

# **Biosicherheit im Bereich der ausserhumanen Gentechnologie**

**Ein Forschungsprojekt im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt  
(BAFU)**

Unterlagen zur Abschluss-Tagung vom 17. Juni 2008

Hotel Kreuz, Bern

# Inhalt

<b>1. Die Früherkennung von unerwarteten und langfristigen Umweltauswirkungen von GVO</b>	
<b>1.1. Umweltmonitoring des kommerziellen Anbaus von Bt-Mais</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Methodische Grundlagen der Langzeitüberwachung von GVO: Schutzziele – Indikatoren – Erhebungsmethoden</b>	<b>7</b>
<b>2. Analyse ethischer Fragen zur Risikobewertung im Bereich Biotechnologie;</b>	
<b>2. Analyse Ethischer Fragen zur Risikobewertung im Bereich der Biotechnologie</b>	<b>13</b>
<b>3. Risiken für das Ökosystem des Bodens</b>	
<b>3.1. Abbaubarkeit von Bt-Mais im Boden und Auswirkungen auf Regenwürmer und andere Bodenmakroorganismen</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Belastungen des Ökosystems Boden durch natürliche sowie gentechnisch veränderte Organismen – Effekte, Methoden und Schadensdefinition als Beitrag zur Risikobeurteilung</b>	<b>23</b>
<b>4. Risiken für Nichtzielorganismen</b>	
<b>4.1. Auswirkungen insektenresistenter transgener Pflanzen auf Solitäre Bienen</b>	<b>28</b>
<b>4.2. Die Wirkung erhöhter Resistenz gegen Krankheitserreger auf die Interaktion mit symbiotischen Pilzen im Reis</b>	<b>33</b>
<b>4.3. Einfluss der Transgenosis auf die Pflanzen-Insekten-Beziehungen im Apfel-System, insbesondere auf chemisch vermittelte Wechselwirkungen</b>	<b>38</b>

## 1.1. Umweltmonitoring während des kommerziellen Anbaus von *Bt*-Mais

Ansätze um mögliche Auswirkungen auf Tagfalter und Nützlinge zu erfassen

Olivier Sanvido, Stéphanie Aviron, Jörg Romeis and Franz Bigler

Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART, Reckenholzstr. 191, CH-8046 Zürich, Switzerland

Kann ein Umweltmonitoring begleitend zum kommerziellen Anbau von gentechnisch veränderten Kulturpflanzen (GVP) negative Auswirkungen auf die Umwelt erfassen? Mit dieser Frage befassten sich Olivier Sanvido, Stéphanie Aviron, Jörg Romeis and Franz Bigler von der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz Tänikon ART. In ihrem Bericht diskutieren sie den Ansatz des Umweltmonitoring und machen Vorschläge, wie sich negative Umweltauswirkungen des Anbaus von GVP nachweisen lassen könnten. Das Umweltmonitoring wurde dabei in eine fallspezifische Überwachung und eine allgemeine überwachende Beobachtung aufgeteilt. Die fallspezifische Überwachung befasst sich mit erwarteten Auswirkungen einer bestimmten GVP und hat zum Ziel festzustellen, ob diese eintreten. Im Gegensatz dazu hat die allgemeine überwachende Beobachtung zum Ziel, unerwartete Auswirkungen auf die Umwelt festzustellen.

### Monitoring möglicher Auswirkungen des kommerziellen Anbaus von *Bt*-Mais auf Tagfalter in der Schweiz

#### *Ausgangslage*

Negative Auswirkungen von GVP müssen festgestellt werden können, um die Umwelt vor Schaden zu schützen. Im Falle von *Bt*-Mais, der das insektizide Protein Cry1Ab aus *Bacillus thuringiensis* produziert, können mögliche Auswirkungen auf Tagfalter aufgrund der spezifischen Wirkung des Toxins auf Lepidopteren (Schmetterlinge und Motten) nicht ausgeschlossen werden. Kann ein anbaubegleitendes Monitoring negative Auswirkungen auf Tagfalterpopulationen feststellen? Wie sollte ein solches Monitoring organisiert werden und welche Alternativen existieren dazu?

#### *Analyse*

Die Autoren verwendeten einen hierarchischen Ansatz, um die natürliche Variabilität der Biodiversität der Tagfalter zu erfassen. Der Ansatz berücksichtigt sowohl die Ebene des Feldes, als auch der Landschaft und der Region. Die Analyse eines bestehenden Datensets über das Vorkommen von Tagfalterpopulationen in drei verschiedenen Mais-Anbauregionen der Schweiz zeigte, dass 15 von 24 getesteten Parametern - die Zusammensetzung der Landschaft und landwirtschaftliche Nutzung der drei beprobten Regionen beschrieben - einen signifikanten Einfluss, sowohl auf die Diversität als auch auf die Häufigkeit der Schmetterlingspopulationen hatten.

#### *Die Herausforderung*

Die Analyse zeigte, dass die Erfassung potentieller Auswirkungen von *Bt*-Mais mit Hilfe einer fallspezifischen Überwachung einen beträchtlichen Probenahmeaufwand benötigt. Durch eine Datenerhebung in hundert Paaren von *Bt*- und nicht-*Bt*-Maisfeldern würden lediglich grössere Veränderungen aufgedeckt (z.B. eine Abnahme der Individuenzahl um mehr als 30%). Dazu

kommt, dass seltene und ökologisch besonders wertvolle Arten dabei kaum erfasst werden können.

#### *Risiko-Hypothesen sollten sollen unter geeigneten Bedingungen getestet werden*

Hypothesen sollten unter Bedingungen getestet werden, bei denen der mutmassliche Effekt am ehesten nachgewiesen werden kann. Statt mögliche Auswirkungen auf Tagfalterarten im Feld zu überwachen, könnte dies bereits im Rahmen der Risikobewertung vor Erteilung der Anbauerlaubnis effizienter ermittelt werden. Dies könnte eine Abschätzung der Wahrscheinlichkeit der Aufnahme des Toxins durch Tagfalter und Untersuchungen der Toxizität auf einzelne Tagfalter-Arten im Labor beinhalten. Unerwartete Auswirkungen eines kommerziellen Anbaus von *Bt*-Mais könnten zusätzlich durch eine allgemeine überwachende Beobachtung festgestellt werden. Dies setzt voraus, dass existierende Monitoringprogramme erlauben, die natürliche Variabilität von Tagfalterpopulationen zu beschreiben. Ist die natürliche Variabilität bekannt, dann könnte die Artenvielfalt von Tagfaltern ein guter Indikator für die allgemeine überwachende Beobachtung sein.

### **Ansätze für das Monitoring der Auswirkungen von *Bt*-Mais auf Nützlinge**

Risikobewertung vor Zulassung und anbaubegleitendes Monitoring sind zwei unterschiedliche Phasen während des Inverkehrbringens einer GVP. Die fallspezifische Überwachung ist ein Mittel, um Risiken zu überwachen, die bei der Risikobewertung identifiziert wurden und um verbleibende Unsicherheiten abzudecken. Welche Unsicherheiten noch bestehen und ob diese akzeptabel sind, muss vor der Einführung einer fallspezifischen Überwachung entschieden werden.

#### *Wissenschaftlich solide Strategien*

Insektenresistente Pflanzen (wie z.B. *Bt*-Mais) werfen eine weitere Frage auf: Werden ökologische Funktionen wie die biologische Schädlingsbekämpfung beeinträchtigt? Diese Funktion wird von nützlichen Insekten wie Räubern und Parasitoiden (natürlichen Frassfeinde) erfüllt. Da das Cry1Ab Protein für Nützlinge jedoch nicht toxisch ist, gibt es keine logische Hypothese, wonach diese Arten durch den Anbau von *Bt*-Mais beeinträchtigt werden könnten. Eine fallspezifische Überwachung von Effekten von *Bt*-Mais auf Nützlinge ist daher nicht angezeigt. Folglich ist auch ein faunistisches Monitoring von bestimmten Arten und Nützlingsgruppen nicht geeignet, um eine Beeinträchtigung der biologische Schädlingsbekämpfung festzustellen. Als Alternative wird ein Ansatz vorgeschlagen, bei dem solche Auswirkungen indirekt durch eine allgemeine Überwachung von Schädlingspopulationen festgestellt werden kann. Unerwartete Ausbrüche von Schädlingen könnten z.B. mit Hilfe eines Fragebogens gesammelt werden, der von Landwirten ausgefüllt wird, welche *Bt*-Mais anbauen. Würde eine Korrelation zwischen dem Anbau von *Bt*-Mais und einem ungewöhnlichen Ausbruch eines spezifischen Maisschädlings festgestellt, müssten spezifische Untersuchungen einen möglichen Zusammenhang mit dem Anbau von *Bt*-Mais ermitteln. Der vorgeschlagene Ansatz basiert auf der Grundlage der funktionellen Ökologie, da er sich auf die biologische Funktion konzentriert und nicht auf die Artenvielfalt und Individuenzahlen. Dadurch wird verhindert, dass wenig aussagekräftige Daten gesammelt werden, die nichts zum Ziel des

Umweltmonitorings - eine wissenschaftlich fundierte Basis für behördliche Entscheidungen zu liefern- beitragen.

### **Herausforderungen und mögliche Lösungen für behördliche Entscheide im anbaubegleitenden Monitoring von gentechnisch veränderten Pflanzen**

Ein anwendbares Kriterium für die Beurteilung von „Umweltschaden“ steht nicht zur Verfügung. Dies macht Entscheide schwierig, ob ein bestimmtes identifiziertes Risiko eingegangen werden darf und ob eine fallspezifische Überwachung nötig ist. Zudem haben Datenerhebung und Analyse ihre Grenzen.

Bei der Beurteilung, ob es sich um einen Umweltschaden handelt, ist man bei behördlichen Entscheidungen zwei wesentlichen Herausforderungen ausgesetzt:

1. Es gibt methodologische Einschränkungen, um eindeutig festzustellen zu können, inwieweit erhobene Daten die natürliche Variabilität eines bestimmten Indikators überschreiten
2. Verschiedene Interessengruppen können wissenschaftliche Daten unterschiedlich interpretieren. Daraus entstehen Kontroversen in Bezug auf die Bewertung von GVP-bedingten Auswirkungen.

Als Ausweg aus dieser Situation wird eine alternative Strategie vorgeschlagen.

#### *Umweltmonitoring ist anspruchsvoll und hilft häufig nicht Unsicherheiten zu beheben*

Als Erstes müssen geeignete Indikatoren ausgewählt werden, mit denen Umweltveränderungen aufgezeigt werden können. Dies ist von Natur aus schwierig, da die meisten biologischen Indikatoren einer hohen Variabilität unterliegen. Hinzu kommt, dass manche Auswirkungen erst nach sehr langen Zeiträume sichtbar werden und eine Vielzahl von Umweltfaktoren es verunmöglicht, einen Effekt eindeutig auf den Anbau einer spezifischen GVP-Sorte zurückzuführen. Ein Umweltmonitoring kann daher einen sehr hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand bedeuten und dennoch keine soliden Daten für Entscheidungsprozesse liefern.

#### *Risikobewertung oft präziser als das anbaubegleitende Monitoring*

Umweltauswirkungen können bei der Risikobewertung einfacher und effizienter ermittelt werden als während eines anbaubegleitenden Monitorings. Die Limiten eines Umweltmonitoring liegen darin, dass Ökosysteme komplex sind und dass es nicht möglich ist, alle sich darin abspielenden Interaktionen aufzuklären. Es bleibt immer die Ungewissheit, ob alle möglichen Auswirkungen bekannt sind und ob diese überhaupt erfasst werden können. Hinzu kommt, dass der Zusammenhang zwischen einem Effekt und dem Anbau einer bestimmten GVP oftmals nicht ermittelt werden kann.

#### *Schlussfolgerungen für Behörden*

Behördliche Entscheide sind nötig, um eine sichere Umwelt zu gewährleisten. Da Umweltschaden mittels absoluter Werte aufgrund methodologischer und praktischer Grenzen nicht bewertet werden kann, wird ein vergleichender Ansatz vorgeschlagen. Umwelteinflüsse

von GVP sollten mit den bekannten Auswirkungen der gegenwärtigen landwirtschaftlichen Praxis verglichen werden. Dadurch sollten Entscheidungen in einem vernünftigen Zeitrahmen möglich sein. Zusätzlich würde dies erlauben, die Schutzziele für den Anbau von GVP denen des herkömmlichen Anbau anzupassen.

Die Genehmigungsbehörden sollten sich der Grenzen eines Umweltmonitorings und deren Brauchbarkeit für Entscheidungsprozesse bewusst sein. Das Ziel, mittels eines Umweltmonitorings negative Einflüsse eines Anbaus von GVP auf die Umwelt zu erfassen, wird als sehr schwer erreichbar eingeschätzt und sollte daher kritisch diskutiert werden.

#### Literatur:

Sanvido O, Aviron S, Romeis J, Bigler F. Challenges and perspectives in decision-making during post-market environmental monitoring of genetically modified crops  
J. Verbr. Lebensm. 2(2007) Supplement 1:37-40

Sanvido O, Widmer F, Winzeler M, Bigler F. A framework for the design of general surveillance of genetically modified crops based on a concept for environmental post-market monitoring. J. Verbr. Lebensm. 1(2006) Supplement 1:5-10

Aviron S, Sanvido O, Herzog F, Baudry J, Romeis J, Bigler F. Monitoring effects of GM crops on butterflies: the use of multiscale approaches for general surveillance. J. Verbr. Lebensm. 1(2006) Supplement 1:85-88

S. Aviron, O. Sanvido, F. Herzog, J. Romeis, F. Bigler. Can potential environmental effects be detected during commercial cultivation of Bt-maize expressing Cry1Ab? A case study with butterflies in Switzerland (in preparation)

## 1.2. Methodische Grundlagen der Langzeitüberwachung von GVO: Schutzziele – Indikatoren – Erhebungsmethoden

Matthias Meier<sup>1</sup>, Daniel Ammann<sup>2</sup>, Christoph Bühler<sup>3</sup>, Angelika Hilbeck<sup>1</sup>

<sup>1</sup>EcoStrat GmbH, Hottingerstr. 32, 8032 Zürich

<sup>2</sup>daniel ammann consulting, dacon, Hottingerstr. 32, 8032 Zürich

<sup>3</sup>Hintermann & Weber AG, Hauptstr. 52, 4153 Reinach

Mit der Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) in die Umwelt – insbesondere dem Anbau von gentechnisch veränderten Pflanzen (GVP) – werden diese Teil des betreffenden Ökosystems. Innerhalb dessen treten GVP in vielfältige Wechselwirkungen mit ihrer Umwelt und können so ökologische Prozesse beeinflussen und verändern. Aufgrund der Komplexität der Wechselwirkungen zwischen einer GVP und ihrer Umwelt ist die Bandbreite der möglichen Konsequenzen ihres Anbaus gross und reicht von Effekten auf Bodenprozesse, Nahrungsketten, Fitness von Arten, Bestäubungsprozesse, usw. bis hin zu agronomischen Effekten (z.B. veränderte Krankheitsanfälligkeit). Die Risikoabklärung, die für die Zulassung einer GVP durchgeführt werden muss, soll verhindern, dass schädliche GVP auf den Markt gelangen. Dabei beschränkt sich die Risikoabklärung bezüglich Umwelteffekte vor allem auf die Abklärung von bekannten und erwarteten Gefahren, die vom betreffenden Transgen ausgehen. In den Tests, die heute im Rahmen der Umweltprüfung für die Zulassung durchgeführt werden, können aber in der Regel lediglich gravierende Effekte aufgedeckt werden. Die Effekte einer GVP, die aufgrund ihrer Wechselwirkungen mit ihrer Umwelt zu Stande kommen, könnten aber schleichend verlaufen und sich erst nach einer längeren Zeit manifestieren. Um solche in der Regel unerwarteten und langfristigen Effekte frühzeitig erkennen und bewerten zu können, sieht die Gesetzgebung während des Anbaus einer GVP deren Langzeitüberwachung – auch Monitoring genannt – vor.

Damit die gesetzlich vorgegebenen Zielsetzungen des GVO-Monitorings erfüllt werden können, müssen für die Entwicklung eines Monitoringkonzeptes Fragen zu den Bewertungsmaßstäben, den zu erhebenden Messgrößen (Indikatoren) sowie zum Erhebungsdesign und zu den Messmethoden geklärt werden. Die Umsetzung eines erfolgreichen GVO-Monitorings erfordert deshalb eine sorgfältige Abstimmung von rechtlich verankerten Schutzzielen, Indikatoren und Erhebungsmethoden.

Innerhalb dieses Projektes wurde ein Prozessverfahren entwickelt, mit dessen Hilfe ausgehend von gesetzlich vorgegebenen Schutzgütern und -zielen geeignete Indikatoren identifiziert werden können. Dazu wurden Varianten eines Erhebungsdesigns entwickelt, die sich für verschiedene Anbausituationen von GVP eignen. Der Gesamtprozess von der Identifikation von Indikatoren bis hin zur Entwicklung eines Erhebungsdesigns mit geeigneten Erhebungsmethoden wurde exemplarisch für das Schutzgut Biodiversität veranschaulicht. Modellhaft wurde dabei vom Anbau der beiden GVP *Phytophthora*-resistente Kartoffel und herbizid-/*Diabrotica*-resistenter Bt-Mais ausgegangen.

### Schutzziele

Aufgrund ihrer Umweltwirkungen können GVO negative Effekte auf Schutzgüter für die Umwelt haben und damit vorgegebene Schutzziele verletzen. Schutzziele für die Umwelt sind Bestrebungen zur nachhaltigen Nutzung beziehungsweise der Erhaltung oder Wiederherstellung von Umweltelementen (Luft, Wasser, Boden, Landschaft, Flora, Fauna etc.). Für den Umgang mit GVO in der Umwelt sind

zahlreiche Schutzgüter und dazugehörige Schutzziele auf Verfassungs-, Gesetzes- und Verordnungsebene festgeschrieben.

Bis anhin wurden Schutzzielnormen aus dem geltenden Recht im Zusammenhang mit dem GVO-Monitoring nur zerstreut und exemplarisch erwähnt. Vorschläge zu möglichen Schutzzieldefinitionen, die daraus abgeleitet wurden, erfolgten ohne konsequente Ausführung des Bezugs zur rechtlichen Norm. Deshalb wurden in diesem Projekt die in den aktuellen Rechtserlassen aufgeführten Schutzgüter bzw. Schutzziele bezüglich ihrer Relevanz für die Früherkennung von unerwarteten und langfristigen Umweltauswirkungen von GVO erfasst und bezüglich ihrer Anwendbarkeit diskutiert.

Die Analyse von über 30 Schweizerischen Rechtserlassen (Bundesverfassung, Gesetze und Verordnungen sowie weitere rechtsassoziierte Richtlinien) führte zu einer streng systematischen und auf das geltende Recht abgestützten Auslegeordnung von Schutznormen. Die als relevant erkannten Normen wurden verschiedenen Schutzgütern zugeteilt. Dabei wurde der gesetzliche Originalwortlaut bezüglich Schutzobjekt, Schutzanspruch und Schutzmass in der Kernaussage der jeweiligen Schutznorm beibehalten. Ausgehend von dieser Auslegeordnung erfolgte eine Auswahl von 13 Schutzgütern und 13 dazugehörigen, qualitativ und teilweise quantitativ konkretisierten Schutzzielen, die im Zusammenhang mit Umweltwirkungen von GVO von Bedeutung sind. Aus der Liste der 13 Schutzgüter wurden jene Schutzgüter selektiert, die sich quantifizieren lassen, voraus eine engere Auswahl von 6 besonders relevanten Schutzgütern resultierte (Tabelle 1). Diese engere Auswahl diente als Ausgangspunkt für die Identifikation geeigneter Indikatoren für ein GVO-Monitoring. Damit war gewährleistet, dass der Wahl von Indikatoren eine rechtsorientierte, schutzzielgeleitete Grundlage als Ausgangspunkt zur Verfügung stand.

Tabelle 1: Die in Projektteil ‚Schutzziele‘ engere Auswahl an Schutzgütern.

<b>Schutzgut</b>	<b>Schutzziel: Qualitative Ausprägung</b>	<b>Schutzziel: Quantifizierung</b>
<b>Lebensraum</b>	Schutz vor und Begrenzung von schädlichen und lästigen Einwirkungen	beeinträchtigte Fläche von 4 ha = mittlere Schädlichkeit
<b>Empfindliche Lebensräume</b>	Bezeichnung der besonders schützenswerten Lebensräume (Gebiete unter Naturschutz, oberirdische Gewässer, 3 Meter breiter Streifen entlang oberirdischer Gewässer, unterirdische Gewässer, Grundwasserschutzzonen, Wald)	Nulltoleranz
<b>Boden</b>	Dauerhafter Erhalt der Bodenfruchtbarkeit und Schutz vor Beeinträchtigung	ab 50 m <sup>2</sup> reduzierter Bodenfruchtbarkeit = leichte Schädlichkeit, ab 1 Hektar reduzierter Bodenfruchtbarkeit = mittlere Schädlichkeit
<b>Biodiversität</b>	Schutz der biologischen Vielfalt	ab 1 verdrängten, verschwundenen, ausgestorbenen Art = mittlere Schädigung, 5 verdrängte, verschwundene, ausgestorbene Arten = katastrophale Schädigung, 2 dezimierte Populationen = mittlere Schädlichkeit
<b>Tiere</b>	Schutz vor schädlichen und lästigen Einwirkungen	1 erkranktes, verletztes oder deformiertes Tier = leichte Schädlichkeit, ab einer Anzahl von 740 toten bzw. 24 erkrankten, verletzten oder deformierten Tiere = mittlere Schädlichkeit
<b>Biolandbau</b>	Verzicht auf gentechnisch veränderte Organismen	Nulltoleranz

## Indikatoren

Nachdem die Schutzgüter und -ziele (Tabelle 1) identifiziert und definiert worden sind, kommt der Auswahl der Indikatoren eine zentrale Stellung bei der Konzeption eines sensitiven GVO-Monitorings zu. Über die Indikatoren muss einerseits mit einer begrenzten aber hinreichenden Anzahl geeigneter Messgrößen eine Beurteilung des Zustands eines Schutzgutes vorgenommen werden, der in der Regel nicht direkt messbar ist. Die Messung des Zustands eines Schutzgutes muss Rückschlüsse über langfristige und unerwartete Effekte von GVO erlauben. Andererseits müssen negative Einwirkungen auf die Umwelt durch GVO bereits im Anfangsstadium erfasst werden können.

Negativer Effekte von GVO lassen sich insbesondere dann frühzeitig entdecken, wenn die Wirkungskette, die zum Schaden geführt hat, bekannt ist. Die Indikatoren für das Monitoring sind dann so zu wählen, dass sie die ersten Stufen innerhalb der kausalen Wirkungskette abbilden. Je genauer der kausale Zusammenhang innerhalb einer Wirkungskette bekannt ist, desto präziser kann ein entsprechender Indikator ausgewählt werden. Kausale Wirkungsketten lassen sich mit Hilfe von Techniken der Risikoanalyse wie der Event-Tree- und Fault-Tree-Analyse herleiten.

Ausgehend vom Anbau der beiden Modell-GVP *Phytophthora*-resistente Kartoffel und herbizidresistenter/*Diabrotica*-resistenter Bt-Mais wurde zuerst für das Schutzgut Biodiversität aufgezeigt, wie geeignete Indikatoren identifiziert werden können. Dazu leiteten wir mit Hilfe der Event-Tree-Analyse verschiedene kausale Wirkungsketten her, über die das Schutzgut Biodiversität beim Anbau der beiden Modell-GVP negativ betroffen sein könnte. Aus diesen Wirkungsketten konnten verschiedene potenzielle faunistische und floristische Indikatoren abgeleitet werden, welche in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Für die restlichen Schutzgüter in Tabelle 1 gingen wir von möglichen Schäden innerhalb dieser Schutzgüter aus und analysierten mit Hilfe der Fault-Tree-Analyse, welche Ereignisse zusammenwirken müssen, damit der Schaden eintritt. Daraus leiteten wir mögliche Indikatoren ab und filterten jene Indikatoren heraus, die mehrere Schutzziele abdecken können (Tabelle 3).

Tabelle 2: Für das Schutzgut ‚Biodiversität‘ identifizierte Indikatoren (fettgedruckte Indikatoren wurden im Teil ‚Erhebungsmethoden‘ weiterverfolgt).

Identifizierte Indikatoren	Vermutete Reaktion auf GVP-Anbau
Modell-GVP Herbizid-resistenter Bt-Mais:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Ackerbegleitflora</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veränderung des Artenspektrums und der Abundanz infolge des mit der GVP gekoppelten Herbizideinsatzes</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Blatt- und Rüsselkäfer</b> in Ackerbiotopen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veränderung des Artenspektrums aufgrund der Veränderungen bei der Ackerbegleitflora (Wirtspflanzen)</li> <li>- Toxische Wirkung von abgelagerten Bt-Pollen, der über die Nahrung aufgenommen wird</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Laufkäfer</b> in Ackerbiotopen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxische Wirkung von Bt-Toxin in der Beute (Nahrungsketteneffekte)</li> <li>- Toxische Wirkung von abgelagerten Bt-Pollen, der über die Nahrung aufgenommen wird</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schmetterlinge in Ackerbiotopen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toxische Wirkung von aufgenommenem Bt-Pflanzenmaterial und Nahrungsketteneffekte</li> <li>- Nahrungsketteneffekte</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• epigäische und endogäische Arthropoden und Anneliden in Ackerbiotopen</li> <li>• Kurzflügler in Ackerbiotopen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Reduzierte Fitness aufgrund eines stärkeren Befalls durch <i>Phytophthora infestans</i></li> <li>- Veränderung des Artenspektrums und der Abundanz infolge Veränderung des Wirtspflanzenspektrums</li> </ul>
Modell-GVP <i>Phytophthora</i> -resistente Kartoffel:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b><i>Solanum nigrum</i></b> (Schwarzer Nachtschatten)</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• mit alternativen <i>Phytophthora</i>-Wirten assoziierte Insekten</li> </ul>	

Tabelle 3: Mögliche Indikatoren für weitere Schutzgüter.

Schutzgüter	Indikatoren
«Biodiversität», «Tiere», «Lebensraum», «empfindliche Lebensräume» und «Biolandbau»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicht-Ziel-Organismen innerhalb der assoziierten Insektenfauna («Biolandbau»: insbesondere ‚Nützlinge‘)</li> </ul>
«Lebensraum», «empfindliche Lebensräume» und «Biolandbau»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Präsenz/Absenz von GVP, transgenen Hybriden zwischen verwandten Arten und/oder Transgenprodukten</li> </ul>
«Boden»	<ul style="list-style-type: none"> <li>• mikrobielle Diversität</li> </ul>

## Erhebungsmethoden

Das Erhebungsdesign ist entscheidend für die Leistungsfähigkeit des Monitorings, weil es die Möglichkeiten für die Datenauswertung und Aussagen bestimmt. Ein geeignetes Erhebungsdesign muss GVO-induzierte Veränderungen möglichst frühzeitig und kosteneffizient erkennen. Weiter muss es flexibel auf sich verändernde Anbaudichten von GVP reagieren können und auch bei hoher Dynamik der Lebensräume im Ackerbaugebiet funktionieren.

In dieser Studie wurden zwei sich ergänzende Varianten eines Erhebungsdesigns weiterentwickelt, deren wichtigsten Eigenschaften in Tabelle 4 zusammengefasst sind. Die beiden Varianten sind ohne Verlust von Stichprobenflächen miteinander kombinierbar, womit die geforderte Flexibilität bezüglich wechselnder Anbaudichte und -muster von GVP gewährleistet ist.

Tabelle 4: Vergleich der beiden ausgearbeiteten Varianten für ein Erhebungsdesign.

Eigenschaft	Variante «gepaarte km-Quadrate»	Variante «einfache km-Quadrate»
Skalen für Messungen	Parzelle und Quadratkilometer	Parzelle und Quadratkilometer
Anordnung der Stichprobenflächen	km-Quadrate immer paarweise, d.h. 2 benachbarte Flächen mit und ohne GVP	km-Quadrate einzeln, mit unterschiedlicher Dichte von GVP-Anbau
Grundprinzip bei Analyse	Simultanvergleich und Zeitreihe	Zeitreihe
Erhebungsrhythmus Gesamtstichprobe	Gestaffelt über 5 Jahre	Gestaffelt über 5 Jahre
Dauer bis zu ersten Aussagen	5 Jahre	10 Jahre
Umsetzbarkeit	anspruchsvoll	wenig anspruchsvoll

Beispielhaft wurden für die in Tabelle 2 fett gedruckten Indikatoren (wobei *Solanum nigrum* in der Ackerbegleitflora integriert ist) Erhebungsmethoden inklusive der zu erhebenden Stichprobengrößen bestimmt. Dazu wurden in einem ersten Schritt eine oder mehrere Messgrößen definiert (Tabelle 5) und eine ökologisch relevante Veränderung ihres Ausgangszustandes innert 10 Jahren als Schwellenwert festgelegt (10% für Veränderungen des Artenreichtums, 30% für Veränderungen der Abundanz). In einem zweiten Schritt wurden mittels bestehender Datensätze aus der Schweiz und dem Ausland Schätzwerte für die erwartete Streuung der Messwerte in der Stichprobe bestimmt. Auf der Basis dieser Streuungen ermittelte eine Computersimulation fiktive Felddaten und berechnete die erforderliche Anzahl an Messflächen für den statistischen Nachweis von Veränderungen. Aus dem Stichprobenumfang (N) liessen sich danach die Kosten für die Erhebungen pro Indikator errechnen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Zusammenfassung der Machbarkeitsstudien für drei Beispiel-Indikatoren für ein GVP-Monitoring.

	<b>Ackerbegleitflora</b>	<b>Rüssel- &amp; Blattkäfer</b>	<b>Laufkäfer</b>
<b>Messgrösse 1</b>	Artenreichtum: Anzahl Arten pro Acker	Artenreichtum: Anzahl Arten pro Acker	Artenreichtum: Anzahl Arten pro Acker
<b>Messgrösse 2</b>	Fitness: Mittlere Biomasse pro Ind. und Acker	Abundanz: Summe aller Individuen pro Acker	Abundanz: Summe aller Individuen pro Acker
<b>Methoden</b>	50 m-Transekt am Ackerrand, vollständige Artenliste. Ernten von 5 blühenden Pflanzen pro Transekt	Kescherfang, zwei 40 m-Transekte am Ackerrand, Bestimmen und Auszählen im Labor	5 Bodenfallen pro Acker, >10 m im Feldinnern gelegen, Bestimmen und Auszählen im Labor
<b>Anzahl beprobter Äcker, N</b>	400 (Artenreichtum) 100 – 400* (Fitness)	1000 (Artenreichtum) 400 (Abundanz)	200 (Artenreichtum) 120 (Abundanz)
<b>N für Schätzung der Kosten</b>	400	400	200
<b>CHF / Acker</b>	500.-	1'200.-	5'700.-
<b>CHF / Jahr (ca.), inkl. Koordination</b>	50'000.-	110'000.-	250'000.-

\* abhängig von der untersuchten Pflanzenart.

N ist die Gesamtzahl notwendiger Probe-Äcker für den schlüssigen Vergleich zwischen GVP-Anbau und herkömmlichem Anbau (Statistische Macht von 80%, Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%).

Die N Äcker werden gestaffelt innerhalb von 5 Jahren erhoben. Alle Kosten sind reine Erhebungskosten für die Routinephase (exklusive Mehrwertsteuer).

Für die Einführung eines GVO-Monitorings empfehlen wir ein Vorgehen, das sich in drei Phasen gliedert:

1. **Startphase** (in der Schweiz sind einzelne Parzellen mit GVP angebaut):  
Die vorgeschlagenen Designvarianten sind in dieser Situation noch nicht anwendbar. Es erfolgen intensivierete Erhebungen pro GVP-Parzelle mit einem reduzierten Set an Indikatoren. Für eine ausreichende Aussageschärfe braucht es in dieser Anbauphase rund 15 bis 20 GVP-Äcker.
2. **Etablierungsphase** (GVP-Anbau ist verbreitet, aber lokal noch selten):  
Die Designvariante «gepaarte km-Quadrate» wird angewendet. Sie produziert in relativ kurzer Zeit eine sehr gute Datengrundlage für vielfältige Vergleiche zwischen den Anbauformen mit und ohne GVP.
3. **Routinephase** (GVP sind eine gängige und lokal häufige Anbauvariante):  
Die Designvariante «gepaarte km-Quadrate» ist allmählich nicht mehr anwendbar und wird nahtlos in die Variante 2 «einfache km-Quadrate» überführt. Die Datenauswertung erfolgt im 5-Jahres Rhythmus auf der Basis von Zeitreihen.

## 2. Analyse Ethischer Fragen zur Risikobewertung im Bereich der Biotechnologie

Moral dient einem Zweck: Sie ist ein Mittel, menschliches Zusammenleben zu ermöglichen. Dabei kann offen gelassen werden, ob dies der einzige Zweck der Moral ist.

### Ethische Risikobewertung

#### Ausarbeitung von Kriterien und Instrumenten für eine ethische Risikobewertung im Zusammenhang mit dem Einsatz, insbesondere der Freisetzung von GVO

**Andreas Bachmann, Klaus Peter Rippe\***

Ethik im Diskurs

\*Kontakt: rippe@ethikdiskurs.ch

#### *Risikoethik*

Ein wichtiges Ziel der Ethik ist die rationale Begründung moralischer Normen und Prinzipien. Das heisst, dass sich diese in einem Diskurs auch ständig verändern können. Für die Argumentation gelten aber insbesondere die Kriterien Konsistenz (Widerspruchsfreiheit) und Kohärenz (Stimmigkeit). Andreas Bachmann und Klaus Peter Rippe sind der Meinung, dass Akzeptanz nicht das einzige Kriterium der Risikoethik sein kann. Sie postulieren, dass ethische Objektivität und damit eine wissenschaftliche Risikoethik möglich ist. Ziel ist es, unabhängige Kriterien für die Akzeptabilität von Risiken zu entwickeln, um konkrete Fragenstellungen, beispielsweise den Einsatz von GVO, beantworten zu können.

#### *Vorbedingungen klären als Basis für Objektivität*

Als Vorbedingungen für die ethische Risikobewertung wurden daher die zentralen Begriffe Risikoethik, Risiko, Wahrscheinlichkeit, Schaden und Schadensausmass propädeutisch geklärt. Darauf aufbauend wurden vier Risikotypen eingeführt:

1. Vollständig kalkulierbare Risiken. Hier sind sowohl das Ausmass des Schadens, sowie die Wahrscheinlichkeit des Eintretens sind bekannt.
2. Das Schadensausmass ist objektiv bekannt aber die Wahrscheinlichkeit muss subjektiv abgeschätzt werden. Hier besteht eine Unsicherheit in Bezug auf die Wahrscheinlichkeit.
3. Bei bekannter Wahrscheinlichkeit muss das Schadensausmass subjektiv abgeschätzt werden. In diesem Falle besteht eine Unsicherheit in Bezug auf das Schadensausmass.
4. Sowohl die Wahrscheinlichkeit als auch das Schadensausmass müssen subjektiv abgeschätzt werden. Dies ist eine Situation der Ungewissheit.

Situationen mit Risiken des Typs 1 sind eher selten. Häufig hingegen die Fälle des Risikotyps 4. Manche der durch den Einsatz von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) bedingten Risiken fallen in die Klasse 4.

„Welche Risikoexpositionen sind ethisch erlaubt, welche verboten?“ Um diese Frage anzugehen, wurden zunächst das Bayes-Kriterium und das Maximin-Kriterium vorgestellt.

Das Maximin-Kriterium besagt: Maximiere den minimalen Nutzen bzw. Minimiere (vermeide) den maximalen Schaden. Anwendung findet es insbesondere mit Blick auf mögliche Katastrophenfälle.

Das Bayes-Kriterium besagt: Maximiere den (subjektiven) Erwartungswert der Folgen deines Tuns. Der Erwartungswert ist das Produkt aus Eintritts-Wahrscheinlichkeit und Schadensausmass (im Fall von Risiken)

Es wurde dargestellt, wie es bei einer strikten Anwendung des einen oder anderen dieser Kriterien zu „zutiefst kontraintuitiven“, utilitaristischen Handlungen, oder zur Handlungsblockade führen würde. Beide (Bayes und Maximin) wurden daher als *allgemeine* Kriterien für die Beurteilung von Risikoexpositionen nach detaillierter Kritik eindeutig verworfen.

Ein weiteres Kriterium, die Zustimmung, wonach einer einem Risiko ausgesetzt werden darf, sofern er zustimmt, erweist sich als nicht zureichend.

Daher wurde ein eigenes, risikoethisches Kriterium entwickelt:

#### *Schwellenwert-Konzeption und Sorgfaltspflichten-Ansatz*

Formell ist ein Schaden zu verstehen als eine um ihrer selbst willen negativ zu beurteilende Veränderung.

Es wird vorgeschlagen, quantitative Risikogrenzwerte mit Hilfe dieser Schwellenwertkonzeption festzulegen. Andere sollen nur Risiken ausgesetzt werden, falls sie unterhalb dieser Grenzwerte liegen, so dass das Eintreten des Schadens sehr unwahrscheinlich wird. Für ein solches Nicht-Schadensprinzip gibt es gute Gründe. Risikoethisch interpretiert, mündet eine solche nicht-utilitaristische Betrachtungsweise in einen Sorgfaltspflichten-Ansatz. Daraus lassen sich – aufgrund einer Schadenstheorie und unabhängig von Chancenüberlegungen – konkrete Risikogrenzwerte und eine Orientierung für Forschende und Entscheidungsträger ableiten.

Die Sorgfaltspflichten bestehen aus zwei Aspekten. Zum einen verlangen sie vom Handelnden eine antizipative Einstellung: Er ist gehalten, sich (a) die möglichen Folgen seiner Handlungen insbesondere ihr Schadenspotenzial, vor Augen zu führen. Zum anderen wird (b) von ihm gefordert, auf der Grundlage dieser Folgenüberlegungen die erforderlichen Vorsichtsmassnahmen zu ergreifen. Das quantitative Schwellenwert-Konzept erlaubt dann Entscheide. Minimierung ist dann so zu verstehen, dass hierdurch ein Schwellenwert – eine ‚ethische Risikoschwelle‘ – bezeichnet wird, unterhalb dessen eine Risikoexposition zulässig, oberhalb dessen sie dagegen unzulässig ist.

#### *Dieser Ansatz stimmt mit dem rechtlichem Ansatz überein*

Der hier vorgestellte risikoethische Ansatz stimmt in vielen Punkten mit dem im Schweizerischen Gentechnikgesetz gewählten rechtlichen Ansatz, im Bezug auf die Freisetzung von GVO überein, auch wenn er eine andere Werttheorie und eine andere umweltethische Position vertritt. Auch im Recht steht die Minimierung der Risiken im Vordergrund. Hingegen sind Nutzen- bzw. Chancenüberlegungen von untergeordneter Bedeutung. Insofern vertritt das Recht zumindest im Bereich der ausserhumanen Gentechnologie einen nicht-utilitaristischen Ansatz.

Aus der Perspektive des hier vertretenen Ansatzes besteht ein Mangel des Gentechnikgesetzes bzw. der Freisetzungsverordnung darin, dass die Risiko-grenzwerte für Freisetzungsversuche un- bzw. unterbestimmt sind. So ist nicht klar, was gemeint ist, wenn in Art. 8 FrSV gesagt wird, Freisetzungsversuche seien zulässig, wenn bestimmte Konsequenzen wie etwa die

Beeinträchtigung geschützter Populationen oder das unbeabsichtigte Aussterben irgendeiner Art von Organismen „nicht zu erwarten“ sind. Hier müsste man einen konkreteren Schwellenwert definieren, der auf einer klaren sentientistischen Schadenskala und den entsprechenden Wahrscheinlichkeiten beruht.

## **Bedeutung des Schadensbegriffs für die Risikobewertung von GVO – sechs Fallbeispiele**

### **Fallbeispiele als Basis für die Ausarbeitung von Kriterien und Instrumenten für eine ethische Risikobewertung von GVO**

**Valentin Küng\***

Küng – Biotech + Umwelt, Höhweg 17, 3006 Bern

\*Kontakt: valentin.kueng@kueng-biotech.ch

In der Arbeit von Küng – Biotech + Umwelt, Bern wurde untersucht, in wieweit der Schadensbegriffs die Risikobewertung von GVO mitdefiniert. Sechs konkrete Fallbeispiele wurden untersucht. Dabei wurde nicht die Eintretenswahrscheinlichkeit im Detail betrachten, sondern das Spektrum der Auswirkungen möglichst breit dargelegt. In der Arbeit von Andreas Bachmann, Klaus Peter Rippe, Ethik im Diskurs, wurden unabhängig davon objektive Kriterien für eine Risikoethik definiert. Diese wurden dann an definierte Fallbeispiele angelegt, um zu entscheiden, welche Risiken aus ethischer Sicht tragbar sind.

#### *Der Risikobegriff*

Neben der naturwissenschaftlichen gehen auch ethische, gesellschaftliche und politische Überlegungen in die Analyse des Risikos mit ein. Solche Faktoren bestimmen mit, welche Auswirkungen überhaupt als Risiko angesehen werden und welche Höhe des Risikos für wen akzeptabel ist.

In einer Risikomatrix können Ausmass des Schadens und Eintrittswahrscheinlichkeit graphisch dargestellt werden. Ein solches Instrument gibt aber keine Auskunft darüber, ob bestimmte Risiken, aus ethischer Sicht, gar nicht eingegangen werden dürfen. Auch gibt es eine gesellschaftliche Aversion gegen – zwar sehr unwahrscheinliche – aber sehr schadensträchtige Ereignisse. Solche Risiken werden als untragbar wahrgenommen, weil bei einem Schaden die Gesellschaft finanziell überfordert sein könnte.

#### *Positive und Negative Auswirkungen*

Eine spezifische Einwirkung auf Mensch, Tier und Umwelt kann, je nach Standpunkt und Werthaltung, einmal positiv und einmal negativ betrachtet werden. Ob etwas nützt oder schadet, hängt vom Bewertungshintergrund ab. Zusammen mit der Eintretenswahrscheinlichkeit definiert die Bewertung des Schadens die Höhe des biologischen Risikos. Es braucht also Fachwissen um bewerten und entscheiden zu können, was ein ökologischer Schaden ist. Die ethische Risikobewertung dient dazu, einen Schaden als solchen zu bewerten und zudem den ethischen Umgang mit Risiken zu begründen.

#### *Unerwünschter Effekt versus wünschenswerter Zustand*

Hinter der Risikobewertung steckt eine zweifache Werteinschätzung. Erstens die Feststellung dessen was schützenswert ist. Zweitens die Festlegung des wünschenswerten Zustands dieser

Güter. Ansonsten kann ein Schaden ja nicht festgestellt werden. Wie etwas sein *sollte*, kann die Naturwissenschaft nicht allein beantworten. Es fliessen bestimmte (z.B. politische) Wertvorstellungen ein und bestimmen den Diskurs. Da Schadensbilder meist komplex sind (ein Schaden kann z.B. einen anderen nach sich ziehen oder bedingen), sollte die Risikobewertung transparent gemacht werden. Dadurch kann nachvollzogen werden, was als Schaden aufgefasst wurde, und was nicht betrachtet wurde, oder methodisch nicht erfasst werden konnte.

#### *Umfassende Betrachtung von Schützgütern*

In der Schweiz ist der Umgang mit Organismen auf Verfassungs-, Gesetzes- und Verordnungsebene geregelt. Ziel ist der Schutz von Mensch und Umwelt.

Als Schaden werden durch GVO verursachte schädliche und lästige Einwirkungen auf Mensch und Umwelt bestimmt. Die Konkretisierung der wünschenswerten Zustände ist gering und es besteht ein Ermessensspielraum für die Behörden in deren Festlegung. In einer Studie des BUWAL und einer Arbeitsgruppe ERFA BIO (BUWAL 2005)<sup>i</sup> wurden Schützgüter definiert, denen Indikatoren zur differenzierten Erfassung einer Gefährdung zugeordnet wurden. Eine ethische Risikobewertung sollte dieselben Schützgüter und Indikatoren verwenden. Dann wird eine umfassende Ableitung der Werteebenen und Risikokategorien möglich.

#### *Risikoreduktion aufgrund bestehenden Rechts*

In vier Verordnungen (ESV, FrSV, StFV, SAMV) wird die Reduktion des Risikos angestrebt. Es wird darin beispielsweise definiert, wie mit Organismen umzugehen ist, ob ein Entweichen in die Umwelt zu minimieren oder sogar zu verhindern ist. Verschiedene staatliche Massnahmen wie etwa Bewilligungsverfahren oder Monitorings dienen dazu, das Risiko zu reduzieren, indem die Eintretenshäufigkeit und/oder die Schadensgrösse reduziert werden. Den Bundesbehörden und beratenden Kommissionen und kantonalen Behörden kommt eine entscheidende Rolle in der Beantwortung folgender Punkte zu:

1. Definition, was unerwünschte Eigenschaften sind
2. Naturwissenschaftliche Beurteilung, ob eine dauerhafte Verbreitung zu erwarten ist.

Expertenstreit und politisches Seilziehen entsteht bei der schwer quantifizierbaren Frage, ob mögliche Schäden *aller* Voraussicht nach abgeklärt wurden und ob *alle* erforderlichen Sorgfaltsmassnahmen getroffen wurden.

#### **Fallbeispiele**

Sechs Fallbeispiele und Szenarien wurden definiert, um die gesamte Bandbreite der möglichen Risiken abzudecken und einer Analyse zugänglich zu machen. Die sechs Beispiele bilden zwei Klassen (A und B).

#### *A: Unbeabsichtigte Freisetzungen aus dem Labor*

1. Eine Freisetzung von Humanpocken-Viren hätte katastrophale Auswirkungen (Epidemie bis Pandemie). Dank aller erforderlichen Sicherheitsmassnahmen ist das äusserst unwahrscheinlich (d.h. 1-mal pro 1000 bis 10'000 Jahre).
2. Die Forschungstätigkeit zu den Virulenzfaktoren von Grippeviren würde ohne Sicherheitsmassnahmen häufig zu Epidemien führen. Durch Sicherheitsmassnahmen sind diese unwahrscheinlich (1-mal pro 100-1000 Jahre).
3. Die Diagnostik von Verdachtsfällen und die Impfstoffproduktion gegen Maul- und Klauenseuche führt gelegentlich zu mittleren bis grossen negativen Auswirkungen. Trotz Sicherheitsmassnahmen geschieht dies 1-mal pro 10 bis 100 Jahre (Grossbritannien 2001 und 2007).

Der Vergleich von 1) und 2) ist interessant, weil den ungefähr ähnlich hohen Risiken ein sehr unterschiedlicher Nutzen gegenüber steht. Mit der Forschung an den ausgerotteten Humanpocken lassen sich „nur“ neue molekularbiologische Erkenntnisse gewinnen. Die Forschung an Influenza hat hingegen konkrete Auswirkungen auf die Impfstoffentwicklung.

#### *B: Experimentelle Freisetzung und Anbau von Nutzpflanzen*

4. Transgener Raps kann mit verwandten Arten auskreuzen. Das führt gelegentlich zur zeitlich begrenzten Verwilderung von Pflanzen mit geringen Folgen für die Umwelt (aufgrund der reduzierten Fitness der transgenen Pflanzen).
5. In diesem Szenario wurde der aktuell intensive Einsatz des Herbizids Glyphosat als Ausgangsbasis genommen. Dieser führt zunehmend zu glyphosatresistenten Unkräutern. Als Folge der Monopolsituation (Saatgut und Glyphosat) und der starken Anhängigkeit der Landwirtschaft von einem einzigen Herbizid gibt es bei einer (postulierten) massiven Zunahme von resistenten Unkräutern Produktionsprobleme, die zu einer Störung bei der Futtermittel- und Nahrungsmittelversorgung führen.
6. Hier ist der reale Fall einer unbeabsichtigten Verbreitung eines transgenen, herbizidresistenten Grases der Ausgangspunkt. Das Szenario postuliert, wie sich die zunehmende Verbreitung des Grases und die Auskreuzung des Resistenzgens in verwandte Gräser auf die Nahrungsmittelversorgung auswirken. Die Folgen reichen von (vorerst) unbestimmbar bis zu massiven Folgen.

In den Fallbeispielen 4-6 wurde deutlich, dass für die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen eine Klassierung von Umweltauswirkungen in verschiedene Schadens- und damit Risikokategorien nötig ist und dies ein klares Verständnis, was ein ökologischer Schaden ist, voraussetzt.

## Anwendung der etablierten Kriterien auf Fallbeispiele

Andreas Bachmann, Klaus Peter Rippe, Valentin Küng

Die Fallsbeispiele 1 und 2 zeigen höchst unwahrscheinliche Ereignisse, die aber, falls sie eintreten würden, einen riesigen Schaden für die Gesellschaft verursachen würden. Daher sind sie aus einer risikoethischen Sicht nicht tragbar. So ist beispielsweise die Forschung an Humanpocken-Viren aus ethischer Sicht inakzeptabel. Der von den Autoren berechnete Erwartungswert (ohne Sicherheitsmassnahmen) liegt bei  $10^6$  Toten. Aber selbst mit Sicherheitsmassnahmen liegt der Erwartungswert pro Tag bei 2,73 Toten. Immer noch klar zu hoch. Erst, wenn der Erwartungswert unter 0,00002 reduziert werden könnte, wäre das Risiko akzeptabel.

Falls die Erwartungswerte bei relativ unwahrscheinlichen Ereignissen aber reduziert sind (wie etwa in Fallbeispiel 3) kann das Risiko tragbar werden. Allerdings hängt hier die Bewertung wesentlich davon ab, wie Schäden überhaupt wahrgenommen werden. Ist etwa der Tod von Tieren dem Tod von Menschen gleichzusetzen? Wie werden Schmerzen konkret quantifiziert? Die Beantwortung solcher Fragen fliesst direkt ein in die Bestimmung des Grenzwertes.

Die Fallsbeispiele 4-6 untersuchten die experimentelle Freisetzung und den Anbau von Nutzpflanzen. Diese Fallbeispiele zeigen Szenarien, die relativ wahrscheinlich bis sehr wahrscheinlich sind. Allerdings ist in diesen Fallbeispielen die Bestimmung des Schadensausmasses ja sehr schwer, oft unmöglich. Die Risikoethik kann daher keinen Erwartungswert bestimmen. Das verunmöglicht es zu bewerten, ob solche Risiken ethisch zulässig oder unzulässig sind.

### *Risikoethische Sicht*

Wichtig ist festzuhalten, dass die Kriterien für die risikoethische Bewertung vor der Analyse der Fallbeispiele erstellt wurden. Nur so ist die objektive Feststellung eines Risikos aus ethischer Sicht möglich. Zwar sind Erwartungswerte keine rein wissenschaftliche Grösse. Ein Schaden ist aber grundsätzlich eine evaluierbare Grösse. Ein einzelner mag beispielsweise ein extrem hohes Risiko für die Behandlung seiner tödlichen Krankheit eingehen. Aus risikoethischer Sicht gilt dies nicht. Man darf andere nicht wegen des erhofften Nutzens einem Risiko aussetzen, welches über dem Grenzwert liegt.

<sup>i</sup> Amman D., Beutler H.P., Epprecht T., Errass C., Fischer D., Hosbach H. and Vögeli U. (2005) „schädlich“- „lästig“? Grundlagen zur Festlegung von Schutzziele. Schriftenreihe Umwelt. Bundesamt für Umwelt BAFU, Bern.

### **3.1. Abbaubarkeit von *Bt*-Mais im Boden und Auswirkungen auf Regenwürmer und andere Bodenmakroorganismen**

**Wolfgang Nentwig<sup>\*</sup>, Linda Hönemann, Corinne Zurbrügg, Simon Knecht**

Zoologisches Institut, Universität Bern, Baltzerstrasse 6, 3012 Bern

<sup>\*</sup> **Kontakt: wolfgang.nentwig@zos.unibe.ch**

Mehrere transgene Maissorten wurden über eine gesamte Vegetationsperiode in einem Feldversuch untersucht. Ziel war es potentielle Risiken durch den Abbau transgener *Bt*-Maisstreu abzuschätzen.

Die vorgelegte Arbeit basiert hauptsächlich auf Resultaten, die durch die Dissertationen von Linda Hönemann und Corinne Zurbrügg sowie der Diplomarbeit von Simon Knecht erarbeitet wurden. Unter der Leitung von Wolfgang Nentwig, wurde von 2005 bis Ende 2007 untersucht, wie transgener *Bt*-Mais im Boden abgebaut wird und wie Nicht-Ziel Bodenorganismen darauf reagieren.

#### **Hintergrund und Notwendigkeit der Untersuchung**

Bei der Ernte von Mais bleiben pro Hektar ca. 2 bis 6 Tonnen trockenes Pflanzenmaterial zurück (Zwahlen et al., 2003). Dieses wird in der Praxis vor der nächsten Aussaat in die oberen Bodenschichten eingearbeitet. Wurde *Bt*-Mais angebaut, enthalten die Pflanzenreste noch *Bt*-Toxin. Dieses kann selbst nach 200 Tagen Exposition noch im Boden nachgewiesen werden (Zwahlen et al., 2003). Obwohl die *Bt*-Toxine sehr spezifisch wirken, kann man *a priori* nicht vollständig ausschliessen, dass Nicht-Zielorganismen davon betroffen sind. Ist dies der Fall, könnte das Ökosystem Boden Schaden nehmen. Würden Destruenten, die eine wichtige Rolle im Recycling von Nährstoffen spielen, geschädigt, könnte die Aufrechterhaltung der Bodenfruchtbarkeit gefährdet sein.

Bisher existierten vor allem Laboruntersuchungen mit einzelnen Arten über kurze Zeiträume, sowie erst eine ‚litter bag‘ Studie, die über mehrere Monate dauerte.

Die hier vorgestellte Freilandstudie stellt mit insgesamt 9 untersuchten Maissorten (3 *Bt*-Sorten, die korrespondierenden Isolinien und 3 konventionelle Sorten) eine wesentlich umfassendere Studie dar.

#### **Freilandversuche: Maisstreuabbau und Bodentiergemeinschaft**

##### *Versuchsaufbau Maisstreuabbau*

Der zentrale Freilandversuch war eine ‚litter bag‘ Analyse, die zwischen Oktober 2005 und Juli 2006 durchgeführt wurde. Untersucht wurde besonders der Abbau verschiedener *Bt*-Toxine, sowie für den Abbau wichtige Pflanzeninhaltsstoffe (z.B. C/N Verhältnis, Cellulose, Hemicellulose, Lignin). Ebenfalls untersucht wurden die am Abbau beteiligten Gemeinschaften an Bodenorganismen.

In Klimakammern wurden Maispflanzen herangezogen. Blätter, die an den Pflanzen getrocknet waren, wurden entfernt und bis zum Freilandversuch eingefroren. Dieses Pflanzenmaterial wurde dann in ‚litter bags‘ (Polyethylenetze mit 4 mm Maschenweite; siehe Abb.1) gefüllt und auf 10

Feldern ausgebracht. Monatlich wurden für alle 9 Maissorten litter bags von den 10 Feldern zurückgeholt. Ein kleiner Teil des enthaltenen Blattmaterials wurde für Laboranalysen entnommen. Aus dem verbleibenden Material erfolgte zur Untersuchung der Organismengemeinschaft eine Extraktion der Tiere mittels Macfadyen Methode.



Abbildung 1.: Litter bag gefüllt mit trockenen Maisblättern

### Resultat Maisstreuabbau

Das Cry3Bb1-Toxin wird in der Sorte Mon88017 in höherer Konzentration exprimiert, als das Cry1Ab-Toxin in den Sorten Mon810 und N4640Bt. Allerdings wird es auch viel schneller abgebaut (siehe Abb.2). Das Cry1Ab-Toxin wurde zudem während der kalten Wintermonate kaum abgebaut. Bodenorganismen sind somit dem Cry3Bb1-Toxin kurzfristiger ausgesetzt als dem Cry1Ab-Toxin. Unterschiede im Biomasseabbau waren durch Unterschiede im C/N Verhältnis erklärbar. Lignin-, Cellulose- und Hemicellulosegehalt schienen eine weniger wichtige Rolle zu spielen. Transgene Maissorten und ihre Isolinien unterschieden sich nur im C/N Verhältnis, diese lagen jedoch im Bereich der erwarteten Varianz zwischen konventionellen Sorten.

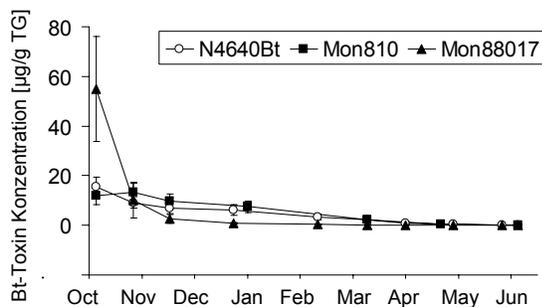


Abbildung 2. Bt-Toxin Konzentration (MW  $\pm$  SA) in seneszenten Blättern von N4640Bt, Mon810 (Cry1Ab) und Mon88017 (Cry3Bb1) während neun Monaten. N = 10 pro Maissorte

### Versuchsordnung Bodentiergemeinschaft

Mittels der Macfayden Methode (Macfadyen, 1961) wurde in monatlichen Proben die Meso- und Makrofauna aus den ‚litter bags‘ extrahiert und unter dem Binokular bestimmt und ausgezählt. Insgesamt wurden 41'342 Tiere aus 21 Taxa bestimmt.

#### *Resultate Bodentiergemeinschaft*

Statistisch signifikante Unterschiede in der faunistischen Besiedlung transgener und nicht-transgener Blattstreu konnten *nicht* gefunden werden. Weniger als 1 % der Varianz in den Abundanzen konnte durch den Faktor ‚transgenes‘ oder ‚nicht-transgenes‘ Blattmaterial erklärt werden. Hingegen beeinflussten der Standort und die Saisonalität die Zusammensetzung der Gemeinschaft der Bodenorganismen, wie bereits früher beschrieben wurde (z.B. Dunger & Fiedler, 1997; Cassagne, 2002; Robertson & Grandy, 2005). Ebenso hatten die Faktoren Untersuchungsfeld und Probemonat einen signifikanten Einfluss auf die Abundanzen.

#### *Schlussfolgerungen Freilandversuche*

Während der 9 Monate der Feldstudie konnte *kein* signifikanter Einfluss seneszenten *Bt*-Maisblattmaterials auf die Zusammensetzung der Bodenorganismen festgestellt werden. 99% des *Bt*-Toxins wurde innerhalb dieser Zeit abgebaut. Der aufgrund unterschiedlicher Anteile von Pflanzeninhaltsstoffen erwartete Sorteneffekt hat sich nicht bestätigt.

### **Laborversuche: Reaktion von Schnecken, Dipterenlarven und Anneliden auf *Bt*-Maisblätter**

Um die Freilandversuche zu ergänzen, wurden Laborversuche durchgeführt. Bei ausgewählten Arten der Agrarlandschaft, die direkt oder indirekt am Abbau von Blattstreu beteiligt sind, wurde die quantitative Aufnahme von transgenem Blattmaterial, der Abbau des *Bt*-Toxins im Magendarmtrakt sowie die Auswirkung der Aufnahme von *Bt*-Toxin auf die Reproduktion untersucht.

Spanischen Wegschnecken (*Arion vulgaris*) und Genetzten Ackerschnecken (*Deroceras reticulatum*) wurden in Plastikbehältern drei Tage mit *Bt*-Maisblättern gefüttert. Beide Cry-Toxine konnten nach drei Tagen in den Schneckendärmen nachgewiesen werden. *Bt*-Toxin wurde auch im ausgeschiedenen Kot gemessen. Nach Stopp der *Bt*-Maisfütterung, fiel die Konzentration innerhalb von drei Tagen besonders für das Cry3Bb1-Toxin stark ab. Das Gewicht der Maiszünslerlarven, welche mit Cry1Ab-haltigem Kot gefüttert wurden, war signifikant geringer als das Gewicht in der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis deutet auf einen sublethalen Effekt hin. Daraus hervorgehenden möglichen Konsequenzen müssen aber noch weiter abgeklärt werden.

Enchyträen (Würmer, die die oberen 5-10 cm des Bodens besiedeln) wurden mit gemahlene *Bt*-Blattstücken gefüttert. Die Mortalität und Reproduktion der Tiere zeigte Unterschiede, diese können aber nicht mit den *Bt*-Toxinen in Verbindung gebracht werden. Eher sind die ermittelten Unterschiede auf einen Sorteneffekt zurückzuführen. Der Frass transgener Maispflanzen ist für Enchyträen somit risikolos.

Saprophage Dipterenlarven sind wichtige Primärdestruente im Bodensystem. Fliegen der Arten *Megaselia scalaris* und *Drosophila melanogaster* wurden mit Frassversuchen über 3-4

Generationen untersucht. Die Anzahl Nachwuchs pro Paar variiert bei beiden Arten vor allem zwischen den Generationen und nur in Einzelfällen pro Behandlung. Es ist kein negativer Trend erkennbar und weder der Mais noch das *Bt*-Toxin wirken sich negativ auf die Fertilität und Entwicklung der Fliegen aus. Die gemessenen Unterschiede sind am ehesten auf die unterschiedliche Nahrungsqualität aller Maislinien zurück zu führen.

### **Schlussfolgerung**

Es konnten *keine Nebenwirkungen* von *Bt*-Mais auf die a) Zusammensetzung der Bodenfauna, b) trophische Reaktion einzelner Arten, sowie c) deren Reproduktion festgestellt werden. *Bt*-Sorten verhalten sich im untersuchten Bereich nicht anders als ihre Isolinien oder andere konventionelle Maissorten.

Die vorgestellten Experimente umfassen eine hohe Anzahl von Maissorten und decken einen langen Zeitraum ab. Ebenfalls wurde ein grosses Spektrum an Bodenorganismen untersucht. Schliesslich wurden über mehrere Generationen die Fertilität und Entwicklung von Fliegen beobachtet.

Für diese *Bt*-Maissorten kann daher *nicht* von einem erhöhten ökologischen Risiko ausgegangen werden.

### **Literatur**

Cassagne N, Gers C, Gauquelin T (2003) Relationships between Collembola, soil chemistry and humus types in forest stands (France). *Biology and Fertility of Soils* 37, 355-361

Dunger W & Fiedler H.J. (1997) *Methoden der Bodenbiologie*. Gustav Fischer Verlag, Jena

Robertson G.P. & Grandy A.S. (2005) Soil system management in temperate regions. In: Uphoff, N.T. (Ed.), *Biological approaches to sustainable soil systems*. CRC Press, Boca Raton, Florida USA, pp. 27-39

MacFadyen A (1996) Improved funnel-type extractors for soil arthropods. *Journal of Animal Ecology* 30, 171-184

Zwahlen C, Hilbeck A, Gugerli P, Nentwig W (2003) Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12, 765-775

## 3.2. Belastungen des Ökosystems Boden durch natürliche sowie gentechnisch veränderte Organismen – Effekte, Methoden und Schadensdefinition als Beitrag zur Risikobeurteilung

S. Scheid<sup>1</sup>, A. Fliessbach<sup>2</sup>, P. Mäder<sup>2</sup>, J. Mayer<sup>1</sup>, K. Nowack<sup>2</sup>, B. Oehen<sup>2</sup>, F. Widmer<sup>1</sup>, H.-R. Oberholzer<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zürich

<sup>2</sup> Forschungsinstitut für biologischen Landbau (FiBL), Ackerstrasse, Postfach, CH-5070 Frick

\* **Kontakt: [hansrudolf.oberholzer@art.admin.ch](mailto:hansrudolf.oberholzer@art.admin.ch)**

In der Verordnung über Belastungen des Bodens (VBBo 1998) werden gentechnisch veränderte Organismen (GVO) zusammen mit pathogenen und exotischen Organismen als „biologische Bodenbelastung“ zusammengefasst. Der Umgang mit diesen Organismen wird durch die Freisetzungsverordnung und das Gentechnikgesetz geregelt. Prinzipiell gilt für alle freigesetzten lebenden Organismen, dass sie sich vermehren, verbreiten und evolutiv verändern können, so dass sich zusätzliche Anforderungen an die Bewilligung einer Freisetzung von Organismen ergeben, unabhängig ob gentechnisch verändert oder nicht. Das vorliegende Projekt der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART und des Forschungsinstituts für biologischen Landbau (FiBL) hatte zum Ziel, einen Beitrag zur Risikobeurteilung biologischer Bodenbelastungen auf das Ökosystem Boden zu erarbeiten. Es gliederte sich in vier Module. **Modul 1** beinhaltet die theoretischen Grundlagen des Forschungsprojektes. **Modul 2** und **Modul 3** befassten sich mit der praktischen Anwendung dieser Grundlagen am Beispiel eines Modellversuches mit dem Organismus *Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0 und einem Feldversuch mit dem Präparat „Effektive Mikroorganismen“ (EM). **Modul 4** stellt die Synthese der Ergebnisse aus den Modulen 1 bis 3 dar.

### Modul 1 - Theoretische Grundlagen (ART und FiBL)

Grundlage der Arbeiten im ersten Teil des Moduls 1 war die Auswertung internationaler Konzepte zur Bestimmung der Bodenqualität und zur Erfassung von Auswirkungen biologischer Belastungen im Hinblick auf bodenphysikalische, -chemische und -biologische Indikatoren. Zudem wurde eine Literaturübersicht zu gentechnisch veränderten Pflanzen, zu gentechnisch veränderten bzw. nicht gentechnisch veränderten Organismen, die dem Boden kontrolliert zugegeben werden sowie zu invasiven, exotischen Organismen durchgeführt. Als Ergebnis wurden die weltweit empfohlenen Indikatoren zur Bestimmung der Bodenqualität sowie die aktuell diskutierten Effekte biologischer Belastungen und Indikatoren zu deren Erfassung zusammengestellt. Des Weiteren wurden Ansätze, wie ein Schaden für die Umwelt bzw. den Boden definiert wird, zusammengetragen.

Im zweiten Teil wurden die möglichen Effekte biologischer Belastungen auf das Ökosystem Boden definiert. Es wurden 17 Effekte erarbeitet, die den Bereichen Bodenphysik, Bodenchemie, Bodenbiologie und Bodenfunktionen zugeordnet werden können (siehe Abb. 1 Poster). Als Effekt gilt die Veränderung einer Bodeneigenschaft beziehungsweise -funktion. Die Liste der Methoden zur Erfassung dieser Effekte, die jederzeit ergänzt werden kann, umfasst in unserer

Zusammenstellung 90 Methoden. Für jede Methode wurde deren Eignung zur Erfassung der postulierten Effekte beurteilt. Jede Methode wurde anhand von 16 Kriterien beurteilt. Als Kriterien wurden unter anderen die Standardisierung, die Reproduzierbarkeit und die Sensitivität herangezogen. Überdies wurde beurteilt, ob eine Methode kostengünstig ist. Im Hinblick auf biosicherheitsrelevante Aspekte wurde beurteilt, ob Effekte, die mit einer Methode gemessen werden, bewertbar sind, und ob aus den Ergebnissen auf einen Schaden für das Bodenökosystem geschlossen werden kann. Des Weiteren wurde eine Schadensdefinition erarbeitet, um die Bedeutung von Veränderungen von Bodeneigenschaften und -funktionen abzuschätzen beurteilen zu können.

Für die Anwendung in der Risikobeurteilung wurde ein Vorgehen für eine effektbezogene Methodenauswahl entwickelt. Im ersten Schritt werden die aufgrund von Expertenmeinungen zu erwartenden Effekte biologischer Belastungen identifiziert und den 17 Effekten zugeordnet. Im Anschluss daran können die geeigneten Methoden zur Erfassung der Effekte ausgewählt werden, deren Vor- und Nachteile sich mit Hilfe der vorgeschlagenen Kriterien beurteilen lassen.

## **Modul 2 - Modellversuch mit dem Organismus *Pseudomonas fluorescens* Stamm CHA0 (FiBL)**

*Pseudomonas fluorescens* wird in der Landwirtschaft mit dem Ziel eingesetzt, das Pflanzenwachstum zu fördern und die Pflanzen vor bodenbürtigen Krankheiten zu schützen. Diesen erwünschten Wirkungen stehen mögliche Effekte auf Nicht-Ziel-Organismen gegenüber, die vor einer Massenfreilassung derartiger Organismen überprüft werden müssen. Die erwünschten und unerwünschten Wirkungen eines freigelassenen Organismus hängen davon ab, wo dieser angewendet wird. Theoretische ökologische Konzepte gehen davon aus, dass Gemeinschaften mit einer hohen Diversität weniger anfällig für Veränderungen durch einwandernde Arten sind. Ausgehend von dieser Theorie wurde ein Modellversuch im Gewächshaus mit Ackerböden von Lössstandorten durchgeführt, deren mikrobielle Biomasse und Aktivität sich durch die Bodenbewirtschaftung unterschiedlich entwickelt haben. Zum Saatzeitpunkt von Sommerweizen wurde *P. fluorescens* Stamm CHA0 mit einer natürlich vorkommenden Resistenz gegenüber Rifampicin ( $\text{rif}^+$ ) inokuliert, dessen Etablierung in den Versuchsböden untersucht wurde. Der eingesetzte *P. fluorescens* Stamm CHA0 wird in der Schweiz nicht kommerziell genutzt, weist aber ähnliche Eigenschaften auf wie *P. fluorescens* im zugelassenen Präparat „Biofitac PF1“. Seine krankheitsunterdrückenden Eigenschaften beruhen unter anderen auf der Produktion der antimikrobiell wirksamen Substanz 2,4-Diacetylphloroglucinol.

Die mikrobielle Biomasse ( $C_{\text{mic}}$ ,  $N_{\text{mic}}$ ), die Basalatmung, der metabolische Quotient  $q\text{CO}_2$ , die Dehydrogenaseaktivität (DHA), bakterielle Keimzahlen, die Mykorrhiza-Wurzelkolonisierung und das bakterielle Substratnutzungsmuster wurden am 18. und 60. Tag nach Aussaat und Anwendung von *P. fluorescens* Stamm CHA0 untersucht. Zu Versuchsbeginn zeigten die bodenbiologischen Parameter grosse Unterschiede, die von den verwendeten Böden herrührten. Im Verlauf des Experiments waren durch die wachsenden Pflanzen und ihre Wurzeln hervorgerufene Veränderungen der bodenbiologischen Parameter messbar. Der Effekt des Inokulums war hingegen klein und bei den meisten Parametern nur vorübergehend. Im Boden mit der geringsten mikrobiellen Biomasse zu Beginn des Versuches war jedoch eine über 60 Tage anhaltende Veränderung messbar. Die bakteriellen Substratnutzungsmuster, welche

Veränderungen in der mikrobiellen Gemeinschaft anzeigen, veränderten sich in erster Linie als Folge des Pflanzenwachstums, während die unterschiedlichen Böden und der Beprobungszeitpunkt vernachlässigbar waren. Die Sensitivität der verwendeten Methoden nahm in Abhängigkeit von den Versuchsböden in der Reihenfolge  $N_{mic}$ , DHA,  $C_{mic}$  und  $qCO_2$  ab. Neben der selektiven Keimzahlbestimmung von *P. fluorescens* Stamm CHA0, der nur in behandelten Böden gefunden wurde, waren die Methoden DHA,  $C_{mic}$  und das  $C_{mic}/N_{mic}$ -Verhältnis zur Ermittlung des Inokulumeffekts geeignet. Der zeitliche oder durch die wachsende Pflanze hervorgerufene Effekt wurde am sensitivsten durch  $N_{mic}$ , DHA,  $C_{mic}$  und  $qCO_2$  angezeigt. Die Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass eine reichhaltige Mikroflora Einflüsse einwandernder Spezies nach einer Massenfreilassung abpuffern kann. Mit anderen Worten: das bakterielle Inokulum war in relativ armen Böden effektiver als in Böden, die belebter waren.

### **Modul 3 - Feldversuch mit dem Präparat „Effektive Mikroorganismen“ (ART)**

In einem vierjährigen, biologisch bewirtschafteten Feldversuch (2003-2006) wurde die Wirkung des Präparates „Effektive Mikroorganismen“ untersucht. Der Versuch wurde an der Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon ART am Standort Reckenholz durchgeführt. Die Versuchsverfahren umfassten (i) die direkte Spritzung des Spritzpräparates EMA sowie (ii) die Ausbringung von EMA in Kombination mit EM Düngerpräparat Bokashi (fermentierte Weizenkleie) und (iii) EMA in Kombination mit Bokashi und Rottemist. EM besteht nach Herstellerangaben aus etwa 80 verschiedenen Mikroorganismenarten (z.B. Lactosebildner, photosynthetisch aktive Bakterien). Das EM-Präparat ist in der Schweiz als Zusatz für Dünger, Bodenverbesserer, Kompostierungsmittel und zur Verbesserung biologischer Vorgänge im Boden durch das BLW zugelassen.

Um die Wirkung der Mikroorganismen im EM Präparat von der ihres organischen Trägermaterials differenzieren zu können, wurden als Kontrolle ein Verfahren ohne EM-Applikation sowie die drei Versuchsverfahren mit autoklavierten EM Präparaten im Versuch mitgeführt.

Es wurden die jährlichen Erträge sowie die bodenbiologischen Parameter mikrobielle Biomasse (SIR, CFE), Basalatmung, Dehydrogenaseaktivität, Substratnutzungsmuster und DNA-Profil im Frühjahr und Herbst 2005 und im Frühjahr 2006 untersucht. In Inkubationsversuchen im Labor wurden der Zelluloseabbau, das N-Mineralisationspotenzial sowie die N-Mineralisationsleistung bestimmt. Wurde nur das EMA Spritzpräparat eingesetzt, liessen sich für alle untersuchten bodenbiologischen Parameter und den Ertrag keine signifikanten Unterschiede zwischen dem EM-Verfahren und der unbehandelten Kontrolle nachweisen. Auswirkungen auf den Ertrag und die bodenbiologischen Parameter wurden für Bokashi und Rottemist gefunden. Die Effekte konnten jedoch nicht für alle untersuchten Parameter und Beprobungszeitpunkte beobachtet werden. Die gemessenen Unterschiede waren lediglich auf das zugegebene organische Material (Bokashi) und den damit verbundenen Nährstoffinput für den Boden zurückzuführen. Der Beprobungszeitpunkt wirkte sich auf den Gehalt an mikrobieller Biomasse, die Basalatmung und das Substratnutzungsmuster aus.

Aus den Ergebnissen des Versuches kann geschlussfolgert werden, dass die Zugabe von „Effektiven Mikroorganismen“ die Pflanzenerträge nicht steigerte und mittelfristig (vier Jahre) keinen Einfluss auf die Bodenqualität im Ackerbau unter den klimatischen Bedingungen in Zentraleuropa hatte.

## Modul 4 - Synthese der Module 1-3 (ART und FiBL)

Das in diesem Projekt erarbeitete schrittweise Vorgehen zur effektbezogenen Methodenauswahl ermöglicht eine systematische und an sachlichen Kriterien orientierte Wahl von Methoden zur Erfassung von Effekten biologischer Belastungen auf das Ökosystem Boden und konnte gut in die Praxis umgesetzt werden. Bei der Erarbeitung der möglichen Effekte von *P. fluorescens* Stamm CHA0 und den „Effektiven Mikroorganismen“ zeigte sich, dass je detaillierter die Kenntnisse über den zu prüfenden Organismus bzw. die Organismengemeinschaft sind, desto präziser konnten die möglichen Effekte auf die Bodenqualität herausgearbeitet werden.

Basierend auf den Versuchsergebnissen wurde die Sensitivität der eingesetzten Methoden zur Erfassung von Veränderungen diskutiert. Es zeigte sich, dass im Modellversuch die Methoden sensitiv waren, Veränderungen aufgrund der Inokulation der Böden mit *P. fluorescens* Stamm CHA0 zu erfassen. Für den Feldversuch traf dies in Bezug auf Veränderungen aufgrund der Zugabe von „Effektiven Mikroorganismen“ nicht zu. Die verwendeten Methoden waren aber grundsätzlich sensitiv, um Veränderungen aufgrund der Zugabe von organischem Material mit der EM-Applikation zu erfassen, so dass Veränderungen, hervorgerufen durch die EM-Applikation, die das gleiche Ausmass wie durch die Zugabe von organischem Material haben, mit diesen Methoden erfasst werden können. Für die Methoden, die sowohl im Modell- als auch im Feldversuch eingesetzt wurden, zeigte sich, dass deren Sensitivität, Effekte erfassen zu können, unterschiedlich sein kann. Dies bedeutet, dass bei der Methodenauswahl die Art des Versuches zu berücksichtigen ist.

Die gemessenen Veränderungen wurden basierend auf den Kriterien der Schadensdefinition auf das Vorliegen eines Schadens hin beurteilt. Ein Vergleich der Verfahren mit Zugabe von *P. fluorescens* Stamm CHA0 und EM mit den jeweiligen Kontrollen liessen in beiden Versuchen nur geringe bzw. keine Einflüsse auf die untersuchten bodenbiologischen Parameter erkennen.

Der Entwicklungsbedarf der bodenphysikalischen, -chemischen und -biologischen Methoden zur Erfassung von Effekten biologischer Belastungen lässt sich in die folgenden zwei Bereiche gliedern:

- *Standardisierte Methoden*, die allgemein zur Beurteilung der Bodenqualität und in der Langzeitbeobachtung eingesetzt werden: Für diese sind die notwendigen methodischen Grundlagen vorhanden, so dass ein Einsatz in der Praxis möglich ist. Für diese Methoden gilt es, Interpretationsgrundlagen zu erarbeiten.
- *Nicht standardisierte Methoden*: Dies betrifft vorwiegend die molekularbiologischen Methoden, für die ein standardisiertes Vorgehen zu erarbeiten wäre, um diese in Routineerhebungen integrieren und Interpretationsgrundlagen erarbeiten zu können.

Die Beurteilung, ab wann eine Veränderung einen Schaden für die Bodenqualität darstellt, ist für die Risikoforschung von zentraler Bedeutung. Neben der weiteren methodischen Entwicklung und der Erfassung „normaler Schwankungen“ bodenbiologischer Parameter im Rahmen einer Langzeitbeobachtung der Bodenqualität ist es notwendig, die vorhandenen Wissenslücken im Bereich der Dateninterpretation zu schliessen.

## Publikationen

- Fließbach, A., Lutz, M., Oberholzer, H.-R., Mäder, P. (2008). Soil amendment with *Pseudomonas fluorescens* CHA0 is more effective in soils low in microbial biomass and activity. submitted
- Mayer, J., Scheid, S., Widmer, F., Fließbach, A., Oberholzer, H.-R. (2007). Wirkungen von ‚Effektiven Mikroorganismen EM‘ auf pflanzliche und bodenmikrobiologische Parameter im Feldversuch - Effects of ‚Effective Microorganisms EM‘ on plant and microbiological parameters in a field experiment. Vortrag 9. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau: Zwischen Tradition und Globalisierung. Universität Hohenheim, DE-Stuttgart, Mar. 20-23, 2007.  
Beitrag archiviert unter [http://orgprints.org/9691/01/9691\\_Mayer\\_Vortrag.pdf](http://orgprints.org/9691/01/9691_Mayer_Vortrag.pdf)
- Mayer, J., Scheid, S., Oberholzer, H.-R. (2008). How effective are ‚Effective Microorganisms‘? Results from an organic farming field experiment. 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, June 16-20, 2008.
- Mayer, J., Scheid, S., Widmer, F., Fließbach, A., Oberholzer, H.-R. (2008). Effects of ‚Effective Microorganisms (EM)‘ on crop yields and soil microbial parameters in a field experiment in temperate climate. In Vorbereitung.

## 4.1. Auswirkungen schädlingsresistenter transgener Pflanzen auf Solitärbienen

### Zusammenfassung der vorläufigen Resultate

**Roger Konrad and Dirk Babendreier<sup>1\*</sup>**

Forschungsanstalt Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zürich, [www.art.admin.ch](http://www.art.admin.ch)

<sup>1</sup> Gegenwärtige Adresse : CABI Europe – Switzerland, Rue des Grillons 1, CH-2800 Delémont

\* **Kontakt:** [d.babendreier@cabi.org](mailto:d.babendreier@cabi.org)

### 1. Auswirkungen transgener Pflanzen auf Larven von Solitärbienen

**Hintergrund und Methoden:** Die Nahrung der Larven vieler Solitärbienen besteht fast ausschliesslich aus Pollen. Daher könnten sie im Falle des Anbaus einer schädlingsresistenten transgenen Kulturpflanze dem Produkt des Transgens (Eiweiss) in hohem Masse ausgesetzt sein. In der vorliegenden Studie wurden mögliche Effekte des Proteaseinhibitors Oryzacystatin 1 (OC-1) im Pollen eines transgenen Rapses auf die Larven der Solitärbiene *Osmia bicornis* (= *O. rufa*) untersucht. Des Weiteren wurden gereinigtes OC-1, das Bt-Toxin Cry1Ab sowie das Schneeglöckchen-Lektin *Galanthus nivalis* Agglutinin (GNA) auf mögliche Auswirkungen auf verschiedene Entwicklungsparameter dieses wichtigen Bestäubers evaluiert. Hierzu wurden jeweils eines dieser insektiziden Eiweisse in gewünschter Konzentration dem Pollenproviant der Bienenlarven zugefügt.

#### **Resultate:**

Diejenigen Larven, die mit Pollen gefüttert wurden, der 0.1% GNA enthielt, unterschieden sich in zwei Entwicklungsparametern statistisch signifikant von der Kontrollgruppe: Nämlich in der Entwicklungsdauer und in der Umwandlung des vorhandenen Futters (Pollenproviant) in Körpergewicht der Larve. Keine der anderen Behandlungsgruppen (transgener OC-1 Pollen, OC-1 0.1%, Cry1Ab 0.01% und GNA 0.01%) unterschied sich in diesen beiden Entwicklungsparametern signifikant von der Kontrolle. Im Gewichtsverlust während der mehrmonatigen Überwinterung sowie in der Lebensdauer nach dem Schlupf der adulten Bienen im Frühjahr wurden keinerlei signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe festgestellt. Ebenfalls in der Sterblichkeit unterschied sich keine der Behandlungen von der Kontrolle:

Von den 174 getesteten Larven starben 5 (2,9%) während der Larvenentwicklung und maximal zwei in einer Behandlung. Weder transgener, OC-1 exprimierender Pollen, noch eine der Behandlungen mit künstlich zugesetztem insektizidem Protein unterschieden sich signifikant von der Kontrolle in Bezug auf die Sterblichkeit während der Entwicklung. Von den 169 Individuen, welche die Larvenentwicklung erfolgreich durchliefen, starben 19 (10,1%) während der Überwinterung, mit einem Maximum von 4 je Behandlung, was ebenfalls einer insgesamt tiefen und homogenen Sterblichkeit entsprach.

**Zusammenfassung und Bedeutung:** Die Verfütterung des Pollens von transgenem OC-1 Raps beeinflusst die allgemeine Entwicklung nicht. Ebenfalls zeigten hohe Dosen von OC-1 und Cry1Ab sowie kleine Dosen von GNA keinen signifikanten Effekt. Hingegen erhöhte eine hohe

Dosis von GNA (0,1%) in der Larvendiat die Entwicklungszeit signifikant und reduzierte die Effizienz des Umsatzes der Pollennahrung in Körpergewicht der Larve.

Die experimentellen Methoden, die in der vorgelegten Studie entwickelt und beschrieben wurden, sind nicht nur in standardisierten Studien zu den möglichen Effekten an Nicht-Zielorganismen durch transgene Pflanzen einsetzbar, sondern könnten auch adaptiert werden für Tests mit systemischen Insektiziden, welche ebenfalls im Pollen von behandelten Pflanzen vorkommen können. Bei *in vitro* Toxizitätstest mit Honigbienenlarven tritt oft eine hohe Kontrollsterblichkeit auf, was vermutlich eine Folge des wiederholten Manipulierens, sprich Umplatzen der Larven ist. In der vorliegenden Studie hingegen wurde eine tiefe Kontrollmortalität beobachtet, was wahrscheinlich auf die minimale Manipulation von Eiern und Larven, welches bei der Aufzucht von Solitärbiene notwendig ist, zurückgeführt werden kann. Ein weiterer Pluspunkt des experimentellen Designs, welches in dieser Studie entwickelt wurde, ist, dass das Sammeln und Verarbeiten des Pollenproviantes durch die Biene unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurde. Dies stellt eine bedeutende Verbesserung gegenüber früheren Studien zu den Auswirkungen von Pestiziden auf Solitärbiene-Larven dar.

Die Resultate der vorgelegten Studie zeigen, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass OC-1 oder Cry1Ab ein Risiko für Larven von *O. bicornis* darstellen. Für GNA, das zwar in hohen Dosen gefährlich für Biene ist, konnte nachgewiesen werden, dass es keinerlei schädlichen Effekt bei den erwarteten Expressionsmengen hat. Es kann erwartet werden, dass diese Resultate, welche für eine einzelne Modell-Art (*O. bicornis*) erhoben wurden, für einen Grossteil der ungefähr 700 solitären Bienearten Mitteleuropas relevant sind, da viele von ihnen polylektisch sind, auf landwirtschaftlich angebauten Futterpflanzen nach Nahrung suchen und sich während der Blüte solcher Pflanzen fortpflanzen.

## 2. Auswirkungen transgener Pflanzen auf adulte Solitärbiene

**Hintergrund und Methoden:** Diese Studie verfolgte zwei Ziele: (i) Die Belastung von sowohl transgenen Rapspflanzen, welche den Proteaseinhibitor (PI) Oryzacystatin 1 (OC-1) exprimieren als auch gereinigten insektiziden Proteinen auf die Lebensdauer von Solitärbiene zu untersuchen und (ii) das Profil der Verdauungsenzyme (Proteasen) dieser Solitärbiene zu charakterisieren und mögliche Veränderungen in der Enzymaktivität aufgrund von PI-Aufnahme zu untersuchen. Die folgenden insektiziden Proteine wurden im ersten Teil der Studie in reiner Form getestet: OC-1, ein Trypsin Proteaseinhibitor aus der Sojabohne (SBTI), das Bt-Toxin Cry1Ab sowie das Schneeglöckchen-Lektin *Galanthus nivalis* Agglutinin (GNA)

Gene welche für PI kodieren, kommen natürlicherweise in einer Vielzahl von Pflanzen, Tieren und Mikroben vor. In Pflanzen können PI einen gewissen Schutz gegen pflanzenfressende Insekten bieten, indem sie spezifisch an proteolytische Enzyme im Insektendarm binden und diese dadurch deaktivieren. Diese direkte Inhibition der Eiweissverdauung induziert oft eine Überproduktion von Proteasen im Insektendarm beim Versuch die Inhibition zu überwinden. Der resultierende Mangel an essentiellen Aminosäuren kann zu einem repressiven Effekt auf Wachstum, Fruchtbarkeit und sogar Überleben von pflanzenfressenden Insekten führen. Solche negativen Effekte auf Insekten wurden bisher beobachtet sowohl für transgene, PI exprimierende Pflanzen als auch wenn PI der Insektennahrung beigefügt worden ist.

**Resultate für Lebensdauer:** Die Lebensdauer von Bienen, die auf transgenem OC-1 Raps sammelten, unterschieden sich nicht von der Lebensdauer von Bienen, die sich von Kontrollpflanzen ernähren. Die mittlere Lebensdauer der Bienen betrug 45,9 Tage ( $\pm 5,01$ ) auf der OC-1 Linie und 52,1 Tage ( $\pm 7,10$ ) auf der Isolinie. Beide Werte waren deutlich grösser als die Lebensdauer wie sie für *Osmia* unter Feldbedingungen bekannt ist.

Unter den Gruppen von Bienen, welche die Insektiziden, in Zuckerwasser gelösten Proteinen verabreicht bekamen, ergaben sich deutliche Unterschiede in der Lebensdauer. Die Bienen, welche GNA (0.01% oder 0.1%) oder eine hohe Dosis an SBTI (0.1%) mit ihrer Diät erhielten, hatten eine deutlich reduzierte Lebensdauer, aber ebenso lebten Bienen, die eine geringe Dosis von SBTI (0.01%) oder eine hohe Dosis von OC-1 (0.1%) erhielten, signifikant weniger lang als die Kontrolle. Einzig die Lebensdauer von Bienen, welche Cry1Ab oder eine tiefe Dosis von OC-1 erhielten, unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

**Resultate für digestive Enzyme:** Die Anfälligkeit einer Insektenart für bestimmte Proteaseinhibitoren hängt ab (i) von der Bandbreite an Proteasen, welche im Verdauungstrakt der Insekten vorhanden sind und (ii) von ihrer Fähigkeit, sich an aufgenommene Inhibitoren anzupassen, indem die ursprünglich vorhandenen, sensitiven Proteasen überproduziert werden oder indem auf insensitive Proteasen umgestellt wird. Eiweiss-verdauende Enzyme werden gemäss ihrem Wirkungsmechanismus generell in vier Grossgruppen eingeteilt: Serine-, Cysteine-, Aspartyl- und Metalloproteasen.

Das Proteaseprofil vom Darmextrakt von adulten *O. bicornis* wurde in Enzymstudien mit Hilfe von synthetischen, klassenspezifischen Substraten und diagnostischen Proteaseinhibitoren untersucht. Für Cysteine- und Metalloproteasen wurde gefunden, dass sie eine untergeordnete Rolle in der Proteinverdauung bei *O. bicornis* spielen (jeweils ungefähr 20% der totalen Aktivität), während keine Aktivität von Aspartylproteasen entdeckt wurde. Um die physiologische Reaktion von *O. bicornis* auf die Aufnahme von zwei PI, welche verschiedene Klassen von Proteasen angreifen, und um schädliche Effekte dieses metabolischen Stressors auf die Bienenlebensdauer zu charakterisieren, analysierten wir die proteolytische Aktivität im Mitteldarm von Bienen, welche entweder SBTI oder OC-1 erhielten. Der Konsum von OC-1 führte zu einer 30% Erhöhung der generellen Hydrolyse im Vergleich zur Aktivität im Darmextrakt von Bienen der Kontrollgruppe. Die Charakterisierung dieser erhöhten Aktivität zeigt eine moderate Verstärkung der Produktion von Aspartyl- und wahrscheinlich Serin- und Cysteineproteasen, was auf einen komplexen Kompensationsmechanismus hindeutet, welcher sowohl die Überproduktion der ursprünglichen Proteasen als auch die Aktivierung von neuen, insensitive Proteasen umfasst. Der Verzehr von SBTI führte zu einer Erhöhung von mindestens 60%, welches eine starke und effektive Kompensation für SBTI-inhibiertes Trypsin anzeigt, da offensichtlich hohe Mengen an ungebundener Protease erreicht wurden. Die Charakterisierung dieser kompensatorischen Antwort auf SBTI brachte Änderungen im Proteaseprofil zum Vorschein, welche ähnlich und sogar verstärkter als in OC-1 gefütterten Bienen sind. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass Serinproteasen gegenüber Cysteineproteasen eine dominantere Rolle im natürlichen Proteaseprofil von *O. bicornis* spielen.

**Zusammenfassung und Bedeutung:** Die Resultate der vorgelegten Studie zeigen, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass das Bt-Toxin Cry1A oder der Cysteine-Proteaseinhibitor OC-1 beim erwarteten Grad an Expression ein Risiko für adulte Bienen von *O. bicornis* darstellt. Das Lektin GNA, der Serin-Proteaseinhibitor SBTI, als auch eine unrealistisch hohe Konzentration von OC-

1 reduzieren signifikant die Lebensdauer der Bienen. Das Resultat für GNA stimmt mit der gut dokumentierten insektiziden Aktivität dieses Proteins für eine breite Palette von Insektenarten überein. Effekte auf die Lebensdauer der Bienen durch die zwei PI können aufgrund der *in vitro* Enzymstudien interpretiert werden, welche auf ein eher komplexes Verdauungssystem hinweisen. Neben den serinen Proteasen, welche für den Grossteil der Eiweissverdauung im Mitteldarm von *O. bicornis* verantwortlich sind, kommen auch cysteinen Proteasen und wahrscheinlich Metalloproteasen vor. Während die wichtige Rolle von serinen Proteasen mit dem übereinstimmt, was für die Honigbiene *Apis mellifera* bekannt ist, unterscheiden sich unsere Resultate zu der Präsenz von cysteiner Enzymaktivität im Mitteldarm von *O. bicornis* von den meisten anderen Studien über die Proteaseaktivität in Bienen, da diese nicht über eine solche Aktivität im Bienendarm berichteten. Wie dem auch sei, die serine Enzymaktivität ist höchstwahrscheinlich essentiell für eine effektive Verdauung der mit der Nahrung aufgenommenen Eiweisse in *O. bicornis*, wie durch die stärkere physiologische Antwort auf Aufnahme von SBTI, verglichen mit OC-1, und dem stärkeren Effekt von SBTI auf die Lebensdauer der Bienen deutlich wurde. Diese Befunde zeigen die Wichtigkeit, dass sowohl das natürliche Proteaseprofil, als auch die Fähigkeit zur Produktion von alternativen Proteasen von wichtigen Nicht-Zielorganismen, in einer Abklärung des Umweltrisikos von transgenen Pflanzen, welche PI exprimieren, mit in Betracht gezogen werden.

### **3. Honigtau als möglicher Weg für die Exposition gegenüber transgenen Produkten**

**Hintergrund und Methoden:** In Gebieten welche durch intensive Landwirtschaft dominiert sind, kann Pollen und Nektar rar sein und der von Pflanzensaft-saugenden Insekten ausgeschiedene Honigtau stellt wahrscheinlich die primäre Zuckerquelle dar. Während die Honigtauaufnahme von Honigbienen gut dokumentiert ist, gibt es nur anekdotische Berichte für Hummeln und praktisch keine Information für Solitärbiene. Da der Honigtau aber das transgene Produkt einer schädlingsresistenten Pflanze enthalten kann und somit einen möglichen Expositionsweg für solche potentiell schädlichen Substanzen darstellen kann, ist das Wissen über den Beitrag des Honigtaus für die Ernährung der Solitärbiene im Rahmen einer Risikobeurteilung von genetisch veränderten Pflanzen von Bedeutung.

Um zu testen ob *O. bicornis* sich von Honigtau ernährt, wurden Weibchen in Feldkäfigen auf ausgesetzt, welche gefüllt waren mit (i) Blattlaus-infizierten Rapspflanzen (nur Honigtau, d.h. keine Wahlmöglichkeit) oder (ii) blühenden nicht-infizierten Rapspflanzen welche Nektar liefern (nur Nektar, d.h. keine Wahlmöglichkeit) oder (iii) sowohl infizierten ALS AUCH blühenden Pflanzen (Wahlmöglichkeit zwischen Nektar und Honigtau). Zwei Arten von Blattläusen (die Grüne Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* und die Kohlblattlaus *Brevicoryne brassicae*) wurden getestet und High Performance Liquid Chromatography (HPLC) wurde benutzt, um das Zuckerprofil des Kropfinhaltes der Bienen zu untersuchen. Die Honigtauaufnahme wurde durch direkte Beobachtung des Verhaltens und durch die Präsenz von Honigtau-spezifischen „Zeigezuckern“ (üblicherweise Erlose und Melozitose) beurteilt. Diese Oligosaccharide werden typischerweise durch Pflanzensaft-saugende Insekten synthetisiert und in den Honigtau abgegeben.

**Resultate:** Keiner der Zeigezucker wurde im Kropf von ungefütterten, frisch geschlüpften Bienen entdeckt und es gab keinen Hinweis darauf, dass *O. bicornis* fähig ist, Honigtau-spezifische Zucker selber zu synthetisieren. Erlose wurde nicht nur in Honigtau von sowohl *M.*

*persicae* als auch *B. brassicae* gefunden (mit höheren Mengen im ersten Fall (6,4 – 14,5% vs. 0,5 – 3,5% des Gesamtzuckers)), sondern wurde auch im Kropf von Kontrollbienen nachgewiesen, welche im Labor gezielt mit Honigtau gefüttert wurden. Erlöse wurde somit als ein geeigneter Indikator für den Nachweis von Honigtauverbrauch bei *O. bicornis* identifiziert. Allerdings ist der Nachweis nur während einer relativ kurzen Zeit nach der Honigtauaufnahme möglich, da der Zuckergehalt des Kropfes bereits 24 Stunden nach Aufnahme stark abgenommen hatte und 96 Stunden nach Aufnahme ein Niveau erreicht hatte, das nicht von demjenigen von ungefütterte Bienen zu unterscheiden war.

Bienen aus denjenigen Käfigen mit blühenden Rapspflanzen (d.h. nur Nektar oder die Wahlmöglichkeit) zeigten hohe Zuckerwerte im Kropf und ein Zuckerprofil das sehr stark dem Nektar von Raps glich (d.h. stark dominiert durch Glukose und Fruktose). Bienen die nur Honigtau von *Brevicoryne* zur Auswahl hatten, zeigten extreme tiefe Werte an Gesamtzucker (29 von 33 Bienen tiefer als 1 µg Gesamtzucker in der Ernte). Der Indikatorzucker Erlöse wurde in keiner dieser Bienen gefunden. Bienen, welche nur den Honigtau von *Myzus* zur Verfügung hatten, zeigten ebenfalls relative tiefe Gesamtzuckerwerte, obwohl ein klarer Hinweis auf Verwendung von Honigtau in diesen Bienen gefunden wurde, da in ungefähr 50% der Bienen Erlöse nachgewiesen werden konnte. Die Analysen des Kropfinhaltes mittels HPLC stimmten mit den direkten Verhaltensbeobachtungen überein; das Sammeln von *Myzus*-Honigtau wurde gelegentlich beobachtet, während die Aufnahme von *Brevicoryne*-Honigtau nie beobachtet wurde.

**Zusammenfassung und Bedeutung:** Die Resultate dieser Studie zeigen, dass *O. bicornis* eindeutig Blütennektar gegenüber Honigtau bevorzugt und Nektar als Zuckerquelle nutzt, wenn Blüten vorhanden sind. Wenn diese Erkenntnisse auf eine Feldsituation übertragbar sind, würden sie darauf hinweisen, dass es in Perioden und Gebieten mit ausreichendem Nektarangebot hoch unwahrscheinlich ist, dass Honigtau als Zuckerquelle genutzt wird. Daher würde Honigtau auch einen sehr unwahrscheinlichen Weg der Exposition gegenüber transgenen Produkten darstellen. Nichtsdestotrotz kann unter bestimmten Bedingungen, wenn beispielsweise andere Zuckerquellen spärlich vorhanden sind, die Aufnahme von Honigtau nicht komplett ausgeschlossen werden. Wir haben hier eindeutig gezeigt, dass *O. bicornis* dazu fähig ist Honigtau von Blattläusen zu verwenden, abhängig von der Art des Honigtaus und dem Angebot an alternativen Zuckerquellen. Daher schliessen wir, dass die Exposition von Bienen gegenüber transgenen Produkten via Honigtau in einer Risikoanalyse von transgenen schädlingresistenten Pflanzen beachtet werden sollte, insbesondere falls das Produkt des Transgens im Pflanzensaft vorhanden ist.

## 4.2. Die Wirkung erhöhter Resistenz gegen Krankheitserreger auf die Interaktion mit symbiotischen Pilzen im Reis

Sylvain Marcel and Uta Paszkowski \*

University of Lausanne, Department of Plant Biology

\* **Kontakt:** [uta.paszkowski@unil.ch](mailto:uta.paszkowski@unil.ch)

### Einleitung

Durch Mikroorganismen erzeugte Krankheiten führen zu hohen Verlusten in Zuchtpflanzen. Um Ertragsverluste zu vermindern, sind neue Zuchtstrategien dringend nötig. Bei genetisch veränderten Pflanzen (GVP) steht die Resistenz gegenüber Krankheitserregern, welche die oberirdischen Teile der Pflanze betreffen im Vordergrund. Dabei werden die Interaktionen der Wurzel ausser Acht gelassen. Es gibt jedoch zahlreiche Pathogene, die sowohl die oberirdischen Organe als auch die Wurzeln befallen können.

Der Pilz, der für den Reisbrand verantwortlich ist (*Magnaporthe oryzae*), kann z.B. sowohl Blätter als auch Wurzeln befallen. In beiden Fällen führt die Infektion zur Krankheit<sup>1</sup>. Die Strukturen, die der Pilz für die Infektion von Blättern oder Wurzeln benützt, unterscheiden sich auch deutlich und verschiedene Gene des Pilzes sind für die Infektion der verschiedenen Pflanzengewebe verantwortlich.

Die Wurzel geht mit anderen Organismen auch nützliche Interaktionen ein. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die uralte arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose (AM). Diese Symbiose ist ein integraler Bestandteil der meisten Ökosysteme und mehr als 80% der Gefässpflanzen, einschliesslich der meisten Anbaupflanzen, gehen diese Symbiose ein. Es ist ökologisch äusserst wichtig, die Effekte von transgenen Resistenzen gegenüber Pathogenen auf die Mykorrhiza-Symbiose hin zu prüfen.

Bei der AM Symbiose handelt es sich um eine der älteste Symbiosen, die vor mehr als 400 Mio Jahren entstand<sup>2</sup>. Daher kann man sie als Urform der Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen betrachten. Unlängst wurde beschrieben, dass zum Teil dieselben genetischen Elemente der Pflanze sowohl an der AM Symbiose, als auch an jüngeren Interaktionen beteiligt sind. So wird eines dieser Elemente, die Rezeptor-Ähnliche Proteinkinase SYMRK von *Lotus japonicus*, für die Früherkennung der AM Pilze, der Rhizobien und der Nematoden benötigt<sup>3,4</sup>. Ein weiteres Beispiel sind die pflanzlichen Strigolactone, welche von AM Pilzen und von parasitären Pflanzen<sup>5</sup> als Signale erkannt werden.

Man kann daher nicht ausschliessen, dass eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen auch einen Einfluss auf die Empfänglichkeit für die AM Symbiose hat. Dieser Aspekt sollte daher sorgfältig untersucht werden.

Invasive Pilze werden graduell in obligate Biotrophe (darunter die arbuskulären Mykorrhiza Pilze), Hemibiotrophe und Nekrotrophe eingeteilt. Biotrophe Mikroorganismen ernähren sich von lebenden Wirtszellen, während Nekrotrophe diese zunächst abtöten und deren Inhalt als Nahrungsquelle verwenden. Je nach Art der Invasion werden unterschiedliche Signalketten in

der Pflanze aktiviert<sup>6</sup>. Dies zeigten die intensiven Studien der vergangenen Jahre mit Blattpathogenen der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Die Salicylsäure (salicylic acid, SA), welche als Signal die systemisch aktivierte Resistenz (SAR) und den programmierten Zelltod vermittelt, ist in der Interaktion mit Biotrophen impliziert. Jasmonsäure (jasmonic acid, JA) und Ethylen hingegen, vermitteln die Abwehr gegen Nekrotrophe. In *Arabidopsis* spielt das Gen *AtNPR1* eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Signalkette, welche zur SAR führt<sup>7</sup>. Gleichzeitig wird dabei die „JA-Signalkette“ unterdrückt<sup>8</sup>. Eine Überexpression von NPR1 führt in *Arabidopsis* zur Resistenz gegenüber zwei biotrophen Pathogenen (*Peronospora parasitica*, ein Pilz und *Pseudomonas syringae*, ein Bakterium). Auch im Reis (*Oryza sativa*) führt Überexpression von *OsNPR1* zur Resistenz der Blätter gegenüber bakteriellen und pilzlichen Pathogenen (*Xanthomonas oryzae*<sup>11</sup> und *Magnaporthe oryzae*).

Weitere wichtige Regulatoren der Abwehrmechanismen, welche in diesem Forschungsprogramm verwendet wurden sind der Transkriptionsfaktor WRKY, der unter anderem NPR1 reguliert, sowie die GTPase OsRac. Überexpression jedes einzelnen dieser Elemente führt zu Resistenz gegenüber Pathogenen<sup>12-17</sup>.

## Ansatz

1. In einem ersten Ansatz, wurden transgene Reislinien mit erhöhter Pathogenresistenz daraufhin untersucht, welchen Effekt die Transgene auf Wurzelinteraktionen haben. Als Pilze wurden der hemibiotrophe Pathogen *Magnaporthe oryzae* und der biotrophe Mykorrhizapilz *Glomus intraradices* gewählt. Der Pathogen wurde ausgewählt, weil er (a) einen vergleichbaren Infektionsmodus wie *Glomus* hat, was einen direkten Vergleich erlaubt und (b) weil er sowohl Wurzeln wie Blätter befällt und sich somit für unsere Fragestellung eignet. Wir verwendeten einen Pilz, der zusätzlich GFP (green fluorescent protein) exprimiert (Linie Guy11<sup>1</sup>), was erlaubt seine Entwicklung unter dem Fluoreszenz-Mikroskop zu verfolgen.

Alle verwendeten Reislinien beeinflussen die Expression der zentralen Abwehr-Regulatoren welche zuvor vorgestellt wurden.

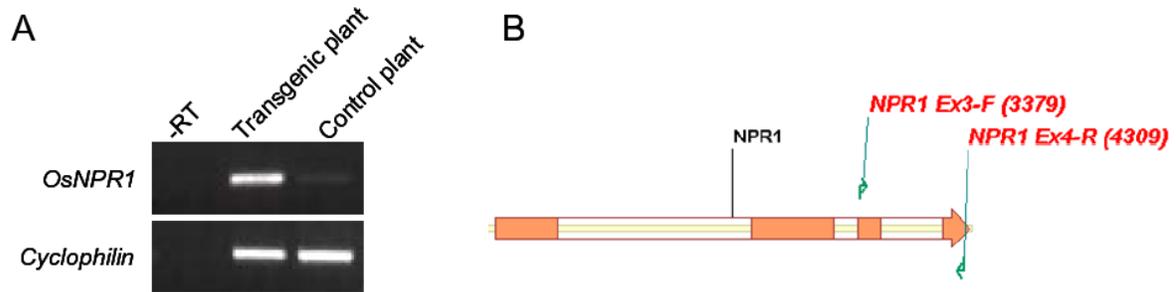
- *OsNPR1*<sup>9</sup>: Linie mit Überexpression des Regulators der SA-vermittelten Antworten
- *OsWRKY71*<sup>15</sup>: Überexpression des Transkriptionsfaktors und
- *OsRac1*<sup>17</sup>, Linie mit konstitutiver Expression aktiver GTPase

Diese Zusammenfassung beschränkt sich auf die Darstellung der Resultate mit *OsNPR1*.

2. Der zweite Ansatz befasst sich mit komplementären Aspekten der Abwehr, wie die Phytoalexin-Produktion oder die zelluläre Dynamik im Zusammenhang mit der biotrophen Interaktion. Dieser Ansatz beinhaltet die Generierung neuer transgener Linien. Detaillierte Reis Expressionsdaten stehen in unserem Labor zur Verfügung<sup>19</sup>. Wir identifizierten Reisgene, welche bei der Kolonisierung von je dem biotrophen *Glomus intraradices*, dem semibiotrophen *Magnaporthe oryzae* und dem nekrotrophen *Fusarium moniliforme* induziert waren. Für weitere Studien, konzentrieren wir uns auf Gene, die bei allen drei Interaktionstypen differenziert exprimiert werden und auf andere, die auf biotrophe und hemi-biotrophe, nicht aber auf necrotrophe Interaktionen reagieren. RNA-Interferenz Linien für fünf Gene und Kombinationen davon wurden generiert. Diese Reislinien werden zurzeit untersucht und die Resultate dieser Studie später vorgestellt.

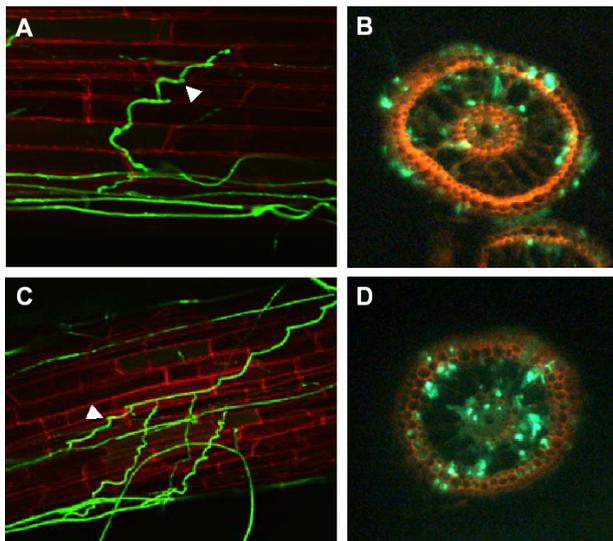
## Resultate

In der Reislinie OsNPR1 wird OsNPR1 auch in Wurzeln exprimiert (Abb. 1)



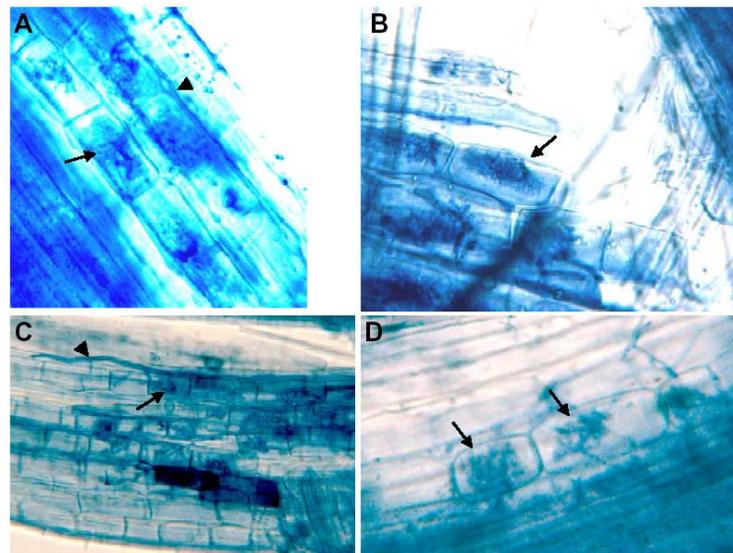
**Abbildung 1:** (A) Expressionsanalyse von *OsNPR1* in der *OsNPR1* Reislinie ("transgenic plant") und in der Kontrolllinie (control plant) mit RT-PCR. Cyclophilin aus Reis wurde als Standard verwendet. (B) Schematische Darstellung des *OsNPR1* Gens und Positionen der PCR Primer (grüne Pfeile). Orange Kästchen sind Exone und leere Kästchen Introne.

Um die Wirkung der Überexpression von *OsNPR1* auf die Anfälligkeit der Reiseswurzel gegenüber *M. oryzae* und *G. intraradices* zu Testen, wurden Wurzeln der überexprimierenden Linie, sowie der Kontrolle mit Konidien von *M. oryzae* oder mit Sporen von *G. Intraradices* inokuliert. Vier Tage nach der Infektion war *M. oryzae* in die äusseren Zellschichten der Wurzeln der Wildtyppflanze und der Vektorkontrolle, erstaunlicherweise aber auch der *OsNPR1* überexprimierenden Pflanzen eingedrungen (Abb. 2). Typisch für biotrophes Wachstum war kein Zelltod zu erkennen. In allen Pflanzen wurden auch 2 bis 3 Wochen nach der Inokulation keine Krankheitssymptome beobachtet. Dies Resultate zeigen, dass obschon die Überexpression von *OsNPR1* zur erhöhten Resistenz in Blättern führt, die Wurzeln dieselbe Anfälligkeit wie der Wildtyp haben.



**Abbildung 2:** Mit *M. oryzae*- infizierte Reisesurzeln im Quer- und Längsschnitt. Die Wurzelzellen sind rot gefärbt. Pilzliche Strukturen sind hellgrün zu erkennen, da es sich um den GFP exprimierenden Stamm Guy11 handelt. Reis Kontrolllinien (A, B) und *OsNPR1*-überexprimierender Reis (C, D) Auf den Bildern ist die Entwicklung des Pilzes in Epidermiszellen nach sechs Tagen in der Kontrolle (A) und in der transgenen Linie (C) zu sehen. Auf den Bildern rechts (nach 12 Tagen) ist ersichtlich, dass der Pilz das Leitgewebe in beiden Pflanzentypen erreicht hat.

Mit *G. intraradices* inokulierte Wurzeln wurden 6-10 Wochen danach gesammelt, präpariert und angefärbt. Die Pilzstrukturen wurden in den Wurzeln qualitativ und quantitativ ausgewertet. Im Wildtyp- sowie in *OsNPR1*-überexprimierenden Wurzeln wurden vergleichbare *G. intraradices* Strukturen gefunden. Es gab keinen Hinweis auf Unterschiede (Abb 3).



**Abbildung 3:** Mit Trypanblau gefärbte Reiwurzeln der Kontrolle (A,B) und der transgenen *OsNPR1* überexprimierenden Pflanzen (C, D). Beide Pflanzen wurden von *G. intraradices* kolonisiert. Pilzliche Strukturen sind dunkelblau zu erkennen: Hyphen im Inneren der Wurzeln (Pfeilspitzen) und Arbuskeln (Pfeile) haben sich in beiden Pflanzen gebildet.

### Schlussbemerkung

Diese Arbeit hat gezeigt, dass eine transgene Reispflanze *OsNPR1* die gegenüber einem Pathogenen (*M. oryzae*) auf den Blättern resistent ist, in den Wurzeln anfällig für denselben Pilzpathogen bleibt. Somit ist Blattresistenz nicht unbedingt gleichzusetzen mit Resistenz der ganzen Pflanze. Gleichzeitig lässt sich die Pflanze durch Mykorrhiza kolonisieren. Die Kolonisierung der Wurzeln mit Mykorrhiza geschieht unabhängig von einer erhöhten Expression von *OsNPR1*.

## Referenzen

- <sup>1</sup> Sesma A. and Osbourn AE. (2004) *Nature* **431**:582-6.
- <sup>2</sup> Paszkowski U. (2006) *Curr Opin Plant Biol* **9**:364-70.
- <sup>3</sup> Stracke S. (2002) *Nature* **417**:959-62.
- <sup>4</sup> Weerasinghe R., Bird D., Allen N. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:3147-52.
- <sup>5</sup> Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. (2005) *Nature* **435**:824-7.
- <sup>6</sup> Glazebrook J. (2005) *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**:205-27.
- <sup>7</sup> Cao H, Li X, Dong X. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:6531-6.
- <sup>8</sup> Spoel SH. et al. (2003) *Plant Cell* **15**:760-70.
- <sup>9</sup> Chern M, Fitzgerald HA, Canlas PE, Navarre DA, Ronald PC. (2005) *MolPlant Microbe Interact.* **18**:511-20.
- <sup>10</sup> Yuan Y et al. (2007) *Plant Biotech J* **5**:313-24.
- <sup>11</sup> Chern M, Canlas PE, Fitzgerald HA, Ronald PC. (2005) *Plant J.* **43**:623-35.
- <sup>12</sup> Eulgem T., Rushton P.J., Robatzek S. and Somssich I.E. (2000) *Trends Plant Sci* **5**:199-206.
- <sup>13</sup> Eulgem T. (2006) *PLoS Pathogens* **2**:e126.
- <sup>14</sup> Yu D., Chen C., Chen Z. (2001) *Plant Cell* **13**:1527-40
- <sup>15</sup> Liu X., Bai X., Wang X. and Chu C. (2007) *J Plant Physiol* **164**:969-79.
- <sup>16</sup> Qiu D. et al. (2007) *Mol Plant Microbe Interact.* **20**:492-99.
- <sup>17</sup> Ono E., Wong H., Kawasaki T., Hasegawa M., Kodama O. and Shimamoto K. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:759-64.
- <sup>18</sup> Kankanala P., Czymbek K., Valent B. (2007) *Plant Cell* **19**:706-24.
- <sup>19</sup> Güimil S. et al. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**:8066-70.
- <sup>20</sup> Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T. (1994) *Plant J* **6**:271-82.

## Kollaborationen

- a) Hiroaki Ichikawa und Seiichi Toki, NIAS, Tsukuba, JAPAN. Konstrukte und Details zur Reistransformation.
- b) Patrick Descombs, Genomics platform, Universität Genf. Expressionsanalysen durch real-time RT-PCR
- c) Ane Sesma, John Innes Centre, Norwich, Great Britain. GFP-Linie Guy11 von *M. oryzae*

### **4.3. Einfluss der Transgenosis auf die Pflanzen-Insekten-Beziehungen im Apfel-System, insbesondere auf chemisch vermittelte Wechselwirkungen**

**Ute Vogler, Anja Rott, Cesare Gessler<sup>1</sup>, Silvia Dorn\***

ETH Zürich, Institut für Pflanzenwissenschaften/ Angewandte Entomologie

<sup>1</sup>Integrative Biologie/ Pflanzenpathologie

\* **Kontakt: [silvia.dorn@ipw.agrl.ethz.ch](mailto:silvia.dorn@ipw.agrl.ethz.ch)**

#### **Vergleichsprüfungen**

Die biologische Beurteilung der Auswirkung von transgenen Pflanzen auf Nicht-Zielorganismen stützt sich in der Regel auf einen einfachen Vergleich, beispielsweise zwischen transgener *Bt*-Pflanze und nicht-transgener Pflanze ohne *Bt*. Wir wählten in der vorliegenden Untersuchung einen neuen Zugang zur biologischen Vergleichsprüfung. Die Basis der Gegenüberstellung bilden eine Ausgangssorte und jeweils eine transgene Linie mit und ohne Zielgen. Ergänzend wurde eine Sorte in den Vergleich einbezogen, bei der das Zielgen natürlich eingekreuzt wurde, das gesamte Genom jedoch verschieden ist.

#### **Gesunde, frische Nahrung und Sortenwahl**

Die Gesellschaft verlangt die Versorgung mit frischen, gesunden Nahrungsmitteln. Um diese Erwartungen zu erfüllen, ist der Pflanzenschutz in den Vordergrund gerückt. Gegenwärtig benötigen Apfelbäume mehr als ein dutzend Behandlungen pro Jahr, selbst unter den ökologischsten Anbauformen, besonders zur Eindämmung von Pflanzenkrankheiten wie der weltweit verbreiteten Schorfkrankheit. Der Wildapfel (*Malus floribunda* 821) besitzt die *Vf* Resistenz, die zu einer erhöhten Widerstandskraft gegen diese Pilzkrankheit führt. Mittels Transgenosis konnte die *Vf* Resistenz auf die anfällige Apfelsorte (*Malus x domestica*) ‘Gala’ übertragen werden (‘Gala-trans*Vf*’). Ebenfalls verfügbar ist eine transgene Sorte ‘Gala-trans0’, die das entsprechende transgene Konstrukt ohne Resistenzgen, jedoch mit Promoter und Selektionsgen besitzt. Die beiden zum Vergleich herbeigezogenen Kultursorten sind die schorfanfällige Sorte ‘Gala’ und die klassisch gezüchtete schorffresistente Sorte ‘Florina’ mit *Vf* Resistenz.

Zusammenfassend wurden folgende Sorten in die Gewächshausversuche einbezogen, um zu gut abgestützten Aussagen zu gelangen:

Bezeichnung	Gala	Gala-trans0	Gala-transVf	Florina
<b>Eigenschaften</b>	<b>Kultursorte</b>	<b>transgen</b>	<b>transgen</b>	<b>Kultursorte</b>
<b>Genotyp</b>	ohne Resistenzgen	mit CaMV 35S RNA Promoter, Selektionsmarker <i>nptII</i> , <u>ohne</u> Resistenzgen “Vektorkontrolle”	mit CaMV 35S RNA Promoter, Selektionsmarker <i>nptII</i> <b>mit Resistenzgen</b> <i>HcrVf2</i>	<b>mit Resistenz Vf</b>
<b>Schorf</b>	Anfällig	Anfällig	Resistent	Resistent

### Aktuelle Forschungsfragen

Zum Einfluss transgener Apfelsorten auf Pflanzen-Insekten-Beziehungen, besonders auf chemisch vermittelte Wechselwirkungen, stehen folgende Forschungsfragen im Vordergrund:

1. Wie beeinflusst die Apfelsorte die **Entwicklungszeit des Apfelblattminierers** (*Phyllonorycter blancardella*)? Der Blattminierer entwickelt sich als Raupe im Inneren des Apfelblatts, was auf der Blattoberfläche als Mine erkenntlich ist. Er ist bei der schorffresistenten transgenen Apfelsorte ein Nicht-Zielorganismus. Die naheliegende Hypothese war damit “kein Unterschied zwischen der schorffresistenten transgenen Sorte ‘Gala-transVf’ und der entsprechenden schorffanfälligen Kultursorte ‘Gala’”.
2. Wie beeinflusst die Apfelsorte den Gehalt am langkettigen Terpen **Squalen auf der Blattoberfläche** bei Blattminierer-befallenen Pflanzen? Dieses sekundäre pflanzliche Stoffwechselprodukt spielt eine zentrale Rolle für einen natürlichen Gegenspieler des Blattminierers, die Schlupfwespe *Pholetesor bicolor*. Dieser Parasitoid ortet den schädlichen Blattminierer, der im Apfelblatt verborgen ist, mittels ganz bestimmter, kritischer Konzentrationen von Squalen auf der Blattoberfläche, wie für die Apfelsorte ‘Golden Delicious’ nachgewiesen wurde. Da auch der Parasitoid bei schorffresistenten transgenen Apfelsorten ein Nicht-Zielorganismus ist, lautet die naheliegende Hypothese erneut “kein Unterschied zwischen der schorffresistenten Sorte ‘Gala-transVf’ und der entsprechenden schorffanfälligen Kultursorte ‘Gala’”.
3. Wie beeinflusst die **Apfelsorte die Emission von Duftstoffen**? Die von gesunden oder Blattminierer-infizierten Apfelsorten freigelassenen Duftstoffe können das Verhalten von Insekten in der Umgebung beeinflussen, und damit wesentlich auf den Gesundheitszustand der Pflanze einwirken. Veränderungen im Duftstoffgemisch können beispielsweise dazu führen, dass Schadinsekten plötzlich angezogen oder Nutzinsekten weggelenkt werden, da diese Nicht-Zielorganismen die chemische Nachricht im Duftstoffgemisch entziffern können. Die naheliegende Hypothese lautet wiederum “kein Unterschied zwischen der schorffresistenten transgenen Sorte ‘Gala-transVf’ und der entsprechenden schorffanfälligen Sorte ‘Gala’”.

## Vergleichende Befunde bei den verschiedenen Apfelsorten

### 1. Entwicklungszeit des Apfelblattminierers und Anzahl geschlüpfter Falter

Die Befunde der biologischen Experimente lassen sich wie folgt zusammenfassen: Der Genotyp beeinflusst die Unterschiede in der Entwicklungsdauer, die aufgrund des phänotypischen Zustands der Pflanze einer natürlichen Variabilität unterworfen ist.

1.1. Der Blattminierer entwickelte sich im vorliegenden Versuch schneller auf der schorffresistenten transgenen Apfelsorte 'Gala-trans $Vf$ ' als auf der entsprechenden Kultursorte 'Gala'. Eine schnelle Entwicklung des Minierers ist ungünstig aus Sicht der Pflanzengesundheit. Einerseits besteht die Gefahr, dass mehr Generationen des Schadinsekts pro Jahr ihren Zyklus vollenden können und der Schaden damit ansteigt; starker Miniererbefall kann zu vorzeitigem Blattfall und Ertragseinbussen bis ins Folgejahr hinein führen. Andererseits wird das Zeitfenster für den Angriff durch natürliche Feinde wie den Raupenparasitoiden *Pholetesor bicolor* enger, was die Gefahr einer verringerten Parasitierung und damit eines grösseren Schadens in sich birgt. Beschränkte man sich auf diesen Vergleich (Sorten 'Gala' und 'Gala-trans $Vf$ '), würde man leicht auf negative Effekte der transgenen Pflanzen schliessen.

1.2. Die klassisch gezüchtete Apfelsorte 'Florina' mit dem gleichen Resistenzgen wie die transgene Sorte 'Gala-trans $Vf$ ' wurde zusätzlich in das Experiment zum Vergleich einbezogen. Die Apfelsorte 'Florina' spielt im Biolandbau eine wichtige Rolle. Bezogen auf diese Apfelsorte ist die Entwicklungsdauer des Minierers auf der transgenen Pflanze 'Gala-trans $Vf$ ' nicht mehr verschieden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die durch das Resistenzgen *Hcr $Vf2$*  vermittelte Resistenz der Apfelpflanze an sich, und nicht die Tatsache einer transgenen Herkunft, für die gemessenen Unterschiede verantwortlich sind. Ein unerwünschter Effekt der transgenen Pflanze 'Gala-trans $Vf$ ' wurde damit nicht festgestellt.

1.3. Vielfach wird auch die Frage aufgeworfen, wie weit das transgenen Konstrukt 'Gala-trans0' mit Marker und Promoter, das heisst ohne das Resistenzgen, die Pflanze mit ihren Eigenschaften verändern könnte. Dieser Genotyp wurde deshalb ebenfalls zum Vergleich ins Experiment einbezogen. Bemerkenswerterweise unterscheidet sich die Entwicklungsdauer des Minierers auf dieser Sorte weder von jener auf der entsprechenden nicht-transgenen Kultursorte 'Gala' noch von jeder der schorffresistenten transgenen Sorte 'Gala-trans $Vf$ '. Ein unerwünschter Effekt der transgenen Sorte 'Gala-trans0' wurde damit nicht festgestellt.

1.4. Die Anzahl der geschlüpften Blattminierer-Falter war innerhalb der Sorten der 'Gala'-Linie nicht unterschiedlich. Dagegen war die Anzahl der geschlüpften Falter bei der Kultursorte 'Florina' tiefer als bei der Kultursorte 'Gala', was erneut auf die Sensibilität des gewählten Systems hinweist.

### 2. Gehalt am Terpen Squalen auf der Blattoberfläche

Die Befunde aus den chemischen Analysen für die verschiedenen Apfelsorten lassen sich wie folgt zusammenfassen:

2.1. Aufgrund der veröffentlichten Untersuchungen mit Sämlingen der Kultursorte 'Golden Delicious' wurde erwartet, dass Extrakte von Blattminierer-befallenen Blättern einen höheren Squalen-Gehalt aufweisen als jene von gesunden Blättern der gleichen Sorte. Dies traf jedoch für

‘Gala-trans $Vf$ ’ nicht zu; der Squalen-Gehalt war vergleichbar. Um dieses Ergebnis korrekt zu interpretieren, müssen weitere Vergleichsexperimente einbezogen werden.

2.2. Die resistente Kultursorte ‘Florina’ wies bei den gesunden Pflanzen einen tiefen Squalene-Gehalt auf, vergleichbar jenem bei ‘Gala-trans $Vf$ ’, bei den Blattminierer-infizierten Pflanzen war der Gehalt jedoch erheblich höher. Damit verhält sich ‘Florina’ wie ‘Golden Delicious’.

2.3. Die Kultursorte ‘Gala’ wies bei gesunden Pflanzen ebenfalls einen tiefen Squalen-Gehalt auf. Allerdings liess sich kein Unterschied im Squalen-Gehalt zwischen gesunden und Blattminierer-infizierten Pflanzen feststellen, was bisher unbekannt war. Auch bei den mitgeprüften Sorten ‘Gala-trans0’ und ‘Gala-trans $Vf$ ’ trat kein Unterschied auf, womit sich die Pflanzen innerhalb der ‘Gala’-Linie gleich verhalten.

### **3. Duftstoffemissionen**

Erste Auswertungen unserer chemischen Analysen weisen auf folgende Befunde hin:

3.1. Unterschiedliche Emissionen zwischen den Genotypen wurden bei den Terpenen (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen, Caryophyllen und Ocimen gemessen. Für das Sesquiterpen (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen ist eine Wirkung auf anfliegende Schadinsekten (Apfelwickler; *Laspeyresia pomonella*) nachgewiesen, die konzentrationsabhängig von Anziehung bis Abstossung reicht, was auf seine verhaltensaktive Rolle hinweist.

3.2. Die Unterschiede der Duftstoffemissionen sind signifikant zwischen den beiden Kultursorten ‘Gala’ und ‘Florina’.

3.3. Punktuelle Unterschiede innerhalb der ‘Gala’-Linie erfordern weitere Analysen. Die Ergebnisse von ‘Gala-trans $Vf$ ’ und ‘Gala-trans0’ liegen konsistent zwischen den Werten für die beiden Kultursorten.

### **4. Folgerung**

Das gewählte System (einschliesslich der Methodik) erlaubt die Messung subtiler Unterschiede zwischen zwei Kulturapfelsorten. Es ist damit ausreichend sensibel und qualifiziert sich für das Monitoring von unerwünschten Nebenwirkungen. Alle gemessenen Werte für die geprüften transgenen Pflanzen liegen im Bereich zwischen den zwei Kultursorten.