

**Stellungnahme der ZKBS  
zu neueren wissenschaftlichen Veröffentlichungen zur  
Risikoabschätzung der Maislinie MON810**

Beim Besuch von Frau Bundesministerin Aigner bei der ZKBS wurden im Rahmen der Sitzung am 09.11.2010 die Anfertigung einer Stellungnahme zu neueren wissenschaftlichen Veröffentlichungen zur Risikoabschätzung der Maislinie MON810 vereinbart. Dabei handelt es sich um die Publikationen von Álvares-Alfageme *et al.* (2010), Porcar *et al.* (2010) und Perry *et al.* (2010). Die ZKBS berücksichtigt in dieser Stellungnahme auch Erkenntnisse aus einem Fachgespräch auf Einladung des BVL zu „Auswirkungen von Cry-Proteinen auf den Zweipunktmarientkäfer *Adalia bipunctata*“ am 9. Februar 2011.

1 Zusammenfassung

Die ZKBS vertritt die Auffassung, dass nach Auswertung der neuen Studien von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) und Porcar *et al.* (2010) und weiteren bekannten Daten aus Freilanduntersuchungen, etwaige schädliche Effekte durch die *Bt*-Proteine Cry1Ab und Cry3Bb1 auf Marienkäfer nicht zu erwarten sind. Einzig die auf einer Laboruntersuchung beruhende Publikation von Schmidt *et al.* (2009) berichtete bislang von nachteiligen Effekten auf Zweipunktmarientkäfer. Die kritische Begutachtung dieser Publikation durch Meissle und Romeis (2008<sup>1</sup>), Rauschen (2010), Ricroch *et al.* (2010) und die neueren experimentellen Ergebnisse von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) und Porcar *et al.* (2010) begründen erhebliche Zweifel an der Relevanz der Studie von Schmidt *et al.* (2009) für die Risikobewertung.

Eine weitere neue Studie (Perry *et al.* 2010) quantifiziert die Gefährdung von Nichtzielschmetterlingen mit Hilfe eines mathematischen Modells. Mittels Extrapolation der im Labor bestimmten Dosis-Wirkungsbeziehungen für das Cry1Ab Protein schätzen die Autoren Mortalitätsraten für die Larven von drei verbreiteten Schmetterlingsarten (Kohlschabe, Tagpfauenauge, Admiral) in Maisfeldern und den unmittelbar daran angrenzenden Biotopen ab. Die Ergebnisse zeigen, dass regionale Populationen von

---

<sup>1</sup> Die Veröffentlichung von Meissle und Romeis (2008) bezieht sich auf eine Vorabveröffentlichung (online first) der Arbeit von Schmidt *et al.* (2009) auf der Internet Seite der Zeitschrift Archives of Environmental Contamination and Toxicology am 20. August 2008.

Nichtzielschmetterlingen durch den Anbau von MON810 nur in einem sehr geringen Ausmaß gefährdet sein könnten. Die errechneten Mortalitätsraten sind so niedrig, dass sie nach derzeitigem Stand in einem Anbau begleitenden Monitoring technisch nicht nachweisbar wären.

## 2 Begründung

### 2.1 Neue Studien zu möglichen Auswirkungen von Bt-Proteinen für den Zweipunktmarientkäfer *Adalia bipunctata*

Die ZKBS hatte bereits am 7. Juli 2009 eine allgemeine Stellungnahme zur Risikobewertung über neue Studien zur Umweltwirkung von MON810 abgegeben (Az. 6788-02-13<sup>2</sup>), in denen u. a. die möglichen Auswirkungen von Bt-Proteinen für den Zweipunktmarientkäfer bewertet wurden. Die ZKBS stellte fest, dass die seinerzeit angeführte Studie von Schmidt et al. (2009) hinsichtlich des eingesetzten Materials, der Versuchsdurchführung und der Interpretation der Ergebnisse erhebliche Mängel aufweist, die die Korrektheit der Ergebnisse bzw. der Aussagen grundsätzlich in Frage stellen. Zum besseren Verständnis der neu zu bewertenden Studien von Álvares-Alfageme et al. (2010) und Porcar et al. (2010) wird zunächst noch einmal die Studie von Schmidt et al. 2009 aufgerufen, da sich aus dem Fachgespräch am 9. Februar 2011 im BVL zusätzliche Erkenntnisse ergeben haben.

---

2

[http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06\\_Gentechnik/ZKBS/01\\_Allgemeine\\_Stellungnahme\\_n\\_deutsch/04\\_pflanzen/zkbs\\_pflanzen\\_mon\\_810\\_neubewertung\\_2009.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/ZKBS/01_Allgemeine_Stellungnahme_n_deutsch/04_pflanzen/zkbs_pflanzen_mon_810_neubewertung_2009.pdf?__blob=publicationFile)

### 2.1.1 Sachstand Studie Schmidt et al. (2009)

Schmidt et al. (2009) untersuchten in Labor-Toxizitätstests die Wirkung der *Bt*-Proteine Cry1Ab und Cry3Bb sowie des Expressionsvektors pBD10 auf verschiedene Entwicklungsstadien (L1-L4) des Zweipunktmarientkäfers *Adalia bipunctata* (Coleoptera, Coccinellidae). Die *Bt*-Proteine wurden in den Konzentration 0, 5, 25 und 50 µg/ml bzw. der Expressionsvektor pBD10 in den Konzentrationen von 0, 10, 50, 100 µg/ml auf Mehlmotteneier (*Ephestia kuehniella*, Lepidoptera, Pyralidae) gesprüht, die als einzige Nahrung für die Versuchstiere dienten. Die Versuchstiere wurden über den gesamten Zeitraum der Larvenentwicklung gegenüber den Testsubstanzen exponiert. Eine signifikante Zunahme der Mortalität gegenüber der Kontrolle wurde für Cry1Ab und Cry3Bb in verschiedenen Konzentrationen festgestellt, die Applikation der Expressionsvektor-Lösung allein führte indes zu keiner gegenüber der Kontrolle erhöhten Mortalität. Negative Effekte der Cry-Proteine auf die Entwicklungszeit oder das Gewicht der Adulten wurden nicht beobachtet. Die Autoren schlussfolgern, dass die erhöhten Mortalitäten auf direkte Effekte der aktivierten *Bt*-Proteine zurückzuführen sein könnten. Der in ihrem Experiment beobachtete Effekt von Cry1Ab auf den Zweipunktmarientkäfer stellt nach Ansicht der Autoren die postulierte Wirtsspezifität bzw. den Wirkungsmechanismus von Cry-Proteinen in Frage, da diese Toxinklasse spezifisch auf Lepidopteren wirkt. Schmidt et al (2009) kommen bei der Interpretation hinsichtlich der ökologischen Relevanz ihrer Ergebnisse zu dem Schluss, dass Marienkäferlarven nur dann potentiell schädlichen Bt-Proteinmengen ausgesetzt sein könnten, wenn sie sich von Bt-Maispollen (direkte Exposition) oder von Beutetieren (z.B. Spinnmilben *Tetranychus urticae*) ernähren, die Bt-Proteine beim Fressen auf Bt-Mais aufnehmen (indirekte Exposition). Das Fressen von Blattläusen stellt in diesem Zusammenhang keinen Expositionspfad für Marienkäferlarven dar, da Blattläuse über das Phloem aus Maispflanzen keine Cry-Proteine aufnehmen.

Die Ergebnisse der Studie von Schmidt et al. (2009) wurde in einer Reihe von wissenschaftlichen Veröffentlichungen kritisiert (Meissle und Romeis, 2008, Rauschen, 2010, Ricroch et al., 2010). Im Mittelpunkt der Kritik stehen a) Zweifel am richtigen methodischen Vorgehen und b) Zweifel an den vorgestellten Ergebnissen:

#### Zu a) – Methodisches Vorgehen

- Die Autoren können nicht zeigen, dass die auf Mehlmotteneier applizierten Cry-Proteine aktiv waren und von den Käferlarven tatsächlich aufgenommen wurden.
- Die Kontrollen ohne Toxin weisen hohe Mortalitätsraten auf. Diese unterscheiden sich bspw. für die Tests mit Cry3Bb nicht signifikant von den Mortalitätsraten bei der höchsten Konzentrationsstufe.

### Zu b) – Ergebnisse

- Die Autoren können keine Dosis-Wirkungsbeziehung in ihren Untersuchungen feststellen. Bei höheren Konzentrationen nimmt gegenüber mittleren Konzentrationen die Mortalität ab. Dies ist für Toxizitätstests sehr ungewöhnlich, was die Autoren in der Diskussion ansprechen, aber nicht erklären können (vgl. hierzu z.B. Tabashnik *et al.* 2002, Säglitz *et al.* 2006a).
- Weitere erhobene Parameter, wie Entwicklungszeit der einzelnen Larvenstadien oder das Körpergewicht der Adulten, zeigen daher keine Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Versuchsansätzen mit den verschiedenen Cry-Proteinen.

Im Fachgespräch „Auswirkungen von Cry-Proteinen auf den Zweipunktmariekäfer *Adalia bipunctata*“ am 9. Februar 2001 im Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit<sup>3</sup> konnte die Seniorautorin (Frau Dr. Angelika Hilbeck) in einer längeren Diskussion diese Zweifel an der Studie nach Auffassung der ZKBS nicht ausräumen.

#### 2.1.2 Bewertung neuer Labor-Studien (Álvares-Alfageme *et al.* 2010, Porcar *et al.* 2010)

Álvares-Alfageme *et al.* (2010) nahmen die Studie von Schmidt *et al.* (2009) zum Anlass, die in Schmidt *et al.* (2009) Studie beobachteten Effekte von Cry-Proteinen auf Marienkäferlarven unter Versuchsbedingungen zu reproduzieren, die zum einen einer natürlichen Exposition des Zweipunktmariekäfers näher kommen (tritrophischer Ansatz mit Spinnmilben als Beutetieren) und zum anderen eine quantifizierbare Exposition hoher Bt-Proteindosen der Marienkäferlarven garantieren („worst case“ Szenario). Eine weitere Studie von Porcar *et al.* (2010) befasste sich in Laborversuchen ebenfalls mit möglichen toxischen Wirkungen von Cry-Proteinen auf Marienkäfer.

##### 2.1.2.1 Aufnahme des Bt-Proteins

---

<sup>3</sup> Im Fachgespräch haben die Seniorautoren Dr. Jörg Romeis die Studie von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) und Dr. Angelika Hilbeck die Studie von Schmidt *et al.* (2009) in einer kurzen Präsentation vorgestellt. Anschließend standen beide Autoren dem Auditorium bestehend aus Vertretern der Behörden und der ZKBS für eine Diskussion zur Verfügung.

In der Studie von Schmidt *et al.* (2009) wurden Insekteneier der Mehlmotte *E. kuehniella* mit einer *Bt*-Proteinlösung besprüht. Beim Verzehr der Eier sollten die Marienkäferlarven (*A. bipunctata*) das *Bt*-Protein aufnehmen.

Álvares-Alfageme *et al.* (2010) verfütterten ebenfalls *E. kuehniella*-Eier an Marienkäferlarven der Art *A. bipunctata* und beobachteten das Fraßverhalten unter dem Mikroskop. Es zeigte sich, dass die Marienkäferlarven die Eier aufbissen und den Inhalt aussaugten. Eine Aufnahme der Eierschalen war nicht zu beobachten.

Eine nennenswerte Aufnahme des *Bt*-Proteins, wie im Versuchsansatz von Schmidt *et al.* (2009) angenommen, ist nach den Beobachtungen von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) unwahrscheinlich. Die Aufnahme der *Bt*-Proteine durch die Marienkäferlarven wurde in den Versuchen von Schmidt *et al.* (2009) nicht überprüft. Positivkontrollen, ob die Testorganismen die verabreichten Substanzen überhaupt aufnehmen sowie eine Überprüfung der biologischen Aktivität der applizierten Cry-Proteine fehlen in der Studie von Schmidt *et al.* (2009) ebenfalls. Im Gegensatz dazu wurden diese wichtigen Kontrollen in den Studien von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) und Porcar *et al.* (2010) durchgeführt.

#### 2.1.2.2 Toxikologische Untersuchungen (Vergleich der Ansätze)

Álvares-Alfageme *et al.* (2010) führten zwei verschiedene Experimente durch, mit denen sie die Toxizität der *Bt*-Proteine Cry1Ab und Cry3Bb gegenüber Marienkäferlarven von *A. bipunctata* überprüften:

Experiment 1: In einem tritrophischen Experiment wurden Marienkäferlarven des ersten und zweiten Larvenstadiums für die Dauer von 2 bis 5 Tagen mit Spinnmilben (*Tetranychus urticae*, Acari, Tetranychidae) gefüttert, die entweder auf Cry1Ab oder auf Cry3Bb1 produzierenden Maispflanzen bzw. auf nicht gentechnisch veränderten Isolinien gehalten worden waren. *Bt*-Gehalte wurden in Blättern der Maispflanzen, den Milben und den Marienkäferlarven gemessen. In Milben, die auf *Bt*-Maispflanzen gehalten waren, war bis zu 50% des *Bt*-Gehaltes des Blattmaterials nachweisbar. In den Marienkäferlarven konnten nach Fraß der Milben, die auf *Bt*-Maispflanzen gehalten worden waren, ebenfalls *Bt*-Proteine nachgewiesen werden (<10% des Gehaltes im Vergleich zu Blattmaterial). Mit den *Bt*-Proteinmessungen konnte nachgewiesen werden, dass Marienkäferlarven in den Versuchen tatsächlich gegenüber dem *Bt*-Protein ausgesetzt waren und diese aufgenommen haben. In Biotests wurde bereits nachgewiesen, dass die *Bt* Proteine Cry1Ab und Cry3Bb in Spinnmilben ihre Toxizität nicht verlieren (Obrist *et al.* 2006, Meissle und Romeis 2009). Trotz der nachgewiesenen Exposition konnten keine erhöhten Mortalitätsraten oder subletalen

Effekte (Entwicklungszeit, Gewicht) bei den Marienkäferlarven gegenüber den Negativkontrollen festgestellt werden.

Experiment 2: In einem zweiten – direkten - Fütterungsexperiment wurde *Bt*-Protein in einer Zuckerlösung angeboten, deren Gehalt den Proteingehalt in den Spinnmilben im Experiment 1 um den Faktor 10 übertraf. Auch in diesem Versuch wurden weder letale noch subletale Effekte beobachtet.

In der Studie von Porcar *et al.* (2010) wurden ebenfalls zwei Experimente zu möglichen toxischen Wirkungen von Cry1Ab und Cry3Bb auf Marienkäferlarven bzw. adulte Marienkäfer durchgeführt.

Experiment 1: Im ersten Experiment wurden Marienkäferlarven der Art *A. bipunctata* über 6 Tage lang nicht trypsinisiertem Cry 1Ab und Cry3Aa bzw. trypsinisierten Cry1Ab in einer Konzentration von 50µg/ml exponiert. Die biologische Aktivität der Cry-Proteine wurde in Biotests mit dem Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*, Lepidoptera, Crambidae) und dem Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera, Chrysomelidae) nachgewiesen. Als Negativkontrollen dienten Wasser und die Pufferlösung, als Positivkontrolle das Insektizid ZZ Cooper (Pyrethroid; Piperonylbutoxid). Die verschiedenen Substanzen wurden den Larven in einer künstlichen Diät kontinuierlich dargeboten. Am sechsten Tag stieg die Kontrollmortalität in der Negativkontrolle stark an (>30%), so dass das Experiment abgebrochen wurde. Im Versuch wurden in den Versuchsvarianten mit Cry-Proteinen keine gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöhten Mortalitäten der Marienkäferlarven beobachtet. Die stark erhöhte Mortalität in der Positivkontrolle (Insektizide) weist auf eine funktionierende Versuchsanordnung hin.

Experiment 2: In einem weiteren Experiment wurden Adulte des Australischen Marienkäfers (*Cryptholaemus montrouzieri*, Coleoptera, Coccinelidae) und des Kurzflügelkäfers (*Atheta coriaria*, Coleoptera, Staphylinidae) über 15 Tage lang nicht trypsinisiertem Cry 1Ab und Cry3Aa bzw. trypsinisiertem Cry1Ab in einer Konzentration von 50µg/ml (entspricht für Cry1Ab der höchsten Konzentration der Studie von Schmidt *et al.* (2009)) exponiert. Als Negativkontrollen diente Wasser, Pufferlösung und Trypsin behandelte Pufferlösung, als Positivkontrolle eine 5% Borsäurelösung. Die Substanzen wurden den Testorganismen in einer künstlichen Diät (bestehend aus Fleischextrakt, Hefeextrakt, Sacchrose, Agarosegel, Honig, Vitaminen und Nipagin) angeboten.

Nach 15 Tagen wurden in den Versuchsvarianten mit Cry-Proteinen für keine der beiden Arten gegenüber der Negativkontrolle erhöhte Mortalitäten festgestellt. Die in der Positivkontrolle deutlich zu beobachteten Effekte auf beide Käferarten bestätigten eine funktionierende Versuchsanordnung.

Die für toxikologische Tests ungewöhnliche Dosis-Wirkungsbeziehung in der Studie von Schmidt *et al.* (2009) (siehe oben) lässt es als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass hier nicht die toxische Wirkung von Cry-Proteinen für die erhöhten Mortalitätsraten verantwortlich ist. Dieser Eindruck wird durch die Studien von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) und Porcar *et al.* (2010) verstärkt. In keiner der beiden letztgenannten Studien wurden signifikante Effekte auf Mortalität gefunden. In Übereinstimmung damit waren auch Entwicklungszeit und Gewichtsentwicklung der Versuchstiere unbeeinflusst.

Folgende versuchstechnische Unterschiede zwischen den genannten Studien könnten zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben:

- a) Dauer, Kontinuität bzw. verringerte Exposition der Marienkäferlarven durch Erholungsphasen im Experiment
- b) Höhe der Exposition mit Cry-Proteinen
- c) Herkunft der verwendeten Cry-Proteine

Zu a) In der Studie von Schmidt *et al.* (2009) wurden die Marienkäferlarven über den gesamten Zeitraum der Larvenentwicklung (10 Tage) gegenüber den Cry-Proteinen exponiert, wohingegen in den Experimenten von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) (Experiment 1) und Porcar *et al.* (2010) die Larven nur 6 Tage kontinuierlich gegenüber Cry-Proteinen exponiert waren. Dass die lange Exposition zur erhöhten Mortalität in der Studie von Schmidt *et al.* 2009 geführt hat, kann nicht zutreffen. In der Studie von Schmidt *et al.* (2009) wurden die bei weitem größten Effekte im ersten Larvenstadium (= 2 bis 3 Tage) nachgewiesen (z.B. 24,2 % Mortalität bei 5µg/ml Cry1Ab). Im weiteren Verlauf des Experiments erhöhte sich die Mortalität nur noch um 3,2%. Aus diesem Grund ist eine kontinuierliche Exposition über die gesamte Dauer der Larvenentwicklung für die beobachteten Effekte nicht ausschlaggebend. Der relevante erste Zeitraum von 2-3 Tagen in der Studie von Schmidt *et al.* (2009) wird in den Studien von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) (Experiment 1) und Porcar *et al.* (2010) mit 6 Tagen mehr als abgedeckt.

Zu b) Die Studie von Schmidt *et al.* (2009) wurde darauf angelegt, einen Dosis-Wirkungszusammenhang festzustellen. Die Studien bzw. Teilstudien von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) und Porcar *et al.* (2010) stellten dagegen entweder die natürliche Exposition der Marienkäferlarven gegenüber Cry-Proteinen oder eine vielfach höhere Exposition als unter natürlichen Bedingungen zu erwarten wäre (Worst-Case-Szenario) nach. Die verabreichten Toxinmengen lassen sich nur schwer vergleichen, da genaue Expositionswerte in der Studie von Schmidt *et al.* (2009) fehlen. In keiner der Teilstudien von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) und Porcar *et al.* (2010) wurden vergleichbar hohe Mortalitätsraten wie in der Studie von Schmidt *et al.* (2009) gefunden. Es wurden im Gegensatz zu Schmidt *et al.* (2009) keine

signifikanten Unterschiede zwischen Testreihen mit Cry-Proteinen und Negativkontrollen festgestellt werden.

Zu c) Ein weiterer Unterschied zwischen den Versuchsansätzen ist die Verwendung von unterschiedlichen bzw. trypsinisierten (Schmidt *et al.* 2009) und nicht trypsinisierten Cry3-Proteinen (Álvares-Alfageme *et al.* 2010; Porcar *et al.* 2010) (siehe oben). Zumindest für Cry3Aa und Cry3Bb könnte die Verwendung unterschiedlicher oder unterschiedlich vorbehandelter Cry-Proteine die sich widersprechenden *in vitro* Effekte auf Marienkäferlarven erklären. Die Ergebnisse von Schmidt *et al.* 2009 stehen dann aber immer noch im Widerspruch zu den Ergebnissen der tritrophischen Experimente von Álvares-Alfageme *et al.* (2010) mit Cry1Ab-Proteinen, die keine Effekte auf Marienkäferlarven zeigten.

### 2.1.3 Bewertung weiterer Labor- und Freilandstudien zu Wirkungen von Cry-Proteinen auf Marienkäfer

Die konträren Ergebnisse von Schmidt *et al.* (2009) gegenüber Álvares-Alfageme *et al.* (2010) bzw. Porcar *et al.* (2010) können mit Hilfe von weiteren Literaturstudien hinsichtlich ihrer ökologischen Relevanz eingeordnet werden: Zahlreiche Labor- und Freilandstudien fanden keine Wirkung der *Bt*-Proteine Cry1Ab und Cry3Bb auf *Adalia bipunctata* (Wold *et al.* 2001) und andere Marienkäferarten (Pilcher *et al.* 1997, Jasinski *et al.* 2003, Candolfi *et al.* 2004, Dively & Rose 2004, Bai *et al.* 2005, Lundgren & Wiedenmann 2005, Poza *et al.* 2005, Álvarez-Alfageme *et al.* 2008).

Ein weiteres Argument gegen eine mögliche Gefährdung von Marienkäferlarven durch Lepidopteren- und Coleopteren-spezifischen *Bt*-Proteinen ist die geringe Exposition der Marienkäferlarven unter natürlichen Bedingungen. Marienkäferlarven ernähren sich vorwiegend von Blattläusen. Es ist nachgewiesen, dass Blattläuse, die auf *Bt*-Maispflanzen leben, Cry-Proteine nicht aufnehmen (Head *et al.* 2001; Raps *et al.* 2001; Dutton *et al.* 2002; Lundgren & Wiedenmann 2005). Eine mögliche Exposition von Marienkäfern ist nur über die Aufnahme von Mais-Pollen gegeben. Insbesondere im Zusammenhang mit MON810 ist jedoch aufgrund der geringen Cry1Ab Menge im Pollen ein Effekt auf Marienkäferlarven nicht zu erwarten. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass Schmidt *et al.* (2009) die Konzentration von Cry1Ab in Maispollen von MON810 um einen Faktor von rund 100 zu hoch angeben in Vergleich zu den Daten der AGBIOS Datenbank (AGBIOS 2011), auf die die Autoren Bezug nehmen. Dies trägt unabhängig von den experimentellen Ergebnissen zu einer falschen Wahrnehmung des Risikos von MON810 für Nichtziel-Organismen bei.

## 2.2 Neue Modellierungs-Studie zur Exposition und möglichen Gefährdung von Schmetterlingen durch den Anbau von Mais MON810

### 2.2.1 Perry et al. (2010)- Originalstudie

Der Anbau von Bt-Maissorten mit Lepidopteren-spezifischen Cry Proteinen gefährdet möglicherweise Nichtzielschmetterlingsarten auf oder in der Nähe von Bt-Maisfeldern. Da entsprechende Studien bisher für die EU nicht existieren, haben Perry *et al.* (2010) mittels einer Modellierung die Exposition und mögliche schädliche Effekte von MON810-Pollen auf Larven von drei Schmetterlingsarten (Kohlschabe, Tagpfauenauge, Admiral) in Maisfeldern und den unmittelbar daran angrenzenden Biotopen abgeschätzt. Die Autoren<sup>4</sup> stellen mit der vorliegenden Arbeit einen Ansatz vor, mit dem erstmals wichtige Wirkfaktoren für eine Quantifizierung der Gefährdung verbreiteter Arten der Nichtzielschmetterlinge auf eine relativ einfache und transparente Weise miteinander in Beziehung gesetzt werden. Hierzu integrieren die Autoren verschiedene Einzelaspekte, wie vorhandene Dosis-Wirkungsstudien aus dem Labor, Abundanz- und Expositionsstudien aus dem Feld sowie Schätzungen von Experten zu lokalen Expositionsparametern für 11 repräsentative Maisanbauregionen in vier EU Mitgliedsstaaten zu einer umfassenden Expositions- und Wirkungsstudie.

In die Berechnung gehen 11 Parameter ein. Für jede Art wurde eine maximale Mortalitätsrate (Wirkungswahrscheinlichkeit) im Maisfeld und in dem an das Feld angrenzenden Randbereich bestimmt. In diese Berechnung gehen aus Dosis-Wirkungsversuchen im Labor abgeleitete Annahmen für die konzentrationsabhängige Mortalitätswahrscheinlichkeit (Änderung der Mortalität mit der Änderung der Konzentration des Cry1Ab-Protein) der jeweiligen Art sowie Daten für die Pollenkonzentration auf den Wirtspflanzen ein. Diese wird im Feld als konstant angenommen und im Randbereich entfernungsabhängig dargestellt. Die maximalen Mortalitätsraten im Feld und im Randbereich des Feldes sind zunächst nur abhängig von der Empfindlichkeit der Larven gegenüber dem Cry1Ab-Protein und errechnen sich hinsichtlich verschiedener Expositionsmerkmale aus Maximalwerten. In dem Modell werden diese Raten bezüglich artspezifischer Expositionsmerkmale angepasst und auf die Population einer Anbauregion bezogen. Die für die Anpassung notwendigen Informationen basieren auf Angaben und Abschätzungen von Experten, die mit den regionalen Gegebenheiten der repräsentativen Maisanbauregionen vertraut sind.

---

<sup>4</sup> Die Autoren sind als Mitglieder und Experten des EFSA GMO Panel und verschiedener Arbeitsgruppen des GMO Panels zu Aspekten der Umweltrisikobewertung sowie als Angestellte der EFSA unmittelbar in die Bewertung von Anträgen auf Zulassung des Inverkehrbringens von GVO in der EU eingebunden und haben Zugriff auf eine Reihe von öffentlich zugänglichen sowie vertraulichen Datenquellen

Die artspezifischen Anpassungen der Exposition werden mit Hilfe von zwei Parametern beschrieben: (1) Physikalische Effekte abgeleitet aus Expertenwissen, z.B. über die Beschaffenheit der Blätter der Wirtspflanze (z. B. rau, glatt), das Fraßverhalten der Larven auf der Wirtspflanze (z.B. exponiert, versteckt) sowie (2) die Synchronität zwischen dem Auftreten des empfindlichen Larvenstadiums und der Maisblüte eingehen. Beide Parameter vermindern die maximalen Mortalitätsraten. Der Bezug von einzelnen Schmetterlingsindividuen auf die Populationsebene wird über mehrere regional-spezifische Parameter hergestellt. Dies sind (1) der Anteil aller Futterpflanzen der Schmetterlingsart in der Anbauregion, welcher sich auf Äckern und in deren Randbereichen befindet, (2) der Anteil der Maisanbaufläche, (3) der Anteil der Maisfelder, welche mit Mais MON810 bestellt werden, (4) die mittlere Größe der Felder, (5) die mittlere Breite der Randbereiche der Felder und (6) die Dichte der Wirtspflanzenart in Maisfeldern und in deren Randbereichen. Der Anteil der Anbaufläche für Mais MON810 an der Gesamtmaisbaufläche konnte nur für eine Region auf Basis tatsächlicher Gegebenheiten angegeben werden, für alle anderen Regionen wurde ein Maximum von 80% (100% - 20% Refugialfläche für das Resistenzmanagement) angenommen.

Die Autoren geben an, immer wenn eine Auswahlmöglichkeit bestand, für jeden Aspekt des Modells die ‚worst-case‘ Annahme gestützt zu haben, wodurch das Modell die Mortalitätsraten eher über- als unterschätzt. Da alle Parameter mit Ausnahme der artspezifischen maximalen Mortalitätsraten im Feld und im Randbereich des Feldes in der Regel nur durch einen lokalen Experten abgeschätzt wurden (keine Auswahl), bezieht sich diese Aussage im Wesentlichen auf die Bestimmung der artspezifischen maximalen Mortalitätsrate im Feld und im Feldrand. Hier wurden folgende Entscheidungen für das Modell getroffen:

- 1.) Die Toxizität von MON810-Pollen ist für Larven von Nichtzielschmetterlingen so gering, dass für die Aufnahme von Pollen bisher keine  $LC_{50}$ -Werte bestimmt werden konnten. Aus diesem Grund haben die Autoren die publizierte Dosis-Wirkungsbeziehung für Pollen eines anderen GVO, nämlich Mais Bt176, so angepasst, dass sie der von Mais MON810-Pollen entspricht. Entscheidend ist hierbei die Festlegung des Faktors, um den die Konzentration von Cry1Ab-Protein im Pollen von Mais MON810 gegenüber der im Pollen von Mais Bt176 verringert ist. Die Autoren entscheiden sich für einen Faktor von 31,05 welcher den Mittelwert der Quotienten aus der publizierten Minimal- bzw. Maximalkonzentration von Cry1Ab-Protein im Pollen von Mais Bt176 (1,1 bis 7,1  $\mu\text{g} / \text{g}$ ) und der publizierten Maximalkonzentration im Pollen von Mais MON810 (0,09  $\mu\text{g}/\text{g}$ ) bildet (Nguyen & Jehle, 2007; EFSA 2009).

- 2.) Der Anstieg (slope) der konzentrationsabhängigen Mortalitätswahrscheinlichkeit von Nichtzielschmetterlingen wurde bisher nur für wenige Arten experimentell bestimmt. Felke *et al.* (2010) publizierten für das Tagpfauenauge eine Steigung von 5,795. Perry *et al.* (2010) betonen, dass die Berücksichtigung einer so hohen Steigung im Modell bei den typischerweise in Maisfeldern oder deren Randbereich gefundenen Pollenkonzentrationen nur zu sehr geringen Mortalitätsraten führen würde. Die Autoren entscheiden sich, für alle drei Arten eine geringere Steigung von 1,095 zu verwenden, etwa wie sie von Saeglitz *et al.* (2006a, b) und Farinos *et al.* (2004) für Schadschmetterlinge (Maiszünsler und Maiseule) ermittelt wurde. Sie führen damit in das Modell einen Sicherheitsfaktor ein, der zu einer nicht bestimmten Überschätzung der Mortalitätsraten führt.
- 3.) Zur Berücksichtigung subletaler Effekte wurde die im Feld und im Randbereich ermittelte maximale Mortalitätsrate mit dem Faktor vier multipliziert, womit impliziert wird, dass zusätzlich zu den akut vergifteten Raupen eine dreifache Menge an Raupen so in ihrer Entwicklung gestört werden, dass auch sie das nächste Larvenstadium nicht erreichen.
- 4.) Für die Pollenkonzentration auf den Wirtspflanzen in und am Rand von Maisfeldern wurden Daten einer umfangreichen Erhebung der Maispollendeposition auf mit Vaseline bestrichenen Objektträgern (Wraight *et al.*, 2000) zugrunde gelegt. Der Vergleich mit entsprechenden Zählungen auf Blattoberflächen (Pleasants *et al.*, 2001; Lang *et al.*, 2004) legt jedoch nahe, dass die Pollendeposition mit dieser Methode etwa um einen Faktor von drei im Modell überschätzt wird. Die Abnahme der Pollendeposition mit der Entfernung vom Feldrand wurde aus mehreren Datensätzen (wie in Perry *et al.* 2010 beschrieben) abgeleitet.

Unter Berücksichtigung der beschriebenen Zusammenhänge und Annahmen errechnen Perry *et al.* (2010) Mortalitätsraten, die bezogen auf die Populationen des Tagpfauenauges und des Admirals in keiner Region 1 von 1572 Individuen überschreiten und für die Kohlschabe maximal 1 von 392 Individuen erreichen würden.

### 2.2.2 Wissenschaftliche Diskussion zur Veröffentlichung von Perry *et al.* (2010)

Lang *et al.* (2011) diskutieren Unsicherheiten zentraler Annahmen im Modell von Perry *et al.* (2010). Die Autoren wenden ein, dass bisher keine Daten vorlägen, mit denen die Linearität der Dosis-Wirkungsbeziehung für das Cry1Ab-Protein abgesichert werden könne. Es sei theoretisch möglich, dass das Protein in geringen Konzentrationen eine überproportional

große Wirkung entfalte. In diesem Zusammenhang kritisieren Lang *et al.* (2011) auch die getroffene Entscheidung für den Konzentrationsunterschied (Faktor 30,05) des Cry1Ab-Proteins im Pollen von Mais Bt176 gegenüber Mais MON810. Sie verweisen auf einen besonders niedrigen Messwert für den Gehalt von Cry1Ab-Protein in Pollen von Mais Bt176 (Nguyen, 2004), der in diesem Fall die gemessene Maximalkonzentration im Pollen von Mais MON810 nur um den Faktor vier übersteige.

Als einen weiteren Kritikpunkt führten die Autoren an, dass für eine der drei von Perry *et al.* (2010) modellierten Arten, den Admiral, bisher keine Daten über die Empfindlichkeit der Art gegenüber Cry1Ab-Protein vorlägen. Da die Empfindlichkeit einzelner Arten sehr unterschiedlich sei, könnten die Berechnungen für den Admiral auf Basis der Annahme einer mit dem Tagfalter vergleichbaren Empfindlichkeit zu falschen Ergebnissen geführt haben. Schließlich würde das Modell die Mortalität von Schmetterlingslarven wahrscheinlich unterschätzen, da die Tiere in den der Abschätzung zugrunde liegenden Laborversuchen nur wenige Tage exponiert worden seien. Auch sei das im Modell verwendete Konzept für die Berücksichtigung subletaler Effekte nicht ausreichend begründet.

Die Beschreibung der Pollenausbreitung und der Populationsdynamik wird von Lang *et al.* (2011) nicht angesprochen.

In einer Antwort auf die Kritik von Lang *et al.* (2011) greifen Perry *et al.* (2011) die Diskussion über Variabilität, Unsicherheiten und die unterschiedliche Sensitivität der Modellparameter auf. Sie veranschaulichen anhand einer Grafik die überproportionale Bedeutung der Steigung (slope) der Dosis-Wirkungsbeziehung für das Cry1Ab-Protein für die errechneten Mortalitätsraten. Demnach ist der Einfluss der Steigung deutlich größer als der angenommene Unterschied der Konzentration des Cry1Ab-Proteins im Pollen von Mais Bt176 im Vergleich zu der im Pollen von Mais MON810. Insbesondere verdeutlichen die Autoren damit, dass mit der getroffenen Entscheidung (geringe Steigung) für Mais MON810 unter Feldbedingungen überhaupt erst nennenswerte Mortalitätsraten errechnet werden können.

Im Bezug auf die weiteren Kritikpunkte führen Perry *et al.* (2011) aus, dass es keinerlei Hinweise für eine Nichtlinearität der Dosis-Wirkungsbeziehung für das Cry1Ab-Protein gäbe. Für einen der zitierten Datensätze (Lang & Vojtech, 2006) sei die Linearität belegt worden. Bezüglich des Konzentrationsunterschieds zwischen Pollen von Mais Bt176 und Mais MON810 hätten Lang *et al.* (2011) Messwerte aus verschiedenen Jahren verglichen. Vergleicht man die von Nguyen (2004) für die beiden Maislinien in den jeweiligen Versuchsjahren ermittelten Werte, so ergäben sich Verhältnisse von 64,8 (Versuchsjahr 2002) bzw. 30,5 (Versuchsjahr 2003).

In Würdigung der weiteren Diskussionspunkte unterstützen Perry *et al.* (2011) den Wunsch der Kritiker nach einer umfangreicheren Datenbasis und begründen, warum die aufgezeigten Datenlücken aus ihrer Sicht und auf Basis des derzeitigen Kenntnisstands nicht zu einer systematischen Unterschätzung der Mortalitätsraten führen.

Den Berechnungen liegen ‚worst-case‘ Annahmen zugrunde, von denen eine wesentliche Komponente die Verwendung der Dosis-Wirkungsbeziehungen empfindlicher Schadschmetterlinge (Maiszünsler und Maiseule) darstellt. In einer weiteren Veröffentlichung (Perry *et al.*, 2011) verdeutlichen die Autoren die hohe Bedeutung der Dosis-Wirkungsbeziehung in ihrem Modell.

Die ZKBS ist der Auffassung, dass das Modell die regionalen Mortalitätsraten von verbreiteten Arten von Nichtzielschmetterlingen auf Grund der verwendeten ‚worst-case‘ Annahmen überschätzt, so dass die prognostizierten Effekte auf Nichtzielschmetterlinge tatsächlich gering sein werden. Werden diese Ergebnisse der Studie von Perry *et al.* (2010) noch mit einer konventionellen Bekämpfung des Schadorganismus mit Insektiziden und den damit verbundenen Risiken auf Nichtzielschmetterlinge in Beziehung gesetzt, schätzt die ZKBS die möglicherweise zu erwartenden Risiken durch den Anbau von MON810 als vernachlässigbar ein.

### 3 Literatur

AGBIOS (2011) GM Databas. Information on GM approved products. [http://cera-gmc.org/index.php?action=gm\\_crop\\_database](http://cera-gmc.org/index.php?action=gm_crop_database). zugegriffen am 16.03.2011

Álvarez-Alfageme, F., Bigler, F. & Romeis, J. (2010) Laboratory toxicity studies demonstrate no adverse effects of Cry1Ab and Cry3Bb1 to larvae of *Adalia bipunctata* (Coleoptera:Coccinellidae):the importance of study design. Transgenic Res. DOI: 10.1007/s11248-010-9430-5.

Álvarez-Alfageme F., Ferry N., Castañera P., Ortego F. & Gatehouse A.M.R. (2008) Prey mediated effects of *Bt* maize on fitness and digestive physiology of the red spider mite predator *Stethorus punctillum* Weise (Coleoptera: Coccinellidae). Transgenic Res. 17: 943-954.

Bai Y.Y., Jiang M.X. & Cheng J.A. (2005) Effects of transgenic rice pollen on fitness of *Propylea japonica*. J. Pest Sci. 78: 123-128.

- Canolfi M.P., Brown K., Grimm C., Reber B. & Schmidli H. (2004). A faunistic approach to assess potential side-effects of genetically modified *Bt*-corn on non-target arthropods under field conditions. *Biocon. Sci. Technol.* 14: 129-170.
- Dively G.P. & Rose R. (2004) Effects of *Bt* transgenic and conventional insecticide control on the non-target natural enemy community in sweet corn. 1st International Symposium on Biological Control of Arthropods: 265-274.
- Dutton A., Klein H., Romeis J. & Bigler F. (2002) Uptake of *Bt*-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol. Entomol.* 27: 441–447.
- EFSA (2009) Scientific Opinion of the Panel on Genetically Modified Organisms on applications (EFSAGMO-RX-MON810) for the renewal of authorisation for the continued marketing of (1) existing food and food ingredients produced from genetically modified insect resistant maize MON810; (2) feed consisting of and/or containing maize MON810, including the use of seed for cultivation; and of (3) food and feed additives, and feed materials produced from maize MON810, all under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *EFSA J.* 1149, 1–85. See [http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific\\_Opinion/gmo\\_op\\_ej1149\\_maize-MON810\\_finalopinion\\_en\\_rev.pdf](http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Scientific_Opinion/gmo_op_ej1149_maize-MON810_finalopinion_en_rev.pdf).
- Farinos, G. P., de la Poza, M., Herná´ndez-Crespo, P., Ortego, F. & Castanera, P. (2004) Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt-maize cultivation in Spain. *Ent. Exp. Appl.* 110: 23–30.
- Felke, M., Langenbruch, G.-A., Feiertag, S. & Kassa, A. (2010) Effect of Bt-176 maize pollen on first instar larvae of the Peacock butterfly (*Inachis io*) (Lepidoptera; Nymphalidae). *Environ. Biosafety Res.* DOI: 10.1051/ebr/2010006.
- Head G., Brown C.R., Groth M.E., Duan J.J. (2001) Cry1Ab protein levels in phytophagous insects feeding on transgenic corn: implications for secondary exposure risk assessment. *Entomol. Exp. Appl.* 99: 37–45.
- Jasinski J.R., Eislely J.B., Young C.E., Kovach J. & Wilson H. (2003) Select nontarget arthropod abundance in transgenic and nontransgenic field crops in Ohio. *Environ. Entomol.* 32: 407-413.
- Lang, A., Brunzel, S., Dolek, M., Otto, M. & Theissen, B. (2011) Modelling in the light of uncertainty of key parameters: a call to exercise caution in field predictions of Bt-maize effects. *Proc. R. Soc. B* 277. (doi:10.1098/rspb.2010.2085)

- Lang, A., Ludy, C. & Vojtech, E. (2004) Dispersion and deposition of Bt-maize pollen in field margins. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 111: 417–428.
- Lundgren J.G. & Wiedenmann R.N. (2005) Tritrophic interactions among *Bt* (Cry3Bb1) corn, aphid prey, and the predator *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ. Entomol.* 34: 1621-1625.
- Meisle, M. & Romeis, J. (2008) Compatibility of biological control with *Bt* maize expressing Cry3Bb1 in controlling corn rootworms. In: Mason P.G., Gillespie, D.R. & Vincent, C. (eds): Proceedings of the third international symposium on biological control of arthropods, Christchurch, New Zealand, 8-13 February 2009, FHTET-2008-06, Morgantown, WV, United states Department of Agriculture, Forest Service, pp 145-160.
- Meisle M. & Romeis J. (2009) Insecticidal activity of Cry3Bb1 expressed in Bt-maize on larvae of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) *Ent. Exp. Appl.* 131: 308-319.
- Nguyen, H.T. & Jehle, J.A. (2007) Quantitative analysis of the seasonal and tissue-specific expression of Cry1Ab in transgenic maize MON810. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz* 114: 82–87.
- Nguyen, H.T. (2004) Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden zum Anbau von Bt-Mais: Expression, Nachweis und Wirkung von rekombinantem Cry1Ab in heterologen Expressionssystemen. PhD thesis, Georg- August Universität Göttingen, Germany.
- Obrist L., Dutton A., Romeis J. & Bigler F. (2006) Biological activity for Cry1Ab toxin expressed by Bt maize following ingestion by herbivorous arthropods and exposure of the predator *Chrysoperla carnea*. *Biocontrol* 51: 31-48.
- Perry J.N., Devos Y., Arpaia, S., Bartsch D., Gathmann A., Hails R.S., Kiss J., Lheureux K., Manachini B., Mestdagh S., Neemann G., Ortego F., Schiemann J. & Sweet J.B. (2010) A mathematical model of exposure of nontarget Lepidoptera to Bt-maize pollen expressing Cry1Ab within Europe. *Proc. R. Soc. B* 277: 1417– 1425.
- Perry J.N., Devos Y., Arpaia S., Bartsch D., Gathmann A., Hails R.S., Kiss J., Lheureux K., Manachini B., Mestdagh S., Neemann G., Ortego F., Schiemann J. & Sweet J. B. (2011) The usefulness of a mathematical model of exposure for environmental risk assessment. *Proc. R. Soc. B* DOI: 10.1098/rspb.2010.2667.
- Pilcher C.P., Obrycki J.J., Rice M.E. & Lewis L.C. (1997) Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Environ. Entomol.* 26: 446-454.

- Pleasants J.M., Hellmich R.L., Dively G.P., Sears M.K., Stanley-Horn D.E., Mattila H.R., Foster J.E., Clark T.L. & Jones G.D. (2001) Corn pollen deposition on milkweeds in or near corn field. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11 919–11 924.
- Porcar M., García-Robles I., Domínguez-Escribà L., Latorre A. (2010) Effects of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry3Aa endotoxins on predatory Coleoptera tested through artificial diet-incorporation bioassays. *Bull Entomol Res.* 100: 297-302.
- Poza de la M., Pons X. Farinós G.P., López C., Ortego F., Eizaguirre M., Castanera P. & Albajes R. (2005) Impact of farm-scale *Bt* maize on abundance of predatory arthropods in Spain. *Crop Protection* 24: 677-684.
- Raps A., Kehr J., Gugerli P., Moar W.J., Bigler F. & Hilbeck A. (2001) Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Mol. Ecol.* 10: 525–533.
- Rauschen, S. (2010) A case of „pseudo science“? A study claiming effects of the Cry1Ab protein on larvae of the two-spotted ladybird is a reminiscent of the case of the green lacewing. *Transgenic Res* 19: 13-16.
- Ricroch A., Bergé J.B. & Kuntz M. (2010) Is the German suspension of MON810 maize cultivation scientifically justified? *Transgenic Res.* 19: 1-12.
- Saeglitz C., Bartsch D., Eber S., Gathmann A., Priesnitz K. U. & Schuphan I. (2006a) Monitoring the Cry1Ab susceptibility of European corn borer in Germany. *J. Econ. Entomol.* 99: 1768–1773.
- Saeglitz C., Engels H. & Schuphan I. (2006b) Final Report of ProBenBt, Workpackage 1, Task 4. See <http://www.bio5.rwth-aachen.de/german/downloads/EU-Review.pdf>.
- Schmidt J.E.U., Braun C.U., Whitehouse L.P. & Hilbeck A. (2009) Effects of activated *Bt* transgene products (Cry1Ab, Cry3Bb) on immature stages of the ladybird *Adalia bipunctata* in laboratory ecotoxicity testing. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 221-228.
- Tabashnik B.E., Liu Y.-B., Dennehy T.J., Sims M.A., Sisterson M.S., Biggs R.W., Carrière Y. (2002) Inheritance of resistance to Bt toxin Cry 1Ac in a field-derived strain of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae) *Journal of Economic Entomology*, 95: 1018-11026.
- Wold S.J., Burkness E.C., Hutchison W.D. & Venette R.C (2001) In-field monitoring of beneficial insect populations in transgenic corn expressing a *Bacillus thuringiensis* toxin. *J. Entomol. Sci.* 36: 177-187.

Wraight, C. L., Zangerl, A. R., Carroll, M. J. & Berenbaum, M. R. (2000) Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 7700–7703.