

**Gutachten zu neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen
hinsichtlich ökologischer und gesundheitlicher Risiken
seit der EU-rechtlichen Zulassung der gentechnisch
veränderten Maislinie MON810 im Jahr 1998**

**Martha Mertens
Institut für Biodiversität Netzwerk e.V.**

August 2006

erstellt im Auftrag der Bundestagsfraktion Bündnis90/Die Grünen

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung – Empfehlungen	3
2 Einleitung	8
3 Die Maislinie MON810	10
4 Mit dem Anbau von MON810 verknüpfte ökologische Risiken	13
4.1 Bt-Toxin in Pollen und anderem Pflanzenmaterial	15
4.2 Wirkungen von Bt-Toxin-haltigem Pollen	16
4.3 Effekte auf Phytophage	19
4.4 Multitrophe Interaktionen	20
4.5 Wirkungen auf das Bodenleben	24
4.6 Schlussfolgerungen	27
5. Mögliche gesundheitliche Effekte	29
5.1 Konzept der substantiellen Äquivalenz	29
5.2 Toxikologie und Allergologie von MON810	30
5.3 Aufnahme von DNA	32
5.4 Schlussfolgerungen	33
6 Referenzen	34

1 Zusammenfassung – Empfehlungen

Die 1998 erfolgte EU-Zulassung für Import, Verarbeitung und Anbau der gentechnisch veränderten Maislinie MON810 der Firma Monsanto, der zwecks Insektenresistenz ein Gen des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* (Bt) übertragen wurde, basierte auf der damals gültigen Freisetzungsrichtlinie 90/220 EWG beziehungsweise der Novel Food Verordnung (EG) Nr. 258/97. Seit 2001 beziehungsweise 2003 existieren neue EU-Regelungen, die eine umfassendere Prüfung gentechnisch veränderter Organismen (GVO) und der mit ihrer Freisetzung und Marktzulassung einhergehenden gesundheitlichen und ökologischen Risiken sowie deren Beobachtung nach Marktzulassung (Monitoring) verlangen. Die EU-Kommission prüft derzeit die Erneuerung der Zulassung der MON810-Maislinie. Bei der Neubewertung sind die in den letzten Jahren zahlreich erschienenen wissenschaftlichen Arbeiten zu berücksichtigen, die sich mit unerwarteten und unerwünschten Wirkungen von insektenresistentem Bt-Mais auf Nichtzielorganismen befassen. Auch bezüglich möglicher gesundheitlicher Effekte ist die Diskussion nicht abgeschlossen.

Die Maislinie MON810

Die durch Partikelbeschuss erzeugte Maislinie MON810 enthält das für das Cry1Ab Bt-Toxin kodierende cry1Ab Gen, den aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) stammenden 35S Promoter und ein Intron. Weitere auf den Plasmiden vorhandene DNA-Sequenzen (Antibiotikaresistenzgenen und Herbizidresistenzgenen) wurden laut Antragsteller nicht integriert bzw. exprimiert, detaillierte Untersuchungen der Insertionsstelle(n) wurden zum Zeitpunkt der Zulassung nicht vorgelegt. Verschiedene nationale Behörden bemängelten die Qualität der vom Antragsteller vorgelegten und vom EU Scientific Committee on Plants (SCP) akzeptierten molekularen Daten. In Sicherheitsstudien, auf denen die MON810 Zulassung beruht, wurden in der Regel bakteriell produzierte Bt-Toxine eingesetzt. Mögliche Nebeneffekte der gentechnischen Veränderung, die die Wirkung der transgenen Pflanzen auf die Umwelt wie auch die Qualität von daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln beeinflussen können, waren deshalb nicht zu erfassen.

Mit dem Anbau von MON810 verknüpfte ökologische Risiken

Der Anbau von Bt-Mais lässt sich mit dem Einsatz von *Bacillus thuringiensis* Spritzmitteln nur bedingt vergleichen, da Organismen, auf die keine Wirkung beabsichtigt ist (Nichtzielorganismen), dem in gentechnisch verändertem Mais gebildeten Bt-Toxin in veränderter Art und Weise ausgesetzt sind. So wirkt das Bt-Toxin in höheren Dosen und über längere Zeiträume und erfasst mehr Organismen, als wenn das Bt-Präparat gespritzt wird. Auch ist eine spezifische Aktivierung des Toxins nicht erforderlich – deshalb ist eine breitere Wirkung als beim Bt-Präparat denkbar. Das Bt-Toxin wird in unterschiedlichen Mengen in den grünen Pflanzenteilen, aber auch im Pollen und in Wurzeln gebildet. Die Bt-Toxingehalte der Maislinie MON810 schwanken innerhalb der Saison, von Jahr zu Jahr, von Standort zu Standort und von Sorte zu Sorte zum Teil erheblich, auch sind gemessene Toxingehalte nicht selten deutlich höher als die im Zulassungsantrag genannten Werte. Beobachtete Effekte auf Nichtzielorganismen lassen sich nicht in jedem Fall allein durch die Toxinmenge erklären. MON810 Mais hat einen höheren Lignin- und Feuchtigkeitsgehalt und reift später, ob derartige physiologische Veränderungen die Interaktion mit Nichtzielorganismen beeinflussen, ist unbekannt.

Nicht alle im vorliegenden Gutachten zitierten Studien zu Umweltwirkungen von Bt-Mais befassten sich mit der MON810 Maislinie, häufig wurden auch die Maislinien Bt176 und Bt11 verwendet. Doch da alle genannten Maislinien das Cry1Ab Toxin exprimieren, sind anhand der Maislinien Bt176 und Bt11 gewonnene Erkenntnisse über Umweltwirkungen ernst zu nehmende Hinweise auf mögliche vergleichbare Effekte bei der Maislinie MON810. War ersichtlich, dass sich die Studie auf MON810 bezog, wird die Maislinie explizit erwähnt.

Pollen von Bt-Mais wird von zahlreichen Organismen aufgenommen, sei es durch aktives Sammeln oder durch beiläufige Aufnahme von auf dem Futter abgelagerten Pollenkörnern. Nicht nur Larven des Monarchfalters wuchsen signifikant langsamer und starben häufiger, wenn ihre Nahrungspflanzen mit Bt-Maispollen bestäubt waren, sondern auch heimische Schmetterlinge wie der Schwalbenschwanz, das Tagpfauenauge, der Kleine Fuchs, die Kohlmotte und der Kleine Kohlweißling wurden in ihrer Entwicklung beeinträchtigt oder gar getötet. Schmetterlinge reagieren von Art zu Art unterschiedlich gegen das Cry1Ab-Toxin, jüngere Larvenstadien sind dabei generell sensitiver als ältere. Kohlmottenlarven reagieren sogar erheblich empfindlicher als Larven des Zielorganismus Maiszünsler. MON810 Pollen zeigt zwar eine geringere Toxizität als der zumeist getestete Pollen der Maislinie Bt176, doch gibt es durchaus Hinweise auf die Schädigung von Schmetterlingen durch MON810 Pollen, insbesondere, wenn die Larven auch Staubgefäße fressen, die bei MON810 Mais einen bis zu hundertmal höheren Bt-Toxingehalt aufweisen als Pollen. Für gegen Bt-Toxine empfindliche Schmetterlingsarten ist eine Überschneidung der Lebensräume mit Agrarflächen und die Überlappung der Flugzeiten und Eiablage mit der Maisblüte nicht ungewöhnlich. Für die Larven von 26 tag- und 53 nachtaktiven Schmetterlingsarten, darunter auch Arten der roten Liste, besteht deshalb eine hohe Wahrscheinlichkeit, mit Maispollen in Berührung zu kommen. Besonders gefährdet sind Larven des Tagpfauenauges, da ihre Nahrungspflanze Brennessel im Agrarraum weit verbreitet ist. Auch Blätter fressende Schmetterlingslarven können in ihrer Entwicklung gehemmt werden. Daten über das Ausmaß der Gefährdung einzelner Arten in den verschiedenen Regionen fehlen allerdings. Andere Pflanzenfresser, die auf Bt-Mais leben, können das Bt-Toxin ebenfalls aufnehmen, reagieren jedoch nicht unbedingt empfindlich darauf. So zeigen auf Bt-Mais lebende Läuse im Allgemeinen keine Effekte, was mit dem Fehlen des Bt-Toxins im Phloemsaft erklärt wird.

Indirekte Effekte von Bt-Toxinen ergeben sich für parasitisch oder räuberisch lebende Insekten und Spinnen, wenn ihre Beutetiere auf Bt-Mais leben und das Toxin in der Nahrungskette weitergeben oder wenn sie durch die Toxinaufnahme geschwächt und deshalb von minderer Futterqualität sind. Florfliegen, die mit auf Bt-Mais lebender Beute oder Toxinversetzter künstlicher Nahrung gefüttert wurden, zeigten eine signifikant höhere Sterblichkeit. Die beobachteten negativen Effekte sollen dabei nicht Folge direkter Toxizität, sondern eine indirekte Folge der durch Bt-Toxine geschädigten Beute sein. Auch räuberische Marienkäferlarven reagierten empfindlich auf mit Cry1Ab Toxin versetztes Futter. Im Freiland fanden sich keine eindeutigen Belege für eine Schädigung von Raubinsekten durch Bt-Mais, teils ergaben sich Hinweise auf negative, teils auf positive Effekte. Parasitoide, deren Larven sich in Maiszünsler-Raupen oder anderen gegen Bt-Toxine empfindlichen Arten entwickeln, finden im Bt-Maissystem weniger Wirtslarven, die zudem aufgrund der Giftwirkung eine schlechte Qualität aufweisen. Parasitoide reagieren möglicherweise mit verlangsamter Entwicklung, selbst wenn sie keine nennenswerten Bt-Toxinmengen aufnehmen.

Bt-Toxin wird durch Pollen, absterbendes Pflanzenmaterial und Erntereste sowie über die Wurzeln in den Boden eingetragen und von den Wurzeln transgener Maispflanzen ausgeschieden. Dadurch werden, verglichen mit dem Einsatz bakterieller Bt-Präparate,

wesentlich mehr Bodenorganismen, insbesondere Organismen im Wurzelbereich, mit Bt-Toxin konfrontiert, und dies auch noch über längere Zeit. Die eingetragenen Toxinmengen schwanken offenbar je nach Jahr und Standort stark und sind möglicherweise auch vom Wachstumsstadium der Maispflanzen abhängig. Das freigesetzte Toxin adsorbiert und bindet rasch an oberflächenaktive Substanzen wie Lehm und Huminstoffe, wodurch es vor mikrobiellem Abbau besser geschützt wird. Aktivität und Stabilität der Toxine werden unter anderem beeinflusst durch Temperatur, pH-Wert und Feuchtigkeit sowie die Zusammensetzung des Bodens, wobei hoher Lehmanteil zu stärkerer Bindung der Bt-Toxine und zu höherer Persistenz führt. Sieben bis acht Monate nach der Ernte von Bt-Mais wurde Bt-Toxin noch im Boden und in verrottendem Pflanzenmaterial nachgewiesen, im zweiten Anbaujahr lagen die Werte höher als im ersten. Ob der beobachtete langsamere Abbau von Bt-Mais mit dessen erhöhtem Ligningehalt zusammenhängt, ist unklar.

Im Boden nachgewiesenes Cry1Ab Toxin erwies sich als toxisch für Schmetterlingslarven. Bakterien, Pilze und Einzeller sollen im Allgemeinen nicht beeinflusst werden, doch gibt es Hinweise, dass Bt-Mais die Fähigkeit von Mycorrhiza-Pilzen, Wurzeln zu besiedeln, beeinträchtigt. Die Symbiose mit Mycorrhiza-Pilzen ist für Pflanzen von großer Bedeutung, da dadurch Nährstoffe besser zur Verfügung gestellt werden. Gravierende Effekte auf Regenwürmer wurden nicht beobachtet, nach längerer Exposition zeigten Versuchstiere allerdings ein geringeres Gewicht und eine niedrigere Schlüpftrate aus den Eikokons. Bt-Toxin im Boden beeinflusst möglicherweise Reproduktion und Wachstum von Nematoden und das Fraßverhalten von Asseln negativ. Im Freiland wurden bei den von abgestorbenem Pflanzenmaterial lebenden Larven der Trauermücken keine wesentlichen Veränderungen gefunden, im Labor brauchten jedoch mit MON810 Blättern und Pollen gefütterte Trauermückenlarven länger bis zur Verpuppung. Auch räuberische Bodenorganismen sind über ihre Beute den Bt-Toxinen ausgesetzt. So verpuppten sich Käferlarven verzögert beziehungsweise starben häufiger, wenn sie mit auf Bt-Mais gehaltenen Trauermückenlarven respektive Schmetterlingslarven gefüttert wurden. Allesfresser am Boden nehmen Bt-Toxin auf, wie der Nachweis des Cry1Ab Toxins in auf Bt-Maisfeldern gefangenen Laufkäfern belegt. Mit dem Kot der Tiere wird das Bt-Toxin teilweise wieder ausgeschieden, sodass weitere Organismen mit dem Toxin in Berührung kommen.

Mögliche gesundheitliche Effekte

Die Zulassung der Maislinie MON810 basiert auf dem Konzept der substantiellen Äquivalenz, wonach eine gentechnisch veränderte Pflanze beziehungsweise die daraus hergestellten Lebensmittel mit der jeweiligen konventionellen Pflanze und den daraus erzeugten Lebensmitteln gleichwertig sein sollen. Dieses Konzept erfuhr jedoch Kritik, da aus der vergleichenden Analyse ausgewählter Inhaltsstoffe nicht auf die gesundheitliche Unbedenklichkeit gentechnisch veränderter Pflanzen geschlossen werden könne. Mängel im Zulassungsverfahren für MON810 wurden von verschiedenen Autoren festgestellt: Qualität und Umfang der zur allergologischen und toxikologischen Sicherheitsbewertung vorgelegten Daten ließen zu wünschen übrig, zudem wurde das in *Escherichia coli* erzeugte Cry1Ab Protein in Tests verwendet und nicht MON810 Pflanzen beziehungsweise das aus ihnen isolierte Bt-Toxin. Die vom Antragsteller vorgelegten (der Öffentlichkeit zugänglichen) Unterlagen seien nicht geeignet, ein Allergierisiko auszuschließen, zumal bekannt ist, dass bakterielle Bt-Präparate des Stammes *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, aus dem das in MON810 übertragene cry1Ab Gen stammt, sowie das verwandte Cry1Ac Protein zu Immunreaktionen führen können. Das Cry1Ab Protein ist stabiler als angenommen und wird nach der Aufnahme von MON810 Mais nicht sofort und vollständig abgebaut. Es wurde im Magen-

Darmtrakt von Tieren bis hin zum Enddarm nachgewiesen, was bedeutet, dass das Toxin zumindest in Fragmenten auch wieder ausgeschieden werden kann.

Mit der Nahrung aufgenommene DNA kann nicht nur die Darmpassage überstehen, sondern in verschiedene Körperzellen gelangen und zumindest bei Mäusen auch in Zellen neugeborener Nachkommen auftreten. In 4–35wöchigen Fütterungsstudien mit Bt-Mais an Nutztieren wurden Fragmente von in vielen Kopien vorliegenden Maisgenen in Blut-, Darm-, Leber-, Milz- und Nierenzellen, teilweise auch in Muskel-, Ovarien- und Milchzellen beobachtet. cry1Ab Genfragmente fanden sich im Pansen- und Darminhalt von Schafen und Rindern, nicht aber in deren Körperzellen. Ähnliche Ergebnisse wurden nach Fütterung von Schweinen mit Bt-Mais berichtet, bei Ferkeln wurde jedoch ein vergleichsweise großes cry1Ab Genfragment in Blut, Milz, Leber, Niere und in einem Fall in Muskelgewebe nachgewiesen. Ob und gegebenenfalls welche Effekte ein Übertritt pflanzlicher Genfragmente und im speziellen ein Übertritt transgener DNA in Körperzellen des tierischen (und menschlichen) Organismus erzeugen kann, ist nicht bekannt. Einige Autoren weisen darauf hin, dass der im MON810 eingesetzte CaMV 35S Promotor Bereiche aufweist, die eine Rekombination mit anderen DNA-Sequenzen begünstigen. Dieser Promotor ist zudem in tierischen Zellen und menschlichen Darmzellen aktiv und enthält Sequenzmotive, an die sich Transkriptionsfaktoren menschlicher Zellen möglicherweise binden können. Die Sicherheit dieses häufig in transgenen Pflanzen verwendeten Promotors ist deshalb umstritten.

Auf Antrag der Europaabgeordneten Hiltrud Breyer (Bündnis 90/Die Grünen), Zugang zu Daten über molekulare und toxikologische Untersuchungen der Maislinie MON810 (sowie zu anderen gentechnisch veränderten Mais-, Baumwolle- und Zuckerrübenlinien) zu erhalten, wurden von der EU-Kommission im Sommer 2006 entsprechende Unterlagen herausgegeben. Danach wurden 90-tägige Fütterungsstudien an Hähnchen und Ratten durchgeführt, die der Analyse der Autoren zufolge bei den gemessenen Parametern (z. B. Gewicht, Blutwerte, klinische Chemie etc.) keine Unterschiede zwischen mit MON810 Mais gefütterten Tieren und den Kontrollgruppen ergaben. Leider konnte im Rahmen dieses Gutachtens nicht eingehender auf diese Studien eingegangen werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass toxikologische Studien, die über längere Zeit laufen, offenbar nicht durchgeführt wurden und dass beobachtete Unterschiede zwischen MON810 gefütterten Tieren und Kontrolltieren regelmäßig als nicht durch MON810 bedingt bezeichnet wurden, da sie sich im Rahmen der Schwankungsbreite der Kontrollen bewegten, nur sporadisch auftraten oder nicht dosisabhängig seien. Auch seien in ansonsten gesunden Tieren kleine Unterschiede nicht als mit MON810 in Verbindung stehend zu sehen.

Schlussfolgerungen und Empfehlungen

Wie diese Darstellung neuer wissenschaftlicher Arbeiten belegt, sind negative Effekte eines Anbaus der insektenresistenten Bt-Maislinie MON810 auf Nichtzielorganismen und damit auf die Biodiversität zu erwarten, mindestens nicht auszuschließen. Dabei müssen negative Effekte nicht unbedingt sofort sichtbar werden, sondern können auch mit erheblicher zeitlicher Verzögerung eintreten. Obwohl viele der in den vergangenen Jahren durchgeführten Studien nicht dem „worst case“ Szenario entsprachen, das eigentlich erfasst werden sollte, gibt es doch eine Asymmetrie in Richtung negativer Effekte, die nach Lövei & Arpaia (2005) zu zahlreich sind, als dass sie wegdiskutiert werden könnten.

Lebensraum und Lebensweise verschiedener Schmetterlingsarten legen nahe, dass bei einem Anbau von MON810 tatsächlich mit signifikanter Toxin-Exposition und einer Gefährdung der

entsprechenden Populationen zu rechnen ist. Aus der Weitergabe des Cry1Ab Proteins in der Nahrungskette sich ergebende Effekte beispielsweise auf Nützlinge und deren Fähigkeiten, Schadinsekten zu kontrollieren, sind weithin unbekannt. Erschwerend kommt hinzu, dass das Toxin beim kommerziellen Anbau von Bt-Mais über Monate, wenn nicht Jahre vorhanden ist und eine Akkumulation im Boden wahrscheinlich ist. Negative Wirkungen können über die reinen Agrarflächen hinaus reichen, da beispielsweise der Pollen des Windblütlers Mais durch den Wind über größere Entfernungen verbreitet und auf Flora und Böden nicht-agrarischer Flächen abgelagert werden kann. So kann selbst in Schutzgebiete, die ob der Seltenheit und Schutzwürdigkeit der dort vorkommenden Arten von negativen Einwirkungen frei zu halten sind, Bt-Toxin-haltiges Material eingetragen werden. Mobile Insekten können zudem sehr wohl aus Schutzgebieten in Agrarflächen einwandern und dort mit Bt-Toxinen konfrontiert werden. Felke & Langenbruch (2005) schlagen daher vor, zwischen Schutzgebieten mit seltener Lepidopterenfauna und Bt-Maisflächen einen Abstand von einem Kilometer einzuhalten, jedoch fehlen Vorschriften, wonach ein Anbau von MON810 Mais in der Nähe von Schutzgebieten verboten ist.

Die Gefährdung der Artenvielfalt durch den Anbau der MON810 Maislinie kann sich qualitativ und quantitativ regional unterschiedlich ausprägen, da Artenzusammensetzung und Abundanz der potentiell betroffenen Nichtzielorganismen starke regionale Unterschiede aufweisen. Zudem ist selbst innerhalb einer Organismengruppe eine erhebliche artspezifische Variation der Empfindlichkeit gegen Cry1Ab vorhanden. Wie selbst von der EU-Kommission eingeräumt, bestehen innerhalb Europas wesentliche Unterschiede in den regionalen Anbaubedingungen und den Wechselwirkungen zwischen den Kulturpflanzen und der sie jeweils umgebenden Biodiversität. Demzufolge wären vor einer Zulassung von MON810 in der EU eigene Risikoanalysen hinsichtlich der Auswirkungen auf die unterschiedlichen Ökosysteme der EU erforderlich gewesen, diese wurden aber offenbar nicht durchgeführt. Eine Genehmigung auf Basis einzelner US-Studien und von Analogieschlüssen zu erteilen, entsprach nicht korrektem wissenschaftlichem und regulatorischem Vorgehen und widersprach zudem dem von der EU als Grundlage ihrer Gesetzestätigkeit anerkannten Vorsorgeprinzip.

Dies ist umso unverständlicher, als sich die für MON810 postulierten ökonomischen Vorteile bei Zünslerbefall offenbar nur bedingt ergeben und es erprobte alternative nicht-chemische Verfahren der Zünslerkontrolle gibt. Auch die teilweise postulierte Einsparung an Insektiziden und der dadurch zu erzielende wirtschaftliche Vorteil, die mit dem Anbau von Bt-Mais verbunden sein sollen, können die Zulassung nicht rechtfertigen, werden doch in Deutschland nur wenige Prozent der Maisflächen tatsächlich mit Insektiziden behandelt. Neue Daten aus China mit Bt-Baumwolle lassen darüber hinaus vermuten, dass nach völliger Ausschaltung einer Schädlingsart die entstehende ökologische Nische sehr rasch von anderen Schädlingen eingenommen würde. Im Baumwollanbau in China werden deshalb inzwischen etwa gleich große Mengen an Insektiziden wie vor Einführung der Bt-Baumwolle ausgebracht, was angesichts höherer Saatgutpreise für Bt-Baumwolle den vermeintlichen wirtschaftlichen Vorteil in einen Nachteil verkehrt (Pearson 2006).

Die zum Zeitpunkt der Zulassung der Maislinie MON810 geltenden Regelungen, Richtlinie 90/220/EWG und Novel Food Verordnung (EG) Nr. 258/97, schrieben eine Beobachtung nach Marktzulassung (Monitoring) zwar nicht zwingend vor, doch die zwischenzeitlich in Kraft getretene Richtlinie 2001/18/EG verlangt, dass mögliche Effekte von GVO nach Marktzulassung zu beobachten sind, ein Monitoringplan vorgelegt und Monitoringberichte veröffentlicht werden müssen. Bislang gibt es jedoch keine Erkenntnisse, dass ein natur- und umweltschutzfachlichen Anforderungen entsprechendes Monitoring der Maislinie MON810

durchgeführt würde. Obwohl die Maislinie in Spanien seit mehreren Jahren angebaut wird, wurde bislang von Seiten der Firma Monsanto kein Monitoringbericht zu MON810 veröffentlicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Die hier zitierten wissenschaftlichen Studien zur Wirkung von Bt-Mais auf Nichtzielorganismen weisen auf eine Gefährdung der Biodiversität in agrarischen und natürlichen Ökosystemen durch den Anbau der Maislinie MON810 hin. Des Weiteren bestehen offene Fragen zu langfristigen Wirkungen einer Aufnahme von MON810 Mais und daraus hergestellten Produkten auf die tierische und menschliche Gesundheit. Ein Anbau der Maislinie MON810 widerspricht deshalb dem in der EU als Grundlage der Gesetzgebung geltenden Vorsorgeprinzip und ist daher nicht zu rechtfertigen. Die EU-Kommission ist aufgefordert, die Genehmigung für MON810 aufgrund neuer Erkenntnisse über unerwünschte Wirkungen auf die Biodiversität und aus Vorsorgegründen zurückzuziehen, keinesfalls jedoch die Genehmigung im Jahre 2008 zu erneuern. Die Vorlage eines umfassenden Monitoringberichts über den bisher in der EU erfolgten MON810 Anbau ist überfällig. Die Bundesregierung wiederum ist aufgefordert, sich dem Beispiel anderer EU-Staaten anzuschließen und den Anbau dieser Maislinie zu verbieten und zu diesem Zweck Vertrieb und Anbau der in Deutschland zugelassenen MON810 Maissorten ebenfalls zu verbieten.

2 Einleitung

Die gentechnisch veränderte Maislinie MON810 der Firma Monsanto wurde 1998 in der EU mit der Entscheidung der EU-Kommission (98/294/EG) zum Import und zur Verarbeitung zu industriellen Produkten und Lebens- und Futtermitteln zugelassen. Die Französische Regierung genehmigte zum Anbau in Frankreich geeignete MON810 Sorten. Die Zulassung erfolgte auf Basis der damals gültigen Freisetzungsrichtlinie 90/220 EWG bzw. der Novel Food Verordnung (EG) Nr. 258/97. Diese EU Regelungen wurden im Jahr 2001 bzw. 2003 von der Richtlinie 2001/18 EG über die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Organismen (GVO) in die Umwelt bzw. durch die Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebens- und Futtermittel abgelöst, ergänzt durch die Verordnung Nr. 1830/2003 über Rückverfolgbarkeit und Kennzeichnung von GVO und die Rückverfolgbarkeit von Lebens- und Futtermitteln, die aus GVO gewonnen wurden.

Die novellierte Richtlinie 2001/18/EG verschärfte die bislang geltenden Vorschriften für die Freisetzung von GVO in die Umwelt. Sie verankerte das Vorsorgeprinzip und führte eine Reihe von Pflichten ein, wie Umweltverträglichkeitsprüfung vor der Zulassung, Überwachung von Langzeiteffekten nach dem Inverkehrbringen von GVO (Monitoring), Information der Öffentlichkeit über GVO-Standorte, Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit und begrenzte die Produktzulassung auf 10 Jahre. Die Mitgliedsstaaten erhielten auch die Möglichkeit, Maßnahmen zur Sicherung der Koexistenz zwischen GVO-Anbau und konventionellem und biologischem Anbau zu beschließen.

Als ein wesentliches Element der neuen Richtlinie gilt die Umweltverträglichkeitsprüfung, wonach etwaige unerwünschte Wirkungen des/der GVO zu ermitteln und bewerten sind. Dazu zählen direkte, indirekte, unmittelbare und spätere Wirkungen der Freisetzung und des Inverkehrbringens von GVO, wobei alle kumulativen und langfristigen Auswirkungen zu berücksichtigen sind. Auch die potentiellen Risiken der durch GVO hergestellten neuen Genprodukte und eines möglichen Gentransfers sind zu bewerten. Diese Grundsätze wurden in die für die Zulassung von Lebens- und Futtermitteln 2003 neu geschaffene Verordnung Nr.

1829/2003 übernommen. Die neuen Zulassungsverfahren sollten darüber hinaus dem durch die Verordnung (EG) Nr. 178/2002 geschaffenen neuen Rahmen für die Risikobewertung in Fragen der Lebensmittelsicherheit Rechnung tragen. Demnach sollten genetisch veränderte Lebensmittel nur dann für ein Inverkehrbringen in der EU zugelassen werden, „wenn eine den höchstmöglichen Anforderungen standhaltende wissenschaftliche Bewertung aller damit verbundenen Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier bzw. für die Umwelt unter der Verantwortung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit durchgeführt worden ist“ (VO (EG) Nr. 1829/2001, Erwägungsgrund (9)). Die neuen Vorschriften gehen damit erheblich über die Anforderungen nach der alten Richtlinie 90/220/EWG und der Novel Food Verordnung (EG) Nr. 258/97 hinaus und verlangen eine umfassendere Prüfung möglicher gesundheitlicher und ökologischer Risiken, die von Freisetzung und Inverkehrbringen von GVO ausgehen.

Zum Zeitpunkt der Zulassung der Maislinie MON810 war eine Beobachtung von GVO nach Marktzulassung (Monitoring) nicht zwingend vorgeschrieben. Die neue Richtlinie 2001/18/EG verlangt jedoch, Auswirkungen von GVO auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit zu beobachten und zu diesem Zweck einen Monitoringplan zu erstellen. Ziel des Monitoringplans ist es einerseits, zu bestätigen, dass eine in der vorausgehenden Prüfung genannte Annahme über das Auftreten und die Wirkung einer etwaigen schädlichen Auswirkung eines GVO zutrifft und andererseits, das Auftreten solcher schädlicher Auswirkungen des GVO auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt zu ermitteln, die in der Umweltverträglichkeitsprüfung nicht vorhergesehen wurden. Ergänzend zu den Leitlinien zum Monitoring (2002/811/EG), die eine Vielzahl von Details offen lassen, formulierte das Bundesamt für Naturschutz natur- und umweltschutzfachliche Anforderungen an das Monitoring und erarbeitete u. a. Parameter für ein Monitoring von Bt-Mais. Danach sind beispielsweise Auswirkungen auf Bodenfunktionen und Bodenorganismen, auf die terrestrische Wirbellosenfauna, die Wirbeltierfauna sowie auf Gewässerfunktionen und Gewässerorganismen in ein Monitoring von Bt-Mais einzubeziehen (Züghart et al. 2005). Obwohl die MON810 Maislinie seit mehreren Jahren in der EU angebaut wird und die EU-Richtlinie 2001/18/EG seit Herbst 2002 in Kraft ist, gibt es keine Erkenntnisse, dass ein natur- und umweltschutzfachlichen Anforderungen entsprechendes Monitoring der Maislinie MON810 durchgeführt würde. Ein Monitoringbericht zu MON810 wurde von Seiten der Firma Monsanto bislang nicht veröffentlicht.

Insbesondere gentechnisch veränderte Pflanzen, die wie die MON810-Maislinie Toxine des Bodenbakteriums *Bacillus thuringiensis* (Bt) bilden und so eine Insektenresistenz ausprägen, gerieten in den letzten Jahren ins Blickfeld von Wissenschaft und Öffentlichkeit, da es neue Erkenntnisse über mögliche Wirkungen dieser GVO und der von ihnen gebildeten Toxine auf die Umwelt gibt. So verfügte Österreich bereits im Juni 1999 ein nationales Verbot für MON810 mit dem Verweis auf Effekte dieser Maislinie auf so genannte Nichtzielorganismen sowie der möglichen Resistenzentwicklung bei den anvisierten Schadorganismen. Der Vorschlag der EU-Kommission, nationale Verbote für GVO, wie sie auch von anderen Ländern für verschiedene gentechnisch veränderte Pflanzen ausgesprochen wurden, aufzuheben, wurde vom Ministerrat im Juni 2005 mit qualifizierter Mehrheit abgelehnt. Zwischenzeitlich sprachen mit Griechenland, Ungarn und Polen weitere EU-Mitgliedsstaaten nationale Verbote für den Anbau von MON810 aus und die Slowakei untersagte die Vermarktung von GVO-Saatgut für 2006. Dies zeigt, wie umstritten der Anbau der insektenresistenten Maislinie MON810 und gentechnisch veränderter Pflanzen allgemein in Europa ist. Derzeit wird die Erneuerung der 2008 auslaufenden EU-Zulassung von MON810 von der EU-Kommission geprüft. Nach Ansicht des Bundesamts für Verbraucherschutz (BVL) sind gemäß der neuen Regelungen eine genauere Beschreibung der gentechnischen

Veränderung und eine intensivere Umweltrisikoprüfung erforderlich, auch soll ein wesentliches Element des Antrags ein Monitoringplan zur Beobachtung des GVO in der Umwelt sein (www.biosicherheit.de/de/aktuell/509.doku.html). Bei der Neubewertung sind die in den letzten Jahren zahlreich erschienenen wissenschaftlichen Arbeiten zu berücksichtigen, die sich mit unerwarteten und unerwünschten Wirkungen insektenresistenter Bt-Pflanzen auf Nichtzielorganismen und die Biodiversität befassen. Auch hinsichtlich möglicher gesundheitlicher Effekte kann die Diskussion nicht als abgeschlossen gelten.

Im Rahmen des vorliegenden Gutachtens wurden in den vergangenen Jahren erschienene wissenschaftliche Originalarbeiten und Studien zu ökologischen Effekten von Bt-Pflanzen und im speziellen zu Effekten der Maislinie MON810 auf Nichtzielorganismen gesichtet und bewertet. Auch neue Erkenntnisse bezüglich möglicher gesundheitlicher Effekte durch den Verzehr von MON810 Maisprodukten wurden gesammelt. Weitere Aspekte wie eine mögliche Resistenzentwicklung auf Seiten des anvisierten Schädling Maiszünsler konnten im Rahmen dieses Gutachtens leider nicht näher behandelt werden. Nicht näher konnte auch auf die erst auf Antrag der Europaabgeordneten Hiltrud Breyer (Bündnis 90/Die Grünen) von der EU-Kommission erlangten Daten über molekulare und toxikologische Untersuchungen der Maislinie MON810 eingegangen werden, da dies im Rahmen dieses Gutachtens nicht zu leisten war und diese Daten erst vor kurzem zugänglich wurden.

3 Die Maislinie MON810

Die gentechnisch veränderte Maislinie MON810, hergestellt mittels Partikelbombardement mit zwei Plasmiden, weist laut Antragsteller nur Sequenzen eines Plasmids (PVZMBK07) auf (Scientific Committee on Plants 1998). Danach enthält die Linie jeweils eine Kopie des verstärkten 35S Promoters aus dem Blumenkohlmosaikvirus (cauliflower mosaic virus CaMV), des verkürzten cry1Ab Gens und des heatshock protein (hsp) 70 Introns; der im Plasmid vorhandene NOS-Terminator am 3'Ende fehlt. Backbone-Sequenzen des Plasmids sowie das Antibiotikaresistenzgen nptII sollen nicht integriert sein. Die auf dem zweiten Plasmid (PV-ZMGT10) liegenden Gene EPSPS und gox, die unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotor stehen und eine Resistenz gegen den herbiziden Wirkstoff Glyphosat verleihen, sowie das nptII Gen werden nicht exprimiert. Southern Blots (DNA-Nachweis mittels entsprechender Sonden) und Western Blots (Proteinnachweis) wurden als Beleg für die Nicht-Integration bzw. die Nicht-Expression angeführt.

Laut Stellungnahme vom Februar 1998 ging das Scientific Committee on Plants der EU (SCP) auf Basis dieser Daten davon aus, dass die Wahrscheinlichkeit einer Integration signifikanter Fragmente der gox, nptII und EPSPS Gene sowie weiterer im jeweiligen Plasmid vorhandener Sequenzen (plasmid backbone) sehr gering (extremely remote) sei. Weitere Informationen bezüglich der mittels Southern Blot nicht nachweisbaren Genfragmente sollten bereit gestellt werden, doch das Fehlen entsprechender Daten beeinträchtigte nach Aussagen des SCP die generellen Schlussfolgerungen und Meinungen zur Sicherheit der Maislinie MON810 nicht. Auch die Landwirtschaftsbehörde der USA (USDA) hatte im Zusammenhang mit der Deregulierung von MON810 keine DNA-Sequenzanalyse des Transgeninserts und der flankierenden genomischen DNA gefordert (Wilson et al. 2004). Inzwischen wurde berichtet dass die genomische Sequenz am 5'Ende 88 % Übereinstimmung mit dem 22 kD alpha Zein-Gen aufweise (de Schrijver & Moens 2003). Die flankierenden genomischen 3' Sequenzen zeigten diese Übereinstimmung aber nicht, von Hernandez et al. (2003) wurde auch keine signifikante Übereinstimmung mit Datenbank-Sequenzen gefunden.

Es ist bekannt, dass alle Sequenzen eines Plasmids, das zum Partikelbombardement verwendet wird, mit gleich hoher Wahrscheinlichkeit integriert werden (Chen et al. 1998), auch werden Transgenkonstrukte nicht selten in mehreren Kopien und veränderter Form an verschiedenen Stellen des Genoms eingebaut. Genomische Umlagerungen an den Integrationsorten und mit Genomsequenzen durchsetzte Transgensequenzen wurden beobachtet (Smith et al. 2001, Svitashv et al. 2000, 2002, Wilson et al. 2004). Vor der Zulassung von MON810 wurde aber offenbar nicht analysiert, ob und in welchem Umfang Umlagerungen genomischer Sequenzen am Integrationsort erfolgten. Es wurde auch nicht zweifelsfrei gezeigt, dass die Transgensequenzen tatsächlich in nur einer Kopie vorlagen, Sequenzen des zweiten Plasmids sowie des Plasmid-Backbones aber nicht integriert wurden. Nach einem Bericht von Hernandez et al. (2003) legen Sequenzdaten und PCR-Analyse der MON810 Maislinie jedoch nahe, dass die Insertion des Transgenkonstrukts zu genomischen Veränderungen führte. Die Tatsache, dass das cry1Ab Gen einen Teil der 3' Sequenzen offenbar verloren hat und die identifizierte genomische 3' Sequenz keine der genomischen 5' Sequenz vergleichbare Homologie zur 22 kD alpha Zein-Sequenz zeigt, weist den Autoren zufolge auf genomische Umlagerungen des ursprünglichen Integrationsortes hin.

Schon die „simple“ Integration einer auf das unbedingt notwendige Maß begrenzten Transgensequenz kann Positionseffekte bedingen, d. h. der Einbau transgener Sequenzen verändert die Aktivität benachbarter pflanzlicher Gene. Ein etwaiger Einbau überflüssiger DNA-Sequenzen und mit der Integration einhergehende genomische Umlagerungen erhöhen aber die genetische Instabilität und die Wahrscheinlichkeit für Positionseffekte und die Inaktivierung/Aktivierung endogener Gene der transgenen Pflanzen. Smith et al. forderten deshalb bereits 2001, die transformierten Linien, insbesondere wenn sie in den Verkehr gebracht werden sollen, eingehender zu untersuchen.

Offenbar wurden auch von anderer Seite umfassendere Daten gefordert. So zeigte sich das britische Advisory Committee on Releases to the Environment (ACRE 2003) in seiner Sitzung vom Mai 2003 „enttäuscht“ über die Qualität der vom Antragsteller vorgelegten Daten zu MON810. Es seien keine schlüssigen Beweise vorgelegt worden für die Abwesenheit von Vektor-Backbone-Sequenzen (zumal die Transformation zwei Plasmide betraf) und dafür, dass Teile der integrierten Sequenzen nicht anderswo im Genom vorhanden seien, außerdem sei die Kopienzahl nicht zweifelsfrei festgestellt worden. Die Risikoabschätzung für MON810 sollte im Sinne eines „worst case“ Szenarios überarbeitet werden, wobei zu berücksichtigen sei, dass es sich beim in der EU verkauften Material um die F2-Generation handle, bei der eine Rekombination nicht ausgeschlossen sei und nicht um die F1-Generation, auf die der Antragsteller sich bezog. Kritik äußerte auch das belgische Biosafety Advisory Council und forderte nähere Analysen hinsichtlich möglicher offener Leseramen in den benachbarten Sequenzen (de Schrijver & Moens 2003). Die vorgelegten molekularen Daten über die MON810 Maislinie waren ganz offensichtlich ungenügend, die Zulassung hätte auf dieser Basis nicht erteilt werden dürfen.

In den Folgejahren reichte Monsanto weitere Unterlagen zu MON810 Mais nach, die einige der angesprochenen Aspekte aufgreifen und belegen sollen, dass die flankierenden genomischen Sequenzen Maissequenzen darstellen, die offenbar teilweise sogar Sequenzen aus den Mitochondrien (Zellorganellen) umfassen. Die Europaabgeordnete Hiltrud Breyer (Bündnis 90/Die Grünen) hatte im April 2006 die Veröffentlichung dieser Unterlagen von der EU-Kommission erfolgreich eingefordert.

Neben Positionseffekten können in transgenen Pflanzen auch pleiotrope Effekte auftreten, d.h. die neuen Genprodukte greifen in unerwarteter Weise in den pflanzlichen Stoffwechsel ein

und erzeugen im Wechselspiel mit anderen Genen bzw. Genprodukten Effekte an anderer unerwünschter, zumindest unerwarteter Stelle. Hierfür gibt es zahlreiche Beispiele (s. Studie von Wilson et al. 2004). Darüber hinaus bricht sich die Erkenntnis Bahn, dass das einfache, der gentechnischen Veränderung zugrunde liegende Modell, wonach ein Gen unabhängig vom Ort der Integration und vom Organismus, in den es übertragen wurde, die gleiche Funktion ausübt, überholt ist. Unstrittig ist, dass die Steuerungsprozesse, die in höheren Organismen wie Pflanzen stattfinden, sehr viel komplexer sind als gerne angenommen und somit über der genetischen Sequenz liegenden Steuerungsebene, der epigenetischen Ebene, eine wesentlich größere Rolle zukommt, ohne dass diese Prozesse im einzelnen verstanden wären (Moch 2006). Die Unsicherheit bzgl. des Ergebnisses einer Transformation und die Nichtvorhersagbarkeit von Nebeneffekten werden so entscheidend erhöht. So können beispielsweise für die Interaktion mit der Umwelt wichtige Eigenschaften der Pflanzen beeinflusst werden und zu Veränderungen führen, die über das angestrebte Ziel - hier eine Resistenz gegen den Schädling Maiszünsler – hinausgehen. Ob der um bis zu 28 % erhöhte Ligningehalt der MON810 Maisstängel und das veränderte Verhältnis der Ligninbausteine (Poerschmann et al. 2005, Stotzky 2000, Saxena & Stotzky 2001a), Veränderungen des Stickstoffhaushalts (Ma & Subedi 2005) oder die langsamere Entwicklung von Bt-Mais (Lang et al. 2005) mit derartigen Prozessen zu tun haben, ist unbekannt.

Positionseffekte und pleiotrope Effekte beeinflussen möglicherweise auch die Qualität und Sicherheit von aus gentechnisch veränderten Pflanzen hergestellten Lebens- und Futtermitteln. Die beliebte und im Falle des MON810 Mais geübte Praxis, bei Untersuchungen zur Wirkung von Bt-Pflanzen auf die Umwelt und die menschliche und tierische Gesundheit vornehmlich Bt-Toxine, die aus Bakterien gewonnen wurden, zu verwenden, entspricht deshalb nicht den EU Vorgaben, wonach bei der Genehmigung von genetisch veränderten Lebens- und Futtermitteln „eine höchstmöglichen Anforderungen standhaltende wissenschaftliche Bewertung aller damit verbundenen Risiken für die Gesundheit von Mensch und Tier bzw. für die Umwelt“ Voraussetzung ist (VO (EG) Nr. 1829/2001, Erwägungsgrund (9)). Das in MON810 Mais gebildete Cry1Ab Toxin ist, verglichen mit dem bakteriellen Toxin, erheblich verkürzt (91 statt 131 kD), auch strukturelle Veränderungen des Proteins sind nicht ausgeschlossen. Der Einsatz bakteriell produzierter Bt-Toxine kann deshalb allenfalls als erster Hinweis auf toxische Effekte und als Kontrolle dienen. Untersuchungen müssen sich auf jeden Fall auf die gentechnisch veränderten MON810 Maispflanzen selbst bzw. auf aus ihnen gewonnene Produkte beziehen – nur so werden etwaige veränderte Eigenschaften des Toxins, dessen unterschiedliche Expression sowie durch Positionseffekte und pleiotrope Effekte bedingte Veränderungen des pflanzlichen Stoffwechsels und pflanzlicher Inhaltsstoffe mit erfasst.

Auch der verwendete 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV 35S), der eine zusätzliche Verstärkersequenz (Enhancer) enthält und die Expression des cry1A(b) Gens kontrolliert, ist in die Kritik geraten. Er enthält Sequenzen, die die Rekombination mit anderen DNA-Sequenzen erleichtern, was wiederum genetische Instabilität und horizontalen Gentransfer begünstigen könnte (Cummins et al. 2000). Vor kurzem wurde gezeigt, dass der CaMV 35S Promotor auch in kultivierten menschlichen Darmzellen aktiv ist (Myhre et al. 2006). Der Promotor gilt allgemein als konstitutiv, d. h. als in allen (grünen) Pflanzenzellen unabhängig von äußeren Einflüssen aktiv. Seine Aktivität wird jedoch auch durch Temperatur und Tageslänge und teilweise durch die kodierenden Gensequenzen beeinflusst (Brinker 1999, Schnurr & Guerra 2000). Dies wiederum kann zu schwankender Expression des Cry1Ab-Toxins führen. Wieweit die berichteten unterschiedlichen Bt-Toxin-Konzentrationen in verschiedenen Sorten von MON810 (Felke & Langenbruch 2005, Lang et al. 2005) mit schwankender Promotoraktivität in Verbindung stehen, ist unklar. Wieweit die Tatsache, dass

der CaMV 35S Promotor nur mit einer Teilsequenz integriert wurde (abzuleiten aus den von Hiltrud Breyer MdEP von der EU-Kommission eingeforderten Unterlagen zu MON810), die Promotoraktivität beeinflusst, ist ebenfalls unklar. Brinker (1999) forderte, vor einer Freisetzung transgener Pflanzen detaillierte Analysen zur Expression der Transgene und angrenzender Sequenzen über mehrere Generationen durchzuführen. Erst recht sollte dies vor einem Inverkehrbringen erfolgen. Das SCP (1998) scheint allerdings auf derartigen Analysen nicht bestanden zu haben.

4 Mit dem Anbau von MON810 verknüpfte ökologische Risiken

Zur Abwehr des Schädling Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) enthält die MON810 Maislinie das aus dem Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Bt) stammende cry1Ab Gen, allerdings verkürzt und in einer an die pflanzliche Kodonnutzung angepassten Sequenz, das zur Bildung des Cry1Ab-Toxins in der Pflanze führt. So hat das native Cry1Ab Protein ein Molekulargewicht von 131 kD, wohingegen das in der Pflanze gebildete Protein nur ein Molekulargewicht von 91 kD aufweist (www.agbios.com/dbase.php). Cry1Ab aus *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* gilt als spezifisch wirksam gegen Schmetterlinge (Lepidopteren). Gegründet auf der langjährigen Erfahrung mit *Bacillus thuringiensis*-Präparaten wurde postuliert, dass Bt-Pflanzen vergleichsweise sichere und effiziente Wege zur Schädlingsbekämpfung seien. Doch die Nutzung von Bt-Präparaten unterscheidet sich von der Bildung von Bt-Toxinen in Pflanzen in einer Reihe von Aspekten.

Von Insekten aufgenommene bakterielle Bt-Toxinkristalle müssen, um ihre Wirkung zu entfalten, im Insektendarm gelöst und durch spezifische Proteasen gespalten werden. Die so aktivierten Toxine binden an Rezeptoren der Darmzellen und führen über die Bildung von Poren zum Absterben der Darmzellen und damit zum Tod der betreffenden Insekten. Die An- oder Abwesenheit spezifischer Proteasen und Rezeptoren im Insektendarm scheint für die Spezifität der Toxinwirkung von großer Bedeutung zu sein (Hilder & Boulter 1999, de Maagd et al. 2001, Schmitz & Schütte 2001, Groot & Dicke 2002). Im Gegensatz dazu ist das im MON810 gebildete Cry1Ab Toxin bereits aktiviert, bedarf zur Wirkung also nicht einer spezifischen Spaltung – und kann so möglicherweise breiter wirken als ein ausgebrachtes Bt-Präparat. Für die potentielle Wirkung der Bt-Toxine auf Organismen, deren Bekämpfung nicht Ziel der gentechnischen Veränderung ist, sog. Nichtzielorganismen, dürfte dieser Mechanismus von großer Bedeutung sein. Zudem sind aufgrund der stark unterschiedlichen Benetzung der Pflanzenoberflächen bei einer Spritzung und bedingt durch den raschen Abbau der ausgebrachten Wirkstoffe unter Feldbedingungen sowohl Ziel- als auch Nichtzielorganismen den bakteriellen Bt-Toxinen nur verhältnismäßig kurze Zeit ausgesetzt.

In transgenen Pflanzen hingegen werden Bt-Toxine während der gesamten Vegetationsperiode und in (fast) allen Pflanzenteilen gebildet. So wurde geschätzt, dass der Anbau von MON810 Mais eine um das 1 500 – 2000 fach höhere Dosis an Cry1Ab Toxin pro Hektar bedeutet, verglichen mit einer einmaligen Anwendung von DIPEL, einem Bt-Präparat (Szekacs et al. 2005). Die Exposition von Nichtzielorganismen gegen Bt-Toxine verändert sich erheblich, da die Toxine in wesentlich höheren Dosen und über längere Zeiträume wirken können und zudem Organismen erfasst werden, die sich bevorzugt auf der (von einer Spritzung nicht betroffenen) Blattunterseite oder auf dem Boden aufhalten. Auch

Pollensammler und Insekten, die eher zufällig Pollen aufnehmen, sind den in Pollen gebildeten Bt-Toxinen ausgesetzt. Schließlich gelangen erhebliche Mengen an Bt-Toxinen über Pflanzenmaterial und Wurzelausscheidungen in den Boden, wo sie Wirkungen entfalten können, die bislang schwer abschätzbar sind.

Die Toxizität der in Pflanzen gebildeten Bt-Proteine kann darüber hinaus durch Interaktion mit pflanzlichen Inhaltsstoffen, Abwehrstoffen gegen Schädlingen und Proteasen oder durch Umweltstress und physiologische Veränderungen im Verlauf der Pflanzenentwicklung verändert werden, wie am Beispiel Bt-Baumwolle gezeigt wurde (Olsen & Daly 2000). Ob und wie weit die Allokation pflanzlicher Ressourcen in Richtung Toxinproduktion den für die natürlichen Abwehrmechanismen wichtigen Sekundärstoffwechsel der Pflanzen verändert, ist unbekannt (Knols & Dicke 2003). Auch die EU-Kommission (2005) verweist in ihrer Antwort an das Panel im WTO-Streitverfahren darauf, dass pflanzliche Inhaltsstoffe, die bei Interaktionen mit Nichtzielorganismen eine Rolle spielen, in Bt-Pflanzen verändert sein können. Die Toxizität von Bt-Toxinen wird so möglicherweise beeinflusst, zumal bei der komplexen Futterzusammensetzung von Herbivoren nicht vorhersehbare toxikologische Wechselwirkungen auftreten können.

Da der Toxingehalt in Bt-Mais mit dem Stickstoffgehalt der Pflanzen korreliert zu sein scheint (Bruns & Abel 2003), könnte die Stickstoffversorgung der Pflanzen ebenfalls von Bedeutung sein. Laut Ma & Subedi (2005) reifen die Bt-Maislinien MON810 und Bt11 (Syngenta) im Vergleich zu ihren Ausgangslinien später und haben einen höheren Feuchtigkeitsgehalt und weisen tendenziell einen niedrigeren Stickstoffgehalt und geringeren Ertrag auf, was in der landwirtschaftlichen Praxis dazu führen könnte, dass vermehrt Stickstoff ausgebracht wird. Wie weit diese beobachteten physiologischen Veränderungen sowie die beschriebenen erhöhten Ligningehalte in Bt-Mais (Poerschmann et al. 2005, Stotzky 2000, Saxena & Stotzky 2001a) die Interaktion mit Nichtzielorganismen beeinflussen, scheint nicht bekannt. Generell schwanken die Bt-Toxin Konzentrationen offenbar innerhalb einer Saison, von Jahr zu Jahr, von Standort zu Standort und von Sorte zu Sorte erheblich (Lang et al. 2005). So lagen in Deutschland beim Anbau von MON810 die Toxinmengen an einem Standort um bis zu 49 % über denen des anderen untersuchten Standorts (www.biosicherheit.de/de/sicherheitsforschung/31.doku.html). Hieraus ist abzuleiten, dass Studien mit bakteriell produzierten Bt-Toxinen die Situation in Bt-Pflanzen nicht abbilden und bestenfalls erste Hinweise liefern können, keinesfalls aber Aussagen über gesundheitliche und ökologische Wirkungen der Bt-Toxin exprimierenden Pflanzen selbst erlauben.

Ungeklärt ist bislang, was mit den von Nichtzielorganismen aufgenommenen Bt-Toxinen passiert. In Zielorganismen binden die Toxine an Rezeptoren der Mitteldarmzellen, infolgedessen sie strukturell verändert werden und vermutlich (einen Teil) ihre(r) Toxizität für die natürlichen Feinde der Zielorganismen verlieren (de Maagd et al. 2001, Groot & Dicke 2002). In Nichtzielorganismen jedoch binden die Toxine nicht (oder schlechter) an Mitteldarmrezeptoren oder führen nicht zur Bildung von Poren. Sie werden vielleicht im Darmtrakt mancher Nichtzielorganismen durch Proteasen gespalten, im Darmtrakt anderer Organismen wiederum nicht – so können sie aktiv bleiben und sich in der Folge auf ihre Fressfeinde auswirken. Groot & Dicke (2002) schließen daraus, dass räuberische Arthropoden mit von Zielorganismen aufgenommenen Bt-Toxinen eher nicht in Berührung kommen, wohl aber mit den von Nichtzielorganismen aufgenommenen Toxinen.

Zahlreiche in den letzten Jahren erschienene Studien und Übersichtsartikel zeigen, dass Wirkungen transgener Bt-Maispflanzen auf Nichtzielorganismen möglich sind und Bt-Toxine

in unterschiedlichen Organismen nachgewiesen werden, wobei Höhe, Route und Dauer der Exposition sehr unterschiedlich sein können (Andow & Zwahlen 2006, Dolezel et al. 2006, Greenpeace 2006, Lövei & Arpaia 2005, Clark et al. 2005, Lang et al. 2005, Felke und Langenbruch 2005, Groot & Dicke 2002, Obrycki et al. 2001, Schmitz & Schütte 2001, Hütter et al. 2000, Hilbeck et al. 2000, Schuler et al. 1999). Nicht alle der im Rahmen dieses Gutachtens zitierten Studien zu Effekten auf Nichtzielorganismen von Bt-Mais befassten sich mit der MON810 Maislinie, häufig wurden auch die Maislinien Bt176 und Bt11 verwendet. Doch da alle genannten Maislinien das Cry1Ab Toxin exprimieren, sind anhand der Maislinien Bt176 und Bt11 gewonnene Erkenntnisse über Umweltwirkungen ernst zu nehmende Hinweise auf mögliche vergleichbare Effekte bei der Maislinie MON810. War ersichtlich, dass sich die Studie auf MON810 Mais bezog, wird die Maislinie explizit genannt.

Im Vordergrund der meisten Studien standen Fragen der Wirkung von Bt-Toxin-haltigem Pflanzenmaterial auf Schmetterlinge und andere pflanzenfressende Insekten (Phytophagen) sowie der Weitergabe von Bt-Toxinen in der Nahrungskette an räuberische Organismen. Teilweise beschäftigten sich die Arbeiten auch mit Effekten auf das Bodenleben, die als Folge des Eintrags von Bt-Toxinen in den Boden auftreten können. Eine Neubewertung der SCP-Stellungnahme (1998) zur MON810 Maislinie, dass für Nichtziel-Phytophagen kein Risiko zu erkennen und das im Mais gebildete Cry1Ab Protein identisch mit dem in bakteriellen Formulierungen vorhandenen Bt-Toxin sei, ist diesen Studien zufolge angezeigt.

Effekte auf Nichtzielorganismen durch den Anbau von Bt-Mais können sich auch unabhängig von einer toxischen Wirkung einstellen. So kann sich die starke Reduktion der Maiszünslerpopulationen auf Organismen auswirken, die vom Maiszünsler leben, wie etwa Vögel, die gerade die Zeit nach der Ernte nutzen, um die auf dem Feld verbliebenen Zünslerlarven aufzunehmen. Vogelarten wie Grauammer, Goldammer, Kiebitz, Goldregenpfeifer, Feldlerche und Rotschulterstärling wurden in diesem Zusammenhang genannt (Schorling 2005).

4.1 Bt-Toxin in Pollen und anderem Pflanzenmaterial

Der die Expression des cry1A(b) Gens steuernde CaMV 35S Promotor führt zur Bildung des Bt-Toxins in allen grünen Pflanzenteilen, einschließlich der Staubgefäße (Antheren). In der MON810 Maislinie werden im Allgemeinen höhere Toxinmengen als in der Bt176 Maislinie gebildet, letzter weist Toxinwerte im grünen Pflanzengewebe und Pollen im Bereich von etwa 1 – 5 µg/g Frischgewicht auf (SCP 1999, Lang et al. 2005). Laut SCP (1999) werden in vegetativem (grünem) Maisgewebe von MON810 zwischen 4,5 und 9,2 µg Bt-Toxin pro g Frischgewicht gebildet. Andere Autoren nannten Bt-Toxinwerte von 10,3 µg/g bis zu 13,53 µg/g im Blattgewebe (Clark et al. 2005, Griffiths et al. 2006) und 0,19 – 0,39 µg/g Samen (Clark et al. 2005). Toxinwerte für Pollen sollen zwischen 0,09 µg/g und 0,25 µg/g Pollen variieren (SCP 1999, Lang et al. 2005). Wraight et al. (2000) fanden jedoch einen Wert von 2,125 +/- 0,3 µg/g Pollen, was dem 24 fachen der vom SCP (1998) angegebenen Toxinmenge (0,09 µg/g) im Pollen entspricht. Von Nguyen et al. (2002) wurden sogar Toxinwerte von 0,32 – 6,6 µg/g Pollen einzelner MON810 Pflanzen genannt, wobei allerdings unklar blieb, ob Antherenmaterial mit enthalten war. In den Wurzeln fanden Nguyen et al. einen Wert von 4,2 µg/g Frischgewicht.

Nahezu 84 % des in der Pflanze gebildeten Cry1Ab Toxins befindet sich nach Szekacs et al. (2005) in den Blättern. Stengel, Samen, Wurzeln und die Maisfahnen enthalten jeweils 8 %, 4

%, 3 % und 1 % der Toxinmenge. Abel & Adamczyk (2004) fanden in MON810 Blättern deutlich unterschiedliche Toxinwerte, je nachdem um welches Blatt und welchen Blattbereich es sich handelte und ob es ein gelbes oder grünes Blatt war: in Blattspitzen und grünen Blättern wurden allgemein höhere Werte gemessen. Laut Griffiths et al. (2006) zeigen Blätter reifer Stadien einen höheren Toxingehalt, der sogar bis zu sechs mal höher als der von Blättern im Fünfblattstadium sein kann. Dolezel et al. (2006) zitieren weitere Arbeiten, wonach die Bt-Toxingehalte mit dem Alter der MON810 Pflanzen und den Anbaubedingungen (offenes und geschlossenes Gewächshaus, Freiland) variieren, höhere Temperaturen könnten danach die cry1Ab Expression reduzieren, außerdem bildeten jüngere Pflanzen weniger Bt-Toxin. Leider wurden die Bt-Toxinwerte der Pflanzen nur in wenigen ökotoxikologischen Studien näher analysiert bzw. angegeben, beobachtete Effekte können deshalb nur bedingt in Beziehung zur Toxin-Dosis gesetzt werden. Clark et al. (2005) empfahlen denn auch, Daten über saisonal, klimatisch und stressbedingt schwankende Toxinwerte zu sammeln. Da offenbar auch sortenbedingt deutlich unterschiedliche Werte beobachtet werden (Felke & Langenbruch 2005, Lang et al. 2005), dürften die verschiedenen MON810 Sorten nicht ohne entsprechende Untersuchungen zugelassen werden. Griffiths et al. (2006) fanden zudem Hinweise auf Wechselwirkungen zwischen der Bt-Expression und einer Insektizidbehandlung, da mit dem Pyrethroid Decis behandelte MON810 Pflanzen signifikant höhere Bt-Konzentrationen in den Blättern aufwiesen.

4.2 Wirkungen von Bt-Toxin-haltigem Pollen

Pollen sammelnde und fressende Insekten können in Pollen vorhandene Bt-Toxine aufnehmen. Solche Nichtzielorganismen müssen nicht unbedingt direkt geschädigt werden, auch subletale Effekte sind denkbar. So zeigten mit Bt-Pollen gefütterte Bienen eine höhere Empfindlichkeit gegen Parasiten als Bienen, die mit konventionellem Maispollen gefüttert wurden, was sich in geringerer Zahl von Jungbienen bemerkbar machte (www.biosicherheit.de/de/sicherheitsforschung/68.doku.html). Eine Wechselwirkung zwischen Bt-Toxin und Pathogen auf den Darmepithelzellen scheint nicht ausgeschlossen. Gesunde Bienen sollen jedoch nicht geschädigt werden. Nach Aussage von Imkern gibt es aber kaum noch gesunde Bienen, außerdem sammeln Bienen Maispollen gezielt und lagern ihn zur Aufzucht der Jungbienen ein. Auch viele als Räuber bekannte Insekten (Prädatoren) fressen gelegentlich Pollen, den sie als zusätzliche Energiequelle oder für die Ei-Produktion nutzen (Groot & Dicke 2002). Von manchen Prädatoren leben wohl die Larven räuberisch, die adulten Tiere ernähren sich aber (auch) von Pflanzenmaterial wie etwa Pollen, z. B. die Florfliege (Pilcher et al. 2005). Auch Spinnen kommen mit Bt-Toxin-haltigem Pollen in Kontakt, sei es über an ihrer Beute haftende Pollenkörner oder über Pollen, der sich in ihren Netzen verfängt und den sie mit dem Netz bei dessen Erneuerung auffressen. Radnetze im Maisfeld wiesen beispielsweise bis zu 7.130 Pollenkörner auf, in 10 m Abstand zum Feld noch bis zu 1.644 Körner (www.biosicherheit.de/de/sicherheitsforschung/16.doku.html). In ersten Studien mit jungen Radnetzspinnen (*Araneus diadematus*) fanden sich allerdings keine Effekte von Bt-Pollen auf Gewicht, Überlebensfähigkeit, Reaktionszeit und Netzeigenschaften (Ludy & Lang 2006).

Nicht nur Insekten, die direkt Pollen sammeln oder fressen, sind Bt-Toxinen in Maispollen ausgesetzt, sondern auch Insekten, die über ihre Futterpflanzen Maispollen aufnehmen. Maispollen wird in erheblichem Maße auf der Wildkrautflora inner- und außerhalb der Maisflächen abgelagert. Bei Versuchen fanden sich innerhalb eines Feldes Pollendichten von unter 100 bis zu 1.400 Pollenkörnern/cm² (Felke & Langenbruch 2005, Pleasants et al. 2001).

Lang et al. (2005) berichteten über Werte von bis zu 429 Körnern/cm²/24 Stunden am Feldrand. Mit steigender Entfernung zum Feldrand sinkt die Pollendichte, so wurden in Abständen von 10 m und 32 m bis zu 93 bzw. 34 Pollen/cm² gemessen (Lang et al. 2005, Felke & Langenbruch 2005, www.biosicherheit.de/de/sicherheitsforschung/136.doku.html). Bei der wilden Möhre, bevorzugter Futterpflanze von Schwalbenschwanzlarven, fanden sich im Mittel 31,6 % und im Extrem 63,5 % des am Feldrand innerhalb von 24 Stunden eingetragenen Maispollens auf den Blättern (Lang et al. 2005). Wird Pollen nicht durch Regen abgewaschen, kann sich während der mehrere Tage dauernden Maisblüte Pollen zu hohen Dichten akkumulieren (Pleasant et al. 2001), zusätzlich abhängig von Wuchsform, Pflanzenhöhe und Oberflächenbeschaffenheit der Futterpflanzen. Darüber hinaus können Bruchstücke der MON810 Staubblätter, deren Bt-Toxinkonzentration verglichen mit Pollen mehr als 10 - 100fach höher ist (Darvas et al. 2005, Felke & Langenbruch 2005), auf Futterpflanzen landen. Die Anwesenheit von (Bt-Mais) Pollen beeinflusste das Eiablageverhalten von Weibchen der Kohlmotte und das Fraßverhalten der Larven nicht, sodass von der Aufnahme von Bt-Maispollen durch Schmetterlinge auszugehen ist (Felke & Langenbruch 2005).

In Laborversuchen wurde gezeigt, dass Larven diverser Schmetterlingsarten empfindlich auf Bt-Toxin-haltigen Pollen reagieren, den sie mit ihrer Futterpflanze aufnehmen. Larven des in den USA verbreiteten Monarchfalters (*Danaus plexippus*) wuchsen signifikant langsamer und zeigten erhöhte Mortalität, wenn die Seidenpflanze, ihre Nahrungspflanze, mit Bt-Maispollen bestäubt war (Losey et al. 1999). Nach dieser ersten, breite Aufmerksamkeit erregenden Studie wurden weitere Arbeiten publiziert, in denen der Wirkung von Pollen verschiedener Bt-Maislinien auf Larven vor allem des Monarchfalters, aber auch weiterer Schmetterlingsarten nachgegangen wurde (Jesse & Obrycki 2001, Hellmich et al. 2001, Stanley-Horn et al. 2001, Zangerl et al. 2001, Dively et al. 2004, Lang et al. 2005, Felke & Langenbruch 2005). Zwar wurde in den meisten Fällen Pollen der Maislinie Bt176 verwendet, die, bedingt durch einen anderen Promotor, mehr Bt-Toxin im Pollen bildet, doch auch die Bt-Linien MON810 und Bt11 kamen zum Einsatz (in letzterer steht das cry1A(b) Gen ebenfalls unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors). Larven unterscheiden in der Regel nicht zwischen Blättern mit Toxin-haltigem Pollen oder konventionellem Pollen.

Neben dem in den USA sehr populären Monarchfalter werden auch Larven anderer Schmetterlingsarten durch Bt-Toxine in ihrer Entwicklung gestört oder sogar getötet, wobei generell jüngere Larvenstadien empfindlicher sind als ältere. Selbst nah verwandte Arten reagieren häufig sehr unterschiedlich gegen Cry1Ab in Bt-Mais. Beispiele empfindlicher Arten sind der Schwalbenschwanz (*Papilio polyxenes* und *Papilio machaon*), das Tagpfauenauge (*Inachis io*), der Kleine Fuchs (*Aglais urticae*), die Kohlmotte (*Plutella xylostella*) und der Kleine Kohlweißling (*Pieris rapae*) (Zangerl et al. 2001, Lang et al. 2005, Felke & Langenbruch 2005, Lang & Vojtech 2006, www.biosicherheit.de/de/sicherheitsforschung/136.doku.html).

In den von Felke & Langenbruch (2005) mit Bt176 Pollen durchgeführten Fütterungstests reagierten Kohlmotten- und Schwalbenschwanzlarven sogar empfindlicher als die Larven des Schädling Maiszünsler: Für das 4. Larvenstadium der Kohlmotte bzw. das 1. Stadium des Schwalbenschwanzes wurde ein LD₅₀ Wert (Dosis, bei der 50 % der Tiere sterben) von nur 8 bzw. 13,7 Pollenkörnern ermittelt, während die LD₅₀ für das 2. Larvenstadium von *O. nubilalis* 32 Pollenkörner beträgt. Bereits ab einer Dosis von 4 Pollenkörnern ergaben sich signifikante Unterschiede in der Mortalität der Kohlmottenlarven, der LD₅₀ Wert für das normalerweise empfindlichste 1. Larvenstadium der Kohlmotte wurde allerdings nicht genannt. Frühe Larvenstadien von Kleinem Kohlweißling, Kleinem Fuchs und

Tagpfauenauge zeigten eine dem Maiszünsler vergleichbare Empfindlichkeit, länger währende Exposition verstärkte die Effekte. Als ziemlich unempfindlich erwiesen sich Larven des Großen Kohlweißlings (*Pieris brassicae*) und der Wintersaateule (*Agrotis segetum*).

Selbst kleine Pollenmengen führten bei sensitiven Larven zu subletalen Effekten, wie etwa einer verzögerten Entwicklung, verspäteter Verpuppung und Falterschlupf sowie geringerem Gewicht, Effekte, die noch in 10 m Entfernung zu Maisfeldern auftreten können. Frischer und 3 Wochen alter Bt176 Pollen war für die Larven der Kohlmotte gleich toxisch (Felke & Langenbruch 2005). Da sich die ermittelten LD₅₀ Werte auf die angebotene und nicht auf die aufgenommene Pollenmenge beziehen – die Larven fraßen häufig nur einen Teil der mit Bt176 Pollen besprühten Blätter – liegen die tatsächlichen LD₅₀ Werte sogar noch niedriger. Außerdem wurde teilweise eingefrorener Pollen verwendet, für frischen Pollen, wie er im Freiland zu erwarten ist, sind die LD₅₀ Werte zusätzlich nach unten zu korrigieren. Unter Berücksichtigung der LD₅₀, der im Freiland erreichten Pollendichten und eines Sicherheitsfaktors von 100 errechneten die Autoren etwa 32 Meter als Abstand zu Bt-Maisflächen, bei dem negative Effekte auf empfindliche Arten wie die Kohlmotte (bzw. Tagpfauenauge und Kleiner Fuchs) nicht auszuschließen sind. Neugeschlüpfte Larven sehr empfindlicher Arten werden möglicherweise bis zur Entfernung von 50 Metern von Bt176-Flächen zumindest subletal geschädigt.

Für Pollen der Maislinie MON810 wurde eine geringere akute Toxizität beobachtet, erklärt durch die, verglichen mit Bt176, üblicherweise niedrigeren Bt-Toxingehalte. So waren in Laborversuchen Nahrungsaufnahme und Mortalität der Kohlmotte nach Verfütterung von 80 Pollen an 4. Larvalstadien unverändert (Felke & Langenbruch 2005), subletale Effekte wurden dabei nicht untersucht. Doch vermag offenbar auch MON810 Pollen die Entwicklung von Schmetterlingslarven zu beeinträchtigen, besonders nach längerer währender Exposition, wie sie im Freiland zu erwarten ist. So überlebten in einem mehrtägigen Fütterungsversuch etwa ein Viertel weniger Monarchlarven, wenn ihre Nahrungspflanzen natürliche (d.h. im Feld erreichte) MON810-Pollendichten von ca. 120 – 180 Körnern/cm² aufwiesen (Dively et al. 2004). Die Larvalentwicklung dauerte knapp 2 Tage länger, außerdem waren die Puppen kleiner und die adulten Tiere hatten ein um etwa 8 % geringeres Gewicht als die Kontrolltiere. MON810 zeigte dabei stärkere toxische Effekte als die ebenfalls untersuchte Maislinie Bt11. Laut Darvas et al. (2005) ist das erste Larvenstadium des Tagpfauenauges (*Inachis io*) besonders empfindlich gegen MON810 Pollen. Toxische Effekte werden deutlich verschärft, wenn auch Teile der Staubgefäße, die bei der MON810 Maislinie 10 – 100fach höhere Bt-Toxingehalte als Pollen aufweisen, auf Nahrungspflanzen abgelagert und von den Larven aufgenommen werden (Anderson et al. 2004, Felke & Langenbruch 2005). Gemeinsame Ablagerungen von MON810 Pollen und Antheren auf Futterpflanzen von Monarchlarven in Mengen, wie sie natürlicherweise in Maisfeldern vorkommen, scheinen eine additive Wirkung zu entfalten. Waren die Tiere in mehrtägigen Laborstudien dieser Kombination ausgesetzt, dauerte ihre Entwicklung signifikant länger und die Puppen waren leichter, als wenn sie Bt-Pollen oder Bt-Antheren allein, bzw. der Kombination nicht-Bt-Pollen/Antheren auf ihren Futterpflanzen ausgesetzt waren (Anderson et al. 2005). Möglicherweise spielten dabei auch Verhaltensanpassungen der Larven eine Rolle sowie der unterschiedliche Geschmack der Blätter.

Lang et al. (2005) verwiesen darauf, dass Untersuchungen im Labor die reale Situation im Freiland nicht abbilden, da die Larven im Freiland zahlreichen Stressoren wie widrigen Klimabedingungen, Nahrungsknappheit, Infektionen und Räubern ausgesetzt sind, was die Anfälligkeit für Bt-Toxine erhöhen könnte. Geschwächte und sich langsamer entwickelnde Larven sind zudem leichtere Beute für räuberische Insekten und für Vögel. Bei

Freilandversuchen spielt aber auch die Größe der Untersuchungsflächen eine entscheidende Rolle, da mobile Nichtzielinsekten sich nicht notwendigerweise auf eine der zu testenden Flächen beschränken und sich zwischen den Bt- und nicht-Bt-Flächen bewegen. Basierend auf den Erfahrungen mit Effekten einer Insektizidbehandlung empfehlen Prasifka et al. (2005) deshalb, kleine Untersuchungsflächen (Breite < 9 m) zu vermeiden.

Kartierungen in Bayern ergaben, dass in der Agrarlandschaft zahlreiche Schmetterlingsarten vorkommen, auch solche, die sich als empfindlich gegen Bt-Toxine erwiesen. So lagen 47 % der Funde des Schwalbenschwanzes (*Papilio machaon*) in landwirtschaftlich beeinflussten Flächen, auch für andere Schmetterlinge ist eine Überschneidung der Lebensräume mit landwirtschaftlichen Flächen gegeben und eine Überlappung von Flugzeiten und Eiablage mit der Maisblüte zu beobachten (Lang et al. 2005). Laut Felke & Langenbruch (2005) besteht für die Larven von 26 tag- und 53 nachtaktiven Schmetterlingsarten aufgrund von Phänologie und Habitatpräferenzen eine hohe Expositionswahrscheinlichkeit für Maispollen. Davon stehen 30 auf der roten Liste in mindestens einem Bundesland und 6 gelten als gefährdet (z. B. Perlmuttfalter (*Issoria lathonia*), Wachtelweizen-Scheckenfalter (*Mellicta athalia*) und Schwalbenschwanz (*Papilio machaon*). Untersuchungen in Ungarn lassen eine besondere Gefährdung von Tagpfauenaugen-Populationen vermuten, die an Maisfeldrändern mit MON810 Pollen auf der Brennessel (*Urtica dioica*), ihrer Nahrungspflanze, in Kontakt kommen können (Darvas et al. 2005). Aufnahme von Bt-Pollen kann demnach zum Tod von bis zu 20 % der Junglarven und zu einer leicht verzögerten Entwicklung der überlebenden Population führen. Da keine Daten über Langzeiteffekte von Bt-Mais auf Schmetterlingspopulationen vorliegen und bislang nicht untersuchte Schmetterlingsarten noch wesentlich empfindlicher reagieren könnten als die Kohlmotte, schlagen Felke & Langenbruch (2005) vor, zwischen Schutzgebieten mit seltener Lepidopterenfauna und Bt-Maisflächen einen Abstand von einem Kilometer einzuhalten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass MON810 Maispollen auf Nahrungspflanzen heimischer Schmetterlinge in- und außerhalb der Maisflächen abgelagert wird und dies über mehrere Tage und in einer Höhe, die zumindest für empfindliche Schmetterlingsarten zu subletalen Effekten führen kann. Heimische und teilweise gefährdete Schmetterlinge kommen in der Agrarlandschaft vor und sind somit den in Bt-Maispollen vorhandenen Toxinen ausgesetzt. Auch subletale Effekte können die Artenzahl und Abundanz heimischer Schmetterlinge beeinträchtigen. Bislang wurden nur wenige Arten näher untersucht, deshalb fehlen Erkenntnisse über das Ausmaß der Gefährdung einzelner Arten in den verschiedenen Landschaftsräumen. Da Maispollen durch den Wind auch über größere Entfernungen verbreitet wird, sind nicht nur in und neben Maisfeldern vorkommende Schmetterlinge potentiell betroffen, sondern auch Arten, die ihren Lebensraum in benachbarten Schutzgebieten haben. Die Gefährdung der Artenvielfalt durch den Anbau der Maislinie MON810 ist deshalb zu befürchten. Diese Gefährdung kann in den einzelnen EU-Regionen unterschiedlich stark ausgeprägt sein, da die einzelnen Schmetterlingsarten regional unterschiedliche Vorkommen aufweisen und zudem die Empfindlichkeit von Schmetterlingen gegen das Cry1Ab Toxin offenbar artspezifisch variiert.

4.3 Effekte auf Phytophage

Pflanzenfresser (Phytophagen) wie Spinnmilben, Thripse und Heuschrecken oder bestimmte Käferarten sind ebenfalls Bt-Toxinen ausgesetzt. Abhängig davon, welche Pflanzenteile sie bevorzugen und wie alt die Pflanzen sind, können sie unterschiedlich viel Bt-Toxin

aufnehmen, da sich die Cry1Ab Werte in verschiedenen Maisgeweben (Abel & Adamczyk 2004) und zwischen jungen und älteren Pflanzen (Dolezel et al. 2006, Griffiths et al. 2006) unterscheiden. Die Spinnmilbe (*Tetranychus urticae*) scheint Cry1Ab Toxin akkumulieren zu können, ohne selbst unter toxischer Wirkung zu leiden (Dutton et al. 2002, Dolezel et al. 2006). Auch wenn auf Spinnmilben spezialisierte Marienkäfer (*Stethorus punctillum*) das Toxin möglicherweise aufnehmen, waren deren Mortalität und Entwicklungszeit nach Verfütterung von auf MON810 lebenden Spinnmilben nicht signifikant verändert (Schmidt & Hilbeck 2005). Thripse und Zikaden können als Zellsaftsauger ebenfalls Bt-Toxin aufnehmen (Eckert et al. 2006), Thripse scheiden das Bt-Toxin auch aus, reagieren aber nicht empfindlich (Dolezel et al. 2006). Innerhalb fünfjähriger Untersuchungen waren Thripse zum Zeitpunkt der Blüte generell häufiger auf konventionellen Maisflächen als auf MON810-Flächen zu finden, in zwei Jahren war der Unterschied signifikant (Schorling 2005).

Andere blattfressende Insekten, die Cry1Ab aus Bt-Maispflanzen aufnehmen, sind etwa Larven von Nichtzielschmetterlingen wie *Spodoptera littoralis*, die dadurch in ihrer Entwicklung beeinträchtigt werden (Vojtech et al. 2005). Im Vergleich zu Kontrolltieren überlebte weniger als die Hälfte der ersten Larvenstadien dieser Art die ersten drei Tage der Fütterung mit MON810 Mais, ältere (überlebende) mit MON810 gefütterte Larvenstadien wogen signifikant weniger. Die unterschiedlichen Cry1Ab Gehalte in Maisblättern führten auch zu unterschiedlichen Toxingehalten in Prozessionsspinnern (Abel & Adamczyk 2004). Ob Bt-Mais zu Effekten auf Zikaden (*Cicadina*) führt, ist bislang unklar (Dolezel et al. 2006). Daly & Buntin (2005) fanden, gemittelt über 2 Jahre und 2 Standorte, in MON810 Maisflächen weniger Milben (*Acaridae*) und Schmuckfliegenlarven (*Otitidae*), für die nicht vom Zünsler befallener Mais weniger attraktiv sein könnte, aber mehr Blattkäfer (*Chrysomelidae*), waren sich jedoch nicht sicher, ob dies möglicherweise Effekte der Probenahme sein könnten. Insgesamt beobachteten sie keine signifikanten Effekte auf Phytophagen im Bt-Mais. Neuere Untersuchungen im Feld belegen jedoch, dass auf Bt-Maisflächen vorkommende Phytophagen wie etwa verschiedene Käfer erhebliche Mengen an Cry1Ab Protein aufnehmen (Harwood et al. 2005).

4.4 Multitrophe Interaktionen

Nichtzielorganismen von Bt-Maispflanzen sind auch solche, die nicht direkt Pflanzenteile des MON810 Mais aufnehmen, sondern als Nützlinge mit Bt-Toxinen indirekt über ihre Beute in Berührung kommen. Räuberische Insekten (Carnivoren) oder Parasitoide, die beispielsweise ihre Eier in Schmetterlingslarven ablegen, in denen sich dann die Nachkommen entwickeln, können über ihre Nahrung Bt-Toxine aufnehmen, wenn ihre Beutetiere auf Bt-Maispflanzen leben. Indirekte Effekte treten auch auf, wenn die Beutetiere aufgrund der Schädigung durch Bt-Toxine von minderer Qualität sind. Kranke, im Wachstum verzögerte oder verendende Tiere sind keine optimale Futterquelle, sodass die Entwicklung der Carnivoren und Parasitoide verlangsamt oder gestoppt wird. Spinnen, wichtige Nützlinge, können nicht nur über in den Netzen gefangenen Pollen, sondern auch über ihre Beutetiere mit Bt-Toxinen konfrontiert werden. Seit Ende der neunziger Jahre erschienen verschiedene Publikationen über derartige tritrophe oder multitrophe Interaktionen (vergl. Reviews von Dolezel et al. 2006, Romeis et al. 2006, Lövei & Arpaia 2006).

In Fütterungsversuchen mit der Florfliege (*Chrysoperla carnea*), deren Beutetiere auf Bt-Mais lebten, zeigten die räuberischen Florfliegenlarven eine signifikant höhere Sterblichkeit. Dies galt sowohl für die Beute Maiszünsler, der als Zielorganismus durch Bt-Toxine bekanntermaßen geschädigt wird, wie auch für die gegen Bt-Toxine unempfindlichere Beute

Spodoptera littoralis (Hilbeck et al. 1998a). Inzwischen wurde allerdings gezeigt, dass auch *Spodoptera littoralis* nicht gänzlich unempfindlich ist gegen Cry1Ab, sondern in Langzeitversuchen mit verlangsamter Entwicklung und geringerem Gewicht auf die Fütterung mit MON810 Maismaterial reagiert (Vojtech et al. 2005). Für Florfliegen erwies sich auch mit dem Bt-Toxin Cry1Ab versetzte künstliche Nahrung (100 µg/ml) als schädlich (Hilbeck et al. 1998b), was auf eine direkte Toxizität hinweisen könnte. In Wahlversuchen mit *Spodoptera littoralis* Larven, die entweder auf Bt-Mais oder auf nicht-Bt-Mais gezogen wurden, zeigten die Florfliegenlarven eine Präferenz für nicht-Bt-Mais-gefütterte Larven (Meier & Hilbeck 2001).

Wurden Florfliegenlarven mit der auf Bt-Mais gehaltenen Milbe *Tetranychus urticae* gefüttert, zeigten sie im Gegensatz zu mit *S. littoralis* gefütterten Larven keine erhöhte Sterblichkeit und verzögerte Entwicklung, obwohl die Milben laut ELISA-Test (enzyme linked immuno sorbent assay) höhere Cry1Ab Werte aufwiesen als *S. littoralis* (Dutton et al. 2002). Nach Romeis et al. (2004, 2006) ist die beobachtete Schädigung der Florfliegen nach Verzehr von auf Bt-Mais gezogenen *S. littoralis* Larven nicht durch direkte Toxizität bedingt, sondern als indirekter Effekt infolge geschädigter Beute zu sehen. Warum der Verzehr einer Beute (Milben) mit dreifach höherem Toxingehalt keine negativen Auswirkungen auf Florfliegen zeigte, wurde damit erklärt, dass Milben Cry1Ab zwar aufnehmen würden, das Toxin mangels passender Rezeptoren in ihrem Darmepithel aber wirkungslos bleibe und auch die Florfliege möglicherweise keine entsprechenden Rezeptoren für das Toxin besitze. Dutton et al. (2002) schränkten allerdings ein, dass der auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion beruhende ELISA-Test keine direkte Aussage über die Toxizität von Cry1Ab erlaube.

Werden auf Bt-Mais lebende Läuse an räuberische Insekten verfüttert, zeigen sich regelmäßig keine Effekte auf die Carnivoren, was mit dem Fehlen des Bt-Toxins im von den Läusen gesaugten Phloemsaft erklärt wird (Bourguet et al. 2002, Raps et al. 2001). Da Florfliegen, falls sie die Wahl haben, bevorzugt Läuse fressen, mag ihre Bt-Toxinaufnahme insgesamt begrenzt sein; sollten Florfliegen wie im Wahlversuch beobachtet, zudem mit Bt-Mais gefütterte Beute vermeiden, könnten sie durch Verhaltensanpassung ihre Bt-Toxinaufnahme weiter reduzieren (Romeis et al. 2006, Dolezel et al. 2006). Verschiedentlich wird diskutiert, ob die wiederholt beobachtete verzögerte Entwicklung und das spätere Abreifen von MON810 Mais einen Einfluss auf die Blattlauszahlen ausübt, dergestalt, dass Pflanzen, die länger grün sind, Blättläusen länger die Möglichkeit zur Aufnahme von Phloemsaft bieten (Schorling 2005, Lang et al. 2005). Allerdings lassen sich die von den Autoren berichteten niedrigeren Blattlauszahlen in MON810 so nicht erklären, vielmehr besteht nach Lang et al. (2005) die Möglichkeit, dass die Nahrungsqualität für Blattläuse wenn nicht durch das Cry1Ab Protein, dann durch pleiotrope Effekte vermindert sein könnte.

In ihrem Feldversuch an MON810 Standorten fanden Bourguet et al. (2002) zwar starke saisonale Schwankungen der Individuenzahl von Läusen, der Florfliege und einzelner Wanzen-, Schwebfliegen- und Marienkäferarten, jedoch keine signifikanten Effekte im Vergleich zur Kontrolle. Allerdings bezog sich der Versuch nur auf ein Jahr, fand nur an zwei Standorten statt und hatte Versuchsflächen, deren Größe (10 x 90 m) die von Prasifka et al. (2005) geforderte Mindestbreite von >9 m gerade eben überschritt. Umfangreichere Untersuchungen wurden von Pilcher et al. (2005) beschrieben, die über drei Jahre (1996 – 1998) an drei Standorten mit breiteren Versuchsflächen (18 x 30 m) Bt176 und Bt11 Maislinien testeten, die sie zu unterschiedlichen Zeiten pflanzten. Der unterschiedliche Entwicklungsstand der Maispflanzen zeigte ausgeprägte Effekte auf die Abundanz von Marienkäfern, räuberischen Wanzen und Florfliegen, signifikante Unterschiede zwischen Bt-Mais- und Kontrollflächen fanden sie jedoch nicht.

In dreijährigen Freilandstudien an fünf Untersuchungsflächen (30 x 50 m) ergaben sich Hinweise auf negative Wirkungen der Bt-Maispflanzen (MON810 und Bt176) auf Blattlausräuber (Florfliegen, Marienkäfer und Schwebfliegen), Wanzen und Spinnen, wobei die Effekte von Jahr zu Jahr teilweise erheblich variierten, in Einzelfällen fanden sich auch positive Effekte (Lang et al. 2005). Wie weit der ungewöhnlich heiße und trockene Sommer 2003 seinerseits die Ergebnisse beeinflusste, blieb offen. Auch Schorling (2005) fand in fünfjährigen Untersuchungen auf Bt-Maisflächen von 5 – 17 ha zu den meisten Boniturterminen weniger Blattlausräuber und Prädatoren als in der konventionellen Bt-Variante, Wanzen waren mal mehr, mal weniger zu finden. Die spezielle Arthropodengemeinschaft in MON810 Maiskolben unterschied sich nach Eckert et al. (2006) nicht signifikant von der der Kontrolle. Effekte auf einzelne Wanzenarten durch den Anbau von MON810 Mais wurden auch aus den USA berichtet, Sichelwanzen (*Nabis spp.*) fanden sich seltener in Bt-Maisflächen, während sich für andere Wanzenarten, Marienkäfer und Spinnen keine signifikanten Unterschiede ergaben (Daly & Buntin 2005). Indiz für die Weitergabe des Toxins an Prädatoren ist auch der Nachweis signifikanter Mengen von Bt-Toxin in auf Bt-Maisflächen gefangenen Wanzen, Marienkäfern und Spinnen (Harwood et al. 2005, Dolezel et al. 2006). Zumindest unter Laborbedingungen reagierten Larven des Zweipunkt-Marienkäfers (*Adalia bipunctata*) empfindlich und zeigten eine erhöhte Sterblichkeit, wenn sie mit Cry1Ab Protein besprühte Mehlmotteneier fraßen; die Aufnahme von Eiern, die mit dem als käferspezifisch geltenden Cry3Bb Toxin besprüht waren, führte überraschenderweise zu geringeren Effekten (Schmidt et al. 2004, Schmidt & Hilbeck 2005). Tritrophe Interaktionen zwischen MON810 Mais, der Spinnmilbe *Tetranychus urticae* und einer anderen Marienkäferart (*Stethorus punctillum*) veränderten die Mortalität der Käfer hingegen nicht wesentlich (Schmidt et al. 2004). Ähnliches galt auch für tritrophe Interaktionen zwischen Bt-Mais, einer gegen Cry1Ab nicht sensitiven Thrips-Art (*Anaphothrips obscurus*) und der räuberischen Wanze *Orius majusculus* (Zwahlen et al. 2000).

Da die Bt-Toxingehalte in den Maispflanzen offenbar stark schwanken, können auch direkte toxische und indirekte Effekte auf Nichtzielorganismen entsprechend variieren, über korrelierende Untersuchungen zur Expressionshöhe des Bt-Toxins in MON810 (bzw. Bt176) wurde allerdings kaum berichtet. Der Einfluss der Insektizidbehandlung auf Parallelfeldern war in der Regel ausgeprägter als der durch Bt-Mais (Lang et al. 2005). Dieser Vergleich hinkt jedoch, da in Deutschland nur 2 % der Maisfläche mit Insektiziden behandelt werden (Langenbruch et al. 2006). Bei breitem Anbau von Bt-Mais sind Nichtzielorganismen wie Phytophage und ihre Räuber durchaus signifikanten Mengen von Bt-Toxinen ausgesetzt (Harwood et al. 2005), langfristig wirkende Effekte, die sehr wohl artspezifisch sein können, sind derzeit nicht abschätzbar. Eine substantielle Reduzierung von räuberischen Käfern, Wanzen und Spinnen, besonders verbreiteten Raubarthropoden, könnte jedoch durchaus Folgen für das Agrarökosystem und die biologische Kontrolle von Schädlingen haben

Parasitoide, deren Larven sich in Maiszünsler-Raupen oder anderen gegen Bt-Toxine empfindlichen Arten entwickeln, sind durch den Anbau von Bt-Mais gefährdet. Zum einen verringert sich ihr Wirtsangebot, was sich, wie Feldbeobachtungen nach Insektizideinsatz und Modellierungen zeigen, regional negativ auf die Populationsgröße der Parasitoide auswirkt (Sisterson & Tabashnik 2005). Dies wird besonders dann deutlich, wenn Parasitoide Spezialisten sind und ihr Entwicklungszyklus synchronisiert ist mit der Entwicklung der Zünsler (Pilcher et al. 2005). Betroffen sind Parasitoide aber auch durch Wirte, die Bt-Toxine in letalen oder subletalen Dosen aufgenommen haben und sich deshalb langsamer entwickeln oder kleiner bleiben und so indirekt die Entwicklung der Parasitoide beeinträchtigen. Die

Verfütterung von MON810 und Bt176 Pollen an adulte *Trichogramma* Schlupfwespen scheint dabei keinen Einfluss auf Eiablage sowie Lebensdauer auszuüben (www.biosicherheit.de/de/sicherheitsforschung/15.doku.html).

Die von pflanzenfressenden Insekten aus Bt-Mais aufgenommenen Bt-Toxine gehen offenbar nicht nennenswert auf Parasitoide über (Vojtech et al. 2005). Bourguet et al. (2002) beschrieben jedoch für Bt176 negative Effekte auf Parasitoide und neuere Untersuchungen zeigten eine signifikant verringerte Überlebensfähigkeit, längere Entwicklungsdauer und geringere Kokongewichte der parasitischen Brackwespe *Cotesia marginiventris*, wenn ihre Wirtslarven *Spodoptera littoralis* auf MON810 Mais gehalten worden waren (Vojtech et al. 2005). Puppen und adulte Parasitoide mit geringerem Gewicht weisen tendenziell eine verringerte Fitness auf, die sich in geringerer Fruchtbarkeit, kürzerer Lebensdauer und geringerer Aktivität äußern kann (Dolezel et al. 2006). Direkte oder indirekte Bt-Toxin-Effekte können sich möglicherweise sogar in die nächste trophische Ebene der Hyperparasitoide, die ihrerseits Parasitoide parasitieren, erstrecken. In Laborstudien führte dies zu verringerter Frequenz und geringerem Erfolg der Parasitierung von *Cotesia flavipes* (Parasitoid des Maisschädling *Chilo partellus*) durch den Hyperparasitoid *Tetrastichus howardi* sowie zu weniger und leichteren Nachkommen von *T. howardi* (Prütz et al. 2004). Eine geringere Wirtsqualität könnte sogar das Geschlechterverhältnis von Hautflüglern beeinflussen, da in kleinere Wirtslarven vermehrt männliche Eier abgelegt werden (Schuler et al. 1999). Ein verändertes Geschlechterverhältnis wurde in den genannten Studien von Vojtech et al. (2005) mit MON810 Mais, *Spodoptera littoralis* und dem Parasitoid *Cotesia marginiventris* beobachtet, allerdings war der Effekt gegenläufig, da aus den auf Bt-Mais gezogenen – wesentlich kleineren - Schmetterlingslarven 47 % männliche Parasitoide schlüpften, wohingegen aus den Kontrolltieren 61 % Männchen schlüpften.

Auch andere komplexe tritrophe Interaktionen könnten beeinflusst werden, beispielsweise das Wechselspiel zwischen Pflanze, Phytophage und Parasitoid, denn zahlreiche Pflanzen geben nach einer Schädlingsattacke flüchtige Substanzen (z. B. Indol und Terpenoide) ab, durch die Parasitoide zur Eiablage angelockt werden. Eine verringerte Emission solcher Geruchsstoffe infolge geringerer Fraßschäden könnte die Abundanz von Parasitoiden auf Bt-Flächen beeinflussen, da weniger Parasitoide angelockt werden (Pilcher et al. 2005). Sorteneinflüsse spielen bezüglich der Quantität und des Musters der abgegebenen Duftstoffe eine wichtige Rolle. Verglichen mit anderen Sorten wurden bei MON810 und der nicht-transgenen Linie im Feld signifikante Unterschiede in der abgegebenen Duftstoffmenge gefunden, wobei MON810 auch im nicht befallenen Zustand mehr Duftstoffe freisetzte (<http://www.biosicherheit.de/de/sicherheitsforschung/23.doku.html>). Ob sich unterschiedliche Duftstoffmuster und -mengen auf die Parasitierung von Schädlingslarven auswirken, wurde nicht berichtet.

Die Einschätzungen, welches die Ursachen für die beobachteten Effekte auf Nützlinge sind und welche Wirkungen auf Ökosysteme die (indirekte) Schädigung von Nützlingen und speziell Parasitoiden zeitigt, weichen auseinander. Eine direkte Intoxikation von Nützlingen durch das über die Beute aufgenommene Cry1Ab Protein, das in seiner Wirkung auf Falterlarven beschränkt sein sollte, scheint nach Fütterungsversuchen mit Florfliegen und Marienkäfern nicht ausgeschlossen. Die Spezifität des Toxins wäre damit in Frage gestellt (Schmidt & Hilbeck 2005). Romeis et al. (2006) gehen jedoch davon aus, dass Nützlinge wie Prädatoren und Parasitoide nicht infolge direkter toxischer Wirkung Schaden erleiden, sondern allenfalls durch gegen Bt-Toxine empfindliche, subletal geschädigte Beute. In Feldstudien seien Abundanz und Aktivität von Parasitoiden in Bt- und nicht-Bt-Kulturen vergleichbar. Hingegen würden durch den Einsatz konventioneller Insektizide in aller Regel

auch die Nützlinge beeinträchtigt. Der Anbau transgener Bt-Toxin exprimierender Pflanzen könne zu einer substantiellen Reduktion des Insektizideinsatzes in einigen Kulturarten (z. B. Baumwolle) führen und zu integrierter Schädlingsbekämpfung mit starker Komponente des biologischen Pflanzenschutzes beitragen. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass die Bekämpfung des Maiszünslers im Mais mittels Insektiziden nach den Regeln der guten fachlichen Praxis nur dann erfolgt, wenn der Befall die Schadschwelle überschreitet, zudem werden alternative Bekämpfungsmethoden erfolgreich eingesetzt. Eine vorbeugende Behandlung, wie sie der Anbau Bt-Toxin-exprimierender Pflanzen darstellt, entspricht nicht den Prinzipien guter fachlicher Praxis. Nach Wurzer-Faßnacht et al. (2003) wurden in den USA vor Einführung der Bt-Maislinien etwa 5 % der Maisflächen zur Bekämpfung des Maiszünslers mit Insektiziden behandelt und in Deutschland erfahren nur 2 % der Maisflächen eine Insektizidbehandlung (Langenbruch et al. 2006). Signifikante Insektizideinsparungen können sich deshalb durch den Anbau von Bt-Mais nicht ergeben. Außerdem wird das toxische Protein über die Pflanzen vorbeugend in großer Menge eingesetzt, was den Selektionsdruck auf die Schadorganismen erhöht, sich ihrerseits den Toxinen anzupassen.

4.5 Wirkungen auf das Bodenleben

Bt-Toxine werden durch Pollen, absterbendes Pflanzenmaterial und Erntereste, durch Wurzelausscheidungen sowie über Kot von Tieren, die Bt-Toxine aufgenommen haben und wieder ausscheiden, in den Boden eingetragen. Dadurch können, verglichen mit der Applikation bakterieller Bt-Präparate, wesentlich mehr Bodenorganismen mit ihnen in Berührung kommen. Außerdem bedürfen die in Pflanzen gebildeten Toxine keiner spezifischen Aktivierung mehr. Die für die Abschätzung von Pestizidwirkungen entwickelten Methoden sind denn nach Clark et al. (2005) auch nicht ausreichend für die Beurteilung von Effekten durch Bt-Toxine aus transgenen Pflanzen. Die Angaben über die eingetragenen Toxinmengen sind uneinheitlich und reichen von einigen Gramm pro Hektar bis zu mehr als 1 kg/ha für Bt-Baumwolle und Bt-Mais, die Toxinkonzentrationen im Boden sollen zwischen 1,5 µg/kg und 2,41 mg/kg Boden (und damit um den Faktor 1.000 variierend) liegen (Clark et al. 2005). Gezeigt wurde, dass in sterilem, hydroponischem Medium, in sterilem und nicht-sterilem Boden und in natürlichen Böden Cry1Ab Toxin über die Wurzeln transgener Maispflanzen ausgeschieden wird (Saxena et al. 1999, Saxena & Stotzky 2000). Warum Cry Proteine von Bt-Mais, Bt-Reis sowie Bt-Kartoffeln ausgeschieden werden, nicht jedoch von Bt-Baumwolle, Bt-Raps und Bt-Tabak, ist unbekannt (Saxena & Stotzky 2005).

Die Toxingehalte variieren von Standort zu Standort und von Jahr zu Jahr und sind allgemein deutlich höher im Bereich der Rhizosphäre als im Gesamtboden. Cry1Ab Toxin wurde in Deutschland sieben Monate nach der Ernte von MON810 Mais (und vor einer erneuten Aussaat) mit einer durchschnittlichen Konzentration von 0,21 µg/kg Boden nachgewiesen, Wurzelreste enthielten 12 % des Bt-Gehalts intakter Wurzeln (Baumgarte & Tebbe 2005). Im zweiten Anbaujahr von MON810 lagen laut ELISA die durchschnittlichen Bt-Toxingehalte der Rhizosphäre auf Standorten in der Nähe von Bonn und Halle mit 1,62 µg/kg bzw. 1,7 µg/kg sieben- bzw. fünffach höher als die des ersten Jahres, Spitzenwerte lagen bei 10 µg/kg (Baumgarte & Tebbe 2005). Saxena et al. (1999) nannten für die Rhizosphäre einen erheblich höheren Wert von 95 µg/g Boden. Überraschend ist, dass obwohl ein sehr sensibles Nachweisverfahren zur Verfügung steht (Tebbe 2003), nur wenige Daten zu Toxingehalten der Böden von Standorten mit mehrjährigem MON810 Anbau vorliegen und im Rahmen der BMBF-geförderten biologischen Sicherheitsforschung diese Untersuchungen nicht fortgeführt

zu werden scheinen. Der Zeitpunkt der Probennahme ist offenbar von Bedeutung, so fanden Griffiths et al. (2006) bei Studien im Gewächshaus abhängig vom Wachstumsstadium der Maispflanzen stark unterschiedliche Toxingehalte im Boden, die um das 16 – 40 fache variieren konnten. Ob diese Varianz mit unterschiedlicher mikrobieller Aktivität in den verschiedenen Wachstumsstadien erklärt werden kann (Baumgarte & Tebbe 2005), ist offen. Studien zum Vorkommen des Bt-Toxins im Grundwasser sind bislang nicht bekannt (Dolezel et al. 2006). Wichtige Gründe für die starken Schwankungen scheinen neben den unterschiedlichen Böden und Umweltbedingungen auch das Fehlen verlässlicher, genauer und universell einsetzbarer analytischer Methoden sowie die große Schwankung der Toxingehalte in den verschiedenen pflanzlichen Geweben zu sein (Dolezel et al. 2006, Clark et al. 2005). Wurzeln bilden danach ein größeres Toxin-Reservoir als Blätter, die rascher abgebaut werden.

Der Abbau von Cry1Ab erfolgt nach Clark et al. (2005) zunächst relativ rasch, ein kleinerer Teil (10 – 40 % je nach Experiment, Bodentyp und Proteinmenge) wird allerdings sehr viel langsamer abgebaut. Durch die Bindung an oberflächenaktive Substanzen wie Tonpartikel und Huminstoffe ist das Toxin besser vor mikrobiellem Abbau geschützt. Von einer unspezifischen Sorption an den Tonfraktionen ist auszugehen, wobei bei erhöhter Ionenstärke und größerer Oberfläche der Bodenpartikel die Sorption erhöht ist. Gleiches gilt für leicht sauren pH-Wert von 4 – 4,5, verglichen mit neutralem pH-Wert. Desorption von Bt-Toxin war sowohl in Feinerde als auch in der Tonfraktion geringer als 10 % (Schröder 2005). Trotz ähnlicher chemisch-mineralogischer Zusammensetzung dreier Standorte zeigten die einzelnen Bodenproben eine deutlich unterschiedliche Affinität zu Bt-Toxin. Der Autor betont, dass aufgrund der schnellen Sorption von Bt-Toxin unter natürlichen Bedingungen möglicherweise nur wenig Zeit für dessen mikrobiellen Abbau zur Verfügung stehe. Verglichen mit Schluffboden fanden Griffiths et al. (2006) in Lehmböden einen bis zum Dreifachen erhöhten Bt-Toxingehalt. Eine vertikale Wanderung von Cry1Ab scheint möglich, abhängig von der Oberfläche und dem Kationen-Austausch der Böden. Über einen Sättigungseffekt der Bt-Toxin-Adsorption im Boden ist nichts bekannt (Dolezel et al. 2006).

Von nicht-Bt-Pflanzen werden die von Bt-Mais ausgeschiedenen Cry1Ab Toxine nicht aufgenommen, wie Experimente mit nicht-Bt-Mais, Karotten, Rettich und Rüben ergaben (Saxena & Stotzky (2001b)). Über verlangsamten Abbau von Bt-Mais, verglichen mit konventionellem Mais, im Boden wurde verschiedentlich berichtet, was in Zusammenhang mit dem beobachteten höheren Ligningehalt im Stengel der Bt-Maissorten gebracht wurde (Stotzky 2000, Saxena & Stotzky 2001a), andere Autoren bestätigten einen verzögerten Abbau allerdings nicht (Hopkins & Gregorich 2003).

Biologische Aktivität und Stabilität von Bt-Toxinen im Boden hängen ab von der Toxinart und -menge und von Faktoren wie Temperatur, pH, Bodentyp, Feuchtigkeit und davon, ob Pflanzenmaterial auf dem Boden verbleibt oder in den Boden eingearbeitet wird (Schmitz & Schütte 2001, Zwahlen et al. 2003a). Auch wenn nach Schätzungen nur 40 - 60 % des Toxins messbar sind (Baumgarte & Tebbe 2005, Tebbe 2003), kann möglicherweise der „Rest“ doch eine toxische Wirkung beibehalten. Da die Temperatur eine wichtige Rolle bei natürlichen Abbauprozessen spielt, liefern bei konstant 20 °C durchgeführte Laborexperimente keine adäquaten Daten zum Abbau von Bt-Toxinen im Feld, wo die mittleren Bodentemperaturen bei 7 – 8 °C liegen und von weniger als 1 °C im Winter bis über 20 °C im Sommer reichen können (Zwahlen et al. 2003a,b). Zwahlen et al. (2003a) fanden Bt-Toxine in geringen Mengen noch nach 240 Tagen. Da die Bt-Toxin-Konzentrationen in den oberen Zentimetern im Bereich der Wurzeln wesentlich höher sind als in tieferen Schichten, ist von einer höheren Exposition für Organismen in oberem Bodenbereich auszugehen (Baumgarte & Tebbe 2005, Hilbeck & Meier 2002).

Wurzelnhangserde von 12 Maissorten (Bt176, Bt11 und MON810) enthielt 40 Tage nach der Keimung Cry1Ab Toxin, das sich in Biotests mit Larven des Schadschmetterlings *Manduca sexta* als toxisch erwies (Saxena et al. 2002). Demnach wird Cry1Ab unabhängig von der jeweiligen Transformation von den transgenen Maislinien ausgeschieden. Die toxische Wirkung auf Larven blieb in verschiedenen Tiefen von Bodensäulen erhalten (Stotzky 2000) und über 180 Tage, die längste untersuchte Zeitspanne (Saxena & Stotzky 2001b). Da Bt-Toxin über die Wurzeln während des gesamten Wachstums ausgeschieden und zusätzlich durch Pollen und Antheren während der Blüte und über Pflanzenreste nach der Maisernte eingetragen wird, ist mit einer Akkumulation im Boden zu rechnen. Erreichte Werte könnten einerseits die Schädlingsbekämpfung verstärken, andererseits aber Nichtzielorganismen im Boden beeinträchtigen und möglicherweise sogar den Selektionsdruck auf Zielinsekten erhöhen (Saxena et al. 2002). Insbesondere von Pflanzenresten lebende und am Abbau beteiligte Bodenlebewesen sind gefährdet und über die Weitergabe des Toxins auch an der Oberfläche lebende räuberische Bodenbewohner und Allesfresser (Obrycki et al. 2001a).

Die mikrobielle Biomasse und Enzymaktivität scheint sich dabei auf Bt-Maisflächen nach mehrjährigem Anbau nicht signifikant zu verändern (Lang et al. 2005). Auch Saxena & Stotzky (2001) beobachteten keine Wirkungen auf die Abundanz von Bakterien, Pilzen, Einzellern und Nematoden im Boden. Turrini et al. (2004) berichteten allerdings über Effekte auf Mycorrhiza-Pilze durch Bt176, dessen Wurzeln das Wachstum der Pilzhyphen beeinträchtigten, sodass es zu weniger Infektionen kam, Bt11 Mais zeigte diese Effekte nicht. Die Symbiose mit Mycorrhiza-Pilzen ist für Pflanzen von großer Bedeutung, da dadurch Nährstoffe besser zur Verfügung gestellt werden. Partiiell im Gegensatz dazu fanden sich in Gewächshaus-Versuchen sowohl bei Bt176 als auch bei Bt11-Mais signifikant weniger Wurzelinfektionen durch den Mycorrhiza-Pilz *Glomus mosseae* (Castaldini et al. 2005). Vier Monate nach Einarbeitung in den Boden reduzierte Bt11 Pflanzenmaterial zudem die Besiedlung von Luzernewurzeln durch bodenständige Mycorrhiza-Pilze um 50 %. Castaldini et al. (2005) beobachteten zusätzlich Veränderungen in der Bakterienflora der Bt176 und Bt11 Rhizosphäre. In Gewächshausstudien nahm die Amöben-Biomasse bei jungen MON810-Pflanzen um etwa das Doppelte zu, nicht jedoch bei älteren Pflanzen (Griffiths et al. 2006).

Regenwürmer, wichtige Zersetzer, wurden nach Saxena & Stotzky (2001b) durch den Bt-Maisanbau nicht beeinträchtigt, allerdings fand sich das Toxin im Darm. Junge und erwachsene Regenwürmer (*Lumbricus terrestris*), die mit Cry1Ab Bt-Maisblättern gefüttert wurden, zeigten in den ersten 160 Tagen keine Veränderungen von Gewicht und Sterblichkeit, doch nach 200 Tagen waren sie erheblich leichter als die Kontrolle (Zwahlen et al. 2003b). Vor kurzem wurde berichtet, dass die in Agrarböden weit verbreitete Regenwurmart *Aporrectodea caliginosa* zwar im Allgemeinen nicht negativ auf Bt-Material reagierte, die Schlüpftrate aus den Kokons jedoch signifikant niedriger war (Vercesi et al. 2006).

Weitere Beispiele potentiell betroffener Bodenorganismen sind Nematoden und im Boden lebende Insektenlarven und deren Prädatoren. Schon länger ist bekannt, dass einige Bt-Toxine gegen bodenlebende Nematoden wirksam sind (Wei et al. 2003). In einem Lebenszyklus-Assay mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, der Wurzelnhangserde von Bt176 und MON810 Maispflanzen ausgesetzt wurde, waren Reproduktionsrate, Zahl der Eier und Körperlänge signifikant verringert – verglichen mit Tieren aus der Kontrollgruppe mit isogenem nicht-GVO-Mais (Arndt 2003, Lang et al. 2005). Die Cry1Ab Gehalte im Boden, die die Effekte auslösten, lagen oberhalb von 0,5 µg/kg Boden. Geringe Effekte von MON810

Mais auf allesfressende Nematoden wurden auch von Griffiths et al. (2006) berichtet. Asseln (*Porcelio scaber*), sehr verbreitete Bodenbewohner, fraßen wesentlich weniger, wenn ihnen Bt-Mais mit hoher Toxin-Expression (Bt11, der den gleichen Promotor besitzt wie MON810) vorgesetzt wurde, als wenn es sich um die Bt176 Maislinie handelte, die einen niedrigeren Bt-Gehalt hat (Wandeler et al. 2002). Cry1Ab fand sich im Darm, Körper und in 3fach bzw. 10fach höherer Menge auch im Kot der Asseln, was darauf hinweist, dass das Bt-Toxin die Darmpassage übersteht und ausgeschieden wird. Danach wird es möglicherweise wieder von Organismen aufgenommen, die selbst keine Pflanzenfresser sind.

Larven der Trauermücken zersetzen abgestorbenes Pflanzenmaterial und sind deshalb auf Bt-Maisflächen mit Bt-Toxinen konfrontiert. Im Feld wurden zwar keine wesentlichen Veränderungen von Fressverhalten und Abundanz beobachtet, im Labor brauchten allerdings mit MON810 gefütterte Larven von *Lycoriella castanescens* längere Zeit bis zur Verpuppung. Der Rückgang der Zersetzungsleistung in der MON810 Variante im dritten Jahr fiel mit einem Anstieg des Bt-Toxingehaltes in der Streu um mehr als das 2,5 fache zusammen (Langenbruch et al. 2006). Ob der erhöhte Ligningehalt von MON810 Maisstroh (Poerschmann et al. 2005) die Abbauleistung zusätzlich beeinträchtigt, ist offen. Auch Larven räuberischer Käfer (*Poecilus cupreus* und *Athea coriaria*), die mit MON810-Mais gefütterte Trauermückenlarven fraßen, verpuppten sich später (<http://biosicherheit.de/de/mais/bt-toxin/243.doku.html>). Vergleichbare Effekte zeigte auch die Verfütterung von MON810 Pollen mit einem Cry1Ab Wert von 0,097 µg/g, während der Pollen von Bt176, der wesentlich höhere Toxinwerte aufweist (2,96 µg/g), dies nicht tat, die beobachtete geringe Futterqualität von MON810 Pollen wäre demnach durch den Toxingehalt allein nicht zu erklären.

Laufkäfer gelten als Allesfresser am Boden. Im Labor hatten Larven des Laufkäfers *Poecilus cupreus* eine signifikant höhere Sterblichkeit, wenn sie mit auf Cry1Ab Mais gehaltener *Spodoptera littoralis* Beute gefüttert wurden (Meissle et al. 2005). Zwahlen & Andow (2005) zeigten vor kurzem, dass auch Laufkäfer, die im Freiland auf Feldern mit Bt-Maisrückständen gefangen wurden, Cry1Ab Toxin enthielten. Demnach sind nicht nur von Pflanzenresten lebende Bodenorganismen mit hoher Wahrscheinlichkeit den Bt-Toxinen dauerhaft ausgesetzt, sondern auch räuberische Insekten, wie etwa Laufkäfer.

4.6 Schlussfolgerungen

Um Effekte von Bt-Toxinen auf Nichtzielorganismen zu erkennen, bedarf es langfristig angelegter Untersuchungen, zumal diese Toxine beim kommerziellen Anbau von Bt-Mais über Monate, wenn nicht Jahre in der Umwelt vorhanden sind, auf großen Flächen wirken würden und eine Akkumulation im Boden wahrscheinlich ist. Insbesondere in Gebieten mit großflächigem Maisanbau ohne Fruchtwechsel, wie er im Rahmen eines vermehrten Biomasse-Anbaus nicht unwahrscheinlich ist, müsste mit verstärkten Effekten auf die Biodiversität gerechnet werden. Aus Bt-Toxinmengen unterhalb der Wirkungsschwelle für den Zielorganismus Maiszünsler zu schließen, eine Wirkung auf Nichtzielorganismen sei unwahrscheinlich, ist beim derzeitigen Kenntnisstand verfrüht, immerhin haben die Ergebnisse der Verfütterung von Bt-Pollen an Schmetterlingslarven gezeigt, dass sehr wohl Nichtzielorganismen empfindlicher reagieren können als der Zielorganismus selbst.

Ohne Versuche, die über Monate, besser Jahre laufen und mehrere Generationen umfassen, sind subletale Effekte einer Aufnahme von Toxin-haltigem Pflanzenmaterial und deren Auswirkungen auf die Nahrungsketten in Agrar- und nicht-Agrarflächen sowie im Boden

nicht zu erkennen. Dabei sind die verschiedenen Toxin exprimierenden Pflanzenteile zu verwenden, und nicht, wie häufig geschehen, gereinigte, aus Bakterien gewonnene Bt-Toxine. Die Messung der Toxingehalte im verwendeten Pflanzenmaterial sollte Standard sein. Auch muss ein breites Spektrum von Arten untersucht werden, einschließlich solcher, deren Wechselwirkung mit transgenem Mais als unwahrscheinlich gilt. Die Protokolle müssen sich zur Erkennung chronischer und subletaler Effekte sowie multitropher Interaktionen eignen und dabei verschiedene Entwicklungsstadien und Ernährungsgewohnheiten sowie Räuber-Beute-Verhältnisse von Nichtzielorganismen berücksichtigen. Da Umweltbedingungen allgemein stark variieren, erlauben in einem Jahr und an einem oder wenigen Standorten gewonnene Erkenntnisse keine Extrapolation auf künftige Jahre und verschiedene Umwelten. Im Freiland untersuchte Flächen müssen, um mobile Insekten zu erfassen, zudem ausreichend groß sein.

Viele der bisher durchgeführten Studien genügen diesen Anforderungen nicht, Verbesserungen im Versuchsdesign wurden deshalb gefordert (Hilbeck et al. 2000, Groot & Dicke 2002, Clark et al. 2005, Lövei & Arpaia 2005, Andow & Zwahlen 2006). Auch die statistische Absicherung der Daten lässt zu wünschen übrig. Marvier (2002) analysierte Versuchsdesign und statistische Aussagefähigkeit der von der Industrie durchgeführten Versuche für transgene Bt-Pflanzen und folgerte, dass in den meisten Fällen die Zahl der Wiederholungen zu klein war, um reale Effekte auf Nichtzielorganismen zu erkennen. Zudem müssten die Versuche länger und umfassender angelegt sein und die Öffentlichkeit sollte Zugang zu den als vertraulich deklarierten Unterlagen über mögliche Effekte auf Nichtzielorganismen erhalten. Die Analyse von 44 publizierten Laborstudien zu Wirkungen von insektenresistenten Pflanzen (darunter etwa zur Hälfte Bt-Pflanzen) auf Prädatoren und Parasitoide ergab, dass, obwohl zahlreiche Nützlingsarten potentiell betroffen sind, nur wenige Arten tatsächlich Verwendung fanden und das Versuchsdesign nicht dem „worst case“ Szenario entsprach, das eigentlich erfasst werden sollte (Lövei & Arpaia 2005). Allein 7 Studien befassten sich mit der Florfliege, wichtige Gruppen wie parasitische Fliegen und Ameisen wurden aber kaum oder gar nicht getestet. Der Mangel an Studien mit Spinnen und sozial lebenden Nützlingen war besonders auffällig. Trotz dieser methodischen Einschränkungen ist es nach Meinung der Autoren bemerkenswert, dass in der Summe der untersuchten Parameter (z. B. Mortalität, Entwicklungszeit, Gewicht, Größe, Nahrungsaufnahme, Reproduktion, Lebensdauer, Verhalten etc.) eine klare Asymmetrie in Richtung negativer Effekte zu beobachten war. Lövei & Arpaia (2005) zufolge sind diese negativen Effekte zu zahlreich, als dass sie als nicht-signifikant oder nicht-relevant wegdiskutiert werden könnten.

Da Artenzusammensetzung und Abundanz der potentiell betroffenen Nichtzielorganismen starke regionale Unterschiede aufweisen, kann die Gefährdung der Artenvielfalt durch den Anbau der MON810 Maislinie qualitativ und quantitativ regional unterschiedlich ausgeprägt sein. Am Beispiel einzelner Schmetterlingsarten zeigte sich zudem, dass eine erhebliche artspezifische Variation in der Empfindlichkeit gegen Cry1Ab besteht, dies dürfte auch für andere Gruppen von Nichtzielorganismen wie etwa Nützlinge gelten. Hierauf verweist auch die EU-Kommission in ihrer Antwort an das WTO-Panel und argumentiert, dass es wissenschaftlich nicht angemessen sei, die begrenzten Ergebnisse von in den USA, Australien oder anderen nicht-europäischen Ländern durchgeführten Risikoanalysen zur Toxizität von Bt-Mais für Mensch und Nicht-Zielorganismen einfach auf die EU zu übertragen und zu extrapolieren (European Communities 2005). In dieser Stellungnahme wird weiter ausgeführt, dass Faktoren wie regionale Anbaubedingungen und -verfahren, Schlaggröße der Felder, die wichtigsten in der Region vorkommenden Ziel- und Nichtzielorganismen und Wechselwirkungen zwischen den Kulturpflanzen und der umgebenden Biodiversität sich

jeweils sehr von der Situation in Nicht-EU-Staaten unterscheiden und dass selbst innerhalb der EU wesentliche Unterschiede auftreten können. Vor einer Zulassung von MON810 in der EU hätten demnach umfangreiche Risikoanalysen hinsichtlich der Auswirkungen auf Ökosysteme der EU durchgeführt werden müssen, eine Zulassung basierend auf weitgehend in den USA erhobenen Daten entsprach demzufolge nicht angemessener wissenschaftlicher Praxis.

Dies gilt umso mehr, als sich die für MON810 postulierten ökonomischen Vorteile bei Zünslerbefall durch geringeren Fraßschaden und bessere Nährstoff- und Energiegehalte infolge ungestörter Wasser- und Nährstoffversorgung offenbar gar nicht einstellen, wie Schorling (2005) im Rahmen mehrjähriger Untersuchungen im Zünslerbefallsgebiet Oderbruch beobachtete. Trotz des, verglichen mit den vorausgehenden Jahren, höheren Larvenbefalls im Jahr 2004 konnte kein größerer Schaden im Feld und im Mittel der Jahre nur ein sehr geringes Ertragsplus auf der Bt-Fläche festgestellt werden. Zusätzlich hatte MON810 Mais eine geringere Energiekonzentration als konventioneller Mais, allerdings sind hier die Sorteneinflüsse sehr ausgeprägt. Im Durchschnitt waren zwar Fusarien- und Mykotoxinwerte im Bt-Mais geringer, doch gab es große Schwankungen je nach Sorte, Standort und Jahr. Vergleichbare Abhängigkeiten fanden auch Magg et al. (2002) bei ihren Untersuchungen in Bayern und Baden-Württemberg zum Mykotoxingehalt von Mais, sie kamen jedoch zum Schluss, dass unter mitteleuropäischen Anbaubedingungen Bt-Mais den Mykotoxingehalt im Mais nur unwesentlich reduziere.

Selbst die EU-Kommission (European Communities 2005) verweist in ihrer Antwort ans WTO Panel darauf, dass vor 1997 mögliche Effekte auf Nichtzielorganismen durch Bt-Mais nicht korrekt berücksichtigt wurden. Die Position (Österreichs), es könnten keine Bt-Pflanzen angebaut werden, solange es keine Kenntnis der potentiell betroffenen Nichtzielorganismen im Boden gebe, sei deshalb vernünftig und rechtmäßig, zumal über Bodenorganismen nicht sehr viel Wissen vorliege. Wie dargestellt, liegen inzwischen viele Labor- und Feldstudien vor, die zeigen, dass Nichtzielorganismen in Agroökosystemen und Böden durch den Anbau von Bt-Mais gefährdet werden. Eine Aufrechterhaltung der Genehmigung für den Anbau der Maislinie MON810 ist deshalb nicht zu rechtfertigen.

5. Mögliche gesundheitliche Effekte

5.1 Konzept der substantiellen Äquivalenz

Zur Bewertung der Sicherheit von Lebensmitteln aus gentechnisch veränderten Organismen wird von Seiten der Regelungsbehörden auf das Konzept der substantiellen Äquivalenz zurückgegriffen. Dieses über die OECD in die internationale Diskussion eingebrachte Konzept bedeutet, dass eine transgene Pflanze bzw. die daraus hergestellten Lebensmittel und Lebensmittelzutaten mit der jeweiligen konventionellen Pflanze bzw. den aus dieser hergestellten Lebensmittel und Lebensmittelzutaten gleichwertig sein sollen. Die substantielle Äquivalenz wird im Allgemeinen durch einen chemisch-analytischen Vergleich sowie agronomische und morphologische Charakteristika bestimmt. Das auch vom SCP bzw. der EFSA im Rahmen der Zulassung von MON810 angewandte Konzept stellt ein wesentliches Element der Sicherheitsbewertung von GVO und daraus hergestellten Lebensmitteln dar. Doch es gibt Kritik an diesem Konzept - sowohl aus grundsätzlichen Überlegungen als auch

infolge der Handhabung in der Praxis (Millstone et al. 1999, Novak & Haslberger 2000, Schenkelaars 2001, Spök et al. 2002, 2003b).

Danach lauten die wesentlichen Kritikpunkte:

- Aus der bloßen chemisch-analytischen Vergleichbarkeit einiger ausgewählter Inhaltsstoffe kann angesichts des möglichen erstmaligen oder verstärkten Auftretens von Allergenen, Toxinen oder antinutritiven Substanzen in transgenen Pflanzen nicht auf die allergologische und toxikologische Unbedenklichkeit der transgenen Pflanze und der daraus hergestellten Lebensmittel geschlossen werden.
- Bestehende Methoden erlauben es nicht, Analysen und Vergleiche sowie toxikologische und allergologische Untersuchungen aller Inhaltsstoffe von Pflanzen und Lebensmitteln durchzuführen. Die getroffene Auswahl an Parametern und die Wahl der Vergleichslinien bzw. -produkte sind möglicherweise ungeeignet, um Sekundäreffekte mit hinreichender Wahrscheinlichkeit zu erkennen.
- Konkrete Anwendungsfälle sind umstritten. Evaluierungen der Praxis zeigen, dass es große Unterschiede in der Qualität der Daten und der Nachvollziehbarkeit und Schlüssigkeit von Untersuchungen und Schlussfolgerungen gibt. Mögliche Umwelteinflüsse auf Inhaltsstoffe transgener Pflanzen sollten stärker berücksichtigt werden.

Unter diesen Bedingungen kommt nach Spök et al. (2003b) der Feststellung der substantiellen Äquivalenz nur eine geringe Aussagekraft zu.

5.2 Toxikologie und Allergologie von MON810

Laut SCP (1998) lieferte Monsanto Daten über die Zusammensetzung von Inhaltsstoffen der Maislinie MON810 sowie zu deren agronomischen Eigenschaften (Fettsäureprofile, Protein- und Aminosäureprofile, Faser- und Ascheanteil, Phytatgehalt und Feuchtigkeit). Signifikante nutritive Unterschiede seien nicht entdeckt worden zwischen GVO- und nicht-GVO-Linie und deshalb könne von einer substantiellen Äquivalenz mit Ausnahme der neuen Eigenschaft ausgegangen werden. In der Stellungnahme zur Maislinie NK603 x MON810 verweist die Europäische Lebensmittelbehörde EFSA (2005) auf Untersuchungen der MON810 Maislinie. Danach erbrachten 90-Tage sub-chronische Fütterungsversuche mit MON810 Mais an Nagern sowie Fütterungsversuche mit Masthähnchen, Rindern und Schweinen keine negativen Effekte und demzufolge gebe es keine Bedenken hinsichtlich der Sicherheit dieser Maislinie. Die Sicherheit des Cry1Ab Proteins sei gezeigt worden, indem das in *Escherichia coli* produzierte Äquivalent in vitro in simulierter Magenflüssigkeit auf seinen raschen Abbau hin getestet worden sei und in einer weiteren Studie Mäusen künstlich Dosen verabreicht wurden, die höher waren als sie in der tierischen oder menschlichen Ernährung aufträten.

In den vergangenen Jahren wurden allerdings von verschiedenen Autoren Mängel im EU-Zulassungsverfahren für gentechnisch veränderte Pflanzen festgestellt, u. a. auch im Verfahren nach Artikel 5 der Novel Food Verordnung 258/97 für die MON810 Maislinie (Spök et al. 2003a,b, Schenkelaars (2001). Spök et al. (2003a) kamen zum Schluss, dass nur zwei toxikologisch wenig relevante Untersuchungsberichte in der Zusammenfassung vorgelegt wurden und der Antragsteller bezüglich der toxikologischen Sicherheitsbewertung inkorrekt argumentierte und mögliche sekundäre Wirkungen nicht behandelt hatte. Zudem wurde das in *Escherichia coli* erzeugte Cry1Ab Toxin in den Tests verwendet und nicht MON810 Pflanzen bzw. das aus ihnen isolierte Toxin. Selbst das SCP hatte 1998 einschränkend darauf verwiesen, dass die häufig verwendeten in-vitro Methoden zur

Untersuchung des Abbauverhaltens des Btk-Toxins zu verbessern sind, zumal die Verwendung eines isolierten Proteins in Toxizitätsstudien den Abbau des gleichen Proteins als integraler Bestandteil der Ernährung nicht adäquat abbilde. Im Jahr 2000 teilte Italien der Kommission mit, dass die Maislinien MON810, T25 und Bt11 seiner Meinung nach nicht substantiell äquivalent seien und deshalb einer vollen Sicherheitsbeurteilung unterworfen werden sollten. Unter Verweis auf die Sicherheitsklausel (Art. 12) der Novel Food Verordnung (EG) 258/97 wurden Vertrieb und Nutzung dieser Maislinien in Italien verboten (Schenkelaars 2001). Auch wenn Unzulänglichkeiten der ursprünglichen Anmeldung wie das Fehlen von PCR-Daten (polymerase chain reaction) bestanden, war das SCP der Meinung, dass es keine hinreichenden wissenschaftlichen Gründe gebe, die Sicherheit der betreffenden Maislinien für die menschliche Gesundheit in Frage zu stellen.

Hinsichtlich des allergenen Potentials der MON810 Maislinie argumentierte das SCP (1998) vor der Zulassung, die breite Nutzung von *Bacillus thuringiensis* (Btk) Insektiziden habe keine Belege für allergische Reaktionen geliefert, auch seien keine Homologien zwischen dem Btk Toxin und bekannten Allergenen bekannt. Laut EFSA (2005) hat die Analyse des allergenen Potentials des Cry1Ab Toxins den indirekten Beweis erbracht, dass dieses Protein mit nur geringer Wahrscheinlichkeit allergen auf Individuen wirke. Mais gelte nicht generell als allergenes Lebensmittel, Allergien gegen Mais träten selten auf und wenn, dann hauptsächlich in der Bevölkerung bestimmter Regionen. Da sich auch die Verzehrgewohnheiten durch MON810 Mais nicht veränderten, würden sich selbst durch eine Überexpression eines endogenen Proteins die allergenen Eigenschaften der transgenen Pflanze oder das Allergierisiko für Verbraucher nicht verändern. Spök et al. (2003a) kamen hingegen nach Analyse der Antragsunterlagen zu MON810 zum Schluss, dass die vom Antragsteller vorgelegten Daten nicht geeignet seien, ein Allergierisiko auszuschließen und dass die Anmeldung bezüglich des Allergierisikos vorwiegend auf falschen Argumenten aufgebaut sei. So fand sich kein Bezug auf mögliche pleiotrope Effekte und auf eine Exposition über die Lungen, etwa durch Pollenflug.

Bernstein et al. (1999) zeigten zudem, dass bei Farmarbeitern, die *Bacillus thuringiensis* Sprays ausgesetzt waren, Immunreaktionen gegen Cry Proteine auftraten. Das überwiegend eingesetzte Präparat enthielt Bt-Proteine aus dem Stamm kurstaki, aus dem auch das in die Maislinie MON810 übertragene cry1Ab Gen stammt. Für das verwandte Cry1Ac Protein wurde eine immunogene Wirkung in Mäusen nachgewiesen (Vazquez et al. 1999), ob dies auch für Cry1Ab gilt, ist offen. Diese Autoren berichteten auch, das Cry1Ac Protein fungiere als Verstärker der Antikörperreaktion auf Proteine, mit denen es gemeinsam verabreicht wurde. Dass in transgenen Pflanzen gebildete Proteine unerwartete immunogene Eigenschaften aufweisen können, zeigten die Ergebnisse von Prescott et al. (2005) mit der in Erbsen exprimierten α -Amylase aus der Bohne. Veränderungen in der Proteinstruktur und Anheftung von Zuckermolekülen wurden als wahrscheinliche Ursachen hierfür genannt. EFSA (2005) argumentierte jedoch, der nach Verabreichung hoher Dosen beobachtete Verstärkereffekt von Cry Proteinen führe nicht zu Bedenken bezüglich einer allergenen Wirkung von Maisprodukten beim Verzehr oder Kontakt. Andererseits empfiehlt die EU Kommission (European Communities 2005) in der Antwort ans WTO Panel, durch Immunisierungsexperimente zu überprüfen, ob der transgene Mais vermehrt neue Immunreaktionen hervorrufen kann. Daraus ist zu schließen, dass auch innerhalb der EU unterschiedliche Positionen hinsichtlich der Sicherheit von MON810 für die menschliche Gesundheit vertreten werden.

Lange wurde davon ausgegangen, dass das Cry1Ab Protein im Magen-Darm-Trakt rasch und vollständig abgebaut wird, auch im Antrag wurde auf die rasche Verdaubarkeit verwiesen

(Spök et al. 2003a). Neuere Arbeiten lassen jedoch Zweifel aufkommen. So berichteten Chowdhury et al. (2003a) über den Nachweis von Cry1Ab Protein im Magen-Darmtrakt von über 28 Tage mit Bt11 Mais gefütterten Schweinen. Über ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) und Immunchromatographie wurde das Bt-Toxin im Inhalt von Magen, Zwölffingerdarm, Krummdarm, Blinddarm und Enddarm nachgewiesen und mittels Immunoblot-Assay im Magen und Enddarm. Dies bedeutet, dass antigene Eigenschaften im Magen-Darmtrakt erhalten bleiben und zumindest Fragmente des cry1Ab Proteins in kleinen Mengen wieder ausgeschieden werden können. Studien mit Kälbern über 90 Tage brachten ähnliche Ergebnisse (Chowdhury et al. 2003b). Aus Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen mit ELISA und Immunoblots nach Fütterung von Bt176 Mais an Rinder (28 Tage) schlossen Lutz et al. (2005), dass der im kommerziellen ELISA eingesetzte Antikörper auch mit Fragmenten des Cry1Ab Proteins, die jedoch noch immunreaktive Epitope aufweisen, im Magen-Darmtrakt reagiert. Da nur Fragmente des Cry1Ab Proteins im Kot ausgeschieden würden, sei nicht mit dem Eintrag des kompletten aktiven Toxins über die Gülle zu rechnen. Wieweit die 17 und 34 kD großen Proteinfragmente noch eine biologische Aktivität besitzen, ist allerdings unbekannt.

5.3 Aufnahme von DNA

Entgegen bisherigen Erwartungen wird mit der Nahrung aufgenommene DNA nicht sofort und vollständig abgebaut, sondern ist in der Lage, aus dem Magen-Darmtrakt in Zellen verschiedener Organe aufgenommen zu werden. Seit dem ersten Bericht über die Aufnahme markierter DNA aus dem Magen-Darmtrakt in Blutzellen von Mäusen (Schubbert et al. 1994) wurde in weiteren Arbeiten gezeigt, dass aus der Nahrung stammende DNA-Bruchstücke in der Größe von mehreren Hundert bis über Tausend Basenpaare nicht nur die Magen-Darmpassage überstehen, sondern auch von peripheren Leukozyten, Milz- und Leberzellen aufgenommen werden und dass von trächtigen Mäusen aufgenommene DNA sogar die Placentaschranke überwinden und in Zellen von Foeten und neugeborenen Mäusen nachgewiesen werden kann (Schubbert et al. 1997, 1998, Doerfler 2000). Die aufgenommene markierte DNA fand sich in den Zellkernen und teilweise gebunden an Chromosomen.

Der Frage des Nachweises transgener DNA nach Aufnahme von gentechnisch verändertem Mais wurde in Fütterungsstudien unterschiedlicher Dauer (28 bis 246 Tage) an Nutztieren nachgegangen. DNA-Fragmente mehrfach vorliegender Gene (z. B. das Rubisco-Gen (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase) aus Chloroplasten oder das Mais-Zein-Gen) werden mit höherer Wahrscheinlichkeit nachgewiesen als Fragmente von Einzelkopie-Genen. So fanden sich bei Rindern nicht nur im Pansen, Darm und Kot Rubisco-Genfragmente, sondern auch in Blut- und Darmzellen und in der Milch, wohingegen cry1Ab Genfragmente wohl im Darminhalt, nicht aber innerhalb von Zellen gefunden wurden (Einspanier et al., 2001, Chowdhury et al. 2004, Phipps et al. 2003). DNA aus Körnermais scheint stabiler zu sein als solche aus Maissilage, wie der Nachweis der gesamten codierenden Sequenz (1914 Basenpaare bp) des cry1Ab Gens im Pansen von Schafen 5 Stunden nach Fütterung mit Körnermais, nicht aber nach Fütterung mit Maissilage nahe legt. Ein wesentlich kleineres Fragment wurde allerdings noch nach 24 Stunden gefunden, unabhängig von der Art der Fütterung (Duggan et al. 2003). Aus der Nahrung aufgenommene DNA kann demnach im Pansen mehrere Stunden lang überleben und so möglicherweise für einen horizontalen Gentransfer auf Pansenmikroorganismen zur Verfügung stehen. Rossi et al. (2005) wiesen im Kropf und Muskelmagen von Hähnchen ein 1800 bp großes Fragment des cry1Ab Gens nach und im Blut ein Fragment des Zein-Gens. Der Nachweis kleinerer cry1Ab Genfragmente im

Brustmuskel von Hähnchen gelang laut Jennings et al. (2003) nicht. Einspanier et al. (2001) hatten bereits früher Fragmente eines Chloroplasten-Gens in Muskeln, Leber, Milz und Nieren von Hühnchen, nicht allerdings in Eiern nachgewiesen.

cry1Ab Genfragmente überleben auch im Magen-Darmtrakt von Schweinen (Chowdhury et al. 2003a, Reuter 2003). Reuter wies im Enddarm eines Tieres sogar noch 48 Stunden nach der letzten Bt-Maisaufnahme das Bt-Genfragment nach, nicht jedoch in Blutzellen, Leber, Lymphknoten, Milz, Niere, Ovarien und Muskelgewebe. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen fand sich ein Fragment des mehrfach vorhandenen Rubisco-Gens in allen genannten Geweben (in 33 % der 432 untersuchten Organ- und Gewebeproben) und sogar in rohem Schinken. Die höchste Nachweisquote wurde für die Ovarien ermittelt, laut Reuter (2003) möglicherweise bedingt durch die intensive Durchblutung der Ovarien während der Follikelreifung. Der Transfer kleiner Fragmente eines Multikopie-Gens (Zein) in Blut, Leber, Niere, Milz und Muskelgewebe von Ferkeln nach Fütterung mit MON810 Mais wurde von Mazza et al. (2005) bestätigt, zusätzlich wiesen diese Autoren jedoch auch ein vergleichsweise großes (519 bp) cry1Ab Fragment in Blut, Milz, Leber, Niere und in einem Fall in Muskelgewebe nach.

Offenbar können Fragmente pflanzlicher Gene im Magen-Darmtrakt persistieren, zumindest für mehrfach in pflanzlichen Zellen vorhandene Genfragmente wurden die Überwindung der Darmbarriere und der Übertritt in andere Gewebe gezeigt. Von einem engen Kontakt aufgenommener DNA mit den Darmzellen muss deshalb ausgegangen werden. Als mögliche Transportrouten werden die M-Zellen der so genannten Peyerschen Platten, Teil des Darm-assoziierten Lymphgewebes, vermutet (Doerfler 2000). Nach Mazza et al. (2005) ist Blut das wichtigste Organ für die Aufnahme von DNA aus dem Magen-Darmtrakt, das Lymphsystem und stark durchblutete und an der Ausscheidung beteiligte Organe nehmen deshalb fremde DNA mit höherer Wahrscheinlichkeit auf als Muskelgewebe.

5.4 Schlussfolgerungen

Die Maislinie MON810 wurde auf Basis nur weniger toxikologischer und allergologischer Untersuchungen zugelassen, die zudem mit aus Bakterien gewonnenem Cry1Ab Protein durchgeführt wurden. Mögliche Veränderungen des Proteins im MON810 Mais, etwa auftretende Wechselwirkungen mit anderen pflanzlichen Inhaltsstoffen sowie durch die Transformation bedingte Effekte werden so nicht erfasst. Das Cry1Ab Protein wird im Magen-Darmtrakt nicht so rasch und vollständig abgebaut, wie angenommen. Es kann zumindest in Fragmenten über den Kot ausgeschieden werden, ohne dass Klarheit über die biologische Wirksamkeit dieser Proteinfragmente vorhanden wäre. Zumindest für das verwandte Cry1Ac Protein wurde eine immunogene Wirkung nachgewiesen.

In den vergangenen Jahren erschienene Arbeiten belegen, dass über die Nahrung aufgenommene DNA im Magen-Darmtrakt von Tieren mehrere Stunden überleben und in verschiedene Körperzellen übertreten kann. Bedingungen für einen horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen sind möglicherweise gegeben. Ob und gegebenenfalls welche Effekte die Aufnahme transgener DNA auf den Organismus hat, lässt sich nicht abschließend feststellen. Laut Doerfler (2000) ist die Aufnahme fremder DNA über den Magen-Darmtrakt ein seit langem wirkender Mechanismus, an den der Säugerorganismus adaptiert ist und gegen den bestimmte Abwehrmechanismen wirken. Danach wirkt sich DNA aus transgenen Organismen nicht anders aus als DNA aus normaler Nahrung.

Doch gibt es auch Stimmen, die darauf hinweisen, dass transgene DNA in ihrer Wirkung nicht notwendigerweise der aus normaler Nahrung identisch sein muss, da die transformierten Pflanzen in aller Regel komplexe DNA-Konstrukte enthalten und sehr häufig Umordnungen der Integrationsstellen aufweisen. Regulatorische Sequenzen besitzen unter Umständen Bereiche, die die Rekombination mit anderen DNA-Sequenzen begünstigen. So weist der in der Maislinie MON810 verwendete CaMV 35S Promotor einen modularen Aufbau auf mit Bereichen erhöhter Rekombinationsfähigkeit (hotspot), wodurch der Einbau damit verknüpfter DNA-Sequenzen in andere Genome erleichtert werden könnte (Cummins et al. 2000). Dieser Promotor ist darüber hinaus in tierischen und kultivierten menschlichen Darmzellen aktiv und enthält 18 Sequenzmotive, an die sich Transkriptionsfaktoren menschlicher Zellen möglicherweise binden (Myhre et al. 2006). Sollte er in Säugerzellen übertragen werden, könnte er so zur Expression etwaiger mit-transferierter DNA-Sequenzen oder auch endogener Sequenzen beitragen. Cummins et al. (2000) plädieren deshalb dafür, solange die Sicherheit dieses Promotors für die Umwelt und die tierische und menschliche Gesundheit nicht gezeigt sei, alle Pflanzen, die diesen Promotor enthalten, vom Markt zu nehmen und auch nicht in Freisetzungsversuchen zu testen. Müller (2004) weist zudem darauf hin, dass bei der Risikobetrachtung nicht nur DNA-Sequenzen, sondern auch RNA-Sequenzen zu betrachten seien, da letzteren in den vergangenen Jahren neue Rollen besonders in der Genregulation zugeschrieben wurden und transgene Pflanzen neue synthetische RNA-Moleküle bilden können.

Aus den im Sommer 2006 auf Antrag der Europaabgeordneten Hiltrud Breyer (Bündnis 90/Die Grünen) von der EU-Kommission herausgegebenen Daten über molekulare und toxikologische Untersuchungen der Maislinie MON810 ist zu ersehen, dass einige Jahre nach der Zulassung (2001) von der Firma Monsanto 90-tägige Fütterungsstudien an Hähnchen und Ratten durchgeführt wurden. Der Analyse der Autoren zufolge ergaben sich bei den gemessenen Parametern (z. B. Gewicht, Blutwerte, klinische Chemie etc.) keine Unterschiede zwischen mit MON810 Mais gefütterten Tieren und den Kontrollgruppen. Im Rahmen dieses Gutachtens konnte leider nicht eingehender auf diese erst seit kurzem zugänglichen Studien eingegangen werden. Bemerkenswert ist jedoch, dass Fütterungsstudien, die über längere Zeit laufen, offenbar nicht durchgeführt wurden und dass beobachtete Unterschiede zwischen MON810 gefütterten Tieren und Kontrolltieren regelmäßig als nicht durch MON810 bedingt bezeichnet wurden, da sie sich im Rahmen der Schwankungsbreite der Kontrollen bewegten, nur sporadisch auftraten oder nicht dosisabhängig seien. Auch seien in ansonsten gesunden Tieren kleine Unterschiede nicht als mit MON810 in Verbindung stehend zu sehen.

6 Referenzen

- Abel, C.A. & Adamczyk Jr., J.J. 2004. Relative concentration of Cry1A in maize leaves and cotton balls with diverse chlorophyll content and corresponding larval development of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae) on maize whorl leaf profiles. *J. Econ. Entomol.* 97, 1737-1744.
- ACRE (Advisory Committee on Releases to the Environment) 2003. Minutes of the 88th Meeting of ACRE at Defra, Room 6a/B, Ashdown House, Thursday 1 May. <http://www.defra.gov.uk/environment/acre/meetings/03/030501m.htm>.
- Agrawal, A.A. 2000. Mechanisms, ecological consequences and agricultural implications of tri-trophic interactions. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 329-335.
- Anderson, P.L., Hellmich, R.L., Prasifka, J.R. & Lewis, L.C. 2005. Effects on fitness and behaviour of monarch butterfly larvae exposed to a combination of Cry1Ab-expressing corn anthers and pollen. *Environ. Entomol.* 34, 944-952.

- Anderson, P.L., Hellmich, R.L., Sears, M.K., Sumerford, D.V. & Lewis, L.C. 2004. Effects of Cry1Ab-expressing corn anthers on monarch butterfly larvae. *Environ. Entomol.* 33, 1109-1115.
- Andow, D.A. & Zwahlen, C. 2006. Assessing environmental risks of transgenic plants. *Ecology Letters* 9, 196-214.
- Arndt, M. 2003. Bt-Mais – ein Projektüberblick mit Ergebnissen bodenfaunistischer Untersuchungen (Nematoden). Monitoring der Umweltwirkungen von gentechnisch veränderten Organismen, Statusseminar zu den bayerischen Projekten. LfU Augsburg.
- Baumgarte, S. & Tebbe, C.C. 2005. Field studies on the environmental fate of the Cry1Ab Bt toxin produced by transgenic maize (MON810) and its effect on bacterial communities in the maize rhizosphere. *Molecular Ecology* 14, 2539-2551.
- Beckman, N. & Hurd, L.E. 2003. Pollen feeding and fitness in praying mantids: The vegetarian side of a tritrophic predator. *Environ. Entomol.* 32, 881-885.
- Bernstein, L., Bernstein, J.A., Miller, M., Tierzieva, S., Bernstein, D.I., Lummus, Z., Selgrade, M.J.K., Doerfler, D.L. & Seligy, V.L. 1999. Immune responses in farm workers after exposure to *Bacillus thuringiensis* pesticides. *Environmental Health Perspectives* 107, 575-582.
- Bourguet, D., Chaufaux, J., Micoud, A., Delos, M., Naibo, B., Bombarde, F., Marque, G., Eychenne, N. & Pagliari, C. 2002. *Ostrinia nubilalis* parasitism and the field abundance of non-target insects in transgenic *Bacillus thuringiensis* corn (*Zea mays*). *Environ. Biosafety Res.* 1, 49-60.
- Brinker, M. 1999. Untersuchungen zur Spezifität von Promotoren. UBA-Texte 80/99 Berlin.
- Bruns, H.A. & Abel, C.A. 2003. Nitrogen fertility effects on Bt δ -endotoxin and nitrogen concentrations of maize during early growth. *Agron. J.* 95, 207-211.
- Castaldini, M., Turrini, A., Sbrana, C., Benedetti, A., Marchionni, M., Mocali, s., Fabiani, A., Landi, S., Santomassimo, F., Pietrangeli, B., Nuti, M.P., Miclaus, N. & Giovanetti, M. 2005. Impact of Bt corn on rhizospheric and soil eubacterial communities and on beneficial mycorrhizal symbiosis in experimental microcosms. *Appl. and Envir. Microbiology* 71, 6719-6729.
- Chen, L., Marmey, P., Taylor, N.J., Brizard, J.P., Espinoza, C., D'Cruz, P., Huet, H., Zhang, S., de Kochko, A., Beachy, R.N. & Fauquet, C.M. 1998. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nature Biotechnology* 16, 1060-1065.
- Chowdhury, E.H., Kuribara, H., Hino, A., Sultana, P., Mikami, O., Shimada, N., Guruge, K.S., Saito, M. & Nakajima, Y. 2003a. Detection of corn intrinsic and recombinant DNA fragments and Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents of pigs fed genetically modified corn Bt11. *J. Anim. Sci.* 81, 2546-2251.
- Chowdhury, E.H., Shimada, N., Murata, O., Mikami, O., Sultana, P., Miyazaki, S., Yoshioka, M., Yamanaka, N., Hirai, N. & Nakajima, Y. 2003a. Detection of Cry1Ab protein in the gastrointestinal contents but not in the visceral organs of genetically modified Bt11-fed calves. *Vet. Hum. Toxicol.* 45, 72-75.
- Chowdhury, E.H., Mikami, O., Murata, H., Sultana, P., Shimada, N., Yoshioka, M., Guruge, K.S., Yamamoto, S., Miyazaki, S., Yamanaka, N. & Nakajima, Y. 2004. Fate of maize intrinsic and recombinant genes in calves fed genetically modified maize Bt11. *J. Food Prot.* 67, 365-370.
- Clark, B.W., Phillips, T.A. & Coats, J.R. 2005. Environmental fate and effects of *Bacillus thuringiensis* (Bt) proteins from transgenic crops: a review. *J. Agric. Food Chem.* 53, 4643-4653.
- Cummins, J., Ho, M.W. & Ryan, A. 2000. Hazardous CaMV promoter? *Nature Biotechnology* 18, 363.
- Daly, T. & Buntin, D. 2005. Effect of *Bacillus thuringiensis* transgenic corn for Lepidopteran control on nontarget arthropods. *Environ. Entomol.* 34, 1292-1301.
- Darvas, B., Csoti, A., Peregovits, L., Ronkay, L., Gharib, A., Kincses, J., Vakkics, G., Polgar, L.A., Juracsek, J., Ernst, A. & Szekacs, A. 2005. The DK-440-BTY (Mon810) Bt-corn pollen and protected Lepidoptera species in Hungary. www.aktionsprogramm2015.de/onlinediskurs/files/butterflies.pdf.
- de Maagd, R.A., Bravo, A. & Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends in Genetics*, 17, 193-199.
- de Schrijvers, A. & Moens, W. 2003. Report on the molecular characterisation of the genetic map of event Mon810. www.biosafety.be/gmcropff/EN/TP/MGC_reports/Report_Mon810.pdf.
- Dively, G.P., Rose, R., Sears, M.K., Hellmich, R.L., Stanley-Horn, D.E., Calvin, D.D., Russo, J.M. & Anderson, P.L. 2004. Effects on monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after

- continuous exposure to Cry1Ab expressing corn during anthesis. *Environ. Entomol.* 33, 1116-1125.
- Doerfler, W. 2000. Foreign DNA in mammalian systems. Wiley-VCH, Weinheim.
- Dolezel, M., Heissenberger, A. & Gaugitsch, H. 2006. Ecological effects of genetically modified maize with insect resistance and/or herbicide tolerance. Bundesministerium für Gesundheit und Frauen, Wien (<http://www.bmgf.gv.at>).
- Duggan, P.S., Chambers, P.A., Heritage, J. & Forbes J., M. 2003. Fate of genetically modified maize DNA in the oral cavity and rumen of sheep. *Br. J. Nutr.* 89, 159-166.
- Dutton, A., Klein, H., Romeis, J. & Bigler, F. 2002. Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecological Entomology* 27, 441-447.
- Eckert, J., Schuphan, I., Hothorn, L.A. & Gathmann, A. 2006. Arthropods on maize ears for detecting impacts of Bt maize on nontarget organisms. *Environ. Entomol.* 35, 554-560.
- EFSA 2005. Opinion of the scientific panel on genetically modified organisms on an application (Reference EFSA-GMO-UK-2004-01) for the placing on the market of glyphosate-tolerant and insect-resistant genetically modified maize NK603 x MON810, for food and feed uses under Regulation (EC) No 1829/2003 from Monsanto. *The EFSA Journal* 309, 1-22.
- Einspanier, R., Klotz, A., Kraft, J., Aulrich, K., Poser, R., Schwägele, F., Jahreis, G. & Flachowsky, G. 2001. The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case-study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 129-134.
- European Communities 2005. Comments by the European Communities on the scientific and technical advice to the Panel. www.foeeurope.org/biteback/download/Comments_part%20I.pdf.
- Felke, M. & Langenbruch, G.A. 2005. Auswirkungen des Pollens von transgenem Bt-Mais auf ausgewählte Schmetterlingslarven. BfN-Skripten 157.
- Greenpeace 2006. Gift im Gen-Mais. Aktuelle Forschung macht Risiken des in Deutschland angebauten Bt-Mais deutlich. www.greenpeace.de
- Griffiths, B.S., Caul, S., Thompson, J., Birch, A.N.E., Scrimgeour, C., Cortet, J., Foggo, A., Hackett, C. & Krogh, P.H. 2006. Soil microbial and faunal community responses to Bt maize and insecticide in two soils. *J. Environ. Qual.* 35, 734-741.
- Groot, A.T. & Dicke, M. 2002. Insect-resistant transgenic plants in a multi-trophic context. *The Plant Journal* 31, 387-406.
- Harwood, J.D., Wallin, W.G. & Obrycki, J.J. 2005. Uptake of Bt endotoxins by nontarget herbivores and higher order arthropod predators: molecular evidence from a transgenic corn agroecosystem. *Mol. Ecol.* 14, 2815-2823.
- Hellmich, R.L., Siegfried, B.D., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E., Daniels, M.J., Mattila, H.R., Spencer, T., Bidne, K.G. & Lewis, L.C. 2001. Monarch larvae sensitivity to *Bacillus thuringiensis*-purified proteins and pollen. *PNAS* 98, 11925-11930.
- Hernandez, M., Pla, M., Esteve, T., Prat, S., Puigdomenech, P. & Ferrando, A. 2003. A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgenic Research* 12, 179-189.
- Hilbeck, A., Meier, M.S. & Raps, A. 2000. Review on non-target organisms and Bt-plants. Report to Greenpeace International Amsterdam. www.greenpeace.org/~geneng/reports/gmo/ecostratbt/pdf
- Hilbeck, A., Baumgartner, M., Fried, P.M. & Bigler, F. 1998a. Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environm. Entomol.* 27, 480-487.
- Hilbeck, A., Moar, W.J., Pusztai-Carey, M., Filippini, A. & Bigler, F. 1998b. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Environm. Entomol.* 27, 1255-1263.
- Hilder, V.A. & Boulter, D. 1999. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection* 18, 177-191.
- Hopkins, D.W. & Gregorich, E.G. 2003. Detection and decay of the Bt endotoxin in soil from a field trial with genetically modified maize. *European J. of Soil Science* 54, 793-800.
- Hütter, E., Bigler, F. & Fried, P.M. 2000. Verwendung transgener schädlingsresistenter Nutzpflanzen in der Schweiz. Schriftenreihe Umwelt Nr. 317, BUWAL Bern.

- Jennings, J.C., Albee, L.D., Kolwyck, D.C., Surber, J.B., Taylor, M.L., Hartnell, G.F., Lirette, R.P. & Glenn, K.C. 2003. Attempts to detect transgenic and endogenous plant DNA and transgenic protein in muscle from broilers fed YieldGard corn borer corn. *Poult.Sci.* 82, 371-380.
- Jesse, L.C.H. & Obrycki, J.J. 2001. Field deposition of Bt transgenic corn pollen: Lethal effects on the monarch butterfly. *Oecologia* 125, 241-248.
- Knols, B.G.J. & Dicke, M. 2003. Bt crop risk assessment in the Netherlands. *Nature Biotechnology* 21, 973-974.
- Lang, A., Arndt, M., Beck, R. & Bauchhenß, J. 2005. Monitoring der Umweltwirkungen des Bt-Gens. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan.
- Lang, A. & Vojtech, E. 2006. The effects of pollen consumption of transgenic Bt maize on the common swallowtail, *Papilio machaon* L. (Lepidoptera, Papilionidae). *Basic Appl. Ecology* 4, 296-306.
- Langenbruch, G.A., Hassan, S.A., Büchs, W., Burgermeister, W., Freier, B. & Hommel, B. 2006. Biologische Sicherheitsforschung mit Bt-Mais. *ForschungsReport* 1/2006, 8-12.
- Lövei, G.L. & Arpaia, S. 2005. The impact of transgenic plants on natural enemies: a critical review of laboratory studies. *Entomol. Experimentalis et Applicata* 114, 1-14.
- Lopez, M.D., Prasifka, J.R., Bruck, D.J. & Lewis, L.C. 2005. Utility of ground beetle species in field test of potential nontarget effects of Bt. crops. *Environ. Entomol.* 34, 1317-1324.
- Losey, J.E. Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399, 214.
- Ludy, C. & Lang, A. 2006. Bt maize pollen exposure and impact on the garden spider *ananeus diadematus*. *Entomol. Experimentalis et Applicata* 118, 145-156.
- Lutz, B., Wiedemann, S., Einspanier, R., Mayer, J. & Albrecht, C. 2005. Degradation of Cry1Ab protein from genetically modified maize in the bovine gastrointestinal tract. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1453-1456.
- Ma, B.L. & Subedi, K.D. 2005. Development, yield, grain moisture and nitrogen uptake of Bt corn hybrids and their conventional near-isolines. *Field Crops Research* 93, 199-211.
- Magg, T., Melchinger, A.E., Klein, D. & Bohn, M. 2002. Relationship between European corn borer resistance and concentration of mycotoxins produced by *Fusarium* spp. in grains of transgenic Bt maize hybrids, their isogenic counterparte and commercial varieties. *Plant Breeding* 121, 146-154.
- Marvier, M. 2002. Improving risk assessment for nontarget safety of transgenic crops. *Ecological Applications* 12, 1119-1124.
- Mazza, R., Soave, M., Morlacchini, M., Piva, G. & Marocco, A. 2005. Assessing the transfer of genetically modified DNA from feed to animal tissues. *Transgenic Research* 14, 775-784.
- Meier, M. & Hilbeck, A. 2001. Influence of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on prey preference of immature *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Basic Appl. Ecol.* 2, 35-44.
- Meissle, M., Vojtech, E. & Poppy, G.M. 2005. Effects of Bt maize-fed prey on the generalist predator *Poecilus curpeus* L. (Coleoptera:Carabidae). *Transgenic Res.* 14, 123-132.
- Millstone, E., Brunner, E. & Mayer, S. 1999. Beyond "substantial equivalence". *Nature* 401, 525-526.
- Moch, K. Ed. 2006. Proceedings of the Conference Epigenetics, Transgenic Plants and Risk Assessment, December 2005. www.oeko.de/oekodoc/277/2006-002-en.pdf.
- Müller, W. 2004. Recherche und Analyse von Indizien bezüglich humantoxikologischer Risiken von gentechnisch veränderten Soja- und Maispflanzen. Studie im Auftrag des Landes Oberösterreich.
- Myhre, M.R., Fenton, K.A., Eggert, J., Nielsen, K.M. & Traavik, T. 2006. The 35S plant virus promoter is active in human enterocyte-like cells. *Eur. Food Res. Technol.* 222, 185-193.
- Nguyen, T.H., Berlinghof, M. & Jehle, J.A. 2002. Expressionsmonitoring von Cry1Ab verschiedener Maislinien an zwei Freisetzungstandorten in Deutschland. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft.* 390, 542-543.
- Novak, W.K. & Haslberger, A.G. 2000. Substantial equivalence of antinutritiva and inherent plant toxins in genetically modified foods. *Food and Chemical Toxicology* 38, 473-483.
- Obrycki, J.J., Losey, J.E., Taylor, O.R. & Jesse, L.C.H. 2001a. Transgenic insecticidal corn: Beyond insecticidal toxicity to ecological complexity. *BioScience* 51,353-361.
- Olsen, K.M. & Daly, J.C. 2000. Plant-toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 93, 1293-1299.
- Pearson, H. 2006. Transgenic cotton drives insect boom. <http://www.nature.com/news/2006/060724/full/060724-5.html>.

- Phipps, R.H., Deaville, E.R. & Maddison, B.C. 2003. Detection of transgenic and endogenous plant DNA in rumen fluid, duodenal digesta, milk, blood, and feces of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86, 4070-4078.
- Pilcher, C.D., Rice, M.E. & Obrycki, J.J. 2005. Impact of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn and crop phenology on five nontarget arthropods. *Environ. Entomol.* 34, 1302-1316.
- Pleasant, J.M., Hellmich, R.L., Dively, G.P., Sears, M.K., Stanley-Horn, D.E., Mattila, H.R., Foster, J.E., Clark, T.L. & Jones, G.D. 2001. Corn pollen deposition on milkweeds in and near cornfields. *PNAS* 98, 11919-11924.
- Poerschmann, J., Gathmann, A., Augustin, J., Langer, U. & Gorecki, T. 2005. Molecular composition of leaves and stems of genetically modified Bt and near-isogenic non-Bt maize – characterization of lignin patterns. *J. Environ. Quality* 34, 1508-1518.
- Prasifka, J.R., Hellmich, R.L., Dively, G.P. & Lewis, L.C. 2005. Assessing the effects of pest management on nontarget arthropods: The influence of plot size and isolation. *Environ. Entomol.* 34, 1181-1192.
- Prescott, V.E., Campbell, P.M., Moore, A., Mattes, J., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., Higgins, T.J.V. & Hogan, S.P. 2005. Transgenic expression of bean alpha-amylase inhibitor in peas results in altered structure and immunogenicity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 9023-9030.
- Prütz, G., Brink, A. & Dettner, K. 2004. Transgenic insect-resistant corn affects the fourth trophic level: effects of *Bacillus thuringiensis*-corn on the facultative hyperparasitoid *Tetrastichus howardi*. *Naturwissenschaften* 91, 451-454.
- Raps, A., Kehr, J., Gugerli, P., Moar, W.J., Bigler, F. & Hilbeck, A. 2001. Immunological analysis of phloem sap of *Bacillus thuringiensis* corn and of the nontarget herbivore *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) for the presence of Cry1Ab. *Molecular Ecology* 10, 525-533.
- Reuter, T. 2003. Vergleichende Untersuchungen zur ernährungsphysiologischen Bewertung von isogenem und transgenem (Bt) Mais und zum Verbleib von "Fremd"-DNA im Gastrointestinaltrakt und in ausgewählten Organen und Geweben des Schweines sowie in einem rohen Fleischerzeugnis. Dissertation Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Romeis, J., Meissle, M. & Bigler, F. 2006. Transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* toxins and biological control. *Nature Biotechnology* 24, 63-69.
- Romeis, J., Dutton, A. & Bigler, F. 2004. *Bacillus thuringiensis* toxin (Cry1Ab) has no direct effect on larvae of the green lacewing *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae). *J. Insect Physiol.* 50, 175-183.
- Saxena, D. & Stotzky, G. 2005. Release of larvicidal Cry proteins in root exudates of transgenic Bt plants. www.isb.vt.edu/news/2005/artspdf/feb0501.pdf.
- Saxena, D., Flores, S. & Stotzky, G. 2002. Bt toxin is released in root exudates from 12 transgenic corn hybrids representing three transformation events. *Soil Biology & Biochemistry* 34, 133-137.
- Saxena, D. & Stotzky, G. 2001a. Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *American Journal of Botany* 88, 1704-1706.
- Saxena, D. & Stotzky, G. 2001b. Bt toxin uptake from soil by plants. *Nature Biotechnology* 19, 199.
- Saxena, D. & Stotzky, G. 2000. Insecticidal toxin from *Bacillus thuringiensis* is released from roots of transgenic Bt corn in vitro and in situ. *FEMS Microbiology Ecology* 33, 35-39.
- Saxena, D., Flores, S. & Stotzky, G. 1999. Insecticidal toxin in root exudates from Bt corn. *Nature* 402, 480.
- Schenkelaars, P. GM food crops and application of substantial equivalence in the European Union. www.sbcbiotech.nl.
- Schmidt, J.E.U. & Hilbeck, A. 2005. Auswirkungen transgener Bt-Kulturpflanzen auf Nichtzielorganismen. *Natur und Landschaft* 80, 330-334.
- Schmidt, J.E.U., Braun, C.U., L'Abate, C., Whitehouse, L.P. & Hilbeck, A. 2004. Untersuchungen zu Effekten von *Bacillus thuringiensis* Toxinen aus transgenen insektenresistenten Pflanzen auf räuberische Marienkäfer (Coleoptera: Coccinellidae). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 14, 419-422.
- Schmitz, G. & Schütte, G. 2001. Insektenresistenz. In: *Transgene Nutzpflanzen*, Hrsg. Schütte, G., Stirn, S. & Beusmann, V., S.123-153. Birkhäuser, Basel.
- Schnurr, J.A. & Guerra, D.J. 2000. The CaMV-35S promoter is sensitive to shortened photoperiod in transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* 19, 279-282.

- Schorling, M. 2005. Ökologische und phytomedizinische Untersuchungen zum Anbau von Bt-Mais im Maiszünsler-Befallsgebiet Oderbruch. Dissertation Universität Potsdam.
- Schröder, D. 2005. Quantifizierung der Beweglichkeit von Bt-Toxinen in Böden. Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden zum Anbau von Bt-Mais. www.edok.01.tib.uni-hannover.de/edoks/e01fb05/487411757.pdf.
- Schubbert, R., Lettmann, C., & Doerfler, W. 1994. Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.* 242, 495-504.
- Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B. & Doerfler, W. 1997. Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 961-966.
- Schubbert, R., Hohlweg, U., Renz, D. & Doerfler, W. 1998. On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol. Gen. Genet.* 259, 569-567.
- Schuler, T.H., Poppy, G.M., Kerry, B.R. & Denholm, I. 1999. Potential side effects of insect-resistant transgenic plants on arthropod natural enemies. *Trends in Biotechnology* 17, 210-216.
- Scientific Committee on Plants SCP 1998. Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the genetically modified, insect resistant maize lines notified by the Monsanto company. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out02_en.html.
- Scientific Committee on Plants SCP 1999. Opinion of the Scientific Committee on Plants on the invocation by Austria of Article 16 (safeguard clause) of Council Directive 90/220/EEC with respect to the placing on the market of the Monsanto genetically modified maize (MON810) expressing the Bt cry1a(b) gene, notification C/F/95/12-02. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scp/out49_en.html.
- Sisterson, M.S. & Tabashnik, B.E. 2005. Simulated effects of transgenic Bt crops on specialist parasitoids of target pests. *Environ. Entomol.* 34, 733-742.
- Smith, N., Kilpatrick, J.B. & Whitlam, G.C. 2001. Superfluous Transgene Integration in Plants. *Critical Review in Plant Sciences* 20, 215-249.
- Spök, A., Hofer, H., Valenta, R., Kienzl-Lochberger, K., Lehner, P., Stirn, S. & Gaugitsch, H. 2003a. Toxikologie und Allergologie von GVO-Produkten – Teil 2A. Monographien Band 164A, Wien.
- Spök, A., Karner, S., Stirn, S. & Gaugitsch, H. 2003b. Toxikologie und Allergologie von GVO-Produkten – Teil 2B. Monographien Band 164B, Wien.
- Spök, A., Karner, S. & Gaugitsch, H. 2002. Evaluating substantial equivalence. A Step towards improving the risk/safety evaluation of GMOs. Tagungsbericht Bd 32, Wien 2002.
- Stanley-Horn, D.E., Dively, G.P., Hellmich, R.L., Mattila, H.R., Sears, M.K., Rose, R., Jesse, L.C.H., Losey, J.E., Obrycki, J.J. & Lewis, L. 2001. Assessing the impact of Cry1Ab-expressing corn pollen on monarch butterfly larvae in fields studies. *PNAS* 98, 11931-11936.
- Stotzky, G. 2000. 2000 Progress report: Toxins of *Bacillus thuringiensis* in transgenic organisms: persistence and ecological effects. <http://es.epa.gov/ncer/progress/grants/97/envbio/stotzky00.html>
- Svitashev, S.K., Pawlowski, W.P., Makarevitch, I., Plank, D.W. & Somers, D.A. 2002. Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal* 32, 433-445.
- Svitashev, S., Ananiev, E., Pawlowski, W.P. & Somers, D.A. 2001. Association of transgene integration sites with chromosome rearrangements in hexaploid oat. *Theor. Appl. Genet.* 100, 872-880.
- Szekacs, A., Juracsek, J., Polgar, L.A. & Darvas, B. 2005. Levels of expressed Cry1Ab toxin in genetically modified corn DK-440-BTY (Yieldgard) and stubble. *FEBS Journal, Supplement 1*, L3-005.
- Tebbe, C. 2003. Nach der Ernte ist das Bt-Toxin nicht einfach verschwunden. www.biosicherheit.de/dr/mais/bt-toxin/243.doku.html.
- Turrini, A., Sbrana, C., Nuti, M.P., Petrangeli, B.M. & Giovanetti, M. 2004. Development of a model system to assess the impact of genetically modified corn and aubergine plants on arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* 266, 69-75.
- Vazquez, R.I., Moreno-Fierros, L., Neri-Bazan, L., de la Riva, G.A. & Lopez-Revilla, R. 1999. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac protoxin is a potent systemic and mucosal adjuvant. *Scand. J. Immunol.* 49, 578-584.

- Vercesi, M.L., Krogh, P.H. & Holmstrup, M. 2006. Can *Bacillus thuringiensis* (Bt) corn residues and Bt-corn plants affect life-history traits in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*? *Applied Soil Ecology*, 32, 180-187.
- Vojtech, E., Meissle, M. & Poppy, G.M. 2005. Effects of Bt maize on the herbivore *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) and the parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *Transgenic Research* 14, 133-144.
- Wandeler, H., Bahylova, J. & Nentwig, W. 2002. Consumption of two Bt and six non-Bt corn varieties by the woodlouse *Porcellio scaber*. *Basic Appl. Ecol.* 3, 357-365.
- Wei, J.Z., Hale, K., Carta, L., Platzer, E., Wong, C., Fang, S.C. & Aroian, R.V. 2003. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *PNAS* 100, 2760-2765.
- Wilson, A., Latham, J. & Steinbrecher R. 2004. Genome scrambling – myth or reality? Transformation-induced mutations in transgenic crop plants. www.econexus.info/pdf/ENx-Genome-Scrambling-Report.pdf.
- Wraight, C.L., Zangerl, A.R., Carroll, M.J. & Berenbaum, M.R. 2000. Absence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* pollen to black swallowtails under field conditions. *PNAS* 97, 7700-7703.
- Wurzer-Faßnacht, U., Gehring, K. & Zellner, M. 2003. Anbau gentechnisch veränderter Pflanzen (GVP): Auswirkungen auf den Verbrauch von Pflanzenschutzmitteln und Bewertung möglicher Veränderungen hinsichtlich der Belastung der Umwelt und des Naturhaushaltes. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Freising-Weihenstephan.
- Zangerl, A.R., McKenna, D., Wraight, C.L., Carroll, M., Ficarello, P., Warner, R. & Berenbaum, M.R. 2001. Effects of exposure to event 176 *Bacillus thuringiensis* corn pollen on monarch and black swallowtail caterpillars under field conditions. *PNAS* 98, 11908-11912.
- Züghart, W., Benzler, A., Berhorn, F., Graef, F. & Sukopp, U. 2005. Monitoring der Wirkungen gentechnisch veränderter Organismen auf Natur und Landschaft nach Marktzulassung. *Natur und Landschaft* 80, 307-312.
- Zwahlen, C., Nentwig, W., Bigler, F. & Hilbeck A. 2000. Tri-trophic interactions of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Environm. Entomol.* 29, 846-850.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Gugerli, P. & Nentwig, W. 2003a. Degradation of the Cry1Ab protein within transgenic *Bacillus thuringiensis* corn tissue in the field. *Molecular Ecology* 12, 765-775.
- Zwahlen, C., Hilbeck, A., Howald, R. & Nentwig, W. 2003b. Effects of transgenic Bt corn litter on the earth-worm *Lumbricus terrestris*. *Molecular Ecology* 12, 1077-1086.
- Zwahlen, C. & Andow, D.A. 2005. Field evidence for the exposure of ground beetles to Cry1Ab from transgenic corn. *Environ. Biosafety Res.* 4, 113-117.