	Hohe Frequenz des Resistenzallels	22
4.3.2.4	Größe der Refuge-Fläche	22
4.3.3	Mobilität des Maiszünslers und Refuge Design	23
4.3.3.1	Mobilität des Maiszünslers	24
4.3.3.2	Sortenmischungen	24
4.3.3.3	Streifenanbau	25
4.3.3.4	Separierte Refuge-Fläche	25
4.3.3.5	Separierte Refuge-Fläche und Fallenpflanzen.....	25
4.3.4	Natürliche Refugien	26
4.3.5	HALO-Effekt.....	26
5	BT-MAIS	27
5.1	Der Maiszünsler	27
5.1.1	Biologie des Maiszünslers	27
5.1.2	Schadensbild und die Bekämpfung des Maiszünslers.....	28
5.2	Resistenz des Maiszünslers gegen Bt und Frequenz der Resistenzallele im Feld	29
5.2.1	Bt-Resistenz des Maiszünslers (<i>Ostrinia Nubilalis</i>) Laborversuche.....	29
5.2.1.1	Problem der Selektion von Laborstämmen.....	29
5.2.1.2	Ergebnisse von Laborselektionen von Maiszünslarven	30
5.2.2	Frequenz der Resistenzallele.....	31
5.2.3	Verhaltensresistenz gegen Bt-Mais.....	34
5.3	Die Eignung der zugelassenen Bt-Mais-Linien für die refuge/high-dose-Strategie	35
5.4	Aufzeigen der Grenzen und Möglichkeiten von Resistenzmanagement	36
5.4.1	Umsetzung der Theorie in die Praxis.....	36
5.4.2	Eingeschränkte Überprüfungsmöglichkeit der Gültigkeit des Modells in der Praxis	36
6	NICHT-ZIELEFFEKTE VON BT-PFLANZEN (Ökotoxikologie)	38
6.1	Ausgewählte Nicht-Zieleffekte von Bt	38
6.1.1	Anreicherung des Bt-Toxins im Boden	38
6.2	Ausgewählte Nicht-Zieleffekte von Bt-Pflanzen	38
6.3	Nicht-Zieleffekte von Bt-Mais	38
6.3.1	Florfliegenlarve (<i>Chrysoperla carnea</i>).....	38
6.3.2	Monarchfalter (<i>Danaus plexippus</i>).....	39

7	EMPFEHLUNGEN FÜR DIE IMPLEMENTIERUNG EINES RESISTENZMANAGEMENTPLANS	41
7.1	Einleitung	41
7.2	Politischer Resistenzmanagementplan	41
7.2.1	Übersicht.....	41
7.2.2	Zielvorgaben und Leitlinien für die Entwicklung des Resistenzmanagementplans.....	41
7.2.3	Strategie der Implementierung des Resistenzmanagementplans.....	42
7.3	Wissenschaftlicher Resistenzmanagementplan	43
7.4	Monitoring der Frequenz von Resistenzallelen	44
7.5	Monitoring von Nicht-Zieleffekten	45
8	LITERATUR	46
ANHANG 1	Draft Protocol for the Monitoring of European Corn Borer Resistance to Bt-Maize	51
ANHANG 2	Opinion of the Scientific Committee on Plants on Bt-Resistance Monitoring (SCP/GMO/094-Final)	59

ZUSAMMENFASSUNG

Eine große Rolle in der Risikoabschätzung transgener Bt-Pflanzen spielt die Frage der Nachhaltigkeit und Stabilität der Resistenz gegen Schädlinge. Erwerben die Schädlinge innerhalb weniger Jahre Resistenzen gegen den Bt-Mais, so geht der Nutzen der transgenen Sorte verloren, was für die Risiko-Nutzenabwägung im Sinne der Risikobewertung von großer Relevanz ist. Die EU-Kommission hat deshalb im November 1997 eine EU-Arbeitsgruppe „Expert Group on Monitoring for Insect Resistance to Bt-toxins“ einberufen, deren erste Aufgabe die Erstellung eines Protokolls für das Monitoring von Maiszünslerresistenzen gegen Bt-Mais war. Diese Arbeiten zum Protokoll wurden im März 1998 vorerst abgeschlossen (Draft Protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize, siehe Anhang 1) und anschließend vom Scientific Committee on Plants begutachtet. Ein Begutachtungsbericht wurde am 10. März 1999 vorgelegt (Opinion of the Scientific Committee on Plants on Bt-Resistance Monitoring SCP/GMO/094-Final, siehe Anhang 2). Dieses Monitoring-Protokoll soll voraussichtlich im Sommer 2001 durch weiterführende Arbeiten ergänzt werden. Ziel ist die Entwicklung von Resistenzmanagement-Plänen für Bt-Mais unter besonderer Berücksichtigung von Nicht-Zieleffekten.

Im Rahmen des vorliegenden Handbuchs wurden die wissenschaftlichen Grundlagen zur Resistenz gegen *Bacillus thuringiensis* sowie Empfehlungen für die Implementierung eines Resistenzmanagementplans erarbeitet. Um die Resistenzentwicklung des Maiszünslers zu verzögern, wird von Wissenschaftlern und Behörden fast uneingeschränkt die „refuge/high-dose“ Strategie vorgeschlagen. Sie ist jedoch nur bei einer rezessiven Vererbung der Resistenzgene wirkungsvoll. Versuche mit Dipel (einem Bt-Präparat HUANG et al., 1999b) deuten darauf hin, dass zumindest partiell dominante Gene des Maiszünslers an der Resistenzentwicklung gegen Bt beteiligt sein könnten. Mehrheitlich werden 20 % Nicht-Bt-Mais neben 80 % Bt-Mais als Refuge-Fläche vorgeschlagen. Manche Autoren erachten diese Größe als zu gering, da sie wenig Toleranz für Fehler beinhaltet. Die bisherigen Modellberechnungen beruhen auf Annahmen, die mit großen Unsicherheiten behaftet sind. So ist etwa über das Mobilitätsverhalten des Maiszünslers vor und nach der Paarung nur wenig bekannt. Eine weitere große Unsicherheit birgt die Implementierung von Resistenzmanagementplänen d. h. die Umsetzung der Theorie in die Praxis. Es ist ungeklärt, in welchem Ausmaß Landwirte die Implementierung von Refuge-Flächen durchführen werden, und ob diese eigene Abänderungen vornehmen werden. Um Fehler in den Modellen bzw. bei der Implementierung von Resistenzmanagementplänen möglichst früh zu erkennen, muss ein sorgfältiges Monitoring durchgeführt werden, damit auf Veränderungen in der Resistenzentwicklung möglichst frühzeitig reagiert werden kann. Die derzeit sensibelste Monitoring-Methode ist der F₂-Screen. Die bisher propagierten Methoden, die auch im „Draft Protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize“ (siehe Anhang 1) vorgeschlagen sind, können Änderungen in der Resistenzentwicklung des Maiszünslers erst zu einem relativ späten Zeitpunkt erkennen, an dem das Resistenzniveau schon sehr hoch ist. Die bisher durchgeführten Studien zur Abschätzung des Resistenzniveaus sind kaum miteinander vergleichbar, da sie durch geringfügige Änderungen im Versuchsdesign erhebliche Unterschiede in den Ergebnissen produzieren. Zudem ist innerhalb eines Versuchsdesigns die Schwankungsbreite zwischen verschiedenen Populationen niedriger als zwischen den Generationen innerhalb einer Population.

Nicht-Zieleffekte von Bt-Mais auf Nützlinge sind im Labor und im Freiland nachgewiesen worden, wobei die Ergebnisse um den Monarchfalter besonders im Mittelpunkt der Diskussion standen. Doch auch Nebenwirkungen auf die Fliege wurde im Labor nachgewiesen. Alle Studien, die Effekte von Bt-Mais auf Nützlinge nachgewiesen haben, waren einer starken methodischen Kritik ausgesetzt. Eine einzige Studie beleuchtet bisher die methodischen Schwachstellen jener Vergleichsstudien, die keine Effekte auf Nützlinge durch transgene Bt-Pflanzen fanden.

Mittlerweile unumstritten ist, dass Bt-Mais über die Wurzel Bt-Toxine in den Boden abgibt. Die Toxine sind mehrere Monate stabil, über deren Auswirkungen ist jedoch wenig bekannt.

SUMMARY

The cultivation of transgenic Bt-plants must be carefully assessed in terms of effects on non target organism and effects on the sustainable use of environmentally sound bio-pesticides by organic farmers.

In November 1997 the EC-Commission initiated the „Expert Group on Monitoring for Insect Resistance to Bt-toxins“. A „Draft Protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize“ was submitted to the EC-Commission by this group in March 1998. The Scientific Committee on Plants reviewed this protocol and made several comments. The EU-Commission intended that the „Expert Group on Monitoring for Insect Resistance to Bt-toxins“ should continue this work to prepare a resistance management plan and a protocol for monitoring non-target effects. That work is now scheduled for summer 2001.

This report summarises the scientific knowledge and scientific suggestions for implementing a resistance management plan for Bt-maize. Most of the scientists agree that the refuge/high-dose strategy will be the most powerful tool to delay resistance. At the moment 20 % refuge area are recommended by most of the scientists and the US EPA. Some scientists argue for a more conservative approach proposing a 25 to 50 % unsprayed refuge area, because that would offer a safety margin with respect to any problems in the scientific assumptions of the refuge/high-dose strategy or uncertainties in its implementation. A robust resistance management strategy will include pro-active monitoring that will allow management to adapt to the evolution of resistance as it occurs but before there are control failures. Such a monitoring system should rely on the F₂-screen which is the most sensitive method for monitoring changes in the frequency of resistance alleles.

There are some identified non-target effects of Bt-maize e. g. to the Monarch butterfly or lacewing. All studies which identified harmful effects of transgenic Bt-plants to benign insects are questioned by industry and heavily disputed within the scientific community. Only one study investigated methodological problems of those studies which did not identify harmful effects of transgenic Bt-plants on non-target organism. It has been published that Bt-maize roots release Bt-toxins into the soil which are stable for some months.

Abkürzungsverzeichnis und Umrechnungstabelle

Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ECB	European corn borer
LD ₅₀	Lethal Dose 50
RR.....	homozygot resistant
RS.....	heterozygot resistant
SS	homozygot sensibel
US EPA.....	Environmental Protection Agency, United States
USDA.....	United States Department of Agriculture

1 yard = 3 feet = 0,9144m..... 1 m = 1,094 yards

1 acre = 0,40468 ha..... 1 ha = 2,471 acre.

1 EINLEITUNG

1.1 „Expert Group on Monitoring for Insect Resistance to Bt toxins“

Eine große Rolle in der Risikoabschätzung transgener Bt-Pflanzen spielt die Frage der Nachhaltigkeit und Stabilität der Resistenz gegen Schädlinge. Erwerben die Schädlinge innerhalb weniger Jahre Resistenzen gegen den Bt-Mais bzw. die Bt-Kartoffel, so geht der Nutzen der transgenen Sorte verloren, was für die Risiko-Nutzenabwägung im Sinne der Risikobewertung von großer Relevanz ist. Die EU-Kommission hat deshalb im November 1997 eine EU-Arbeitsgruppe „Expert Group on Monitoring for Insect Resistance to Bt-toxins“ einberufen, deren erste Aufgabe die Erstellung eines Protokolls für das Monitoring von Maiszünslerresistenzen gegen Bt-Mais war. Diese Arbeiten zum Protokoll wurden im März 1998 vorerst abgeschlossen (Draft Protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize, siehe Anhang 1) und anschließend vom Scientific Committee on Plants begutachtet. Ein Begutachtungsbericht wurde am 10. März 1999 vorgelegt (Opinion of the Scientific Committee on Plants on Bt – Resistance Monitoring, SCP/GMO/094-Final, siehe Anhang 2). Dieses Monitoring-Protokoll soll voraussichtlich im Sommer 2001 durch weiterführende Arbeiten ergänzt werden. Ziel ist die Entwicklung von Resistenzmanagement-Plänen für Bt-Mais unter besonderer Berücksichtigung von Nicht-Zieleffekten.

Das vorliegende Handbuch gibt einen zusammenfassenden Überblick über die wissenschaftlichen Erkenntnisse zum Thema Resistenzmanagement von Bt-Mais sowie von Nicht-Zieleffekten. Abschließend werden einzelne Aspekte angeführt, die bei der Erstellung eines Resistenzmanagement-Plans zu berücksichtigen sind.

2 BT-GRUNDLAGEN

2.1 Ökologie und Taxonomie von *Bacillus thuringiensis* (Bt)

2.1.1 Ökologie von *Bacillus thuringiensis*

Bacillus thuringiensis wurde in den letzten Jahren sehr intensiv hinsichtlich seiner Wirkungen auf Zielinsekten einerseits und toxischer Wirkungen auf den Menschen andererseits untersucht. Die Ökologie dieser Bakterienart ist jedoch weitgehend unerforscht geblieben (MEADOWS, 1993: 194f). *Bacillus thuringiensis* ist ein weit verbreitetes, aerobes, gram-positives Bakterium, welches bei der Sporulation kristalline Proteine mit insektoxischer Wirkung bildet. Diese Kristalle können bis zu 25 % des Trockengewichtes der sporulierten Zelle ausmachen. Die meisten Bt-Stämme können mehr als nur ein Kristallprotein synthetisieren, welches auch durch verschiedene, aber doch verwandte delta-Endotoxine geformt werden kann. Es wurden mehrere tausend verschiedene Bt-Stämme aus verschiedensten geographischen Gebieten und von verschiedensten Ursprüngen isoliert. *Bacillus thuringiensis* wurde in verschiedenen Medien (BERNHARD et al., 1997: 2.363 Proben; THEUNIS et al., 1998: 801 Proben), wie Kornstaub, Boden (z. B. OHBA et al., 2000, BRAVO et al., 1998), Insekten, Blattoberflächen (z. B. MIZUKI et al., 1999) und aquatischen Biotopen nachgewiesen (LERECLUS et al., 1993). *Bacillus thuringiensis* ist auf allen 5 Kontinenten verbreitet (BERNHARD et al., 1997), und wurde vor kurzem auch in drei von 60 Bodenproben der Antarktis nachgewiesen (FORSYTH & LOGAN, 2000). Dass es sich bei den Funden in der Antarktis lediglich um eine Kontamination durch den Menschen oder Vögel und keine eigenständigen vermehrungsfähigen Populationen handelt, ist sehr unwahrscheinlich, da erstens *Bacillus thuringiensis* bei 2 der drei Fundstellen mehrmals nachgewiesen wurde und zweitens alle Probebeziehungen von ungestörten Flächen gezogen wurden (FORSYTH & LOGAN, 2000).

BERNHARD et al. (1997) isolierten 5.303 *Bacillus thuringiensis*-Stämme aus 2.363 Proben, d. h. dass einige Proben (Medien) mehrere Bt-Stämme enthielten. Die Mehrzahl (ca. 50 %) der von BERNHARD et al. (1997) isolierten *Bacillus thuringiensis* Stämme sind nicht bzw. sehr schwach toxisch für Insektenarten. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien, die ähnlich umfassende Analysen durchführten. Eine Korrelation zwischen dem Habitat und dem Toxizitätsspektrum der Stämme konnte bis auf 2 Ausnahmen (BERNHARD et al., 1997) nicht erkannt werden. So waren 15,5 % der aus Bodenproben isolierten Stämme gegen unterschiedliche Insektenarten toxisch, wobei jedoch keine der geprüften Insektenarten als Bodenlebewesen eingestuft werden konnte. In Proben aus gelagerten Produkten (wie Kornstaub, Mehl, Rückstände von Futtermittelwerken) wurde nur 29,6 % sowie in Proben aus Insektenkadavern nur 23,3 % toxische Stämme isoliert. Die Autoren schließen daraus, dass die Insektentoxizität keinen positiven Selektionsfaktor darstellt (BERNHARD et al., 1997). Weiters gibt es keine Korrelation zwischen Pflanzenarten und den – die Phyllosphäre besiedelnden – Bt-Stämmen (MIZUKI et al., 1999). Ebenso lag keine Korrelation zwischen der Form des Kristalls und seiner Toxizität vor. Trotz der ubiquitären Verbreitung ist das Toxizitätsspektrum der toxischen Stämme sehr schmal. Nur 2,3 % der toxisch aktiven Stämme wiesen eine Toxizität sowohl gegenüber Coleoptera, Diptera und Lepidoptera auf (BERNHARD et al., 1997).

Die Ursache für die weite Verbreitung von Bt in der Umwelt, die im ungeklärten Widerspruch zu der starken Spezifität der Toxinkristalle steht, ist unbekannt (BERNHARD et al., 1997). Gelegentlich wurde bei Bt eine enzootische Lebensweise entdeckt (d. h. Bt ist in einer Insektenpopulation stets präsent, aber unterhalb des Levels eines epidemischen Krankheitsausbruchs, MEADOWS, 1993: 195f). Letztlich ist jedoch ungeklärt welches Habitat dem Bt eigentlich zugerechnet werden soll, da sporenbildende Kolonien sowohl in Insekten, als auch auf Blattoberflächen sowie auch im Boden gefunden wurden (MEADOWS, 1993: 194ff). Manche Autoren (SMITH and COUCHE, 1991, zit in MEADOWS, 1993: 195ff) stufen Bt aufgrund des häufigen Auftretens auf verschiedenen Blattoberflächen als einen Epiphyten ein. Sie vermuten,

dass Bt sich von Exudaten der Blattoberfläche ernährt und somit einen gewissen Schutz der Pflanze vor Insektenfraß darstellt. Im Gegenzug wird Bt durch die Pflanzenoberfläche vor UV-Licht geschützt.

2.1.2 Taxonomie von *Bacillus thuringiensis*

Taxonomie: *Bacillus thuringiensis* gehört zur Gruppe der gram-positiven Eu-Bakterien.

Familie..... *Bacillaceae*

Art..... *Bacillus thuringiensis*

Genetische Einteilung: Die Art *Bacillus* kann aufgrund ihrer Wirkung und ihrer molekularen Homologien in Klassen von delta-Endotoxin-Genen eingeteilt werden.

LERECLUS et al. (1993) unterscheiden 5 Klassen:

1. cryI-Gene: codieren für lepidopteren-spezifische Toxine
2. cryII-Gene: codieren für lepidopteren- und dipteren-spezifische Toxine
3. cryIII-Gene: codieren für coleopteren-spezifische Toxine
4. cryIV-Gene: codieren für dipteren-spezifische Toxine
5. cryV-Gene: codieren für coleopteren-spezifische und lepidopteren-spezifische Toxine wie 81 kDa delta-Endotoxin (TAILOR et al.1992, zit. in LERECLUS et al., 1993).

Es wurden jedoch noch weitere Toxingene entdeckt, sodass diese Klasseneinteilung nur vorläufig ist. So beschreiben BRAVO et al. (1998) bereits Toxine der Klassen Cry 11 bis Cry 14 und Cry 21, wobei Cry5, Cry12, Cry13, und Cry14 toxisch gegen Nematoden wirken.

Neben diesen am häufigsten produzierten Endotoxinen gibt es noch das sogenannte thuringiensin (beta-exotoxin) Nucleotid. Hier wird das Toxin außerhalb der Spore gebildet. Die insektizide Wirkung dieses hitzestabilen Exotoxins beruht auf der Behinderung der RNA-Polymerase durch Konkurrenz mit ATP (LECADET 1981 und SEBASTA 1970) zit. in LERECLUS et al., 1993). Es ist nicht insektenspezifisch und in den meisten Ländern verboten. (LECADET 1981 und SEBASTA 1970 zit. in LERECLUS et al., 1993).

2.1.3 Verwandtschaft mit anderen Bakterienarten

Bacillus thuringiensis unterscheidet sich von *Bacillus cereus* lediglich durch die Bildung von parasporalen Kristallen, von denen ca. die Hälfte (BERNHARD et al., 1997) keine toxische Wirkung gegen Insekten besitzt. Die Gene, die für das Toxinkristall codieren, sitzen auf Plasmiden, die zwischen *B. cereus* und *B. thuringiensis* (horizontal) ausgetauscht werden können (HELGASON et al., 2000). Wenn die Gene, die für die parasporalen Kristalle codieren, verloren gehen, kann *Bacillus thuringiensis* von *B. cereus* nicht mehr unterschieden werden. *B. cereus* ist ein ubiquitär vorkommendes Bakterium, dass bei immungeschwächten Personen Lebensmittelvergiftungen sowie ernste Augenentzündungen bis zur Blindheit hervorrufen kann. Es wird befürchtet, dass das Bt-Toxin bei immunschwachen Personen ebenfalls Krankheits-symptome hervorrufen könnte (DIXON, 1994).

Daneben ist auch noch *B. anthracis* (das auch als biologische Waffe eingesetzt wird) nahe mit *B. cereus* und *B. thuringiensis* verwandt. HELGASON et al. (2000) kommen aufgrund genetischer Analysen zu der Ansicht, dass alle drei Bakterienarten zu ein und derselben Art zusammenzufassen sind.

2.2 *Bacillus thuringiensis* als Pflanzenschutzmittel

2.2.1 Geschichte der Nutzung von *Bacillus thuringiensis* als Pflanzenschutzmittel – Ein kurzer Überblick

Bt wurde 1901 zum erstenmal vom japanischen Wissenschaftler ISHAWATA aus einer Seidenraupenlarve (*Bombyx mori*) isoliert und er nannte diesen *Bacillus sotto*. Dieser verursacht bei der Larve Austrocknungserscheinungen. 1915 isolierte der Wissenschaftler BERLINER den Bacillus von einer befallenen Mehlmotte (*Anagasta kuehniella*) und bemerkte, dass die Larven bei Fütterung des Bacillus zugrunde gehen. In den späten 20er Jahren wurden erste vielversprechende Feldversuche mit Bt gegen den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) durchgeführt. Das erste kommerzielle Mittel „Sporeine“ wurde bereits 1938 in Frankreich produziert (MILNER, 1994).

Erst ab 1970, nachdem der Stamm *kurstaki* (benannt nach seinem Entdecker KURSTAK) und sein sehr effektives Isolat HD-1 (DULMAGE 1970 zit. in FRANKENHUYZEN 1993) gefunden wurde, begann ein kommerzieller „Bt-Boom“ (FRANKENHUYZEN, 1993). Mittlerweile basieren 80–90 % aller biologischen Pflanzenschutzmittel weltweit auf *Bacillus thuringiensis* (BERNHARD et al., 1997).

1976 wurde die Subgattung *israelensis* entdeckt, die gegen Mosquitolarven und die Rübenlaus wirksam ist, und in den 80ern die Subgattung *tenebrionis*, die gegen Coleopteren, so auch gegen den Kartoffelkäfer wirksam ist. In den 80ern waren die unterschiedlichen Bt-Präparate bereits weltweit etabliert (FRANKENHUYZEN, 1993).

2.2.2 Wirkungsweise des bakteriellen Bt-Toxins

Die hohe ökologische Verträglichkeit von Bt-Präparaten liegt im speziellen vierstufigen Wirkungsmechanismus, der für die hohe Spezifität der Bt-Stämme verantwortlich ist. Obwohl mehrere Faktoren letztlich für die toxische Wirkung des bakteriellen Bt-Toxins verantwortlich sind, müssen zumindest folgende Bedingungen erfüllt sein:

- Auflösung des Toxinkristalls im alkalischen Milieu des Insektendarmes
- Überführung des Protoxins mit Hilfe spezifischer Proteasen in die aktive Toxinform
- Bindung des aktiven Toxins an spezifische Rezeptoren des Darmes
- Induktion von Poren im Darm des Insektes, was zur Lyse des Darmes und zum Tod des Insektes führt.

Dieser vierstufige Prozess stellt jedoch nur die notwendige Mindestvoraussetzung für die toxische Wirkungsweise des bakteriellen Bt-Toxins dar. Es gibt mehrere Faktoren, die die Überführung in die nächste Stufe beeinflussen, wobei nur einige Faktoren bekannt sind (VISSER et al., 1993).

Die meisten bakteriellen delta-Endotoxine werden als kristalline Protoxine gebildet. Im Darm des Insektes erfolgt zuerst die Auflösung des Kristalls wodurch das inaktive Protoxin entsteht. Die spezifischen Proteasen des Insektendarmes spalten das Protoxin in die aktive Toxinform auf. Die spezifische Proteasenzusammensetzung des Insektendarmes und die jeweilige Struktur des Proteins beeinflussen wesentlich die Effizienz dieses Schrittes (VISSER et al., 1993). Die aktivierten Toxine binden sich an spezifische Rezeptoren im Epithel des Darms empfindlicher Insekten, was zur Produktion von Poren führt und das osmotische Gleichgewicht der Zellen stört. Die Durchlässigkeit für K^+ -Ionen wird gesteigert. Dies führt zum Zusammenbruch des elektrischen Potentials, des K^+ -Gradienten und einer Absenkung des pH-Wertes im Darm, was letztlich nach wenigen Minuten mit der Lyse der Epithelzellen des Darms zum Tod des Insektes führt (MEADOWS 1993: 195f).

Nicht völlig aufgeklärt, ist das Zusammenwirken der Spore und des reinen Kristalltoxins. Die folgenden Untersuchungen geben einen Überblick über den nicht gänzlich konsistenten Stand des Wissens. Eine Untersuchung zeigt, dass *Bt ssp tenebrionis*-Stämme, die nur Sporen und keine Kristalle produzieren, nicht wirken. Mutierte Stämme, die nur Kristalle ausbildeten, riefen hohe Mortalität bei den Larven hervor. Daher wird vorgeschlagen bei konventionellen – nicht transgenen – *Bt ssp tenebrionis*-Präparaten die Sporen durch Gamma-Strahlung zu zerstören. So könnte man die Reproduktion bei gesprühtem *Bt ssp tenebrionis* verhindern und das Mittel auch in Wasserschutzgebieten verwenden (KELLER & LANGENBRUCH, 1993:179f). JOHNSON und McGAUGHEY (1996) dagegen berichten, dass die Sporen in der Sporenhülle cry-Toxine beinhalten, die toxisch wirken. Die Kombination von Sporen und reinen Toxinen reduzierte in Laborversuchen die LD₅₀ 35 bis 50-fach. Der Mechanismus für diesen synergistischen Effekt ist noch ungeklärt.

2.2.3 Mögliche Unterschiede in der Wirkungsweise von Bt-Präparaten und Bt-Pflanzen

Ein erweitertes Wirtsspektrum der Toxine von Bt-Pflanzen wird theoretisch deshalb erwartet, da in konventionellen Bt-Präparaten das Toxin in der kristallinen Form vorliegt, die im Insektdarm zuerst in das Protoxin und danach in das aktive Toxin umgewandelt werden muss. Wie bereits in Abschnitt 2.2.2 erwähnt ist jeder dieser Schritte von bestimmten art-spezifischen Gegebenheiten im Darmmilieu abhängig, wodurch sich die hohe Spezifität von Bt-Präparaten erklärt.

In den transgenen Bt-Pflanzen kommt eine verkürzte Form des Protoxins vor, wodurch einerseits der Schritt der Auflösung des Kristalles entfällt und andererseits das verkürzte Protoxin selbst an Selektivität eingebüßt haben könnte. Diese Komponenten vermindern die erforderlichen Gegebenheiten für die Auslösung der toxischen Wirkung des Bt-Proteins, wodurch sich eine Erweiterung des Wirtsspektrums auf Nicht-Zielorganismen ergeben könnte. So wurde bei *Spodotera exigua* eine 2-fach erhöhte Empfindlichkeit gegen Cry1Ac und Cry1C Toxinen im Vergleich zu den entsprechenden Protoxinen gefunden (MOAR et al., 1990, 1995 zit in HILBECK et al., 2000: 10ff).

3 INSEKTENRESISTENZ GEGEN BT

3.1 Begriffsdefinition

Resistenz ist die Fähigkeit eines Organismus, trotz starker Exposition gegen ein Toxin zu überleben und sich weiter zu vermehren. Die Entwicklung/Evolution der Resistenz von Insekten gegen (chemische oder biologische) Insektizide oder Bt-Pflanzen kann prinzipiell auf zwei Ursachen zurückgeführt werden:

1. genetische Resistenz
2. Verhaltensresistenz.

Genetische Resistenz ist die Fähigkeit eines Organismus, ein Toxin biochemisch zu inaktivieren und diese Fähigkeit weiter zu vererben.

Verhaltensresistenz ist die Fähigkeit eines Organismus, trotz Empfindlichkeit gegen das Toxin, die Exposition des Toxins zu verringern bzw. zu vermeiden und sich weiter zu vermehren.

Von Kreuzresistenz spricht man, wenn ein Insekt gleichzeitig gegen mehrere Insektizide resistent ist. Meist sind genetische Ursachen für die Kreuzresistenz verantwortlich.

Die der genetischen Resistenz zugrundeliegenden Gene können dominant oder rezessiv vererbt werden. Sie können homozygot (auf beiden Allelen die gleiche Geninformation (SS (homozygot sensibel) oder RR (homozygot resistent)) oder heterozygot (auf beiden Allelen liegen unterschiedliche Gene (SR oder RS)) vorliegen.

Der Begriff „Dominanz“ hat unterschiedliche Bedeutung, die folgende Begriffsklärung wurde aus ILSI (1998) übersetzt:

„**Genetische Dominanz**“ beschreibt den Unterschied der Dosis-Mortalitäts-Kurve von heterozygot resistenten im Vergleich zu homozygot resistenten und homozygot sensiblen Elternpopulation. Genetische Dominanz variiert nicht mit der Dosis.

Im Gegensatz hierzu beschreibt der Begriff „**funktionelle Dominanz**“ die relative Mortalität der drei unterschiedlichen Genotypen (SS, RS und RR) bei einer spezifischen Dosis.

„**Effektive Dominanz**“ wird für eine Population verwendet, bei der aufgrund biologischer (nicht genetischer) Parameter z. B. nicht zufällige Paarung, der „Dominanz-Wert“ sich von der funktionellen Dominanz unterscheidet.

3.2 Theorie der genetischen Resistenzentwicklung

Um die Resistenzentwicklung anhand von Resistenzmanagementplänen zu verzögern oder zu verhindern braucht es eine Theorie, wie sich die Resistenz über einen Zeitraum entwickelt und welche maßgeblichen Faktoren die Resistenzentwicklung beschleunigen bzw. verzögern. Im Falle der „genetischen Resistenz“ nimmt man an, dass sich durch Mutation Resistenzgene entwickeln. Diese Resistenzgene vermitteln Insekten auf Bt-Feldern (oder auf mit einem Insektizid behandelten Feldern) einen Selektionsvorteil. Durch diesen Selektionsvorteil vermehren sich diese Insekten in größerer Zahl als empfindliche Insekten der gleichen Population. Dies führt nach und nach zu einer Akkumulierung des anfangs seltenen Resistenzgens in der gesamten Population. Die Geschwindigkeit, mit der sich Resistenzgene ausbreiten, ist von folgenden Faktoren abhängig:

3.2.1 Genetische Faktoren

- *Wird das Gen, das die Resistenz vermittelt, rezessiv oder dominant (mit allen Übergangsformen partiell dominant) vererbt?*
Rezessive Gene verzögern, dominante Gene beschleunigen die Resistenzentwicklung.
- *Basiert die Resistenz auf einem Genlocus oder wird sie durch das Zusammenspiel mehrerer Genloci vermittelt?*
Mehrere rezessive Genloci wirken sich nachteilig auf die Verzögerung der Resistenzentwicklung aus (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 24f).
- *Bietet das Gen einen allgemeinen Fitnessnachteil?*
Ist es fitnessneutral oder bietet es einen Fitnessvorteil unter nicht selektiven Bedingungen (das heißt wenn kein Pestizid angewendet bzw. kein Toxin exprimiert wird)?
Ein Fitnessnachteil wird im allgemeinen als günstig (verzögert die Resistenz) erachtet. Es besteht auch die Möglichkeit, dass ein Fitnessnachteil zu einer Verzögerung in der Entwicklung führt, und dass deshalb die homozygot resistenten Individuen sich stärker untereinander paaren, was zu einer Beschleunigung der Resistenzentwicklung führt.
- *Ist die Ausgangsfrequenz der Resistenzallele in der Population hoch oder niedrig?*
Für eine Verzögerung der Resistenzentwicklung durch Resistenzmanagementmaßnahmen wird gefordert, dass die Ausgangsfrequenz der Resistenzallele unter 1×10^{-3} -besser unter 1×10^{-4} liegen soll.

3.2.2 Umwelt- bzw. biologische Faktoren

- *Anzahl der Generation des Schädlings pro Jahr?*
Mehr Generationen pro Jahr beschleunigen die Resistenzentwicklung.
- *Mobilitätsverhalten des Insektes?*
Die Mobilität des Insektes hat ebenfalls einen großen Einfluss auf die Resistenzentwicklung, z. B. Eiablageverhalten, Mobilität vor und nach der Paarung, Verhaltensresistenz (Insekt weicht auf nicht toxische Pflanzen bzw. Pflanzenteile aus).
- *Natürliche Refugien?*
Viele Schadinsekten können eine Reihe von Wirtspflanzen befallen. Wenn in unmittelbarer Umgebung der Ackerfläche solche Wirtspflanzen vorkommen, so können sie als natürliche Refugien dienen und so die Resistenz verzögern bzw. die Refuge-Fläche¹ der Kulturpflanze verkleinern.
- *Paarungsverhalten des Insektes?*
Werden Partner bevorzugt in der Nähe aufgesucht oder werden für die Partnerwahl größere Distanzen zurückgelegt? Ebenso beeinflussen Muster in der Eiablage das Design der Refuge-Fläche.
- *Biologische Mortalitätsfaktoren?*
Werden natürliche Predatoren, Parasiten, Krankheiten des Insektes durch den Einsatz der Toxine nicht geschwächt, so helfen sie diploid resistente (RR) Insekten zu vermindern.
- *Störungen der Entwicklungszeit des Schadinsektes?*
Subletale Exposition von Insekten durch transgene Bt-Pflanzen kann zu starken Verzögerungen in der Entwicklungszeit des Schadinsektes führen. Eine starke Verzögerung der Entwicklungszeit von Insekten innerhalb eines Bt-Maisfeldes gegenüber Insekten, aus den Bt-freien Refuge-Flächen könnte zu einer starken Verminderung der Paarungsraten zwischen hetero-

¹ Refuge-Fläche: jene Fläche bei einem Feld transgener insektenresistenter Pflanzen, die das insektenspezifische Toxin nicht exprimieren/enthalten, damit auf dieser Fläche homozygot sensible Insekten erhalten bleiben, die die Entwicklung von homozygot resistenten Individuen verlangsamen.

zygot resistenten und empfindlichen Insekten führen, wodurch die Effektivität des Resistenzmanagement mit Refuge-Flächen stark vermindert werden könnte. Eine starke Entwicklungsverzögerung könnte jedoch zu einer geringeren Rate an fortpflanzungsfähigen heterozygot resistenten Individuen führen und die Anzahl der Generationen pro Jahr vermindern, was sich positiv auf die Verzögerung der Resistenzentwicklung auswirken könnte (ILSI, 1998: 21f).

3.2.3 Toxin Level in der Bt-Pflanze

Wieviel Prozent der Organismen, bei denen das Resistenzgen heterozygot vorliegt, werden abgetötet? Es ist schwierig eine exakte Konzentration zu nennen, die benötigt wird um eine „high dose“ zu erreichen. Eine vorgeschlagene Definition lautet, „high dose“ ist das 25-fache jener Konzentration, die benötigt wird, um 99 % des empfindlichsten Stadiums der empfindlichen Insekten abzutöten (GOULD & TABASHNIK, 1998: 74f). Andere Autoren (ILSI, 1998: 21) schätzen die „high dose“ als jene Konzentration, mit der 95 % der heterozygot resistenten (RS) Individuen und 10 bis 25 mal jener Konzentration mit der 99,9 % der empfindlichen (SS) Individuen abgetötet werden. Die genaue Kenntnis des Prozentsatzes der Mortalität von heterozygot resistenten Individuen ist ein wichtiger Faktor in der Abschätzung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von resistenten Insekten. Eine Abnahme in der Ausgangsfrequenz der Resistenzallele um das 10.000-fache bewirkt eine Resistenzverzögerung um das 5-fache. Demgegenüber bewirkt eine Zunahme der Mortalität von heterozygot resistenten Individuen von 80 % auf 99 % eine Resistenzverzögerung um das 10-fache (ROUSH & SHELTON, 1997). Ein wichtiger Faktor ist auch in den unterschiedlichen Expressionsraten in verschiedenen Gewebstypen der Pflanze als auch in einem etwaigen Rückgang der Expression innerhalb einer Saison zu sehen. Letzteres verhilft Insekten mit mehr als einer Generation pro Jahr zu einem höheren Anteil an überlebenden SR-Individuen später in der Saison, was beschleunigend auf die Resistenzentwicklung wirkt.

Gene Stacking

Unter „gene stacking“ wird der Einbau mehrerer unterschiedlicher (Bt) Gene in eine transgene Pflanze verstanden. Dadurch erhofft man sich eine starke Verzögerung der Resistenzentwicklung von Schadinsekten. Obwohl solche Pflanzen bereits entwickelt worden sind, steht deren Produktzulassung noch bevor (ILSI, 1998: 23f).

3.2.4 Abschließende Bemerkung

Die Vorhersage der Resistenzentwicklung erweist sich aufgrund dieser vielen Einflussfaktoren recht schwierig. Außerdem sind viele der Größen der Einflussfaktoren nicht genau bekannt. Die Abschätzung der Resistenzentwicklung erfolgt nach der Formel:

$$R = (h^2)S$$

R..... vorhergesagte Änderung von einer Generation zur nächsten,
 S..... Selektionskoeffizient,
 h² Heritabilität

Detaillierte wichtige Informationen bezüglich der Biologie, der Ökologie und der Genetik des Schadinsektes sind selten verfügbar, sodass die Werte für h² und S häufig auf ungenauen Abschätzungen basieren, weshalb die Aussagen für das Resistenzmanagement lediglich den Charakter von Schätzungen bzw. Empfehlungen aufweisen. Sehr treffend wurde dies von einem Expertenrat – der im Auftrag der Industrie einen Bericht verfasste – formuliert:

„Unfortunately, critical information about pest biology, ecology, and genetics is often not available; therefore, h² and S are often based on uncertain estimates. This is further complicated by limitations of sampling to detect resistant genes in a pest population before field control problems are observed (ROUSH and MILLER, 1986). As a consequence of these data gaps, RM strategies often must be implemented in an environment of uncertainty“ (ILSI, 1998: 23f).

3.2.5 Überblick über resistente Labor- und Freilandpopulationen unterschiedlicher Insekten gegen diverse Bt-Toxine

Der Wettlauf zwischen der Pestizidentwicklung und der Resistenzentwicklung von Insekten ist ein Phänomen, das den chemischen Pflanzenschutz seit mehreren Jahrzehnten begleitet. Bereits mehr als 500 Insekten- und Milbenarten sind gegen Insektizide resistent geworden (GEORGHIU 1991 zit in MCGAUGHEY & WHALON, 1992). Da Bt mehr als zwei Jahrzehnte ohne Berichte über Resistenzerscheinungen bei Insekten angewendet wurde, vermuteten einige Wissenschaftler (z. B. BARJAC 1987, KRIEG und LANGENBRUCH 1981, beide Zitate in TABASHNIK, 1994), dass eine Resistenzentwicklung gegen das Bt-Toxin sehr unwahrscheinlich sei. 1985 wurden in den USA erste Resistenzentwicklungen der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) gegen Bt nachgewiesen. Die Ursache dafür war der massive Einsatz von Bt als biologisches Pflanzenschutzmittel in Hawaii bei Monokulturanbau von Kohl (MCGAUGHEY, 1994b). Es ist dies bisher der einzige dokumentierte Fall einer Resistenzentwicklung eines Insektes im Feld (TABASHNIK et al., 1997). Zwei Übersichtsartikel geben den Stand der Resistenzentwicklung von im Labor selektierten Insektenpopulationen gegen Bt wieder:

TABASHNIK (1994) fasst 50 Experimente über 3–120 Generationen mit 16 Insektenarten zusammen. Hierbei ist bei 9 Insektenarten ein 10-facher Anstieg der LD₅₀ beobachtet worden. FRUTOS et al. (1999) listen detailliert Selektionsexperimente mit 12 Insektenarten auf. Die in Tabelle 1 angeführte Liste von Insekten gibt einen groben Überblick über das Ausmaß der Resistenz bei verschiedenen Laborstämmen. Die Zusammenfassung von FRUTOS (1999) ist sehr Detail genau und listet je Laborstamm sowohl die unterschiedliche Höhe des Resistenzniveaus als auch die Toxinklasse sowie Evidenzen über die Dominanz bzw. Rezessivität des Resistenzgens auf. Die meisten Untersuchungen gibt es bei der Kohlmotte (*Plutella xylostella*), der bisher einzigen Art, bei der Resistenz in Feldpopulationen nachgewiesen wurde.

Tab. 1: Resistente Insektenarten gegen Bt
(nach TABASHNIK, 1994 Spalte 1 und FRUTOS et al., 1999 Spalte 2).

Insekt	resistenter als empfindliche Stämme nach	
	TABASHNIK, 1994	FRUTOS et al., 1999
LEPITOPTERA		
Amerikanische Tabakeule (<i>Heliothis virescens</i>)	–60	3–1.000
<i>Spodoptera exigua</i>	100	11–850
<i>Spodoptera littoralis</i>	3,3–26	10–20
Kohlmotte (<i>Plutella xylostella</i>), diamondback moth	2,5–66	8–5.800 (1–330 Feldpopulationen)
<i>A. kuehniella</i>	3,3	
Dattelmotte (<i>Cadra cautella</i>),	3,3–7,8	2–8
Sonneblumenmotte (<i>Homoeosoma electellum</i>)	1,7	2
Dörrobstmotte (<i>Plodia interpunctella</i>)	8–140	3–250
<i>C. fumiferana</i>	3,8	
<i>Trichoplusia ni</i>	26	4–31
Maiszünsler (<i>Ostrinia nubilalis</i>)		3–70
COLEOPTERA (KÄFER)		
<i>Cryomela scripta</i>	> 50	3.000
Kartoffelkäfer (<i>Leptinotarsa decemlineata</i>)	8–60	16–290

Insekt	resistenter als empfindliche Stämme nach	
	TABASHNIK, 1994	FRUTOS et al., 1999
DIPTERA		
Mücken (Culicidae)		
Aedes aegypti	1,1–1,9	
Culex quinquefasciatus	4–70	3–43
Drosophilidae		
Drosophila melanogaster	2,9–7,2	
Muscidae		
M. domestica	1–13	

Neben den einfachen Resistenzen haben Insekten auch Resistenzen gegen mehrere Bt-Toxine aufgebaut (Kreuzresistenzen). Kohlmotten (*Plutella xylostella*), die auf Resistenz gegen das Bt-Präparat DIPEL bestehend aus cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry2A, cry2B selektiert wurden, zeigten Resistenz gegen cry1F und cry1J, wobei die Resistenz gegen cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac und cry1F auf einem einzigen Gen beruhte (GOULD et al., 1997). Mc GAUGHEY berichtet über Kreuzresistenzen des Kartoffelkäfers gegen cryIIA und anderen cryIII Toxinen (MCGAUGHEY, 1994a).

3.3 Mechanismen der Insektenresistenz gegen Bt

Insekten haben viele Möglichkeiten Resistenzen gegen Bt zu entwickeln, so z. B. durch Veränderung des pH-Wertes im Darm, Veränderung der Proteasenaktivität, morphologische Änderungen der Darmmembran und deren Rezeptoren. In der Kohlmotte wird die Resistenz durch eine Veränderung des Membranrezeptors im Darm verursacht (FERRE et al., 1991). Ein Teil der Resistenz in der Eulenraupe (*Heliothis virescens*) beruht auf einer verringerten Bindung der Toxine an das Darmepithel. Zusätzlich wird die Bildung von Toxinporen verhindert (FULLER, 1997). Kann sich die Resistenz auf mehreren Loci aufbauen, so verschärft sich die Resistenzproblematik.

4 DARSTELLUNG VON MONITORING-PLÄNEN UND RESISTENZMANAGEMENTPLÄNEN

4.1 Monitoring

Das Monitoring von Bt-Resistenz ist ein fallspezifisches (case-specific) Überwachungsmonitoring (im Sinne der Novellierung der EU-Richtlinie 90/220/EWG (EU-RAT, 1999), und dient dem Zweck möglichst früh die Präsenz sowie Häufigkeit von resistenten Insekten bzw. Resistenzallelen in Freilandpopulationen zu entdecken. Ausgangspunkt jedes Monitoringprogramms ist deshalb die Festlegung der Ausgangssituation (baseline). Darauf folgend wird in einem kontinuierlichem Zeitintervall die Veränderung des Resistenzniveaus im Vergleich zur Ausgangssituation erfasst. Das Monitoring erfolgt durch die Testung von Freilandpopulationen auf ihre Sensitivität gegen Bt. Es gibt mehrere Monitoringmethoden, die sich grundsätzlich insbesondere in ihrer Aussagekraft voneinander unterscheiden (siehe unten). Zudem können sich gleiche Monitoringmethoden, z. B. LD₅₀-Tests, deutlich im Detail des Versuchsdesigns unterscheiden, wodurch es zu erheblichen Abweichungen in den Ergebnissen kommen kann.

4.1.1 „Dose-Response“ Test

Bei Dosis-Wirkung-Tests werden Wirkungen an Schadinsekten mit 4 bis 5 unterschiedlichen Dosen von Insektiziden, die eine Mortalität zwischen 10 % und 90 % verursachen, getestet. Resistenz ist dann das Verhältnis der LD₅₀ bzw. LD₉₀ der resistenten zur LD₅₀ bzw. LD₉₀ der sensiblen Stämme. Diese Technik ist geeignet, um Phänomene aufzuzeigen, bei denen die Resistenz bereits ein hohes Niveau erreicht hat. So ändert sich die LD₅₀ erst bei einer Frequenz der Resistenzallele von 20 %. Für LD₉₅ ist erst bei einer Frequenz von 1 % mit einem signifikant veränderten Kurvenverlauf zu rechnen. Die Methode ist deshalb für eine frühe Erkennung geringfügiger Veränderungen der Frequenz von Resistenzallelen zu wenig sensitiv (ROUSH & MILLER, 1986). Zudem werden viele Individuen (mit potentiellen Resistenzallelen) für die Testung von geringen Dosen „verschwendet“. Sinnvoller ist es deshalb, möglichst alle gesammelten Individuen bei hohen Dosen (Diagnostic or discriminating concentration) zu testen (MARCON et al., 2000).

4.1.2 „Diagnostic or discriminating concentration“

Bei diagnostischen Konzentrationstests werden alle gesammelten Individuen mit hohen Dosen eines Toxins getestet. Die Dosis des Toxins ist an der LD₉₉ ausgerichtet, das heißt, dass bei der verwendeten Dosis 99 % der empfindlichen Organismen nicht überleben. Die LD₉₉ erhält man durch ausführliche Vortests, in denen das Ausgangsresistenzniveau (baseline) für das betreffende Insekt bzw. für die betreffende Population festgelegt wird (MARCON et al., 2000). Doch auch diese Methode ist unsensitiv für die Identifikation von seltenen Resistenzallelen. Bei einer diagnostischen Konzentration, die der LD₉₉ entspricht, benötigt man 1.500 Individuen, um Resistenzallele mit einer Frequenz von 1 % (10×10^{-3}) mit 95 % Wahrscheinlichkeit zu identifizieren (ROUSH & MILLER, 1986). Für ANDOW und HUTCHISON (1998) ist diese Methode lediglich für die Erkennung dominanter Resistenzgene geeignet. Für ein komplett rezessives Allel erlaubt ein Screening von 1.400 Individuen lediglich eine Schätzung der Allelfrequenz von ca. 27×10^{-3} . Dies ist jedoch zu ungenau, da man davon ausgeht, dass die high dose/refuge-Strategie ab einer Allelfrequenz von $> 1 \times 10^{-3}$ scheitert (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 44f). Bei der Durchführung von Screening-Tests, die der Abschätzung der Frequenz von Resistenzallelen dienen, ist bei der statistischen Auswertung zu beachten, dass der Maiszünsler Eipakete zu 15 bis 20 Eiern auf den Blättern ablegt. Werden diese Eipakete gesammelt und daraus Larven für das Screening herangezogen, so erhält man in der

Probe zu großen Teilen Voll- oder Halbgeschwister. Dies ist insbesondere bei der Interpretation von Monitoringregimen auf Basis von „diagnostic concentration“ problematisch, da das zugrundeliegende Modell von einer „unabhängigen“ Stichprobe einer Population ausgeht (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 44f).

4.1.3 Kreuzung mit einem Teststamm

GOULD et al. (1997) kreuzten vom Feld gesammelte männliche adulte amerikanische Tabak-eulen (*H. virescens*) mit weiblichen Individuen eines homozygot resistenten (RR) Laborstammes. Die F_1 ist heterozygot resistent (RS) oder bei Vorliegen eines heterozygoten Resistenzallels in der Feldpopulation homozygot resistent (RR). Sie unterzogen die F_1 einer Konzentration, die es ermöglichte, homozygot resistente (RR) von heterozygot resistenten (RS) Individuen zu selektieren, wodurch herausgefunden werden kann, ob und in welcher Frequenz ein Resistenzallel (R) in der Feldpopulation vorkommt (GOULD et al., 1997). Die wichtigste Einschränkung dieser Methode ist, dass man über resistente Laborstämme mit einem Resistenzallel R verfügen muss, um diese Prozedur durchzuführen. Wenn die Resistenz durch mehreren Allele verursacht wird, so wird mit dieser Methode lediglich die Frequenz des Resistenzallels des Laborstammes gemessen. Nach Ansicht von ANDOW und ALSTAD (1998) ist diese Methode eine „best case-analysis“. Für eine Abschätzung eines realistischen Szenarios ist es notwendig, alle potentiellen Resistenzallele (R) zu identifizieren und deren Frequenz abzuschätzen. Hierfür eignet sich der „ F_2 -screen“.

4.1.4 „ F_2 -screen“

Beim F_2 -screen (entwickelt von ANDOW & ALSTAD, 1998) werden befruchtete weibliche Maiszünsler gefangen und im Labor als isofemale² Linie behandelt. Die F_1 der Linien werden untereinander innerhalb einer Mutterlinie (Geschwisterpaarung) angepaart. Der Vorteil ist: wenn ein Resistenzallel **heterozygot** in einer isofemale Linie vorliegt, erhält man in der F_2 **homozygot** resistente Individuen im Verhältnis 1/16 (ANDOW & ALSTAD, 1998). Die Larven der F_2 werden auf Bt-Pflanzen bzw. mittels „diagnostic concentration tests“ geprüft. Wenn in diesen Tests keine resistenten Individuen (Allele) gefunden werden, so kann man bei einer Anzahl von 750 weiblichen Ausgangsindividuen, davon ausgehen, dass Resistenzallele mit einer Frequenz von $< 1 \times 10^{-3}$ in der Population vorliegen (SCHNEIDER, 1998, ANDOW & ALSTAD, 1999). Wenn Resistenzallele gefunden werden, so ist die Bestimmung ihrer Frequenz möglich. Sind mit dem Gen Fitnessnachteile verbunden, so können daraus weitere Aussagen bzw. Abschätzungen über die Resistenzentwicklung abgeleitet werden (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 24f).

4.2 Resistenzmanagement-Pläne am Beispiel von Bt-Mais

Von den in den frühen 90er Jahren vorgeschlagenen Resistenzmanagementstrategien hat sich die „refuge/high dose“ Strategie gegenüber anderen Strategien klar durchgesetzt. Sie ist Basis einer Vielzahl von Untersuchungen und theoretischer Überlegungen und das Standardmodell der US EPA (US EPA, 1998; US EPA, 1999a; US EPA, 1999b). Lediglich dem „gene stacking“, dem mehrfachen Einbau unterschiedlicher Resistenzgene, wird noch eine große

² isofemale Linie: Die Nachkommen jedes überlebenden, befruchteten vom Feld gesammelten und ins Labor verfrachteten Weibchens wurden als eine Linie behandelt. Die F_1 dieser Linien wurden untereinander (innerhalb einer Linie) angepaart und die F_2 auf Resistenz getestet. Jedes Individuum einer Linie stammt somit von der gleichen Mutter, Großmutter etc. ab, jedoch möglicherweise von unterschiedlichen Vätern.

Bedeutung zugemessen. Im folgenden Abschnitt folgt eine detaillierte Abhandlung der refuge/high dose Strategie, wobei ebenfalls historische Empfehlungen zur Größe der Refuge-Flächen wiedergegeben werden.

4.3 „Refuge/high-dose“ Strategie

4.3.1 Ziel und Voraussetzungen der refuge/high-dose Strategie

Die refuge/high-dose Strategie ist jene Resistenzmanagementstrategie, die sich gegenüber anderen potentiellen Strategien durchgesetzt hat.

Ihr liegen 3 Voraussetzungen zugrunde (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 25f):

1. Die Dosis im Pflanzengewebe muss (wie der Name schon sagt) sehr toxisch sein, sodass die Resistenz funktionell rezessiv ist. Das heißt alle homozygot sensiblen (SS) wie auch heterozygot resistenten (RS) Individuen werden durch diese Dosis getötet. Man nimmt an, dass die Konzentration („high dose“) in den Pflanzengeweben 25 mal höher als die LD_{99} von empfindlichen Stämmen (SS) sein muss, um alle heterozygot resistenten Insekten abzutöten. HUANG et al. (1999a) weisen darauf hin, dass das fünfte Larvenstadium weniger empfindlich gegen *Bacillus thuringiensis* ist als die ersten beiden Larvenstadien. Die „high dose“ muss deshalb auf Basis der Empfindlichkeit des fünften Larvenstadiums definiert werden.
2. Das Resistenzallel in der Population ist rezessiv und sehr selten. Es liegt mit einer Frequenz von weniger als 1×10^{-3} vor.
3. Eine Fläche von Nicht-Bt-Pflanzen stellt genügend homozygot sensible (SS) Individuen bereit, die sich mit wenigen homozygot resistenten (RR) Individuen paaren, deren Nachkommen alle heterozygot resistent (RS) sind. Die Paarung erfolgt zufällig zwischen (SS) und (RR) Individuen.

Ziel der refuge/high-dose Strategie ist es, dass die wenigen überlebenden homozygot resistenten (RR) Insekten aus dem Bt-Maisflächen sich ausschließlich mit homozygot empfindlichen (SS) Insekten aus den Refuge-Flächen paaren. Deren Nachkommen sind heterozygot resistent (RS) und können auf Bt-Pflanzen nicht überleben. Wenn zum Beispiel die ursprüngliche Frequenz der Resistenzallelen 1×10^{-3} und die Frequenz des Bt-Toxins empfindlichen Allels 999×10^{-3} ist, und wenn homozygot resistente (RR) Insekten sich zufällig mit homozygot empfindlichen Insekten (SS) paaren, so ist die Wahrscheinlichkeit von Kreuzungen zwischen homozygot resistenten (RR) und homozygot empfindlichen (SS) Insekten (RR x SS) eine Million mehr wahrscheinlich als die nicht gewünschte Paarung von homozygot resistenten (RR) untereinander (RR x RR, ANDOW & HUTCHISON, 1998: 25f). Die Wahrscheinlichkeit von (RS x SS) Paarungen ist sowohl von der Größe der Refuge-Fläche, als auch vom Selektionsdifferential abhängig. Computersimulationen haben gezeigt, dass unter diesen Umständen die Evolution von Resistenz deutlich verzögert werden kann (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 25f). Dieses Modell funktioniert nur dann, wenn die Resistenz funktionell rezessiv ist. US EPA und Industrie behaupten (nach Aussage von ANDOW & HUTCHISON, 1998: 26f), dass die Konzentration von Bt-Toxin in den transgenen Pflanzen hoch genug sei, um alle heterozygot resistenten (RS) Individuen abzutöten bzw. dass die Resistenz funktionell rezessiv ist. Dies ist aber wissenschaftlich nicht zu beweisen (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 26f). Obwohl die Konzentration in manchen Geweben transgener Maispflanzen mehrfach die Konzentration der LD_{90} übersteigt, lässt sich daraus nicht schließen, dass die Resistenz funktionell rezessiv ist. Denn Fitness ist sowohl eine Funktion des Genotyps als auch seiner Umwelt (insbesondere der Toxinkonzentration). Es kann deshalb aus der alleinigen Betrachtung der Umwelt (Toxinkonzentration) nicht auf die funktionelle Rezessivität der Resistenz geschlossen werden (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 26f).

4.3.2 Limitierende Faktoren der refuge/high-dose Strategie

Mehrere Faktoren beeinflussen bzw. limitieren den Erfolg der refuge/high-dose Strategie:

4.3.2.1 Dominante Vererbung der Resistenz

Der zentralste Angelpunkt dieser Strategie ist, dass die Resistenz rezessiv vererbt wird. Dadurch überleben bei Toxinexposition nur jene Individuen, die homozygot resistent (RR) sind. Sollte die Resistenz dominant vererbt werden, sodass auch heterozygot resistente (RS) Individuen die Toxin-Exposition überleben, schlägt die refuge/high-dose Strategie fehl. In diesem Fall wäre eine refuge/low dose Strategie angebracht (ANDOW & HUTCHISON, 1998,26f).

4.3.2.2 Nicht zufällige Paarung

Ein weiterer wichtiger Faktor ist, dass die Paarung zufällig erfolgt. Wenn die Paarung zwischen homozygot resistenten (RR) untereinander (RR x RR) mehr wahrscheinlich ist als die Paarung zwischen homozygot empfindlichen (SS) mit homozygot resistenten (RR) Insekten (RR x SS), so wird die Verzögerung der Resistenzentwicklung deutlich verkürzt. Diese Möglichkeit ist nach den Ergebnissen von LIU et al. (1999) ernsthaft in Erwägung zu ziehen. Sie beobachteten, dass resistente Larven von *Pectinophora gossypiella*, einem Baumwollschädling auf Bt-Baumwolle, um durchschnittlich 5,7 Tage länger für die Entwicklung zum adulten Insekt brauchten, als empfindliche Larven auf Nicht-Bt-Baumwolle. Diese Verzögerung führt zu einer höheren Wahrscheinlichkeit von Kreuzungen zwischen homozygot resistenten Insekten untereinander, und führt in weiterer Folge auch zu Phasen-verschobenen Populationsentwicklungen, die RR x RR Paarungen weiter favorisieren. Lediglich wenn die längere Entwicklungszeit zu einer erhöhten Mortalität (insbesondere erhöhten Wintersterblichkeit) führt, könnte diese „nicht zufällige“ Paarung keinen oder sogar einen verzögernden Einfluss auf die Resistenzentwicklung haben (LIU et al., 1999).

4.3.2.3 Hohe Frequenz des Resistenzallels

Wie schon oben erwähnt muss die Frequenz des rezessiven Resistenzallels geringer als 1×10^{-3} sein. Ab dem Zeitpunkt wo die Frequenz diesen Wert übersteigt, droht die refuge/high-dose Strategie zu scheitern (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 44f). Das Scheitern der refuge/high-dose Strategie (Resistenzdurchbruch) wird als jener Zeitpunkt verstanden, an dem die Anzahl der (resistenten) (RR) Schadinsekten im Bt-Feld 50 % der Anzahl der empfindlichen Insekten im Nicht-Bt-Feld ausmacht (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 30f).

Noch stärker als die Ausgangsfrequenz des Resistenzallels beeinflusst der Grad der Abtötung heterozygot resistenter (RS) Insekten die Zeitspanne bis die Resistenz durchbrochen ist. So bewirkt eine Abnahme in der Ausgangsfrequenz der Resistenzallele um das 10.000-fache eine Resistenzverzögerung um das 5-fache. Demgegenüber bewirkt eine Zunahme der Mortalität von heterozygot resistenten Individuen von 80 % auf 99 % eine Resistenzverzögerung um das 10-fache (ROUSH & SHELTON, 1997).

4.3.2.4 Größe der Refuge-Fläche

Die Empfehlungen bezüglich der Größe der Fläche schwanken stark im historischen Verlauf. So wurde anfangs davon ausgegangen, dass 5 bis 10 % Refuge-Fläche für die Verzögerung der Resistenzentwicklung ausreichen sollte (HOLMES, 1993).

1998 verpflichteten die Firmen Monsanto und Dekalb Genetics Landwirte, die ihre Bt-Mais Produkte (MON810, DBT418) verwendeten – in einem „Technology Agreement“ mit Kosten

von \$ 32 per acre (0,4046ha) „technology usage fee“, die Monsanto und Dekalb Genetics zusätzlich zu den Saatgutkosten einhoben – zu einem Anbau von 5 % unbehandelter Refuge-Fläche bzw. 20 % mit Insektiziden behandelte Refuge-Fläche (US EPA, 1998).

Eine etwas größere Fläche wurde von der USDA empfohlen, die in ihrem Report USDA-NC-205 20 bis 30 % strukturierte unbehandelte bzw. 40 % mit Insektiziden behandelte Refuge-Fläche empfahlen (US EPA, 1998).

In den aktuellsten Richtlinien fordert die US EPA (1999a) für Bt-Mais

- 20 % strukturierte Refuge-Fläche
- 50 % strukturierte Refuge-Fläche in Baumwollgebieten³.

Die Empfehlung einzelner Wissenschaftler gehen jedoch noch darüber hinaus (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 26f und 31f). Im Sinne des Vorsorgeprinzips sollte davon ausgegangen werden, dass Bt-Mais nicht alle heterozygot resistenten (RS) Insekten abtötet (verglichen mit homozygot empfindlichen Insekten (SS) könnte es nur zu einer Mortalität von 90 bis 95 % bei heterozygot resistenten Insekten kommen). Deshalb wird als Vorsorgemaßnahme eine 50 % unbehandelte Refuge-Fläche empfohlen (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 26f und 31f).

ANDOW und HUTCHISON (1998: 31f) begründen ihre Empfehlung auf Basis von Simulationsmodellen, in denen sich zeigte, dass zumindest 25 % der Schadinsekten (25 % von jener Summe an Insekten, die in einem Nicht Bt-Mais-Feld auftreten würden) nicht mit Bt-Mais in Kontakt kommen sollten, um die Resistenz deutlich zu verzögern. Aufgrund mehrerer Effekte (wie HALO-Effekt, siehe 4.3.5 und anderen) kommen in einer 25 %igen Refuge-Fläche weniger als 25 % der Insekten mit Bt-Mais nicht in Kontakt. Ähnlich erhält eine 50 %ige Refuge-Fläche weniger als 50 % der Schadinsektenpopulation. Obwohl nach Ansicht von ANDOW und HUTCHISON (1998: 31f) auch eine 25 %ige Refuge-Fläche möglich ist, erlaubt sie kaum Puffer für mögliche Fehler.

ANDOW bekräftigte im Rahmen eines US EPA/USDA Workshops (US EPA, 1999b: 27ff) seine Bedenken gegen eine Refuge-Fläche von lediglich 20 %, da sie keine Sicherheiten biete, um Unsicherheiten bei den Modellannahmen und der Implementierung abzupuffern. Lediglich mit einem sorgfältigen Monitoring-Programm könne diesen Unsicherheiten begegnet werden. Die Zeitspanne, um auf Änderungen in der Resistenzentwicklung zu reagieren bevor die Resistenz durchbrochen wird, beträgt für ein vollständig dominantes Resistenzgen 2 bis 4 Jahre, für ein vollständig rezessives Resistenzgen 2 bis 12 Jahre, je nachdem wie früh Änderungen in der Frequenz des Resistenzallels erkannt werden.

ONSTAD und GUSE (1999) schließen aus ihren ökonomischen Modellberechnungen mit Refuge-Flächen zwischen 5 und 30 %, dass 20 % Refuge-Fläche in den meisten Fällen die optimalste Größe darstellt. Im Gegensatz zu ANDOW und HUTCHISON (1998: 31f) gehen ONSTAD und GUSE (1999) davon aus, dass 25 % der homozygot resistenten (RR) Maiszünsler durch die hohe Toxinkonzentration in Bt-Mais-Pflanzen („high-dose“) abgetötet werden.

4.3.3 Mobilität des Maiszünslers und Refuge Design

Die Art des Refuge-Designs steht eng im Zusammenhang mit dem Verhalten des Schadinsektes. Zwei prinzipiell verschiedene Refuge-Designs wurden vorgeschlagen. Das eine Design sieht eine separate Fläche von Bt-Pflanzen und nicht Bt-Pflanzen vor, das andere sieht eine Saatgutmischung, in der zu einem fixen Prozentsatz Nicht-Bt-Saatkörner in Bt-Saatkörner beigemischt werden, vor. Das optimale Refuge-Design ist stark vom Verhalten des

³ „Registrants must ensure that growers plant a minimum structured refuge of at least 20 percent non-Bt corn. For Bt corn grown in cotton areas, registrants must ensure that farmers plant at least 50 percent non-Bt corn in these areas“.

Insektes im Larvenstadium sowie während der Partnersuche (Vorpaarungsmobilität), sowie nach der Paarung und bei der Auswahl der Blätter für die Eiablage (Nachpaarungsmobilität) abhängig. Die folgende Analyse konzentriert sich auf die Bedingungen für den Maiszünsler und Bt-Mais.

4.3.3.1 Mobilität des Maiszünsler

Die Larve des Maiszünslers bewegt sich zwischen einzelnen Maispflanzen bzw. zwischen Mais und Unkrautpflanzen in einem engem Radius. Die erwachsenen Tiere dagegen bewegen sich in einem Umkreis von zumindest 800 m (ROSS and OSTLIE 1990 zit. in US EPA, 1998). Bi-voltine (zwei Generationen pro Jahr) Populationen können in einem Jahr auch Distanzen bis zu 32 km zurücklegen (SHOWERS 1993; SHOWERS et al. 1995 zit in US EPA, 1998). Die Mehrheit der erwachsenen Maiszünsler bewegen sich nur in einem kleinen Radius (US EPA, 1998).

DAVIS und ONSTAD (2000) untersuchten unter Feldbedingungen den Einfluss von Saatgutmischungen auf das Verbreitungsverhalten von Junglarven. Sie stellten fest, dass Maiszünslerlarven auf Bt-Mais in einem deutlich höherem Ausmaß Pflanzen wechselten als Larven auf Nicht-Bt-Mais. Dies könnte zu einer Selektion von Larven mit einer erhöhten Mobilität führen. Mobilität erhöht prinzipiell die Mortalitätsrate bei Maiszünslerlarven. Ursachen hierfür sind in einer stärkeren Exposition gegenüber Predatoren, Austrocknung und Verhungern, da keine geeignete Wirtspflanze aufgefunden werden konnte, zu suchen. Jedoch können auch Dichte – abhängige Mortalitätsfaktoren⁴ jenen Individuen einen Selektionsvorteil verschaffen, die durch ihre Mobilität neue Pflanzenressourcen erschließen.

Eine Grundvoraussetzung für das Erstellen eines idealen Refuge-Designs mittels Computersimulationen, insbesondere für separierte Refuge-Flächen, ist die genaue Kenntnis des Verhaltens der Insekten, vor der Paarung und nach der Paarung (insbesondere der Eiablage). ANDOW und HUTCHISON (1998) betonen, dass Unterschiede im Vor- und Nachpaarungsverhalten einen wesentlichen Einfluss auf die Effektivität der Refuge-Fläche haben können. Jedoch steht diese Information nicht mit der nötigen Detailauflösung zur Verfügung. Das Vor- und Nachpaarungsverhalten bei Maiszünsler zählt deshalb zu einer der bedeutendsten Wissenslücken („knowledge gaps“) bei der Abschätzung der Effektivität von Refuge-Flächen (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 34f).

4.3.3.2 Sortenmischungen

Sortenmischungen hätten den Vorteil, dass sie die Umsetzung des von den Behörden vorgegeben Anteils der Refuge-Fläche erheblich erleichtern würden. Man bräuchte lediglich kontrollieren, ob Saatgutmischungen mit weniger als z. B. 20 % Nicht-Bt-Mais-Körnern verkauft werden, um zu erkennen, ob die Umsetzung der refuge/high-dose-Strategie auch befolgt wird.

Modelluntersuchungen ergaben jedoch, dass Sortenmischungen keine geeignete Strategie sind, um die Resistenzentwicklung gegen Bt beim Maiszünsler zu verhindern (ONSTAD & GOULD, 1998).

Die experimentellen Untersuchungen von DAVIS und ONSTAD (2000) offenbarten, dass in Sortenmischungen Maiszünslerlarven, die anfangs auf Bt-Mais geschlüpft und auf Nicht-Bt-Mais gewandert sind, eine höhere Mortalität aufweisen als Maiszünslerlarven, die keine Exposition gegen Bt hatten. Dies würde die Selektion von heterozygoten Maiszünslern begünstigen (DAVIS & ONSTAD, 2000).

⁴ Faktoren, die die Mortalität von Maiszünslerlarven bei ansteigender räumlicher Dichte (Konkurrenz, Krankheitsausbruch udgl.) erhöhen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen SHELTON et al. (2000) mit der Kohlmotte (*Plutella xylostella*) und Bt-Brokkoli in Glashaushaus- und Feldversuchen. Dieser Versuch war der erste, der die Effizienz der refuge/high-dose-Strategie experimentell überprüfte, indem er resistente Kohlmotten freiließ und Änderung der Frequenz des Resistenzallels bestimmte (Details siehe Kapitel 5.4.2).

4.3.3.3 Streifenanbau

Modellüberlegungen ergaben für den Streifenanbau von jeweils 2 Streifen Nicht-Bt-Mais und 16 Streifen Bt-Mais eine lange Verzögerungszeit von 100 Jahren (unter den optimalen Bedingungen des Modells), bis die Frequenz der Resistenzallele 30×10^{-3} erreichte. Diese Werte waren ähnlich gut wie für separierte Refuge-Flächen, ihre Anwendung würde jedoch ein größeres Risiko (raschere Resistenzentwicklung als das Computermodell errechnet hatte) als separierte Refuge-Fläche bedeuten. Die guten Werte der Resistenzverzögerung für den Streifenanbau beruhen in erster Linie auf den Schätzungen bezüglich Larvenmobilität aus der Umgebung, sowie der Mortalität vor und während der Ausbreitung der Larven. Die diesbezüglichen Daten liegen jedoch nicht fundiert vor. Änderungen in diesen Annahmen ergeben ungünstigere Werte für den Streifenanbau im Vergleich zur separierten Refuge-Fläche (ONSTAD & GOULD, 1998).

4.3.3.4 Separierte Refuge-Fläche

Die Mehrzahl der Entomologen sowie die Mehrzahl der Computermodelle favorisieren separierte Refuge-Flächen. Diese können die Resistenz deutlich länger verzögern als Sortenmischungen und sind robuster bezüglich Änderungen in der Larvenmobilität. Die Refuge-Fläche muss direkt neben Bt-Mais angebaut werden. Obwohl es viele (unterschiedliche) Empfehlungen bezüglich des Anteils der Refuge-Fläche an der Gesamt Bt-Mais-Fläche gibt, finden sich keine Empfehlungen für den maximalen oder minimalen Abstand der Refuge-Fläche zu den Bt-Mais-Flächen. Dies ist in erster Linie durch die unbefriedigende Datenlage bezüglich der Mobilität des Maiszünslers während des Larvenstadiums als auch vor und nach der Paarung begründet (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 32f). Diese Autoren empfehlen einige Streifen Nicht-Bt-Mais bis zu 40 bis 80 acre (16 bis 32 ha) (benachbarte Feldflächen).

Detailliertere Angaben über die maximale Größe der Bt-Mais-Fläche werden nicht gemacht. ONSTAD und GOULD (1998) geben keine Angaben über die maximale Entfernung von Bt-Mais und Refuge-Flächen. Ihre Berechnungen zeigen, dass ein 100 ha großes Feld mit 20 % Refuge-Fläche die Resistenz effektiv verzögert, wenn Bt-Mais in einem langen schmalen Rechteck angebaut wird. Nähere Angaben über die maximale Feldbreite werden nicht gemacht. ONSTAD und GUSE (1999) empfehlen die Anlage einer 20 %igen Refuge-Fläche in der Mitte jedes Feldes bzw. benachbart zu einem 100 ha Feld.

4.3.3.5 Separierte Refuge-Fläche und Fallenpflanzen

ALSTAD und ANDOW (1995) entwarfen – auf Basis mehrfacher Beobachtungen, dass die Maiszünslerweibchen bei ihrer Eiablage die am stärksten entwickelten Maispflanzen bevorzugen – eine neue Strategie für das Design der Refuge-Fläche. Sie empfehlen ein Verhältnis von Bt-Mais und Nicht-Bt-Mais von 50 % zu 50 %. Bt-Mais wird früh angebaut und dient als Lockfalle für die weiblichen Maiszünsler bei der Eiablage. Der später angebaute Nicht-Bt-Mais profitiert überproportional von diesem Effekt und wird weniger geschädigt. Nach Modellberechnungen kann in der neunten und zehnten Generation die Maiszünslerdichte in der Refuge-Fläche (Nicht-Bt-Mais) um 83 bzw. 53 % reduziert werden. Dem gegenüber würde die Variante mit gleichem Anbauzeitpunkt (oder zufälliger – nicht bevorzugter Eiablage) die Maiszünslerdichte lediglich um 38 und 29 % reduzieren. Die Resistenzverzögerung der Me-

thode mit bevorzugter Eiablage (durch Frühanbau von Bt-Mais) hatte im Vergleich zum konventionellen Refuge-Design nur marginal schlechtere Werte in der Verzögerung der Resistenzentwicklung (ALSTAD & ANDOW, 1995: Table 1). ALSTAD und ANDOW (1995) sind der Ansicht, dass mit dieser Methode der Maiszünslerbefall auf zwei Flächen (Refuge-Fläche und Bt-Mais-Fläche) zum Preis von einer Fläche (Kosten für Bt-Mais-Saatgut) reduziert werden kann.

4.3.4 Natürliche Refugien

Neben den Refugien von nicht Bt-Mais in der Anbaufläche von Bt-Mais, gibt es auch noch die Möglichkeit, die natürliche Vegetation, sofern sie eine Wirtspflanze des Maiszünsler darstellt, für ein Refuge zu nutzen. Im Falle von Bt-Mais erwies sich die Hoffnung auf natürliche Refugien als verfrüht. Wie die Untersuchungen von BOURGUET et al. (2000) zeigten, sind die Maiszünslerpopulationen auf Mais von den Maiszünslerpopulationen, die natürliche Wirtspflanzen befallen, genetisch verschieden, sodass man annimmt, dass es keinen genetischen Austausch zwischen diesen Populationen gibt:

„Conversely, the samples collected on maize were genetically different from those collected on sagebrush and hop. Three of the six loci considered displayed greater between-host-plant than within-host-plant differentiation in comparisons of the group of samples collected on sagebrush or hop with the group of samples collected on maize. This indicates that either there is genetic isolation of the insects feeding on maize or that there is host-plant divergent selection at these three loci or at linked loci” (BOURGUET et al., 2000).

4.3.5 HALO-Effekt

Die Implementierung einer Refuge-Fläche bietet einen langfristigen Nutzen zur langfristigen Reduzierung von Maiszünslern. Die Verluste auf den Refuge-Flächen sind geringer im Vergleich zum Anbau von Nicht-Bt-Mais auf der ganzen Fläche. Der Anbau von Bt-Mais reduziert die Dichte der Maiszünsler insgesamt, was der Refuge-Fläche zugute kommt. Diese Reduktion der Dichte an Schädlingen in einem unbehandeltem Feld, durch den Anbau von Bt-Pflanzen oder den Einsatz von Insektiziden, wird HALO-Effekt genannt. Innerhalb von 50 yards (45,72 m) trägt der HALO-Effekt zu einer Verminderung der Schädlingspopulation von 30 bis 50 % bei (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 33f). Der HALO-Effekt ist ein kurzfristiger Nutzen der Refuge-Fläche, da für diese Fläche kein teures Bt-Saatgut gekauft werden muss. Je schmaler die Refuge-Fläche ist, desto größer ist der HALO-Effekt. So führt eine Refuge-Fläche in Form von 6 bis 8 Streifen im Bt-Mais zu einer beträchtlichen Reduktion von Maiszünslern in den Nicht-Bt-Mais-Streifen (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 33f). Da die überwiegende Mehrheit der Maiszünsler lediglich kurze Distanzen zurücklegt, ist der HALO-Effekt kleinräumig nutzbringend, wodurch die Implementierung von Refuge-Fläche auch einen direkten sichtbaren Nutzen für den Landwirt bringt. Letztlich muss dieser HALO-Effekt auch bei den Modellen berücksichtigt werden.

5 BT-MAIS

5.1 Der Maiszünsler

Der Maiszünsler (engl. European corn borer, *Ostrinia nubilalis*) ist der bedeutendste Mais-schädling in Europa wie auch in den großen Teilen der USA. Während in den USA mehrere Schädlinge den Mais befallen (Corn earworm, *Helicoverpa zea* Boddie; Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith); Southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella* Dyar; Sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* F. und European corn borer, *Ostrinia nubilalis*) sind es in Europa lediglich zwei Insektenarten, die Fraßschäden in größerem Ausmaß erzielen können. Es sind dies:

- *Ostrinia nubilalis* (Maiszünsler, engl. European corn borer, ECB)
- *Sesemia nonagrioides* (engl. Mediterranean corn borer).

Das Verbreitungsgebiet des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) reicht in Europa von Südspanien, Griechenland, Süditalien mit 3 Generationen pro Jahr über Norditalien, Nordspanien, Südfrankreich mit (2 Generationen pro Jahr) über Österreich, Deutschland, Benelux-Staaten, Südschweden und Südnorwegen mit je einer Generation pro Jahr. Die Höhe des Befallsdrucks und des Schadenspotenzials korreliert naturgemäß positiv mit der Anzahl der Generationen pro Jahr, sodass man von einem Süd-Nord Gefälle sprechen kann. *Sesamia nonagrioides* tritt lediglich in Südeuropa (Spanien, Portugal, Italien, Griechenland sowie Südfrankreich) als bekämpfungswürdiger Massenschädling auf. In Spanien ist *Sesamia nonagrioides* der bedeutendere Schädling für Mais (GONZÁLES-NÚÑEZ et al., 2000).

Der Maiszünsler ist erst 1900 von Europa nach Amerika eingeschleppt worden, und hat sich seit seiner Entdeckung ab 1920 massiv in den USA ausgebreitet. Sein Verbreitungsgebiet reicht in Amerika von Kanada im Norden bis Florida und New Mexiko im Süden (RENNER, 1999). In Süden und Südwesten der USA ist der Southwestern corn borer der ökonomisch bedeutendere Schädling (HOPKINS National Corn Growers Association in US EPA, 1999b).

5.1.1 Biologie des Maiszünslers

Obwohl der Maiszünsler ein bedeutender Maisschädling ist, ist über seine Biologie vergleichsweise wenig bekannt. Maiszünsler gehören zu den Schmetterlingen (Lepitopteren). Der Maiszünsler hat ein breites Wirtsspektrum und war in früheren Zeiten ein bedeutender Schädling im Hanf. Mehr als 200 Wirtspflanzen sind für den Maiszünsler bekannt (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 27f).

Reife Larven überwintern in Stängeln oder anderen schützendem Pflanzenmaterial. Sie verpuppen sich im Frühling. Im späten Frühling entstehen die erwachsenen Maiszünsler, die sich nach wenigen Tagen paaren. Jedes Weibchen legt 500-600 Eier in kleinen Paketen von 15-20 Eiern auf die Blattunterseite. Die Larven schlüpfen nach 3 bis 12 Tagen, in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur. Die Mortalität der frisch geschlüpften Larven liegt bei ca. 90 %. Ursachen hierfür sind natürliche Feinde, Hitze und/oder geringe Feuchtigkeit (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 35f). Die jungen Larven beginnen für gewöhnlich mit dem Fraß an der Blattoberfläche. Im weiteren Verlauf bohren sie sich durch die Mittelblattader und den Blattstiel. Im 4. Larvenstadium bohrt sich der Maiszünsler in den Maisstengel bzw. in den Kolben. *Sesamia nonagrioides* bohrt sich bald nach dem Schlüpfen in den Maisstengel (das Maisblatt) und ist deshalb mit Pestiziden schwieriger zu bekämpfen als *Ostrinia nubilalis* (GONZÁLES-NÚÑEZ et al., 2000).

Je nach Region überwintert diese Larve oder es entwickelt sich eine partielle 2. Generation, die sich nicht mehr generativ fortpflanzt oder eine vollständigen 2. Generation. In Südspanien,

Griechenland, Süditalien schafft der Maiszünsler 3 Generationen pro Jahr. In Norditalien, Nordspanien, Südwestfrankreich sind es 2 Generationen pro Jahr und in warmen Jahren eine dritte partielle. In Österreich, Deutschland, Benelux-Staaten Südschweden und Südnorwegen kommt es bei Maiszünslern lediglich zu einer Generation pro Jahr.

Je nach topographischer Lage können mehrere genetisch isolierte Populationen des Maiszünsler definiert werden. Daneben gibt es noch eine Unterteilung in Pheromonrassen. Die Z-Rasse dominiert in Nordamerika und weiten Teilen Europas. Die E-Rasse tritt in der Schweiz, Italien und im Nordosten der USA auf (MARCON et al., 1999).

5.1.2 Schadensbild und die Bekämpfung des Maiszünslers

Der Fraßbeginn setzt an den Blättern ein. Mit späterem Reifestadium bohrt sich die Larve durch die Mittelader und den Blattstiel in den Stängel. Der Hauptschaden wird durch einen verringerten Stärke oder Zuckergehalt des Maiskorns verursacht. In manchen Fällen kann es auch zu einem Knicken des Stängels, zum Abfall der Kolben oder kleinen Kolben kommen. Bei den modernen Sorten kommt es trotz Maiszünslerbefall nur noch selten zu einem Halmbruch, sodass der Befallsdruck mit Maiszünsler leicht übersehen werden kann.

Die Bekämpfung des Maiszünslers mit Insektiziden ist in Österreich und weiten Teilen Europas nicht üblich. Der Mehraufwand durch Ausbringung des Insektizids mit Spezialtraktoren (Stelzentraktoren) ist nur in wenigen Fällen gerechtfertigt. Als ökologische Alternativen zum Insektizideinsatz bieten sich Bt-Präparate sowie Schlupfwespen an. Die Bekämpfung mit Bt-Präparaten ist schwierig (KLÖPFFER et al., 1999: 45f). Wie bei allen Bt-Applikationen muss aufgrund der kurzen Persistenz der Präparate der Zeitpunkt des Ausbringens günstig gewählt werden. Beim Maiszünsler kommt die Schwierigkeit hinzu, dass er nur im frühen Larvenstadium (Blattfraß) mit Bt erreichbar wäre. Ab dem Zeitpunkt, wo der Maiszünsler sich in die Blattader bohrt, ist er durch Bt nicht mehr bekämpfbar. Aus diesem Grund wird Bt nur vereinzelt gegen den Maiszünsler eingesetzt.

Bei starkem Maiszünslerbefall ist auch das Ausbringen von Schlupfwespen (*Trichogramma evanescens*), die den Maiszünsler parasitieren, sinnvoll. Der Wirkungsgrad ist zwar hoch, jedoch ist die Ausbringung der Kärtchen mit Schlupfwespeneiern sehr arbeitsaufwendig. Diese Methode wird deshalb nur in teurem Süßmais auf wenigen hundert ha in Österreich angewendet (KLÖPFFER et al., 1999: 45f).

Auch in den USA erfolgt in der überwiegenden Zahl der Fälle keine direkte chemische oder biologische Bekämpfung des Maiszünslers. Dies ist auch im Mittleren Westen des „Corn belts“ der Fall (OSTLIE et al. 1997 zit in ANDOW & HUTCHISON, 1998: 37f). Lediglich in den bewässerten Gebieten erfolgt (über die Bewässerung) eine Bekämpfung mit Insektiziden. Das „International Life Science Institut (ILSI)“ gibt an, dass auf ca. 5-10 % der Maisanbaufläche der USA Insektizide zur Bekämpfung des Maiszünslers eingesetzt werden (ILSI, 1998: 30f). Doch auch in den USA stellt sich die Frage, ob sich der Einsatz von Pestiziden ökonomisch lohnt:

„For example, European corn borer is a sporadic pest throughout the central and eastern Corn Belt. It is viewed as a relatively more consistent, but still sporadic, pest in the western Corn Belt, especially in the irrigated corn areas of Nebraska, Kansas, and Colorado. Annual survey data of actual infestation levels of European corn borer are generally lacking, but unpublished estimates by cooperative extension specialists in Nebraska are in agreement that economic infestations in the irrigated corn growing areas occur about 2–3 years out of 5 on most acres. As a result of hybrid improvement, average percentage yield losses in infested, untreated fields range from approximately 0 to 10 %. In some years a minimal number of fields can be found with as much as a 20–25 % yield loss and an average infestation of 4–6 borer larvae per plant. Clearly, this last scenario is a worst case. The estimated corrected average annual yield loss is still less than 5 % in non-Bt field corn“ (ILSI, 1998: 37f).

Die wirkungsvollste und effizienteste Alternative zur direkten Bekämpfung ist eine indirekte Bekämpfungsweise, das Strohschlegeln und sauberes Unterpflügen im Herbst. Der Wirkungsgrad liegt bei ca. 70-90 %. Aufgrund der Intensivlandwirtschaft und zur Vorbeugung der Bodenerosion erfolgt der Maisanbau in den USA zu 37,26 % ohne diese wirkungsvolle vorsorgeorientierte Maßnahme. Saatbettbereitung sowie Stoppelbearbeitung werden nach dem Prinzip der Minimalbodenbearbeitung (conservation tillage) (kein wendendes Pflügen) durchgeführt (CTIC, 2001).

Bei 100 % Befallsgrad (das heißt ein Maiszünsler pro Pflanze, es sind somit Befallsgrade über 100 % möglich) kommt es zu Ertragseinbußen von 5 bis 10 %.

5.2 Resistenz des Maiszünslers gegen Bt und Frequenz der Resistenzallele im Feld

5.2.1 Bt-Resistenz des Maiszünslers (*Ostrinia Nubilalis*) Laborversuche

Die überwiegende Anzahl der Untersuchungen bezüglich resistenter Insektenpopulationen gegen Bt-Mais konzentrieren sich auf den Maiszünsler. Wenige Untersuchungen gibt es für den „Fall armyworm“ oder „Corn earworm“ (LYNCH et al., 1999a; LYNCH et al., 1999b).

5.2.1.1 Problem der Selektion von Laborstämmen

Detaillierte Analysen von Laborselektionen des Maiszünslers zeigen mehrere Schwierigkeiten auf.

BOLIN et al. (1999) selektierten Maiszünslerlarven über mehr als 36 Generationen und mussten im Laufe des Versuches die Versuchsanordnung mehrmals verändern. Sie starteten ihre Selektionsserie indem die Nährmischung des Maiszünslers oberflächlich mit MVP (ein von Mycogen entwickeltes Bt-Präparat⁵) besprüht wurde. Ab F₂₂ wurde MVP in die Nährmischung eingemischt, da sich seit F₁₆ ein Resistenz-Plateau ausgebildet hatte. Da sich durch den Wechsel der Methode die Mortalität der Maiszünslerlarven „dramatisch“ (BOLIN et al., 1999: 1027f) erhöhte, lassen sich daraus zwei Schlüsse ziehen. Entweder die Maiszünslerlarven konnten eine Verhaltensresistenz entwickeln, indem sie verstärkt in die Nährmischung hinein bohrten, um so die Aufnahme größerer Toxinmengen zu vermeiden oder die Toxinkonzentration war durch die Beimischung signifikant höher (BOLIN et al., 1999,1027f). Die Frage, wie sich eine

⁵ CellCap system: Um die Persistenz von Bt-delta-Endotoxinen zu verlängern, entwickelte die Fa. Mycogen (San Diego, California) das CellCap-System. Diese Methode vergrößert die Persistenz der insektizid wirkenden Proteine auf den Blättern um das 3-4-fache. Dabei wird ein delta-Endotoxin tragendes Plasmid in das nicht pathogene – jedoch Blätter-bewohnende – Isolat von *Pseudomonas fluorescens* transferiert. Wenn die transgenen *P. fluorescens* Zellen im Fermenter weitervermehrt werden, werden die Endotoxine in Kristallform in einer Menge von 10–20% des totalen Zellproteins exprimiert. Das Fermentationsendprodukt sind intakte *Pseudomonas* Zellen, die ein oder mehrere delta-Endotoxin Kristalle beinhalten. Normalerweise besteht das Fermentationsprodukt aus Sporen und ungeschützten Kristallen. Es war, vorgesehen lebendige, Bt-Toxin exprimierende *P. fluorescens* auszubringen. Da es in den USA verboten war, 1991 gentechnisch veränderte Mikroorganismen auf den Markt zu bringen, wurden *P. fluorescens* Zellen mit chemischen Mitteln im Fermenter abgetötet, wodurch sich die Zellwand durch das Verbinden von Zellwandproteinen verdickte. Diese verdickte *P. fluorescens* Zelle dient als Kapsel für die delta-Endotoxine. Folgende zugelassene Präparate – die keine lebenden Zellen mehr beinhalteten -basieren auf dem CellCap System (kein Anspruch auf Vollständigkeit):

- MVP mit dem lepidopteren – spezifischen Protein cryIAC
- M-Track mit dem coleopteren – spezifischen Protein cryIIIA
- Migula mit dem lepidopteren – spezifischen Protein cryIAb.

Verhaltensresistenz in einer Laborpopulation vererben konnte, sodass trotz einer starken Anstiegs der Toxinkonzentration die Mortalität bei 64 % stagnierte, muss unbeantwortet bleiben.

Zudem musste ab F_{22} die Anzahl der Versuchstiere von 25 auf eine Maiszünslerlarve je Versuchsplot reduziert werden, da es zu Kannibalismus unter den Maiszünslerlarven kam.

Für die Abschätzung der Resistenzentwicklung unter Laborselektion noch bedeutsamer ist die Tatsache, dass die LD_{50} bzw. LD_{90} nicht kontinuierlich anstieg, sondern dass in allen untersuchten Kolonien die Mortalitätsrate der Maiszünslerlarven nach einem stetigen Rückgang in einer der darauffolgenden Generation wieder anstieg. So stieg im Stamm S-I die LD_{50} von 57,39 ng/cm² in der Generation F_{12} auf 3431,14 ng/cm² in Generation F_{16} an und ging bei Generation F_{20} auf 375,14 ng/cm² zurück. Starken Schwankungen war auch die LD_{50} des nicht selektierten Stammes⁶ unterworfen. Die LD_{50} lag bei Generation 9 bei 9,41 ng/cm², Generation 13 mit 29,30 ng/cm², Generation 14 mit 49,34 ng/cm², Generation 20 bei 6,72 ng/cm² und Generation 21 mit 11,42 ng/cm².

BOLIN et al. (1999) führen den Rückgang bzw. den nicht kontinuierlichen Anstieg der LD_{50} auf Inzuchtdepression zurück. Diese These wurde unterstützt durch eine Rückkreuzung in F_{36} mit dem nicht selektierten (Bt-sensiblen) Stamm, wodurch die Resistenz gegen das Bt-Toxin wieder anstieg.

HUANG et al. (1997) hatten in ihren Versuchen von Beginn an Bt-Toxine (in Form von Dipel, ein Bt-Präparat, das mehrere Bt-Toxine enthält) in die Nährmischung eingemischt, dadurch konnten sie keine Effekte der Verhaltensresistenz wie BOLIN et al. (1999) entdecken. Die Schwankungen der LD_{50} traten aber auch bei ihren Experimenten auf, wenngleich diese aufgrund der kürzeren Selektionszeit (7 Generationen) viel weniger stark ausgeprägt waren (HUANG et al., 1997).

5.2.1.2 Ergebnisse von Laborselektionen von Maiszünslerlarven

Im Freiland wurden bisher keine resistenten Maiszünslerlarven gefunden. Die vorliegenden Ergebnisse von Laborselektionen müssen im Lichte der oben beschriebenen methodischen Probleme entsprechend vorsichtig interpretiert werden.

HUANG et al. (1997) konnten resistente Laborstämme selektieren. 5 Stämme von 3 unterschiedlichen Regionen der USA wurden mit Dipel ES (ein Bt-Präparat) behandelt. Bei den Stämmen von Kansas erhöhte sich die LD_{50} nach 3 selektierten Generationen 35,8-fach nach 7 selektierten Generationen 72,9-fach. Maiszünslerlarven von Iowa hatten nach 9–14 Generationen eine 25- bis 35-fach erhöhte LD_{50} . Stämme aus dem Nordosten Kansas hatten nach 4 Generationen eine 16,2-fach erhöhte, nach 6 Generationen eine 35-fach erhöhte LD_{50} (HUANG et al., 1997).

Auf Basis dieser selektierten resistenten (R) und sensiblen Stämme (S) wurden folgende Kreuzungen durchgeführt:

- a) Maiszünsler des sensiblen (S) Stammes gepaart mit Individuen des resistenten Stammes (R x S) sowie (S x R).
- b) Weiters wurde die F_1 untereinander angepaart (F_1 x F_1).
- c) Rückkreuzungen der F_1 mit dem sensiblen Stamm
- d) drei wiederholte Rückkreuzungen zwischen heterozygot resistenten (RS) und empfindlichen (S) Individuen.

⁶ Bei den selektierten Stämmen wurden jeweils die Larven die 3 bzw. 7 Tage überlebten als Gründertiere der nächsten Generation herangezogen, beim nicht selektierten Stamm wurden jeweils Versuchstiere entnommen, die gegen Bt getestet wurden. Überlebende Larven wurden nicht in die Stammpopulation rückgeführt.

Die Nachkommen dieser Kreuzungen wurden mit 7 unterschiedlichen Bt-Konzentrationen, die in die Nährmischung eingemischt wurden, auf Resistenzeigenschaften (durch Bestimmung der Mortalität nach 5 Tagen) untersucht. Die LD₅₀ wurde statistisch ausgewertet. Auf Basis dieser Untersuchung vermuten HUANG et al. (1999b), dass die Resistenz in den selektierten Laborstämmen auf einem Gen – das unvollständig dominant autosomal vererbt wird – beruht. Die resistenten Maiszünslerlarven verursachten auf Bt-Mais im Glashaus deutlich größere Fraßschäden als sensible Stämme. Da die refuge/high-dose Strategie auf der Annahme beruht, dass die Resistenz rezessiv vererbt wird, erhalten diese Ergebnisse besondere Brisanz. Sollte die Resistenz des Maiszünslers gegen Bt-Mais auf einem dominantem Gen beruhen, wäre die refuge/high-dose Strategie nicht mehr länger die Methode erster Wahl. In diesem Fall sollte auf eine refuge/low-dose Strategie umgeschwenkt werden (ANDOW & HUTCHISON, 1998: 26f).

Aus diesen Ergebnissen mit Dipel kann naturgemäß nicht auf das Potential der Resistenz gegen Bt-Mais geschlossen werden. Auch die Feststellung, dass Maiszünsler, die gegen Dipel resistent sind, größere Fraßschäden auf Bt-Mais anrichten als empfindliche Maiszünsler, kann nicht als Indiz für eine deutliche Resistenzentwicklung von Maiszünsler gegen Bt-Mais gewertet werden. Entscheidend für die Entwicklung von Resistenzgenen ist das Überleben von Maiszünsler auf Bt-Mais mit nachfolgender Paarung. Dies konnte jedoch noch nicht gezeigt werden. Beim Kartoffelkäfer wurde beobachtet, dass sich Larven trotz einer 400-fachen Resistenz (im Vergleich zu sensiblen Laborstämmen) gegenüber dem Bt-Toxin cryIIIA auf Bt-Kartoffeln, die das gleiche Toxin exprimierten, nicht zu vollständig adulten Kartoffelkäfern entwickeln konnten. Es ist aus dieser Sicht sehr wahrscheinlich, dass Schädlinge extrem hohe Resistenzeigenschaften entwickeln müssen, um die hohen Konzentrationen in Bt-Pflanzen überwinden zu können (TABASHNIK et al., 2000).

BOLIN et al. (1999) selektierten über einen Zeitraum von 4 Jahren Maiszünslerlarven über mehr als 36 Generationen. Sie konnten einen deutlichen Anstieg in der Resistenz gegen das Bt-Präparat MVP (mit dem Toxin cryIAC) bereits nach 8 Generationen feststellen. In der F₁₄ wurde eine 162-fache Resistenz bei den selektierten Stämmen im Vergleich zu empfindlichen nicht selektierten Stämmen gefunden. Wobei hier jedoch die Möglichkeit einer Verhaltensresistenz (siehe oben) sehr wahrscheinlich ist. Dieses Resistenzniveau konnte über die folgenden 3 Generationen nicht gesteigert werden, danach wurde das Toxin in die Nährmischung hineingemischt, was einen deutlichen Abfall des Resistenzniveaus bewirkte (F₁₈ ca. 30-fache Resistenz im Vergleich zum nicht selektierten Stamm). Eine Kreuzresistenz der 4 selektierten Stämme gegen cryIAb war bis auf einen Stamm (16-fache Kreuzresistenz gegenüber empfindlichen Stamm) nicht ausgeprägt.

5.2.2 Frequenz der Resistenzallele

Einer der wichtigsten Parametern für die Wirksamkeit der refuge/high-dose Strategie ist eine geringe ($<1 \times 10^{-3}$) Frequenz des Resistenzallels. Um die Resistenzentwicklung des Maiszünslers zu überwachen, muss im Rahmen des Monitorings zuerst die Ausgangssituation (baseline) und anschließend die Veränderung des Resistenzniveaus im Vergleich zur Ausgangssituation erhoben werden.

Wie oben schon beschrieben ist die Erstellung einer „baseline“ und der Vergleich auf Basis der LD₅₀ sehr ungenau und führt erst zu einem späten Zeitpunkt, an dem das Resistenzniveau schon recht hoch ist, zu signifikanten Veränderungen. Aktuelle Arbeiten zur Erstellung der baseline ergaben zwischen Spanien und den USA erhebliche Unterschiede in der LD₅₀, weshalb darauf näher eingegangen wird.

GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000) sammelten je 2 Maiszünslerarten – European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) und Mediterranean corn borer (*Sesamia nonagroides*) – von den vier bedeutendsten Maisanbaugebieten in Spanien. In Spanien ist *Sesamia nonagroides* der be-

deutendere Schädling als *Ostrinia nubilalis*. Zudem bohrt sich *Sesamia nonagroides* gleich im ersten Larvenstadium in den Maisstängel ein und ist deshalb noch schwieriger als *Ostrinia nubilalis* zu bekämpfen (GONZÁLES-NÚÑEZ et al., 2000).

GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000) sammelten Larven des Maiszünslers durch Aufschneiden von Maisstängeln wenige Tage vor der Maisernte im Herbst 1998. Alle gesammelten Larven befanden sich oder begannen mit der Diapause nach der Sammlung. Dies wurde auf Basis der Entwicklungssperre im fünften Larvenstadium festgestellt. Die Diapause wurde durch Umgebungstemperatur von 28 °C sowie kontinuierlichem Lichtangebot gebrochen. Die sich daraus entwickelten adulten Tiere wurden angepaart und die Larven der F1 wurden folgendem Bioassay unterzogen:

Larven des ersten Entwicklungsstadiums (<24h alt) wurden auf eine Nährmischung mit oberflächlich besprühten cryIAb gesetzt und die Mortalität (keine sichtbare Reaktion) nach 7 Tagen bewertet. Das cryIAb Toxin (von Novartis zur Verfügung gestellt) wurde von einem bakteriellen Stamm *Bacillus thuringiensis kurstaki* HDI-9 gewonnen. Die Reinheit des Toxins betrug 25 %. Im Gegensatz zu den in Bt-Mais exprimierten cryIAb handelte es sich um eine nicht verkürzte Form des Toxins. *Sesamia nonagroides* war im Durchschnitt signifikant empfindlicher gegen cryIAb als *Ostrinia nubilalis*. Die LD₅₀ bei *Sesamia nonagroides* schwankte zwischen 23 und 70 ng/cm². Während die Werte der LD₅₀ bei *Ostrinia nubilalis* zwischen 104 und 109 ng/cm², also nur gering schwankten. Im Bereich der LD₉₀ ergaben sich stärkere Streuungen, wobei für *Sesamia nonagroides* die Werte zwischen 113 und 815 ng/cm² und für *Ostrinia nubilalis* zwischen 426 und 733 ng/cm² schwankten.

Die Ursachen der Unterschiede in der Empfindlichkeit zwischen *Sesamia nonagroides* und *Ostrinia nubilalis* sind kaum bekannt. GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000) vermuten, dass dies auf Unterschiede in der Inaktivierung oder Bindungsaktivität des Toxins im Darm zurückzuführen ist. Ein weiterer Grund könnte darin liegen, dass das Wirtsspektrum von *Ostrinia nubilalis* deutlich größer als jenes von *Sesamia nonagroides* ist. Insekten mit größerem Wirtsspektrum sollten – so die Theorie – über ein größeres Potenzial zur Entgiftung diverser Toxine verfügen als Insekten mit einem engen Wirtsspektrum (GONZÁLES-NÚÑEZ et al., 2000). Andere Faktoren wurden von den Autoren nicht angesprochen, aber es scheint naheliegend, dass die Unterschiede im Bereich der LD₅₀ auch auf einen unterschiedlichen Grad der Toxinaufnahme bzw. auf Unterschiede bei der Toxinvermeidung (siehe 5.2.1.1 oben) zurückzuführen sind. Auf die starken Schwankungen der LD₉₀, die z. T. mit den Werten der LD₅₀ im Widerspruch stehen, gehen GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000) leider nicht ein.

MARCON et al. (1999) sammelten Maiszünslers von 10 US Bundesstaaten und von Norditalien. Die Sammlung konzentrierte sich auf die bivoltine Z-Rasse der USA, da diese den Hauptanteil im mittleren Westen der USA ausmacht. Zusätzliche Sammlungen wurden an Orten durchgeführt, wo es dokumentierte Fälle der multivoltinen E-Rasse (North Carolina) und univoltine Z-Rassen (North Dakota) gab. Aus Italien wurde eine Laborkolonie, die über 20 Generationen im Labor kultiviert wurde, in die Untersuchung mit einbezogen. Es wurden junge Larven, Eipakete sowie weibliche Maiszünslers gesammelt. Die F₁ dieser Kolonien (in jenen seltenen Fällen, in denen die Nachkommenschaft zu gering waren, die F₂ bzw. F₃) mit mindestens 50 Gründereltern wurden folgendem Bioassay unterzogen:

Larven des ersten Entwicklungsstadiums (<24 h alt) wurden auf eine Nährmischung mit oberflächlich besprühten cryIAb oder cryIAC gesetzt und die Mortalität (Larven die innerhalb von 7 Tagen – durch starke Wachstumsverlangsamung – nicht über das erste Larvenstadium hinaus kamen und weniger als 1mg wogen) nach 7 Tagen bewertet. Das cryIAb Toxin (von Novartis zur Verfügung gestellt) wurde von einem bakteriellen Stamm *Bacillus thuringiensis kurstaki* HDI-9 gewonnen. Eine 98 %ige Kristallkonzentration des cryIAb wurde durch Zentrifugation (mittels Dichte-Gradienten) erreicht. Im Gegensatz zum in Bt-Mais exprimierten cryIAb handelte es sich um eine nicht verkürzte Form des Toxins. Das Toxin cryIAC auf Basis von MVP (siehe Fußnote 5 Seite 29) wurde einer Waschprozedur unterworfen und zentri-

fugiert. Das gereinigte cryIAC wurde für den Bioassay herangezogen. Im Gegensatz zu den Versuchen in Spanien waren die Werte der LD₅₀ für cryIAb und cryIAC sehr heterogen. Die Werte der LD₅₀ für cryIAb lagen zwischen 2,22 ng/cm² und 7.89 ng/cm². Die LD₅₀ für cryIAC schwankte zwischen 0,20 ng/cm² und 0,78 ng/cm². Ebenso starken Schwankungen unterlagen die Werte der LD₉₅ für cryIAb bei 9,59 ng/cm² und 57,67 ng/cm². Die Werte der LD₉₅ für cryIAC schwankten zwischen 1,15 ng/cm² und 4,53 ng/cm². Neben den signifikanten Unterschieden zwischen den Populationen gab es auch signifikante Unterschiede innerhalb einer Population zwischen unterschiedlichen Generationen. Sie betragen auf Basis der LD₅₀ das 2 bis 3-fache, auf Basis der LD₉₅ das 2 bis 4-fache für cryIAb. Für cryIAC schwankten die Werte zwischen den Generationen innerhalb einer Population geringer, ca. um das 2-fache. Das heißt, dass die Unterschiede zwischen den Generationen innerhalb von Populationen stärker schwankten als die Unterschiede zwischen den Populationen.

Vergleicht man die Werte von MARCON et al. (1999) mit den Werten von GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000), so lassen sich daraus beträchtlich Unterschiede in den Werten der LD₅₀ herauslesen. Es sind dies 2,22 bis 7.89 ng/cm² für MARCON et al. (1999) und ca. 100 ng/cm² für GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000). Diese Unterschiede sind vermutlich in der unterschiedlichen Bestimmung der Mortalität, wie auch in möglichen Unterschieden in der Konzentration des Toxins cryIAb zu suchen, wie GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000) vermuten. Die Werte für cryIAC mit einem nicht selektierten Stamm von BOLIN et al. (1999) liegen ebenso deutlich über jenen von MARCON et al. (1999). Es sind dies Schwankungen von 0,20 bis 0,78 ng/cm² bei MARCON et al. (1999) und 5,59 und 49,34 ng/cm² bei BOLIN et al. (1999). Diese Unterschiede können einerseits auf die Aufbereitung (Waschung und Zentrifugation) des Toxins cryIAC bei MARCON et al. (1999) bzw. auf Unterschiede in der Bestimmung der Mortalität (nach 7 Tagen bei MARCON et al. (1999) und nach 3 Tagen bei BOLIN et al. (1999) zurückzuführen sein. BOLIN et al. (1999) wechselten die Bestimmung der Mortalität ab Generation F₂₅ auf 7 Tage, jedoch auch ab F₂₂ von einer oberflächlichen Besprühung zu einer Einmischung des Toxins in die Nährmischung. Die hier angeführten Werte für BOLIN et al. (1999), MARCON et al. (1999) und GONZÁLES-NÚÑEZ et al. (2000) wurden alle durch Besprühen der Nährmischung mit Bt-Toxinen erreicht. Der Wechsel von oberflächlichem Besprühen der Toxine zu einem Untermischen führte bei BOLIN et al. (1999) zu stark verringerten LD₅₀ Werten.

Diese detaillierte Beschreibung der Versuchsdesigns soll zeigen, dass Werte zwischen den Labors kaum bzw. nicht vergleichbar sind, da geringe Abweichungen im Versuchsdesign zu erheblichen Unterschieden in den Ergebnissen führen können. Im Rahmen des Monitorings sind deshalb die Methoden exakt zu beschreiben und über den Überwachungszeitraum beizubehalten, um vergleichbare Werte zu erhalten. Zudem müssen bei der Interpretation von Ergebnissen die Schwankungsbreite zwischen den (nicht selektierten) Generationen einer Population ebenso berücksichtigt werden.

Die oben angeführten Methoden erlauben ein Monitoring der Resistenzentwicklung auf Basis der erstellten baseline. Diese Methode eignet sich gut, um Veränderungen der Resistenzentwicklung zu erkennen, wenn die Resistenz bereits auf einem sehr hohen Niveau ist. Für die Umsetzung und Feinsteuerung der refuge/high-dose Strategie sind jedoch sensiblere Methoden notwendig (siehe 4.1). Die sensibelste Methode stellt zur Zeit der F₂-screen (entwickelt von ANDOW & ALSTAD, 1998) dar. Anhand dieser Methode wurde die Frequenz des Resistenzallels für 2 Populationen des Maiszünslers in den USA abgeschätzt (ANDOW et al., 1998; ANDOW et al., 2000). Die Sammlung von befruchteten weiblichen Maiszünslern erfolgte mit Hilfe von Fallen während der 2. Flugperiode zwischen Ende August und Mitte September. Die Nachkommen jedes überlebenden, befruchteten Weibchens wurden als eine Linie behandelt. Die F₁ dieser Linien wurden untereinander (innerhalb einer Linie) angepaart und die F₂ auf Resistenz unter folgendem Bioassay getestet:

Frisch geschlüpfte (4–6 h alte) Larven der F₂ wurden auf Bt-Mais NK4640BT (welcher cryIAb exprimiert) im mittleren bis späten Vegetationsstadium gesetzt.

Zudem wurden bei ANDOW et al. (1998) frisch geschlüpfte (4–6 h alte) Larven auf eine Nährmischung mit untergemischtem cryIAb gesetzt. Als cryIAb Toxin wurde „Migula“ (CellCap von Mycogen (siehe Anmerkungen von Fußnote 5 Seite 29) eingesetzt. Es wurden vier cryIAb Konzentrationen der Nährmischung zugesetzt: 12 µg, 6,0 µg, 3,0 µg und 1,5µg/ml Nährmischung. Eine Larve wurde als resistent gewertet, wenn sie das 2. Larvenstadium auf Bt-Mais erreichte, als partiell resistent, wenn sie das 2. Larvenstadium auf der Nährmischung erreichte. Bt-Mais wurde im Intervall von 7, 10, 14 Tagen auf überlebende Larven untersucht, Fanden sich Fraßlöcher größer als 2mm im Durchmesser, so wurden Larven der gleichen Linie einem Wiederholungstest unterworfen.

Keine der Larven auf Bt-Mais und auf 12µg Toxin je ml Nährmischung erreichte das 2. Larvenstadium. Jene 6 Linien, die am längsten bei 12µg überlebt haben, wurden bei geringeren Konzentrationen getestet. Nur einige Larven einer Linie erreichten das 2. Larvenstadium. ANDOW et al. (1998) folgern daraus, dass in der getesteten Population keine Haupt-Resistenzallel vorliegen. Jedoch liegen Gene, die eine partielle Resistenz vermitteln, in der Häufigkeit von >0 und $< 20 \times 10^{-3}$ (bzw. nach einer Modifikation der statistischen Auswertung (ANDOW & ALSTAD, 1999) zwischen 1 und 15×10^{-3}) vor (95 % iges Konfidenzintervall).

Auch in der Population von Iowa (ANDOW et al., 2000) konnte keine Larve auf Bt-Mais das 2. Larvenstadium erreichen. Die Testung mit Nährmischungen ergab, dass 2 Linien das 2. Larvenstadium erreicht haben.

5.2.3 Verhaltensresistenz gegen Bt-Mais

In Laborversuchen wurden unterschiedliche Pflanzenteile an den Maiszünsler verfüttert. Dabei zeigten Pollen und Blätter eine 100 % Mortalität. Eine deutlich verringerte Mortalität (80 %) zeigte sich nach Fraß an den Blattachsen. Beim Kolben, bei den Lieschblättern und bei der Seide wurde im Vergleich zu isogenetischen Nicht-Bt-Sorten keine deutlich erhöhte Mortalität festgestellt. Dies lässt den Schluss zu, dass Larven, die nicht an den Blättern sondern direkt an den Lieschblättern und an der Seide fressen und in den Kolben einwandern, auf Bt-Pflanzen überleben können. 1999 wurde der Maiszünslerbefall in einem Maissortiment an zwei Bt-Maissorten und zwei Vergleichssorten ermittelt (MEISE et al., 2000). Bei der Eiablage gab es zwischen den Sorten nur geringe Unterschiede. Drei Wochen nachdem die ersten Fraßspuren in den Vergleichssorten gefunden wurden, hatten weniger als 5 % der Bt-Pflanzen geringe Fraßspuren an den Blättern. Zum gleichen Zeitpunkt waren 10 % der Kolbenspitzen befallen. Zur Ernte fanden sich im Stängel in ca. 10 % der Bt-Pflanzen Larven. Der Befall in den Vergleichssorten lag bei ca. 70–90 %. Ob die Larven aus den Kolben mit den im Stängel gefundenen Larven identisch waren, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da evtl. die Möglichkeit der Einwanderung von Larven aus 5 bzw. 8 Reihen entfernten Nicht-Bt-Sorten bestand. Die Labor- und Feldversuche zeigten, dass diese, als „tolerant“ bezeichneten, Bt-Mais-Linien eine effektive Bekämpfung des Maiszünslers ermöglichen. Eine hundertprozentige Befallsfreiheit ist aber nicht gewährleistet. Einzelne Larven, die zur Zeit der Kolbenentwicklung schlüpfen, können am Kolben und bei späterem Einwandern in den unteren Stängelteil überleben. Es konnte noch nicht geklärt werden, ob die Larven das Toxin in den Blättern wahrnehmen können und daher diese meiden oder ob die zunehmende Gewebehärte der Blätter die Larven veranlasst, weiches Gewebe wie die Kolbenspitze und die Seide aufzusuchen. Kurzfristig ist ein starker Befall von Bt-Maispflanzen durch diese Resistenzlücke nicht zu erwarten, aber langfristig sollte dieses Phänomen weiter beobachtet werden, da eine Vermeidung von toxischen Pflanzenteilen zu einer Verhaltensresistenz führen könnte. Unabhängig von der Verhaltensresistenz besteht die Gefahr, dass die Maiszünsler eine Toxin-Resistenz auf physiologischer Ebene entwickeln (MEISE et al., 2000).

5.3 Die Eignung der zugelassenen Bt-Mais-Linien für die refuge/high-dose-Strategie

Folgende Bt-Mais-Linien sind in der EU zugelassen:

1. Mais (*Zea Mays* L.) – Linie (CG 00256-176) Entscheidung der Kommission vom 23. Januar 1997 gemäß der Richtlinie 90/220/EWG (enthält: zwei Kopien eines synthetischen verkürzten Gens, das für ein Insekten abwehrendes Protein codiert, das den aktiven Teil des cryIAb Delta-Endotoxins darstellt, aus dem *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki*-Stamm HD1-9). Antragsteller: Novartis
2. Mais (*Zea mays* L., Linie MON 810) Entscheidung der Kommission vom 22. April 1998 gemäß der Richtlinie 90/220/EWG. Gen cryIAb des *Bacillus thuringiensis*, Unterart *kurstaki*. Antragsteller: Monsanto. Der Antragsteller hat eine Strategie entwickelt, um die Gefahr der Entstehung von Insektenresistenzen zu minimieren, und angeboten, die Kommission und/oder die zuständigen Behörden der Mitgliedstaaten über die Ergebnisse einschlägiger Überwachungsmaßnahmen zu unterrichten.
3. Mais (*Zea mays* L., Linie Bt-11) Entscheidung der Kommission vom 22. April 1998 gemäß der Richtlinie 90/220/EWG. Synthetisches Gen cryIAb des *Bacillus thuringiensis*, Unterart *kurstaki*, Stamm HD, Antragsteller: Novartis.

WALKER et al. (2000) untersuchten 1996 sechs unterschiedliche Bt-Mais-Linien (Event 176 – cry1Ab (Novartis), Bt11 – cry1Ab (Novartis), MON810 – cry1Ab (Monsanto), MON802 – cry1Ab (Monsanto), DBT418 – cry1Ac und CBH351 – cry9c). Nur die Bt-Mais-Linie Event 176 enthält einen Maispollen – spezifischen Promotor und einen Mais Phosphoenolpyruvate – carboxylase Promotor. Die Toxinexpression erfolgt in den Pollenkörnern und im grünen Pflanzengewebe. Alle anderen verwenden einen Cauliflower mosaic virus 35S Promotor, der das Toxin in allen Pflanzenteilen exprimiert.

Das Versuchsdesign von WALKER et al. (2000) umfasste Larven des Maiszünslers aus 5 verschiedenen Entwicklungsstadien, die sie jeweils zu den unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Bt-Mais-Linien auf Bt-Mais-Blätter setzten und die Fraßlöcher bzw. die Strecke der Einbohrung maßen. Gemäß ihren Ergebnissen entsprechen die Linien MON802, MON810, CBH351 den Kriterien der refuge/ultra-high-dose Strategie, sie zeigten in allen Entwicklungsstadien eine effektive Kontrolle von Maiszünslarven aller Stadien. Weder in den vegetativen noch in den reproduktiven Mais-Entwicklungsstadien wurden überlebende Larven gefunden.

Auf Event 176 konnten Larven des vierten Larvenstadiums im 8-Blattstadium im hohem Ausmaß überleben. Die Überlebensfähigkeit in späteren Reproduktionsstadien war deutlich geringer. Die Autoren sind der Ansicht, dass Event 176 sowohl im vegetativem Stadium als auch im Reproduktionsstadium die Kriterien der refuge/high-dose Strategie erfüllt. DBT418 hingegen erfüllt in den vegetativen Stadien die Anforderungen der refuge/high-dose Strategie nicht, in den späteren Reproduktionsstadien jedoch werden die Anforderungen der refuge/high-dose Strategie erfüllt (WALKER et al., 2000).

ONSTAD und GOULD (1998) weisen jedoch darauf hin, dass die Abnahme der Toxinmenge gegen Ende der Saison erheblich die Resistenzentwicklung beschleunigen könnte und mahnen eine sorgfältige Evaluierung der Toxinabnahme und ihrer Effekte auf die Überlebensraten von Maiszünslern ein.

5.4 Aufzeigen der Grenzen und Möglichkeiten von Resistenzmanagement

5.4.1 Umsetzung der Theorie in die Praxis

Einer der größten Unsicherheiten besteht in der Frage wie die Implementierung von Resistenzmanagementplänen sichergestellt werden kann. Die Umsetzung von der Theorie in die Praxis stellt sicherlich einen der zentralsten kritischen Kontrollpunkte dar. Ein Resistenzmanagementplan, der schwierig umzusetzen ist, der die Absicht des Landwirts Profite zu maximieren nicht berücksichtigt, läuft Gefahr nicht oder abgeändert implementiert zu werden (ILSI, 1998).

Gelingt es nicht, die Landwirte vom Wert einer Refuge-Fläche zu überzeugen, so wird sich die Resistenz binnen weniger Jahre in den Maiszünslerpopulationen manifestieren.

Die Modellberechnungen der refuge/high-dose Strategie gehen von einer konsequenten Anbaustrategie über 20 Jahre aus. Es ist unwahrscheinlich, dass Landwirte die Anbaustrategie über 15 bis 20 Jahre gleich belassen. Wie die Landwirte auf die Änderung des Befallsdrucks durch den Einsatz von Bt-Mais reagieren werden, ist ungewiss. Es ist durchaus möglich, dass Landwirte bei einer starken Reduktion des Befallsdrucks des Maiszünslers durch den Einsatz von Bt-Mais die Anbaufläche mit Bt-Mais verringern (HURLEY et al. 1997 zit in ONSTAD & GUSE, 1999), dies könnte sich positiv auf die Verzögerung der Resistenzentwicklung auswirken.

Das prinzipielle Problem bei der Implementierung der refuge/high-dose Strategie ist, dass jeder einzelne Landwirt einen persönlich wahrnehmbaren kurzfristigen Nachteil mit der Implementierung einer möglichst großen Refuge-Fläche hat. Der damit verbundene langfristige Vorteil entsteht nur dann, wenn alle Landwirte einer Region ebenfalls eine Refuge-Fläche implementieren. Dies ist zwar kommunizierbar, appelliert jedoch an die Solidarität der Landwirte untereinander. Zudem ist die Frage, ob die Implementierung einer Refuge-Fläche so etwas wie positiven Vorbildcharakter ausstrahlt oder eher als unnötig innerhalb einer Gruppe von Landwirten angesehen wird. Aus den Berichten des Landwirts Mark LIPSON am US EPA/USDA Workshop (US EPA, 1999b: 14f) geht hervor, dass die Implementierung von Resistenzmanagementplänen eines erheblichen Aufwandes bedarf um bei Landwirten akzeptiert zu werden:

„On a practical level, the theoretical nuances of refugia design seem somewhat beside the point. Despite the verbal commitments being made to „grower practicality,“ organic growers that I have talked to are deeply skeptical about implementation of IRM (insect resistance management) plans. What they are seeing and hearing from their neighbors stirs a great deal of doubt about the willingness of growers to comply with refuge recommendations. In some coffee shop discussions the idea of planting refuges to encourage target pest survival reportedly does not even pass the „laugh test.“ The magnitude of grower reluctance to implement this strategy is probably being greatly underestimated or simply discounted“ (Mark LIPSON, US EPA/USDA Workshop (US EPA, 1999b: 14f)).

5.4.2 Eingeschränkte Überprüfungsmöglichkeit der Gültigkeit des Modells in der Praxis

Ein Problem der refuge/high-dose Strategie ist, dass ihre Gültigkeit bisher lediglich anhand von Computersimulationsmodellen gezeigt werden konnte. Um die refuge/high-dose Strategie experimentell zu überprüfen, müsste sie großflächig getestet werden. Man müsste in einem hohen Ausmaß resistente Insektenpopulationen freisetzen, anhand derer man die Veränderung der Frequenz der Resistenzallele bestimmen kann. Die Freisetzung von resistenten Insektenpopulationen stößt jedoch auf große Bedenken seitens der Landwirte, könnte sie die Resistenzentwicklung erst richtig in Schwung bringen. SHELTON et al. (2000) waren die

ersten, die dieses Problem insofern umgingen, als sie auf einer Versuchsfläche im Staat New York – wo die Kohlmotte den Winter nicht überstehen kann – Bt-resistente Kohlmotten freisetzen und Bt-Brokkoli mit unterschiedlichen Refuge-Flächen anbauten. Sie setzten resistente Kohlmotten mit einer bekannten Allel-Frequenz frei und überprüften, wie sich die verschiedenen Refuge-Flächen auf die Frequenz der Resistenzallele sowie auf die Dichte der Kohlmottenpopulation auswirkte. Aus „Gründen der Praktikabilität“ mussten sie – obwohl sie wussten, dass die refuge/high-dose Strategie auf niedrigen Anfangsfrequenzen von Resistenzallelen basiert – Insekten mit einer hohen Frequenz an Resistenzallelen (120×10^{-3} und 800×10^{-3}) freisetzen. Aufgrund dieser Tatsache konnten sie nur gewisse Aspekte der refuge/high-dose Strategie überprüfen (GOULD, 2000). Das zentrale Ergebnis dieser Studie ist, dass eine separierte Refuge-Fläche deutlich effizienter als eine Sortenmischung die Resistenzentwicklung verzögerte. Überraschenderweise war die Frequenz der Resistenzallele am Versuchsende geringer als zu Versuchsbeginn. Die Autoren führten dies auf einen Verdünnungseffekt durch Zuwanderung empfindlicher Larven aus dem Umland zurück. Die Ergebnisse im Glashaus zeigten keinen Verdünnungseffekt bei der Frequenz der Resistenzallele (SHELTON et al., 2000).

6 NICHT-ZIELEFFEKTE VON BT-PFLANZEN (ÖKOTOXIKOLOGIE)

6.1 Ausgewählte Nicht-Zieleffekte von Bt

6.1.1 Anreicherung des Bt-Toxins im Boden

TAPP & STOTZKY (1995) zeigten, dass cryIIIA-Proteine an Tonmineralen (Montmorillonit oder Kaolinit) im Boden angereichert werden. Durch die Adsorption und Bindung der Toxinproteine an Tonpartikel, bleibt ihre insektizide Wirkung bis zu 234 Tage (der längste untersuchte Zeitraum) erhalten (KOSKELLA & STOTZKY, 1997) und wird manchmal sogar vergrößert (TAPP & STOTZKY, 1995).

6.2 Ausgewählte Nicht-Zieleffekte von Bt-Pflanzen

Bei Laborversuchen mit transgener Bt-Baumwolle konnte ein signifikant höherer Besatz an Bakterien und Pilzen im Boden festgestellt werden (DONEGAN et al., 1995). Verglichen wurden folgende Varianten: 1) Boden, 2) Boden und Bt-Toxin, 3) Boden und Baumwollblätter, 4) Boden und Baumwollblätter und Bt-Toxin, 5) Boden und transgene Bt-Baumwollblätter (aus drei Linien). Zwei dieser Linien verursachten ein signifikant höheres Populationsniveau von Bakterien und Pilzen. Weder die dritte transgene Linie noch die Variante mit dem besprühten Bt-Toxin zeigten erhöhte Populationswerte. Aufgrund des Fehlens von Effekten bei Bt besprühten Pflanzen und der dritten transgenen Linie führen DONEGAN et al. (1995) diese Unterschiede auf Veränderungen in der Pflanze zurück, die durch den Prozess der gentechnischen Veränderung oder den Prozess der Gewebekultur entstanden sind.

SAXENA et al. (1999) wiesen nach, dass Bt-Mais über Wurzelexudate, Bt-Toxine in den Boden (Rhizosphäre) abgibt. Die daraus gewonnenen und gereinigten Toxine zeigten volle Wirksamkeit gegenüber Maiszünslerlarven. Dies ist besonders vor dem Hintergrund der Untersuchungen (über die Bt-Toxin Anreicherung im Boden) von TAPP & STOTZKY (1995) zu beachten (siehe 6.1.1).

6.3 Nicht-Zieleffekte von Bt-Mais

6.3.1 Florfliegenlarve (*Chrysoperla carnea*)

In tritrophischen Laborstudien wurden Effekte von Bt auf die Florfliegenlarve (*Chrysoperla carnea*) gemessen. Durch das Verfüttern von Maiszünslerlarven, die auf transgenem Bt-Mais herangezogen wurden, erhöhte sich die Larvalmortalität des Nützlings auf das Doppelte (HILBECK et al., 1998). Eine Kontrollvariante mit konventionellen Bt-Pestiziden wurde nicht durchgeführt.

In einer tritrophischen Laborarbeit mit Bt-Mais (cryIAb) und *Anaphothrips obscurus* (*Thysanoptera: Thripidae*), und dem Räuber (Predatoren) *Orius majusculus* (*Heteroptera: Anthocoridae*) konnten keine Unterschiede zwischen Bt-Mais und der isogenen Kontrollpflanze gefunden werden (ZWAHLEN et al., 2000). Die Gesamtmortalität war gering. Die Methode sollte deshalb nach Ansicht der Autoren als Standardtestverfahren zur Abschätzung von Nicht-Zieleffekten von transgenen Pflanzen auf kleine Predatoren (vor der Registrierung) herangezogen werden.

6.3.2 Monarchfalter (*Danaus plexippus*)

LOSEY et al. (1999) führten in den USA Laborversuche mit dem Monarchfalter (*Danaus plexippus*) und Pollen von Bt-Mais durch. Eine in den USA häufig vorkommende Art der Gattung Schwalbenwurzgewächse (*Asclepias curassavica*, engl. Milk weed) wurde mit Pollen von transgenem Bt-Mais sowie mit Pollen einer normalen (nicht-transgenen) Hybrid-Mais-Sorte bestäubt, und zwar in jener Konzentration, die den natürlichen Bedingungen im Freiland entspricht. *Asclepias curassavica* (engl. Milk weed) wächst in der Nähe von Maisfeldern und ist (laut LOSEY et al., 1999) die ausschließliche Nahrungspflanze des Monarchfalters. Die Pollenverbreitung bei Mais dauert 8–10 Tage und findet in den USA (Corn belt) zwischen Ende Juni und Mitte August statt, jener Zeit, in der die Larven des Monarchfalters auf den Blättern des Milk weeds fressen. Auf unterschiedlich präparierte Blätter wurden jeweils fünf (drei Tage alte) Larven des Monarchfalters gesetzt. Die Versuchsdauer betrug jeweils 4 Tage. Diese Versuchsanordnung wurde in 5-facher Wiederholung durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den beiden Versuchsvarianten waren deutlich. Die Larven des Monarchfalters in der Variante mit Bt-Pollen fraßen weniger, wuchsen langsamer und hatten eine höhere Mortalität (LOSEY et al., 1999).

HANSEN et al. (2000) publizierten ein Jahr später Ergebnisse von Labor- und Freilandversuchen. In dieser Studie wurden Blätter von *A. syriac* (milkweed) an Larven des Monarchfalters verfüttert, die Pollen von Bt-Mais (Event 176 und Bt11) und Nicht-Bt-Mais aufwiesen.

Folgende Effekte wurden mit Pollenbelag natürlichen Ursprungs (er wurde nicht künstlich auf die Blätter von *A. syriac* appliziert) beobachtet:

Nach 48 h zeigten Larven auf Blättern mit Bt-Pollen eine Mortalität von 20 %, Larven auf Blättern mit Nicht-Bt-Pollen wiesen dagegen 0 % Mortalität auf. Blätter, von denen Pollen abgewaschen wurde, wiesen eine Mortalität von 3 % nach 48 h auf.

Die Mortalität korrelierte nicht mit der Zahl der Pollenkörner/cm². Mortalität wurde beobachtet bei 10-306 transgenen Pollenkörner/cm². Die durchschnittliche Pollendichte auf den Blättern von *A. syriac* lag bei 74 Pollenkörner/cm² für Event 176 und bei 36 Pollenkörner/cm² für Nicht-Bt-Mais.

Folgende Effekte wurden mit künstlich applizierten Pollendichten, die im Feld erreicht werden können erzielt:

• Larven im Alter von 12-36 h

- Bei Pollendichten von 1.300 Pollenkörner/cm² – welche bei ruhigen Windverhältnissen und keinem Regen möglich sind (HANSEN et al., 2000) – lag die Überlebensrate von Monarchlarven nach 120 h bei 88 % bei Nicht-Bt-Mais, bei 44 % für Bt11 und 31 % für Event 176.
- Bei Pollendichten von 135 Pollenkörner/cm² (welche im Feld gemessen wurden, HANSEN et al., 2000) lag die Überlebensrate von Monarchlarven nach 120 h bei 100 % bei Nicht-Bt-Mais, bei 75 % für Bt11 und 63 % für Event 176.
- Keine Unterschiede zwischen den drei Mais-Pflanzen fanden sich bei Pollendichten von 14 Pollenkörner/cm².

• Larven im Alter von < 12h

- Bei Pollendichten von 1.300 Pollenkörner/cm² lag die Überlebensrate von Monarchlarven nach 120 h bei 40 % bei Nicht-Bt-Mais, bei 40 % für Bt11 und 30 % für Event 176.
- Bei Pollendichten von 135 Pollenkörner/cm² lag die Überlebensrate von Monarchlarven nach 120 h bei 100 % bei Nicht-Bt-Mais, bei 40 % für Bt11 und 30 % für Event 176.
- Keine Unterschiede zwischen den drei Mais-Pflanzen fanden sich bei Pollendichten von 14 Pollenkörner/cm².

Neben den direkten letalen Effekten, wurden keine subletalen Effekte beobachtet. Doch HANSEN et al. (2000) sprechen sich für detailliertere Studien aus, um subletale Effekte zu messen. Denn ein verringerter Fettgehalt bzw. verkürzte Flügellängen könnten dazu führen, dass Monarchfalter ihre mehrere tausend km entfernten Winterquartiere in Mexiko nicht erreichen und so indirekt die Mortalität erhöhen.

Die Aussage, dass Insektizide den Monarch und andere Nützlinge noch stärker schädigen als Bt-Mais (z. B. PIMENTEL & RAVEN, 2000), lassen HANSEN et al. (2000) nicht gelten, da Insektizide in IOWA nach Berechnungen der Autoren lediglich auf 2 % der Maisfläche ausgebracht wurden (HANSEN et al., 2000). Selbst die industriennahe Vereinigung „International Life Sciences Institute (ILSI)“ publizierte, dass lediglich auf 5-10 % der Flächen Insektizide ausgebracht werden (ILSI, 1998: 30f).

Die Ergebnisse von HANSEN et al. (2000) und LOSEY et al. (1999) wurden in der „scientific community“ heftig angegriffen (HODGSON, 1999; NIILER, 1999; PIMENTEL & RAVEN, 2000; HODGSON, 2000). Man unterstellte ihnen starke methodische Mängel, frühzeitige Publikation der Ergebnisse ohne genau zu wissen in welchem Ausmaß Monarchfalterlarven auf „milkweed“ in unmittelbarer Nachbarschaft von Bt-Mais fressen. Ebenso unbekannt sei das Mobilitätsverhalten, ohne diese Kenntnis könne man keine Aussagen über den Gefährdungsgrad des Monarchfalters treffen. Erzwungene Fütterung im Labor mit Bt-Mais-Pollen auf „milkweed“ spiegle nicht die Realität wieder (HODGSON, 1999) NIILER, 1999; HODGSON, 2000. Wenn man sich vergegenwärtigt, dass alle Untersuchungen auf Nicht-Zieleffekte von Pflanzenschutzmitteln auf ähnlicher wissenschaftlicher Basis erfolgen, und das Konzept der Testung von ausgewählten „keystone species“ nur ein unbefriedigendes Konzept darstellt (siehe auch MÜLLER, 2000), um die ungeheure Vielfalt an möglichen Nebenwirkungen methodisch im Labor bewältigen zu können, so erscheint die heftige Kritik der Schwachstellen in den Monarchstudien als unangemessen und unausgewogen.

Im Gegensatz zu den unzähligen Studien und Kommentaren zu den methodischen Schwachstellen von Experimenten, die nachteilige Effekte von Bt-Pflanzen erbracht haben, gibt es bisher lediglich eine Studie, die die methodischen Schwachstellen jener Berichte analysiert, die keine Effekte von Bt-Pflanzen auf Nicht-Zielorganismen gefunden haben (HILBECK et al., 2000). Ergebnis dieser Untersuchung war, dass es – bei jenen Versuchen, die keine negativen Wirkungen auf Nicht-Zielorganismen fanden – eine Reihe von erheblichen methodischen Schwachstellen gab.

VILLIGER (1999) analysierte in seiner Studie das Gefährdungspotential einheimischer Schmetterlingsarten in der Schweiz. Er kommt zum Schluss, dass 124 Tagsschmetterlingsarten potentiell (Überschneidung des Maispollenflugs mit der Larvenentwicklung) gefährdet sind. Wie stark diese Arten den Bt-Pollen ausgesetzt wären, kann man derzeit nicht voraussagen. Ebenso wenig lässt sich derzeit prognostizieren, wie empfindlich die aufgelisteten Arten auf Bt-Pollen reagieren würden. Nur von wenigen Arten ist bekannt, dass sie empfindlich auf Bt-Präparate sind: Der Kleine Fuchs (*Aglais urticae*), der Trauermantel (*Nymphalis antiopa*), der Baumweissling (*Aporia crataegi*), der Grosse Kohlweissling (*Pieris brassicae*) und der Kleine Kohlweissling (*Pieris napi*) – von ihnen allen weiss man, dass sie anfällig auf ein *Bt thuringiensis* – Präparat sind (KRIEG, 1986, zitiert in VILLIGER, 1999: 32f).

7 EMPFEHLUNGEN FÜR DIE IMPLEMENTIERUNG EINES RESISTENZMANAGEMENTPLANS

7.1 Einleitung

Die Implementierung eines Resistenzmanagementplans umfasst zwei wesentliche Teilbereiche. Im Rahmen eines „politischen Resistenzmanagementplans“ müssen die Ziele, Leitlinien und alle organisatorischen Fragen abgeklärt werden. Im „wissenschaftlichen Resistenzmanagementplan“ müssen die politischen Zielvorgaben in konkrete Empfehlungen über das Design des Resistenzmanagements münden. Vielfach werden diese strukturell unterschiedlichen Inhalte miteinander vermischt. Im Folgenden wird auf die wichtigsten Gesichtspunkte näher eingegangen.

7.2 „Politischer“ Resistenzmanagementplan

7.2.1 Übersicht

- **Abklärung der Verantwortlichkeiten**
 - Abklärung der Verantwortlichen für Zielvorgaben und Leitlinien für die Entwicklung des Resistenzmanagementplans
 - Abklärung der Verantwortlichen für die Erstellung und Begutachtung des Resistenzmanagementplans
 - Abklärung, wie der Resistenzmanagementplan implementiert wird und wie die Umsetzung politisch überwacht wird (politische Erfolgskontrolle, das heißt alle Landwirte die Bt-Mais anbauen, halten sich an die Vorgaben des Resistenzmanagementplans)
 - Abklärung der Verantwortlichkeiten für Monitoring.
- **Politische Zielvorgaben und organisatorische Umsetzung**
 - Zielvorgaben und Leitlinien für die Entwicklung des Resistenzmanagementplans
 - Strategie zur Implementierung des Resistenzmanagementplans
 - Umsetzung des Wechsels von Resistenzmanagementstrategien aufgrund des Erreichens von Schwellenwerten
 - Umsetzung des zeitlich begrenzten oder unbegrenzten Verbotes des Anbaus von Bt-Mais bei Erreichen der Abbruchkriterien
 - Festlegen, wer die Kosten des Resistenzmanagementplans (seiner Erstellung, seiner Implementierung und seiner Kontrolle) übernimmt
 - Überwachung der gesetzten Maßnahmen.

Folgende Punkte werden näher erläutert:

7.2.2 Zielvorgaben und Leitlinien für die Entwicklung des Resistenzmanagementplans

Die Grundlage jedes Plans ist eine klare Zieldefinition. Insbesondere bei Resistenzmanagement muss die Zieldefinition klar geregelt sein, da sich alle weiteren Maßnahmen von dieser Definition ableiten.

Soweit bekannt, gehen alle wissenschaftlichen Modelle (ALSTAD & ANDOW, 1995; IVES et al., 1996; ONSTAD & GOULD, 1998) davon aus, dass Resistenzmanagementstrategien die Resistenzentwicklung lediglich hinauszögern, jedoch nicht verhindern können. Es ist deshalb klar zu definieren, wie lange die Resistenzentwicklung hinausgezögert werden soll.⁷ Wichtig ist die Festlegung, auf wieviel Jahre die Resistenzentwicklung hinausgezögert werden soll. Da es aber unterschiedliche Ansichten über den Begriff „Resistenzentwicklung“ geben kann, ist ein Schwellenwert anzugeben, der das Ziel klar definiert. So könnte z. B. der Schwellenwert der Frequenz von Resistenzallelen in einer Feldpopulation mit 300×10^{-3} angegeben werden. Das Ziel könnte folgendermaßen lauten:

„Innerhalb von 40 Jahren darf die Frequenz von Resistenzallelen in einer Feldpopulation 300×10^{-3} nicht überschreiten.“

Der nächste wichtige Punkt ist welchen Stellenwert man diesem Ziel gibt. Oder indirekt formuliert: Welche ethischen Leitlinien werden bei der Erstellung und Umsetzung des Resistenzmanagementplans vorgegeben? Wird der Stellenwert des Ziels sehr hoch angesetzt, so wird man eher einen Vorsorge orientierten Ansatz wählen. Das heißt, dass alle Unsicherheiten bei der Modellerstellung so berücksichtigt werden, dass sie die Erreichung des Ziels nicht gefährden.

Hat die Erreichung des Ziels einen mittleren oder untergeordneten Stellenwert, so wählt man einen neutralen, oder „best case“ Ansatz mit dem das Ziel gerade noch erreicht werden kann.

Natürlich kann man als Zielgröße auch mehrere Werte für die Verzögerung der Resistenzentwicklung vorgeben, z. B. 20 Jahre Minimum und 100 Jahre Maximum, bzw. 40 Jahre Minimum, 70 Jahre durchschnittlich usw. Am sinnvollsten ist die Wahl eines Minimumwertes, der auch unter „worst case“ Bedingungen sicher erfüllt werden kann. Je klarer das Ziel und je klarer die Leitlinien für die Zielumsetzung formuliert werden, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass das Ziel effizient erreicht wird.

7.2.3 Strategie der Implementierung des Resistenzmanagementplans

Im wissenschaftlichen Teil des Resistenzmanagementplans werden die Mindestanforderungen an das Resistenzmanagement sowie Schwellenwerte festgelegt. Im politischen Teil wird festgelegt, wie diese wissenschaftlichen Vorgaben die Landwirte erreicht (Aussendungen, Berater vor Ort etc.) und wie die Implementierung eingefordert und eventuell auch überwacht wird. Es ist auch abzuklären, welchen Beitrag die Industrie organisatorisch und/oder finanziell bei der Implementierung bzw. Umsetzung leistet. In jedem Teilbereich sind klar die Verantwortlichkeiten und im Sinne des Qualitätsmanagement kritische Kontrollpunkte festzulegen. Ziel ist es, die Implementierung des Resistenzmanagementplans effizient zu gewährleisten, sowie im Falle des Fehlschlags der Implementierung des Resistenzmanagementplans die Ursachen hierfür zu identifizieren und Alternativvorschläge zu erarbeiten (politisches Monitoring). Ein sicherlich effizienter Weg für die Implementierung und Überwachung des Resistenzmanagementplans ist die klare und unmissverständliche Formulierung von Abbruchkriterien, sowie die Aussendung klarer Signale, dass bei Erreichen der Abbruchkriterien die entsprechenden Maßnahmen unverzüglich exekutiert werden und deren Einhaltung überwacht wird. In diesem Fall könnte man die organisatorische Umsetzung gänzlich der Industrie überlassen. Lediglich der Teil des wissenschaftlichen Monitorings müsste in unabhängigen (wissenschaftlichen bzw. staatlichen) Institutionen verbleiben. Die Umsetzungsstrategie brächte sowohl für die staatlichen Institutionen als auch für die Industrie Vorteile. Seitens der staatlichen Institu-

⁷ Letztlich ist die Unterscheidung in „Verhinderung“ und „Verzögerung“ rein philosophisch. Denn je nach Zeitrahmen des Betrachters ist eine 100 jährige Verzögerung wie sie z. B. ONSTAD und GOULD (1998) berechnet haben, auch eine sehr effektive Verhinderung der Resistenzentwicklung von Insekten. Das gleiche kann auch für kürzere Zeitrahmen gesagt werden.

tionen würden erhebliche Kosten in der Verwaltung (Aussendung, Überwachung etc.) einspart, ohne auf die Zielerreichung verzichten zu müssen. Die Industrie trägt zwar die Kosten der Umsetzung, hat jedoch den Vorteil, die Implementierung effektiv und direkt umsetzen zu können. Zum Beispiel besteht die Möglichkeit, Landwirte bei Kauf von Bt-Mais-Saatgut zum anteilmäßigen Kauf von Nicht-Bt-Mais-Saatgut zu verpflichten udgl. Die Industrie hat dadurch die Umsetzung in der eigenen Hand.

7.3 Wissenschaftlicher Resistenzmanagementplan

Das Resistenzmanagement umfasst zwei Aspekte, die nicht losgelöst voneinander betrachtet werden können und doch zwei unterschiedliche Funktionen aufweisen. Der erste Aspekt betrifft die Umsetzung des Resistenzmanagementplans, der auf Basis eines Modells entwickelt wird. Das Monitoring dient dazu, die Dynamik der Resistenzentwicklung zu evaluieren und bei Erreichen des auf Basis des Modells formulierten/berechneten Schwellenwertes Aktionenhandlungen (Vergrößerung der Refuge-Fläche, Aussetzung des Anbaus von Bt-Mais) auszulösen. Das Monitoring sichert die Zielerreichung nach den Vorgaben des Resistenzmanagementplans.

Der zweite Aspekt betrifft das Modell, das für die Erstellung des Resistenzmanagementplans herangezogen wird. Monitoring kann auch dazu dienen um kontinuierlich das Modell zu verfeinern, wodurch Schwellenwerte und Aktionspläne eine Änderung erfahren (Hypothesentest).

Ein Resistenzmanagementplan umfasst deshalb folgende Gesichtspunkte:

- *Festlegung eines Resistenzmanagementplans.*
- *Schwellenwerte*, bei deren Erreichen andere Resistenzmanagementstrategien implementiert werden (z. B. bei Vorliegen eines dominanten Resistenzallels erfolgt ein Wechsel von einer refuge/high-dose Strategie zu einer refuge/low-dose Strategie.).
- *Erstellung eines Basismodells*, von dem Empfehlungen (Mindeststandards) für die geeignetste Resistenzmanagementstrategie abgeleitet werden.
- *Design und Mindestgröße* der Refuge-Fläche für unterschiedliche Phasen der Resistenzentwicklung (eventuell für spätere Phasen sind auch Anforderungen an die Höhe und die Expressionsdauer des Toxins in den Pflanzengewebe festzulegen).
- *Resistenzmanagementstrategie 1.*
- *Resistenzmanagementstrategie 2* ab Erreichen des ersten Schwellenwertes bzw. bei geänderten Rahmenbedingungen (z. B. Resistenz wird anstelle von rezessiv dominant vererbt).
- *Resistenzmanagementstrategie 3* ab Erreichen des zweiten Schwellenwertes usw.
- *Festlegung von Abbruchkriterien*: Wenn absehbar ist, dass die Mindestzielvorgabe (z. B. innerhalb von 20 Jahren soll Frequenz von Resistenzallelen in einer Feldpopulation niedriger als 300×10^{-3} liegen) mit Resistenzmanagementstrategien nicht mehr erreicht werden kann, so ist der Anbau von Bt-Mais-Linien zu verbieten oder für eine gewisse Zeitspanne auszusetzen. Die Kriterien werden so festgesetzt, dass der Abbruch rechtzeitig erfolgt, damit das Ziel nicht gefährdet wird.
- *Festlegung des zeitlichen Intervalls und der Methoden des Monitorings* (aus heutiger Sicht stellt der F_2 -screen, die beste (da sensibelste) Methode zur Abschätzung der Frequenz von Resistenzallelen in der Feldpopulation dar). Daneben ist auch abzuklären, welche Parameter noch zu erheben sind: z. B. Mobilitätsverhalten des Maiszünslers, Wirkungen auf Predatoren bzw. Parasiten des Maiszünslers (Monitoring der Veränderung der natürlichen Mortalitätsfaktoren), da dies ebenfalls die Effektivität beeinflussen kann (Erfolgskontrolle des Resistenzmanagementplans).

- *Festlegung der offenen Fragen* (wie z. B. Vor- und Nachpaarungsmobilitätsverhalten des Maiszünsler)
- *Festlegung des zeitlichen Intervalls*, mit dem *Erkenntnisse aus dem Monitoring* und *neue wissenschaftliche Erkenntnisse* die ursprünglichen Modellberechnungen beeinflussen und
- *Abklären*, ob der Resistenzmanagementplan an neue Erkenntnisse adaptiert wird (Wissenschaftliche Erfolgskontrolle – stimmt Theorie des Resistenzmanagementplans mit den biologischen Gegebenheiten am Feld überein – Erfolgskontrolle der Hypothesen des Resistenzmanagementplans).

7.4 Monitoring der Frequenz von Resistenzallelen

Die „Expert Group on monitoring for insect resistance to Bt-toxins“ hatte im Auftrag der EU-Kommission im April 1998 ein Monitoring Regime fertiggestellt (Draft protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize, siehe Anhang 1), worin detailliert eine gemeinsame Vorgangsweise festgelegt wurde.

Die wichtigsten Punkte:

1. Festlegung von geographisch verschiedenen (kein Genaustausch) Populationen des Maiszünsler,
2. Festlegung der Ausgangsempfindlichkeit („baseline“) des Maiszünsler gegen Bt,
3. Identifikation von Änderungen in der Empfindlichkeit des Maiszünsler gegen Bt durch kontinuierliches Monitoring,
4. Abschätzung der Resistenzentwicklung des Maiszünsler anhand Selektion mit Bt über 4 Generationen,
5. Übermittlung der nationalen Daten an europäische und nationale Behörden.

Die Testung der „baseline“ erfolgt mittels 5 verschiedener Konzentrationen, die ca. 10, 30, 50, 70 und 90 % Mortalität des Maiszünsler verursachen.

Die Abschätzung der Resistenzentwicklung erfolgt anhand einer Dosis, die zwischen 70 und 80 % Mortalität (= LD₇₀₋₈₀) verursacht.

Diese Verfahren sind wenig sensibel, um die Änderung der Frequenz der Resistenzallele festzustellen, wenn die Frequenz niedrig (d. h. $< 1 \times 10^{-3}$) ist (ANDOW & ALSTAD, 1998). Diese Verfahren ergeben erst signifikante Änderungen ab einer Frequenz von 100×10^{-3} (ROUSH & MILLER, 1986; ANDOW & ALSTAD, 1998).

Das „SCIENTIFIC COMMITTEE ON PLANTS“ empfiehlt im Rahmen ihrer Begutachtung des Monitoringregimes (siehe Anhang 2) die Anwendung einer LD₉₅ sowie den F₂-screen. Ebenso kritisch hinterfragt, wurde die im „Draft protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize“ festgelegte Methode für die Sammlung von Maiszünsler im Feld, sowie die Unklarheit, welche theoretischen Überlegungen (Modelle) dem Monitoringregime zugrunde liegen bzw. anders ausgedrückt: Im „Draft protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize“ wird zwar vorgegeben, wie man Veränderungen misst, jedoch fehlen Anleitungen, wie die Veränderungen hinsichtlich der Resistenzentwicklung zu interpretieren sind.

Es ist deshalb notwendig, das „Draft protocol for the monitoring of European Corn Borer resistance to Bt-maize“ nochmals zu überarbeiten und es an aktuelle Methoden (F_2 -screen entwickelt von ANDOW & ALSTAD, 1998) und Modellweiterentwicklungen anzupassen. Wichtige Detailpunkte die noch zu klären sind:

- Wahl der Methode (F_2)
- Design des Resistenz-Screening (Bt-Pflanzen und/oder verschiedene Konzentrationen von Toxinen in Nährmischung)
- Definition des Zeitpunktes und Qualität der Mortalitätsmessung
- Mindestgröße des Samples (der Probe)
- Welche Stadien des Maiszünslers werden gesammelt.

7.5 Monitoring von Nicht-Zieleffekten

Neben den Monitoring Maßnahmen zur Erfolgskontrolle des Resistenzmanagementplans sind auch potentielle Nicht-Zieleffekte im Rahmen des Monitorings zu berücksichtigen, einerseits deshalb weil Nicht-Zieleffekte auf Parasiten und Predatoren einen erheblichen Einfluss auf die Effektivität von Resistenzmanagementplans haben können, andererseits auch deshalb um die Hypothesen der Risikoabschätzung (= „die verschiedenen Bt-Mais-Linien haben keinen schädigenden Wirkungen auf Nicht-Zieleffekten“) zu überprüfen (fallspezifisches Monitoring). Die folgenden Aspekte sind zu berücksichtigen:

- Pollenverbreitung von Bt-Mais (maximale Distanzen der Pollenverbreitung in Abhängigkeit der Pollenkonzentration),
- Wirkungen von Pollen auf Nicht-Zielorganismen,
- Pollentransport durch Bienen,
- Wirkung des eingelagerten und (d. h. von den Insekten enzymatisch behandelten) Pollens auf die Larvenentwicklung bei Honigbienen (*Apis mellifera*), Hummelarten (z. B. *Bombus terrestris*) und insbesondere auf Solitärbienearten,
- Toxinausscheidung über die Wurzel (Konzentration, Abbau und Persistenz des Toxins im Boden),
- Wirkungen des über die Wurzel ausgeschiedenen Toxins auf Organismen der Rhizosphäre und andere Bodenlebewesen,
- Wirkung von Bt-Mais auf die Nicht-Zielorganismen im Rahmen von di- und tritrophischen Studien.

8 LITERATUR

- ALSTAD, D. N. & ANDOW, D. A. (1995): Managing the Evolution of Insect Resistance to Transgenic Plants. *Science*, 268: 1.894–1.896.
- ANDOW, D. A. & ALSTAD, D. N. (1998): F2 screen for rare resistance alleles. *J.Econ.Entomol.*, 91(3): 572–578.
- ANDOW, D. A. & ALSTAD, D. N. (1999): Credibility Interval for Rare Resistance Allele Frequencies. *J.Econ.Entomol.*, 92(4): 757–758.
- ANDOW, D. A.; ALSTAD, D. N.; PANG, Y. H.; BOLIN, P. C. & HUTCHISON, W. D. (1998): Using an F2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (*Lepidoptera: Crambidae*). *J.Econ.Entomol.*, 91(3): 579–584.
- ANDOW, D. A. & HUTCHISON, W. D. (1998): Bt-Corn Resistance Management. In: MELLON, M. & RISSLER, J. (Hg.): Now or Never – Serious new Plan to Save a Natural Pest Control. Union of Concerned Scientists (UCS).
- ANDOW, D. A.; OLSON, E. R.; HELLMICH, R. L.; ALSTAD, D. N. & HUTCHISON, W. D. (2000): Frequency of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin Cry1Ab in an Iowa Population of European Corn Borer (*Lepidoptera: Crambidae*). *J.Econ.Entomol.*, 93(1): 26–30.
- BERNHARD, K.; JARRETT, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D. J.; ROBERTS, G. M.; PAULI, S.; RODGERS, P. & BURGESS, H. D. (1997): Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70(1): 59–68.
- BOLIN, P. C.; HUTCHISON, W. D. & ANDOW, D. A. (1999): Long-term selection for resistance to *Bacillus Thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of European corn borer (*Lepidoptera: Crambidae*). *J.Econ.Entomol.*, 92(5): 1.021–1.030.
- BOURGUET, D.; BETHENOD, M. T.; TROUVE, C. & VIARD, F. (2000): Host-plant diversity of the European corn borer *Ostrinia nubilalis*: what value for sustainable transgenic insecticidal Bt maize? [In Process Citation]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 267(1449): 1.177–1.184.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LOPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F. J.; PENA, G.; NUNEZ-VALDEZ, M. E.; SOBERON, M. & QUINTERO, R. (1998): Characterization of cry Genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* Strain Collection. *Appl Environ Microbiol*, 64(12): 4.965–4.972.
- CTIC (2001): United States Summary (2000). <http://www.ctic.purdue.edu/Core4/CT/ctsurvey/2000/2000USSummary.html>. Conservation Tillage Information Center.
- DAVIS, P. M. & ONSTAD, D. W. (2000): Seed mixtures as a resistance management strategy for European corn borers (*Lepidoptera: Crambidae*) infesting transgenic corn expressing Cry1Ab protein. *J.Econ.Entomol.*, 93(3): 937–948.
- DIXON, B. (1994): Keeping an eye on *B.thuringiensis*. *Bio/Technology*, 12: 435–435.
- DONEGAN, K. K.; PALM, C. J.; FIELAND, V. J.; PORTEOUS, L. A.; GANIO, L. M.; CHALLER, D. L.; UACO, L. Q. & SEIDLER, R. J. (1995): Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* endotoxin. *Applied Soil Ecology*, 2: 111–124.
- EU-RAT (1999): Gemeinsamer Standpunkt des Rates im Hinblick auf den Erlaß der Richtlinie des Europäischen Parlamentes und des Rates zur Änderung der Richtlinie 90/220/EWG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen in die Umwelt. Interinstitutionelles Dossier 99/0072 (COD).
- FERRE, J.; REAL, M. D.; VAN-RIE, J.; JANSSENS, S. & PEFEROEN, M. (1991): Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 88(12): 5.119–5.123.
- FORSYTH, G. & LOGAN, N. A. (2000): Isolation of *Bacillus thuringiensis* from Northern Victoria Land, Antarctica. *Lett.Appl.Microbiol.*, 30(3): 263–266.

- FRANKENHUYZEN, K. (1993): The challenge of *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. & HIGGS, S. (Hg.): *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons.
- FRUTOS, R.; RANG, C. & ROYER, F. (1999): Managing insect resistance to plants producing *Bacillus thuringiensis* toxins. *CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY*, 19(3): 227–276.
- FULLER, S. (1997): Safety of transgenic corn. *Nature*, 385: 109–109.
- GONZÁLES-NÚÑEZ, M.; ORTEGO, F. & CASTAÑERA, P. (2000): Susceptibility of Spanish Populations of the Corn Borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* Endotoxin. *J.Econ.Entomol.*, 93(2): 459–463.
- GOULD, F. (2000): Testing Bt refuge strategies in the field [news; comment]. *Nat.Biotechnol.*, 18(3): 266–267.
- GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKERL, D. G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARD, R. & LASTER, M. (1997): Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94: 3.519–3.523.
- GOULD, F. & TABASHNIK, B. E. (1998): Bt-Cotton Resistance Management. In: MELLON, M. & RISSLER, J. (Hg.): *Now or Never – Serious new Plan to Safe a Natural Pest Control*. Union of Concerned Scientists (UCS).
- HANSEN, L. C.; OBRYCKI, J. & OBRYCKI, J. J. (2000): Field deposition of Bt transgenic corn pollen: lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologica*, online-version August: <http://link.springer.de/link/service/journals/00442/contents/00/00502/paper/s004420000502ch71.html>.
- HELGASON, E.; OKSTAD, O. A.; CAUGANT, D. A.; JOHANSEN, H. A.; FOUET, A.; MOCK, M.; HEGNA, I. & KOLSTO, A. B. (2000): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Appl Environ Microbiol*, 66(6): 2.627–2.630.
- HILBECK, A.; BAUMGARTNER, M.; FRIED, P. M. & BIGLER, F. (1998): Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (neuroptera: Chrysopidae). *Environ.Entomol.*, 27: 1–8.
- HILBECK, A.; MEIER, M. S. & RAPS, A. (2000): Review on Non-target Organisms and Bt-plants. Report to Greenpeace International, Amsterdam.
- HODGSON, J. (1999): Monarch Bt-corn paper questioned [news] [see comments]. *Nat.Biotechnol.*, 17(7): 627.
- HODGSON, J. (2000): Critics slam new monarch Bt-corn data [In Process Citation]. *Nat.Biotechnol.*, 18(10): 1.030.
- HOLMES, B. (1993): The perils of planting pesticides. *New Scientist*, 28 August: 34–37.
- HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L. & HIGGINS, R. A. (1999a): Susceptibility of different instars of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to diet containing *Bacillus thuringiensis*. *J.Econ.Entomol.*, 92(3): 547–550.
- HUANG, F.; BUSCHMAN, L. L.; HIGGINS, R. A. & MCGAUGHEY, W. H. (1999b): Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science*, 284(5416): 965–967.
- HUANG, F.; HIGGINS, R. A. & BUSCHMAN, L. L. (1997): Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J.Econ.Entomol.*, 90: 1.137–1.143.
- ILSI (1998): An Evaluation of Insect Resistance Management in Bt field corn – A Science based framework for Risk Assessment and Risk Management. ILSI – International Life Sciences Institute.
- IVES, A. R.; ALSTAD, D. N. & ANDOW, D. A. (1996): Evolution of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*-transformed plants. *Science*, 273(5280): 1.412–1.413.
- JOHNSON, D. E. & MCGAUGHEY, W. H. (1996): Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indianmeal moth larvae. *Curr.Microbiol.*, 33(1): 54–59.
- KELLER, B. & LANGENBRUCH, G. A. (1993): Control of coleopteren pests by *Bacillus thuringiensis*. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. & HIGGS, S. (Hg.): *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons.

- KLÖPFER, W.; RENNER, I.; TAPPESSER, B.; ECKELKAMP, C. & DIETRICH, R. (1999): Life Cycle Assessment gentechnisch veränderter Produkte als Basis für eine umfassende Beurteilung möglicher Umweltauswirkungen. Umweltbundesamt Wien.
- KOSKELLA, J. & STOTZKY, G. (1997): Microbial utilization of free and clay-bound insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* and their retention of insecticidal activity after incubation with microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 3.561–3.568.
- LERECLUS, D.; DELECLUSE, A. & LECADET, M. M. (1993): Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. & HIGGS, S. (Hg.): *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons.
- LIU, Y. B.; TABASHNIK, B. E.; DENNEHY, T. J.; PATIN, A. L. & BARTLETT, A. C. (1999): Development time and resistance to Bt crops. *Nature*, 400(6744): 519.
- LOSEY, J. E.; RAYOR, L. S. & CARTER, M. E. (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399(6733): 214.
- LYNCH, R. E.; WISEMAN, B. R.; PLAISTED, D. & WARNICK, D. (1999a): Evaluation of transgenic sweet corn hybrids expressing CryIA (b) toxin for resistance to corn earworm and fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J.Econ.Entomol.*, 92(1): 246–252.
- LYNCH, R. E.; WISEMAN, B. R.; SUMMER, H.; PLAISTED, D. & WARNICK, D. (1999b): Management of Corn Earworm and Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) Injury on a Sweet Corn Hybrid Expressing a cryIA(b) Gene. *J.Econ.Entomol.*, 92(5): 1.217–1.222.
- MARCON, P. C.; SIEGFRIED, B. D.; SPENCER, T. & HUTCHISON, W. D. (2000): Development of diagnostic concentrations for monitoring *Bacillus thuringiensis* resistance in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J.Econ.Entomol.*, 93(3): 925–930.
- MARCON, P. C.; YOUNG, L. J.; STEFFEY, K. L. & SIEGFRIED, B. D. (1999): Baseline Susceptibility of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxins. *J.Econ.Entomol.*, 92(2): 279–285.
- MCGAUGHEY, W. H. (1994a): Implications of cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins in resistance management. *Biocontrol.Sci.Technol.*, 4(4): 427–435.
- MCGAUGHEY, W. H. (1994b): Problems of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Agric.,-Ecosyst.-Environ.*, 49(1): 95–102, Workshop on *Bacillus thuringiensis*, Canberra (Australia), 24–26 Sep 1991.
- MCGAUGHEY, W. H. & WHALON, M. E. (1992): Managing insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Science*, 258: 1.451–1.455.
- MEADOWS, M. P. (1993): *Bacillus thuringiensis* in the environment: Ecology and risk assessment. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. & HIGGS, S. (Hg.): *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons.
- MEISE, T, LORENZ, N, and LANGENBRUCH, G. A. (2000): Resistenzlücken beim Bt-Mais? – Auswirkungen unterschiedlicher Toxinkonzentrationen in den Pflanzenteilen einer Bt-Mais-Linie auf die Überlebenschance von Maiszünslerlarven (*Ostrinia nubilalis*). *Mitt.Biol.Bundesanst.Land-Forst-wirtsch.*, 376: 153, 52. Deutsche Pflanzenschutztagung, Freising Weihenstephan.
- MILNER, R. J. (1994): History of *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture, ecosystem and environment*, 49(9): 13.
- MIZUKI, E.; ICHIMATSU, T.; HWANG, S. H.; PARK, Y. S.; SAITOH, H.; HIGUCHI, K. & OHBA, M. (1999): Ubiquity of *Bacillus thuringiensis* on phylloplanes of arboreous and herbaceous plants in Japan. *J.*, 86(6): 979–984.
- MÜLLER, W (2000): Uncertainty – vorsorgeorientierte Risikoabschätzung von GVO. *Wissenschaft & Umwelt Spezial*, 5, Forum Österreichischer Wissenschaftler für Umweltschutz – Wien.
- NIILER, E. (1999): GM corn poses little threat to monarch. *Nat.Biotechnol.*, 17(12): 1.154.
- OHBA, M.; WASANO, N. & MIZUKI, E. (2000): *Bacillus thuringiensis* soil populations naturally occurring in the Ryukyus, a subtropic region of Japan. *Microbiological Research*, 155(1): 17–22.
- ONSTAD, D. W. & GOULD, F. (1998): Modelling the Dynamics of Adaption to Transgenic Maize by European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J.Econ.Entomol.*, 91(3): 585–593.

- ONSTAD, D. W. & GUSE, C. A. (1999): Economic analysis of transgenic maize and nontransgenic refuges for managing European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J.Econ.Entomol.*, 92(6): 1.256–1.265.
- PIMENTEL, D. S. & RAVEN, P. H. (2000): Bt corn pollen impacts on nontarget Lepidoptera: Assessment of effects in nature. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 97(15): 8.198–8.199.
- RENNER, R. (1999): Will Bt-Based Pest Resistance Management Plans Work? *Environmental Science and Technology*, (October 1): 4.10A–4.15A.
- ROUSH, R. T. & MILLER, G. L. (1986): Considerations for Design of Insecticide Resistance Monitoring Programs. *J Econ.Entomol.*, 79(2): 293–298.
- ROUSH, R. T. & SHELTON, A. M. (1997): Assessing the odds: the emergence of resistance to Bt transgenic plants. *Nat.Biotechnol.*, 15(9): 816–817.
- SAXENA, D.; FLORES, P. & STOTZKY, G. (1999): Transgenic plants: Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature*, 402: 480.
- SCHNEIDER, J. C. (1998): Confidence Interval for Bayesian Estimates of Resistance Allele Frequencies. *J.Econ.Entomol.*, 92(4): 757.
- SHELTON, A. M.; TANG, J. D.; ROUSH, R. T.; METZ, T. D. & EARLE, E. D. (2000): Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants [see comments]. *Nat.Biotechnol.*, 18(3): 339–342.
- TABASHNIK, B. E. (1994): Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu.Rev.Entomol.*, 39: 47–79.
- TABASHNIK, B. E.; LIU, Y. B.; FINSON, N.; MASSON, L. & HECKEL, D. G. (1997): One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 94: 1.640–1.644.
- TABASHNIK, B. E.; ROUSH, R. T.; EARLE, E. D. & SHELTON, A. M. (2000): Resistance to Bt toxins [letter]. *Science*, 287(5450): 42.
- TAPP, H. & STOTZKY, G. (1995): Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bound on pure and soil clays. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 1.786–1.790.
- THEUNIS, W.; AGUDA, R. M.; CRUZ, W. T.; DECOCK, C.; PEFEROEN, M.; LAMBERT, B.; BOTTRELL, D. G.; GOULD, F. L.; LITSINGER, J. A. & COHEN, M. B. (1998): *Bacillus thuringiensis* isolates from the Philippines: habitat distribution, delta-endotoxin diversity, and toxicity to rice stem borers (Lepidoptera : Pyralidae). *Bulletin Of Entomological Research*, 88(3): 335–342.
- US EPA (1998): The Environmental Protection Agency's White Paper on Bt Plant-pesticide Resistance Management January 14, 1.998.
- US EPA (1999a): Letter to Bt Corn Registrants 12/20/99. US EPA Office of Pesticide Programs, www.epa.gov/pesticides/biopesticides/otherdocs/bt_corn_ltr.htm.
- US EPA (1999b): Proceedings of EPA/USDA Workshop (June 18, 1999) on Bt Crop Resistance Management. US Environmental Protection Agency (EPA), <http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/otherdocs/btcornproceedings.htm>.
- VILLIGER, M. (1999): Effekte transgener insektenresistenter Bt-Kulturpflanzen auf Nichtzielorganismen am Beispiel der Schmetterlinge. WWF Schweiz und Forschungsinstitut f. biologischen Landbau (FiBL) Schweiz.
- VISSER, B.; BOSCH, D. & HONEE, G. (1993): Domain-Function Studies of *Bacillus thuringiensis* of Crystal Proteins: A Genetic Approach to toxin delivery systems. In: ENTWISTLE, P. F.; CORY, J. S.; BAILEY, M. J. & HIGGS, S. (Hg.): *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons.
- WALKER, K. A.; HELLMICH, R. L. & LEWIS, L. C. (2000): Late-Instar European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) Tunneling and Survival in Transgenic Corn Hybrids. *J.Econ.Entomol.*, 93(4): 1.276–1.285.
- ZWAHLEN, C.; NENTWIG, W.; BIGLER, F. & HILBECK, A. (2000): Tritrophic Interactions of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the Predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Environmental Entomology*, 29(4): 846–850.

ANHANG 1

Doc.: XI/157/98

30 March 1998

Draft

PROTOCOL FOR THE MONITORING OF EUROPEAN CORN BORER RESISTANCE TO Bt-MAIZE

Monitoring regime

The steps of the monitoring regime are described below

1. Define distinct geographical populations of the European Corn Borer (ECB)

Preliminary data on distinct geographical populations of the ECB already exists for France (Anglade et al 1984) and Italy (Suss and Ciampolini 1983). Other countries likely to be affected, should also define geographical populations of the ECB.

2. Establish the ECB's baseline of susceptibility to the insecticidal protein

a) *Collection procedure*

The collection of ECB shall be done by randomly collecting a sample of 300–1000 of the 5th instar larvae at 4–5 different sites (fields) of each geographically distinct population. This should be done by collecting maize stalks at sites where Bt-maize or Bt-microbial preparations have not been used before. If, in any case, such use has been made at the site, the history of the site should be recorded.

b) *Establishment of a susceptibility baseline*

The establishment of a baseline shall be carried out according to the baseline analysis specified in Annex IA.

3. Detect changes in susceptibility through regular monitoring

a) *Collection procedure*

The collection of the 5th instar ECB larvae shall be done every 4 generations of each geographically distinct population by randomly collecting 100 maize stalks per field in 10 different fields of Bt maize.

b) *Detection of changes in susceptibility*

The detection of changes in susceptibility shall be carried out according to the baseline analysis specified in Annex IA. Any deviation from the initial baseline (see step 2 above) must be recorded.

4. Forecast of the development of resistance to the insecticidal protein

a) *Collection procedure*

The collection of the 5th instar ECB larvae shall be done every 4 generations of each geographically distinct population. The initial generation shall be collected according to step 2a above and the subsequent generations (i. e. 4th, 8th, 12th...) according to step 3a above.

b) *Forecast of the development of resistance*

The detection of changes in resistance shall be carried out according to the protocol specified in Annex IB during 4 generations with a subsequent baseline study specified in Annex IA under laboratory conditions. Any deviation from the initial baseline (see step 2 above) must be recorded.

5. Report of national data to European and National Authorities

When development of resistance is observed according to step 3 or anticipated according to step 4 above, the European Commission and the Member States affected or likely to be affected must be immediately notified about the situation through a submission of a comprehensive report.

Annex I

Experimental protocols on the monitoring of European Corn Borer resistance to transgenic Bt-maize expressing *Bacillus thuringiensis* toxins

A. Baseline analysis

The analysis is done to determine the baseline of a ECB population's susceptibility to Bt toxins. It is performed by treating first instar larvae with different dosages of the Bt toxin on a surface of nutritive medium. The mortality rate is then applied to determine the baseline of susceptibility.

Procedure

1. While the nutritive medium (see Annex IIC) is still in a liquid state, 100–120 ml of it is poured in a box measuring 11 x 17 cm into which a matrix is placed to produce 84 compartments. Each compartment has a surface area of 1.65 cm² and a height of 15 mm. The final height of the nutritive medium in each compartment will approximately be 10 mm.
2. Five different Bt toxin dosages (see Annex IIB) are prepared to produce 10, 30, 50, 70 and 90 % mortality. It is a function of the protein dose according to Bradford 1976.
3. When the nutritive medium has solidified, 25 µl of the Bt toxin is placed in each compartment using a micro-pipette.
4. When the treatment has dried (in free air) the first instar larvae (see Annex IIA) are placed individually in each compartment. Thirty to 50 individuals are treated at each mortality dosage. The assay is maintained at 25°C for 7 days at a photoperiod of 16:8 or 18:6 L:D (Light : Dark) hours. The length of the photoperiod depends on the origin of the insects. Mono-voltine races must be reared at 18:6 L:D hours while bi-voltine and multi-voltine races must be reared at photoperiod of 16:8 L:D hours.
5. After the completion of the treatment, the number of killed larvae at each Bt toxin concentration are counted and the data is used in the baseline calculation.
6. The baseline calculation (establishing the regression lines) and the calculation of the resistance ratio at the 95 % confidence level, are made using the commercially available "Probit" software, developed by Praxeme⁸ or any other equivalent "Probit" software.

⁸ Praxeme, 19 avenue de Montpellier, 34680 St Georges d'Orques, France. Tel. 33 4 67 47 79 24, Fax. 33 4 67 02 87 24.

B. Forecast of resistance development

The analysis is done to anticipate the potential development of the ECB's resistance to Bt toxins. It is performed by treating four subsequent first instar larvae generations with increased dosages of the Bt toxin on a surface of nutritive medium. The offspring of the fourth generation are then treated according to protocol A above to determine the baseline of susceptibility to the Bt toxin. As a control a non-treated sensitive line is maintained in the same conditions as those of the treated line – this is made up of 250 to 300 larvae at each generation.

Procedure

1. While the nutritive medium (see Annex IIC) is still in a liquid state, 100–120 ml of it is poured in a box measuring 11 x 17 cm into which a matrix is placed to produce 84 compartments. Each compartment has a surface area of 1.65 cm² and a height of 15 mm. The final height of the nutritive medium in each compartment will approximately be 10 mm.
2. When the nutritive medium has solidified, 25 µl of Bt toxin (see Annex IIB) is placed in each compartment using a micro-pipette. The dosage is calculated to produce 70–80 % mortality in each generation. It is a function of the protein dose according to Bradford 1976.
3. When the treatment has dried (in free air) 300–1000 first instar larvae (see Annex IIA) are placed individually in each compartment. The assay is maintained at 25°C for 7 days at a photoperiod of 16:8 or 18:6 L:D hours. The length of the photoperiod depends on the origin of the insects. Mono-voltine races must be reared at 18:6 L:D hours while bi-voltine and multi-voltine races must be reared at photoperiod of 16:8 L:D hours. The surviving larvae are moved onto a fresh untreated nutritive medium and are raised in the same conditions until pupation.
4. The pupae are placed in plastic boxes measuring 50 cm² x 5 cm containing a moist substrate (i.e. peat).
5. The sex of the pupae is determined by observing the ventral side of each pupa, to establish the sex-ratio. Then the pupae are weighed as a function of their sex and as a function of whether they belong to the non treated sensitive line or to the treated line. This step is necessary in order to determine the fitness of the resistance if it appears.
6. After emergence, the moths are transferred to a laying nest maintained at a temperature of 25°C and a photoperiod of 16:8 L:D hours (see Annex IIA). The eggs are collected every 2nd day and 300–1 000 of the newly hatched 1st instar larvae are used to establish the following generation.
7. The offspring of the fourth generation are then treated according to protocol A above to determine the baseline of susceptibility to the Bt toxin.

Annex II

A. Treatment of the ECB

The ECBs are collected from the field at the 5th instar larval stage by randomly collecting maize stalks⁹. After releasing the larvae from the maize stalks by cutting, they are placed on nutritive medium in aerated plastic boxes measuring 16 x 14 x 8 cm. Corrugated pieces of cardboard are placed in the boxes to serve as pupation sites. After pupation the pupae are placed in plastic boxes measuring 50 cm² x 5 cm containing a moist substrate (i. e. peat). The emerging moths are transferred to laying nests and maintained at a temperature of 25°C and photoperiod of 16:8 L:D hours. The laying nest is a cage with a minimum size of 30 x 20 x 30 cm made from wire netting (small meshes). A sulphurised paper is placed on the top of each box for the moths to lay their egg masses. On top of the sulphurised paper a moist cloth is placed in order to maintain a high level of humidity in the nest. The moths are fed with water and honey. The eggs are collected every 2nd day and 300–1 000 of the 1st instar larvae, from all egg laying females, are used at each generation.

B. Preparation of the Bt-toxin

The Bt toxin to be used in this investigation must be the same Bt toxin as produced in the Bt maize. The Bt toxin should therefore be supplied by the companies or obtained from recombinant E.coli expressing it. Approximately 100 mg is needed for 30 generations¹⁰. The Bt-toxin is prepared according to Lecadet *et al* 1980.

C. Nutritive medium for the ECB

Water for agar.....	340 ml
Agar-agar.....	16 g
Water for powder.....	340 ml
Crouched maize.....	112 g
Wheatgerm.....	28 g
Brewers' yeast.....	30 g
Benzoic acid.....	2 g
Ascorbic acid.....	6 g
Fumidil.....	1 g
Vitamin Diet For Mixture ¹¹	2 g
Aureomycin (only for the original medium).....	0,4 g
Nipagine (+ alcohol).....	1 g
Sorbic acid.....	0,8 g

The agar-agar powder is mixed with the “water for agar” and heated up to be dissolved. The remainder of the ingredients are dissolved in the “water for powder”. The two solutions are then carefully mixed to avoid solidification.

⁹ The larvae could be kept inside the maize stalks over winter at environmental temperature without feeding and changing its larval stage.

¹⁰ The approximately amount of Bt toxin needed in this analysis is based on the initial sensitivity of “the Landes” ECB population from the south west part of France.

¹¹ From ICN Biochemicals, INC, 1263 South Chillicothe Road, Auroa, Ohio 44202, USA, Catalog n° 904654.

D. The biology of the ECB

Distribution – Within the European Union, the ECB is one of the major lepidopteran pest for maize in France, Austria, Germany, Italy, Spain, Greece and Portugal.

Host Plants – The ECB is a polyphagous insect and has been found on more than 200 host plants, but corn is a preferred host. In addition to corn, crops likely to suffer primary economic damage from the ECB include barley, beans, millet, oats, Irish potatoes, and sorghum.

Damage – Initial feeding occurs on the leaf surface, generally in the whorl. Later the larvae bore down midribs of leaves into stalks. Frass and silk, near entrance holes, are evidence of their presence. Primary damage to conducting tissue may result in a reduction of starch and sugar reaching the grain. Serious tunnelling damage by subsequent generations may weaken plants so extensively that tassel and stalk breakage, ear dropping, and small ears may occur.

Life History – Mature larvae overwinter inside tunnels in stubble, stalks, ears, or other protective plant material. They pupate in the spring. During late spring, the adult moths emerge and mate. Each female lays 500 to 600 eggs in small clusters of 15 to 20 on the underside of leaves. Eggs hatch in 3 to 12 days, depending upon the temperature. The young larvae usually begin feeding on the leaf surface and, as they mature, begin to bore in the midribs of the leaves. During the 4th instar, stalk- or ear-boring commences and continues until pupation. In the south west of France and northern Italy ECB typically completes two generations each year, but in warm years it may complete a partial to full third generation. In the north east of France and northern maize growing areas and higher elevations, ECB may only complete one generation each year, whereas in southern parts of Europe it usually completes three generations annually.

Movement – After emergence, ECB larvae may move from plant to plant, either between maize plants or between maize plants and weeds (Ross and Ostlie 1990). ECB adults, on the other hand, are known to disperse at least 800 meters and bi-voltine populations may disperse up to 32 kilometres in a single year (Showers 1993; Showers *et al.* 1995). This dispersal, in contrast to the interplant movement of larvae, may maintain susceptible alleles in the ECB population which is important for avoiding development of insect resistance to the Bt-maize. This behaviour may help to decrease the likelihood of resistance development in regions where multiple hosts are available, in particular when the alternative host plants are not within the fields of Bt maize.

E. Cost estimate

It is estimated that it would take one permanent laboratory technician full-time. You also need a technician capable of multiplying the toxin (unless the companies supply it), measuring it and characterising it (electrophoresis). That represents about 5 % of one technician's time.

F. References

- Anglade P., Stockel J and IWGO Cooperators, 1984. Intraspecific sex pheromone variability in the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera: Pyralidae). *Agronomie*, 4 183–187.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram amounts of protein utilising the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.
- Davis P.M. and Roush R.T., 1995. Resistance management for transgenic corn. Report to Monsanto Company.

- Huang F, R.A. Higgins and L.L. Buschmann, 1997.* Baseline Susceptibility and Changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* susp. *Kurstaki* under selection pressure in European Corn Borer. *Journal of Economic Entomology*, 90, p.1137–1143.
- Lecadet M.M., Blondel, M.O. and Ribier, J., 1980.* Generalised transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715, using bacteriophage CP54 Ber. *J. Gen. Microbiol.* 121: 203–212.
- Ross G.L. and Ostlie K.R., 1990.* Dispersal and survival of early instars of European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) in field corn. *J. Econ. Entomol.* 83:831–836.
- Showers, W.B., 1993.* Diversity and variation of European corn borer populations. *Evolution of insect pests: patterns of variation*, pp. 287–309. K.D. Kim and B.A. Mc Pheron, eds. John Wiley and Sons, NY.
- Showers, W.B., Weis M.J., Derrik M.E. and Hendrix III W.H., 1995.* Potential movement on surface airflow of a bivoltine population of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae), into a historically univoltine habitat. *Environ. Entomol.* 24(4): 835–840.
- Suss L. and Ciampolini M., 1983.* Presenza nell'Italia stentrionale di Piralide del mais (*Ostrinia nubilalis* Hb.) ad unico ciclo annuale. *L'Informatore agrario*, Verona, XXXIX (24).
- The Environmental Protection Agency's White Paper on Bt Plant-pesticide Resistance Management, January 14, 1998.

ANHANG 2

SCIENTIFIC COMMITTEE ON PLANTS

SCP/GMO/094-Final

10 March 1999

OPINION OF THE SCIENTIFIC COMMITTEE ON PLANTS ON Bt-RESISTANCE MONITORING (SCP/GMO/094-Final)

(Opinion expressed on 4 March 1999)

Background

1. In December 1996, on the basis of the opinions of three Scientific Committees, the Commission adopted a Decision to place the Novartis Bt-maize on the market.. This maize is modified to express the insect specific Bt toxin in plant in order to control infesting Lepidoptera larvae when they consume the maize tissues. Following the specific recommendation of the Scientific Committee on Pesticides, the Commission decided to launch a programme to monitor for the development of insect resistance in target pests of the Bt-maize. An Expert Group on monitoring insect resistance to Bt was therefore established by the Competent Authorities under Directive 90/220/EC to produce a suitable monitoring protocol. The resultant draft Protocol for the monitoring of European corn borer resistance to Bt-maize (Document XI/157/98) was forwarded to the Scientific Committee on Plants for its scientific opinion. A sub-group of experts met in January 1999 to discuss the draft opinion and the original protocol.

Draft Monitoring Protocol

2. The salient features of the original monitoring protocol proposed by the Expert Group for each geographically distinct population of European Corn Borer (ECB) are to
 - *establish the baseline susceptibility to the insecticidal protein in insects derived from the field*
(Field collection of 5th instar larvae from infested maize stalks in 4–5 fields where neither Bt- maize had been grown previously nor Bt-spray used before. Rearing until the next generation, then 1st instar larvae tested in the laboratory at a range of doses of Bt calculated to cause mortality between 10 % and 90 %. The results are subjected to probit analysis.)
 - *detect change over time in baseline susceptibility*
(Collection of 5th instar larvae every 4 generations in the field to produce the next generation for 1st instar testing in the laboratory. Comparison with baseline by calculation of resistance ratios.)
 - *forecast the development of resistance to the insecticidal protein*
(Rearing 4 subsequent generations by testing the 1st instar larvae of the first 3 generations in the laboratory with a dose calculated to cause 70 %–80 % mortality. Testing the offspring of the 4th generation selected in the laboratory with a range of doses to compare with original baseline data using resistance ratios.)

Comments of the Scientific Committee on Plants on the Draft Protocol

3. Since any resistance genes are likely to be present in the population at very low initial frequency, an effective monitoring programme must be sufficiently sensitive to detect the early development of resistance resulting from changes in gene frequency. This requires large sample sizes for testing and an adequate understanding and interpretation of baseline data derived in the laboratory. Although the draft monitoring protocol requires the collection of 300 to 1000 5th instar larvae by collecting 100 maize stalks per field in 10 different fields, it may be better to sample ECB by collecting eggs from the surface of maize plants rather than 5th instar larvae which have already been exposed to the Bt plants. However care should be taken when sampling and interpreting the results since individuals emerging from the same egg batch are genetically related.
4. The extent to which baseline levels can be determined and interpreted will be influenced by the inherent variation in the responses of insect populations to insecticides and the likely variability in the test assays. The draft protocol does not indicate how it should be implemented in practice or how the selection of sites will be related to selection pressure in the field which will differ according to the extent of Bt-maize grown in any location. In

addition, exposure of larvae in the field may vary due to late season senescence or to a reduction of toxin concentration (loss of titre) in certain transgenic maize hybrids.

5. Whilst the proposed protocol may produce resistant insects within 4 generations in the laboratory as a result of low selection pressures, it is not known how relevant this is to the situation in the field where insects will normally be exposed to a high dose in the transgenic plants. For practical reasons it is not possible to sustain insects in the laboratory at Bt concentrations equivalent to those expressed in the plant in order to mimic selection pressure under field conditions.
6. As a technique in the laboratory, the determination of resistance ratios is not as effective in detecting resistance or as sensitive as the application of a high discriminating dose (for example LC_{95}). Selection for resistance can alter the slope of the dose-response curve as well as its location on the dosage axis. The level at which the discriminating dose is set should be based on field data of susceptibility in specific areas.

General Comments

7. The general issue of monitoring to detect the appearance of resistance to Bt in primary pests of Bt-pesticide plants together with management strategies to delay the onset of resistance, have been the subject of considerable discussion, debate and scientific publication, particularly in North America. This is associated with the earlier commercial introduction of GM crops in the USA. Although only key references are listed below, each contains a more extensive list of relevant published papers.
8. Out of the international debate there is a consensus view, shared by the Scientific Committee on Plants, that one of the most important elements of the (L_{95} Lethal concentration that kills 95 % of the susceptible population) husbandry of Bt crops is to develop and implement effective resistance management plans which will delay the appearance of practical resistance to Bt in the target pests. Any monitoring programme should relate directly to the resistance management plan and be targeted to areas of higher selection pressure in order to have maximum chance of detecting resistance at an early stage. In this case this should clearly relate to the areas and intensity of Bt-corn planted.
9. The resistance management strategy that is most widely accepted is the high dose/structured refuge model which is being implemented in North America. The intention is to kill all susceptible insects and heterozygotes that carry one copy of any resistance gene, and the inherent assumption is that this is achieved by a high level of expression in Bt-plants. Structured refuges are defined as all suitable non-Bt host plants for the target pest that are planted and managed by people and should be maintained in proximity to Bt-plants. The principle is that an overwhelming number of susceptible pest adult insects emerging from the refuges will mate with any potential resistant insects from nearby Bt crops thus maintaining low resistance gene frequency. How large these refuges should be is a matter of considerable discussion. A conservative approach is recommended in the early stages of commercial experience. For example current recommendations in North America are that 20–30 % of the maize area grown should be planted with non-Bt plants and where alternative spraying of pesticides to control ECB is anticipated then the refuges should be increased to 40 %. The size and spatial arrangement of refugia should be investigated on an experimental scale since random mating may not necessarily occur in practice due, for example, to asynchronous emergence of sexually mature adults. As research findings and practical field experience increase such initial recommendations of refuge size may be modified (either decreased or increased). With the progressive introduction of Bt-crops into Europe, in practice there will initially be very large refuges (i.e. alternative non-Bt host plants) adjacent to planted GM crops.

10. It is recognised that the impact of predatory or parasitic beneficial insects from adjacent refuges adds another important layer of complexity in resistance management which is poorly understood. The functional ecology of such beneficials in relation to transformed crops in the field should be further investigated.
11. Monitoring to detect the development of resistance by field collection and subsequent laboratory tests is important. However the quality of the data generated should justify the effort expended. In some cases extended laboratory studies may be more relevant to field conditions dependent on the local biological cycle of the ECB and where high plant expression of the toxin in tissues may not be maintained all season. F₂ screening may prove a useful technique for monitoring incipient resistance development and is considered more likely to detect recessive resistance alleles than a straightforward discriminating dose assay: insects which have been collected in the field should be bred in the laboratory and their F₁ progeny allowed to cross breed before the F₂ larvae are tested with, for example, a discriminating dose.
12. Whilst alleles for partial resistance may be reasonably common in natural populations of the ECB, in contrast alleles for complete resistance (to high levels of toxin expressed in transgenic plants) may be rare. Laboratory testing could be enhanced by a standardised bioassay on transgenic plant material to distinguish between 'true' and 'partial' resistance (i. e. when larvae can survive to the second instar on toxin-containing diets but would not survive the high dose on transgenic plants).
13. Long term resistance management plans should also consider alternative tactics in combination with the transgenic expression of insecticidal toxins, as well as effects on minor pests and non-target organisms.
14. There is a strong argument that the Mediterranean Corn Borer (MCB) *Sesamia nonagrioides* should also be included in monitoring plans to detect the development of resistance to Bt. MCB currently affects at least 600,000 ha of maize in southern Europe (Southern France, all Spain, Portugal, Greece and southern Italy). When present it is more abundant and causes more damage than ECB. Several features of its biology suggest that MCB is as much a candidate for resistance development as ECB given the right conditions:
 - the species principally feeds on maize and sorghum, although it does feed on a few wild graminaceae and typhaceae;
 - it does not disperse through the season but adults from overwintered larvae may move several km to colonise maize fields in the spring.
 - female MCB are sedentary and probably move only when mated. Therefore females from non-Bt-maize fields (potential refuges) would rarely mate with males from Bt fields through the season.

Conclusions – Managing Insect Resistance to Bt Corn

- The draft protocol to monitor for resistance in European corn borer to Bt-maize should be linked firmly to field management plans on the ground. The proposed protocol which is based on experience and practical data should be broadened by the inclusion of more sensitive laboratory tests to detect low frequency resistance alleles and should include a suitable discriminating dose. Monitoring should be targeted to more extensive areas of planted Bt-maize where selection pressures may be highest for resistance development and procedures adjusted according to the GM variety grown (in relation to seasonal decline of toxin concentration).

- Effective high dose/structured refuge resistance management plans should be implemented for Bt-maize. Initially very large refuges may exist in practice as the total area of Bt maize will be small in Europe. However, plans should also take account of spatial structuring on a local scale.
- Growers should be required to survey their growing Bt-maize to detect unusual patterns of pest damage and ineffective control which should be thoroughly investigated by insect sampling and laboratory testing. Field survey should include the collection of plant material and the laboratory determination of expression levels in tissue, and the assessment of pest densities in the Bt crop and surrounding vegetation at the time of the problem.

Recommendations

1. Three phases are envisaged in a revised monitoring programme:
The regular monitoring of field populations to detect changes in susceptibility to Bt;
More detailed experimental testing in the laboratory over several generations bred from field collected insects in order to predict the likelihood of resistance developing;
Additional research is required on the basic biology of the pest and on method development to extend and increase the sensitivity of monitoring and predictive testing. The interactions of GM crops locally with other pest control strategies e.g.integrated pest management should be explored by modelling.
2. All geographic populations of ECB and MCB should be defined and identified. Minor pests for each region should be identified in case of later secondary pest outbreaks following declines in target species.
3. The susceptibility of target pests should be established for each geographically distinct field populations before the introduction of GM crops.
4. The field locations and varieties of all transgenic Bt crops should be notified each year to enable the monitoring to be targeted towards high risk situations.
5. Each year field populations should be sampled from transgenic crops and their surrounding areas and tested to detect changes in susceptibility, with particular attention to transgenic crops grown in successive seasons and any areas of naturally-high resistance/tolerance.
6. To predict the development of resistance, insects should be collected from the field each year, selected for 4 generations in the laboratory. Resistance ratios, based on LC_{50} values, should be used to determine significant shifts away from baseline susceptibilities. A more sensitive discriminating dose bioassay (LC_{95}) can also be carried out, before (F_1) and after (F_4) of the laboratory breeding selection, in order to test for resistant homozygotes.
7. In addition, it is recommended that in cases where incipient resistance is suspected, or considered more likely to develop, a separate portion of the sample should be taken for F_2 screening. Thus it will be necessary to split the samples and test the F_1 generation (as above) and subject the remaining half of the samples to more sensitive testing in order to express the recessive alleles either at F_2 or over the next 4 generations.
8. Individual growers and the supply industry (e. g. seed companies) should be obliged to notify the Competent Authorities (at the end of each growing season) of any control failures which should have been thoroughly investigated for evidence of resistance.
9. While these transgenic crops are at an early stage of introduction into Europe, there is a clear and urgent need for further research studies on both ECB and MCB to investigate the baseline variability and stability of susceptibility to Bt.

10. Improved experimental protocols should be developed to provide validated methods for the laboratory and the means to identify high risk target populations in the field.
11. The refuge concept should be thoroughly investigated using experimental studies and theoretical modelling, using all available information from elsewhere outside Europe which already grow GM crops on the larger scale. In addition, investigations of the ecological impact of GM crops should assess the risk to non-target organisms both within and beyond the crop ecosystem.

Acknowledgements

The Committee wishes to acknowledge the contribution of the following working group and rapporteur that prepared the initial draft opinion:

Bt-Monitoring Resistance: Prof. A. Hardy (Chairman), and invited experts Prof. A. Albajes, Dr. N. Birch, Dr. D. Bourguet, Dr. R. Cannon, Prof. G.C. Lozzia, Prof. G. Riba, Dr. T. Sherratt.

Key References

- Draft protocol for the monitoring of European corn borer resistance to Bt-maize (Document XI/157/98) submitted by DGXI 29/04/98 [SCP/GMO/014].
- EPA 1998. The Environmental Protection Agency's White Paper on *Bt Plant-pesticide Resistance Management*. January 14, 1998.
- Final Report of the FIFRA Scientific Advisory Panel Subpanel on *Bacillus thuringiensis* (Bt) Plant-Pesticides and Resistance Management. February 9 and 10 1998.
- McGaughey, WH, F Gould & W Gelernter, 1998. Bt Resistance Management: a plan for reconciling the needs of the many stakeholders in Bt-based products. *Nature Biotechnology* 16 February 1998.
- Mellon, M & J Rissler (eds), 1998. Now or Never: serious plans to save a natural pest control. Union of Concerned Scientists, Cambridge, Massachusetts.
- Ostlie, KR, WD Hutchinson & RL Hellmich (eds), 1997. Bt Corn and European Corn Borer (*Long-Term Success Through Resistance Management*). NCR publication 602. University of Minnesota, St. Paul, MN.