

Neue Erkenntnisse zu möglichen Auswirkungen von transgenem Bt-Mais auf Bienen

¹Dirk Babendreier, ¹Jörg Romeis, ¹Franz Bigler und ²Peter Fluri

¹Agroscope FAL Reckenholz, Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zürich

²Agroscope Liebefeld-Posieux (ALP), Zentrum für Bienenforschung, CH-3003 Bern

Insektenresistente, transgene Nutzpflanzen sind gezielt mit insektentoxischen Eigenschaften ausgestattet, welche sich gegen Schadinsekten richten. Das Insektentoxin kann auch im Pollen gebildet werden, der den Bestäuberinsekten als Nahrung dient. Honigbienen sind als Bestäuber von vielen Kultur- und Wildpflanzen sowohl ökologisch als auch ökonomisch von grosser Bedeutung. Deshalb müssen transgene Nutzpflanzen bienenverträglich sein. In der vorliegenden Studie wurde in einem ersten Experiment die Exposition von Honigbienenlarven gegenüber transgenen Pflanzen untersucht. In einem zweiten Experiment untersuchten wir die Wirkung von Bt-Mais und dem Bt-Toxin in hohen Konzentrationen auf die Entwicklung der Futtersaftdrüse.

Insektenresistente, gentechnisch veränderte (transgene) Nutzpflanzen sind gegen bestimmte Schadinsekten (Zielorganismen) widerstandsfähig, weil sie in den befallenen Pflanzenteilen selbst insektengiftige Proteine bilden können. In Europa ist als transgene, insektenresistente Pflanze bisher ausschliesslich der so genannte Bt-Mais im kommerziellen Anbau, wobei Bt für das weit verbreitete Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* steht. Diese Bt-Maispflanzen produzieren ein Toxin, welches spezifisch gegen Schadschmetterlinge wirkt. In Mitteleuropa ist es vor allem der Maiszünsler, welcher bekämpft wird. Die hohe Spezifität ist dadurch gegeben, dass das Toxin an bestimmte Rezeptoren binden muss und diese Rezeptoren je nach Tiergruppe unterschiedlich sind. Um die Schadorganismen zu bekämpfen, werden die insektengiftigen Proteine primär in den grünen Pflanzenteilen und den Wurzeln gebildet. Darüber hinaus können diese Toxine auch im Pollen vorkommen, wurden jedoch bisher nicht im Nektar gefunden. Dieses liegt auch daran, dass Pollen generell sehr reich an Proteinen ist während Nektar fast ausschliesslich aus Zuckern besteht.

Diese Toxine sollen Nicht-Zielorganismen wie die Honigbienen oder Wildbienen sowie andere Insekten und frei lebende Tiere nicht schädigen. Die Wirkung der Toxine hängt generell von der Menge und der spezifischen Toxizität des gebildeten Proteins sowie von der Exposition ab, das heisst von der Wahrscheinlichkeit und dem Ausmass der Aufnahme des Toxins durch die Nicht-Zielorganismen. Für eine fundierte Risikoanalyse muss aus diesem Grund die Menge Pollen, die von Larven und adulten Bienen aufgenommen wird, genau bekannt sein. Da genaue Daten insbesondere für die Larven fehlen, haben wir im ersten Teil dieser Studie die Menge Pollenkörner quantifiziert, die von einzelnen Honigbienenlarven während der gesamten Entwicklungsdauer aufgenommen und verwertet wird ⁽¹⁾. In einem zweiten Experiment wurde die Auswirkung von Bt-Maispollen auf die Entwicklung der Futtersaftdrüse untersucht ⁽²⁾. Die Mehrzahl der bisher durchgeführten Studien über mögliche Auswirkungen von transgenen Pflanzen auf Bienen hat sich auf die Sterblichkeitsrate konzentriert. Es können darüber hinaus aber auch andere Parameter, zum Beispiel die Futtersaftdrüse, wichtig für die Entwicklung eines Bienenvolkes sein. Für unsere Studie haben wir das System Mais aus zwei Gründen gewählt. Erstens wird Bt-Mais auch in Europa bereits kommerziell angebaut und zweitens ist von der Honigbiene bekannt, dass sie zur Zeit der Maisblüte sehr viel Maispollen einträgt und der Gesamtanteil Maispollen im Jahr 20% betragen kann ⁽³⁾.

Pollenkonsum der Larven

Um den Pollenkonsum von Larven zu bestimmen, wurden diese unter Halbfreilandbedingungen ausschliesslich gegenüber Maispollen exponiert. In drei bienendichten Flugzelten (8 m x 14 m, Abb. 1) wurde nicht transgener Mais gesät (Sorte Monumental), wobei insgesamt etwa 800 Pflanzen pro Käfig wuchsen. Sobald die Maispflanzen zu blühen begannen, wurden in jedes Flugzelt zwei kleine weiselrichtige Honigbienenvölker (ca. 1'000 Bienen in Einwabenkästchen) gestellt. Die

Bienen wurden mit einem proteinfreien Futterteig aus Saccharose und Honig sowie mit Wasser versorgt, hatten jedoch keine Pollenvorräte in den Waben. Dieser Versuchsaufbau stellte sicher, dass die Bienen nur Maispollen sammeln und entsprechend die Larven nur mit dieser einen Sorte Pollen versorgt werden konnten. Wichtig für diesen Versuch ist die Tatsache, dass die Larven der Honigbiene den Darminhalt während der gesamten Wachstumsphase nie leeren. So konnte in den ausgewachsenen Larven die gesamthaft aufgenommene Pollenmenge im Darm gefunden und analysiert werden. Für jedes der insgesamt fünf Völker, die Bruterfolg hatten, wurden zwischen 26 und 35 Larven aus den frisch verdeckelten Zellen entfernt, gewogen und seziiert. Der präparierte Darm wurde in isotonischem Wasser homogenisiert und die Pollen unter dem Binokular ausgezählt. Alle Pollenkörner wurden einer von drei Klassen zugeordnet: vollkommen verdaut (maximal 10% Inhalt im Pollenkorn), teilweise verdaut oder unverdaut (kein erkennbarer Unterschied zu frischem Pollen, siehe Abb. 2).



Abb. 1: Tunnelzelte (8 m x 14 m) mit Mais

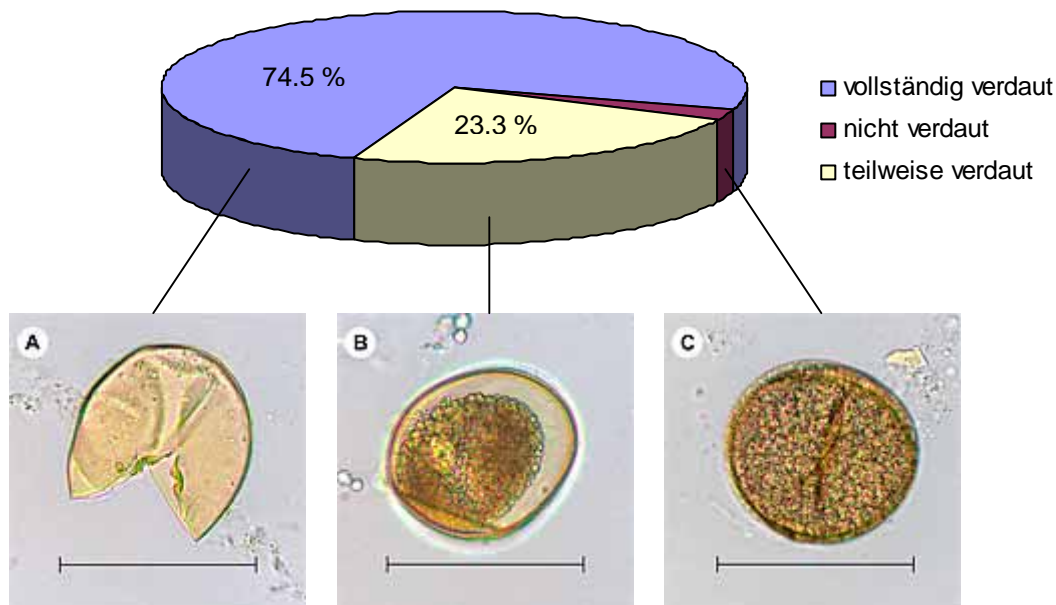


Abb. 2: Anteil des Pollens in den Därmen von Larven der Honigbiene der gar nicht, teilweise oder vollständig verdaut ist (n = 177 Larven aus 5 Völkern). Der Massstab entspricht 0.1 mm.

Gemittelt über die Daten aus je einem Volk wurden zwischen 1720 und 2310 Maispollenkörner im Darm der einzelnen Honigbienenlarven gefunden. Unter Berücksichtigung des Frischgewichtes von Mais-Pollenkörnern entspricht dies zwischen 1.5 und 2.0 mg Pollen (Abb. 3). Durchschnittlich waren 75% der Pollenkörner vollkommen verdaut, während 23% teilweise und 2% unverdaut waren (Abb. 2). In der vorliegenden Studie wurden auch einige Drohnenlarven aufgezogen. Sie waren 39% schwerer als die Arbeiterinnenlarven und enthielten 36% mehr Pollenkörner im Darm. Dies bedeutet, dass die Zahl der Pollen in der Nahrung der Drohnen nicht wesentlich von den bei Arbeiterinnen gefundenen Mengen abweicht.

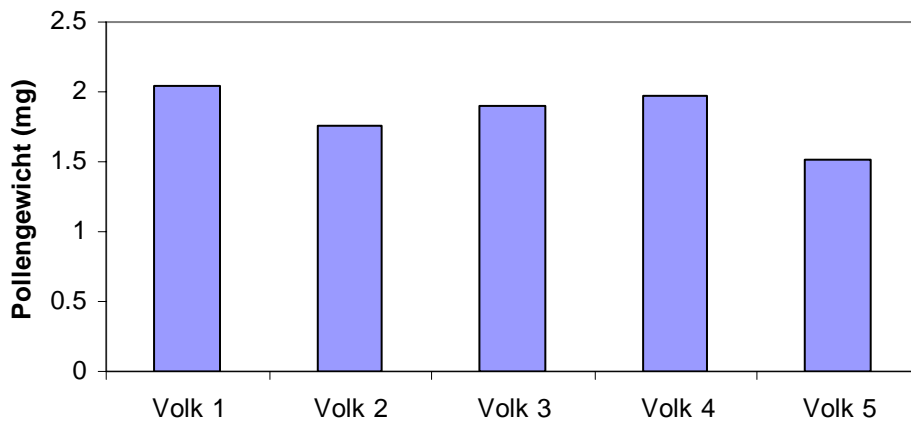


Abb. 3: Durchschnittliche Menge an Pollen, welche die einzelnen Larven aufgenommen haben (n = 26-35 für die 5 Völker).

Wie aber steht die von uns bestimmte Menge an Pollen zu dem Gesamtprotein, das nötig ist, um eine Larve aufzuziehen? Frühere Abschätzungen haben gezeigt, dass ein Volk etwa 160 mg Pollen pro Larve benötigt ⁽⁴⁾. Dies schliesst jedoch den Bedarf der adulten Bienen für das gesamte Jahr mit ein. Ein genaueres Mass erhält man, indem vom Gehalt an Stickstoff der einzelnen Larven (ca. 1.85 mg) ausgegangen wird ⁽⁵⁾. Berücksichtigt man die bereits erfolgte Kotabgabe, den Umrechnungsfaktor von Stickstoff zu Protein und den Gehalt von Protein im Pollen, so errechnet sich für Mais eine ungefähre Pollenmenge von 86 mg, welche nötig ist, um eine einzelne Larve aufzuziehen. Unsere Daten zeigen somit, dass der aus Pollenkörnern stammende Proteinanteil nur ca. 2,5% des Proteinbedarfs der Larven während der gesamten Entwicklungsdauer ausmacht. Der gesamte Rest und damit der bei weitem grössere Teil des Proteins wird den Larven über den Futtersaft verabreicht. Nun ist zu bedenken, dass die Anzahl Pollen in Abhängigkeit verschiedener Faktoren (z.B. Artenspektrum des gesammelten Pollens) variieren könnte. Eine bereits 1955 durchgeführte Studie kommt jedoch zu ähnlichen Ergebnissen ⁽⁶⁾. In der Studie von Simpson wurden die Bienen allerdings nicht experimentell mit einer Sorte Pollen gefüttert, sondern konnten Pollen von verschiedenen Pflanzen im Feld sammeln. Letzteres führt aufgrund der erheblichen Grössenunterschiede der Pollenkörner zu Schwierigkeiten bei der Berechnung der aufgenommenen Pollenmenge.

Die relativ geringe Menge von knapp 2 mg Pollen je Larve bedeutet, dass die Exposition der Honigbienenlarven gegenüber den von transgenen Pflanzen produzierten Toxinen bisher überschätzt wurde. So haben beispielsweise Malone et al. ⁽⁷⁾ Toxinmengen an Bienenlarven verfüttert, die auf Annahmen beruhen, welche ein Vielfaches über den hier ermittelten Werten liegt. Unsere Daten zum Pollenkonsum sollten als Grundlage für weitere Risikostudien zu den Larven der Honigbienen herangezogen werden, um zu gewährleisten, dass realistischere Toxinmengen in Fütterungsversuchen verwendet werden ⁽¹⁾. Die Frage, ob Toxine in die Futtersaftdrüsen der Ammenbienen und zu den Larven gelangen können, wurde in einem zweiten Experiment behandelt (siehe unten).

Effekte auf die Futtersaftdrüsen der Ammenbienen

Die Futtersaftdrüsen der adulten Arbeiterinnen produzieren den proteinreichen Futtersaft für die Larven und sind daher für die Entwicklung der Völker von hoher Bedeutung. Entsprechend könnte die Futtersaftdrüse ein wichtiger Faktor sein, um die Risiken transgener Pflanzen auf Honigbienvölker abzuschätzen. Anhand des Modellsystems Bt-Mais haben wir untersucht, ob die Fütterung von transgenem Pollen Auswirkungen auf die Entwicklung der Futtersaftdrüsen bei Arbeiterinnen hat ⁽²⁾. Die von uns verwendete Sorte MON 810 enthält im Pollen jedoch sehr wenig Bt-Toxin. Daher haben wir darüber hinaus die Bienen auch mit hohen Konzentrationen des reinen Toxins (Cry1Ab, 0,0014%), gelöst in Zuckerwasser, gefüttert. Zusätzlich bekamen die Bienen auch Maispollen der nicht transgenen Sorte (Monumental). Kontrollbienen erhielten ebenfalls diesen Pollen sowie Zuckerlösung ohne Zusatz. Als Positivkontrolle diente ein Proteaseinhibitor (Soja-

bohnen Trypsin Inhibitor, abgekürzt SBTI), von dem negative Wirkungen auf Bienen bekannt sind^(8, 9, 10). Diese Bienen wurden mit nicht transgenem Maispollen und Zuckerlösung gefüttert, welche SBTI in zwei Konzentrationen (0,1% und 1%) enthielt.

In unserem Versuch hielten wir in Klimakammern weiselrichtige und brütende Kleinvölker der Honigbiene mit etwa 250 Arbeiterinnen (Abb. 4). Für jede Behandlung und Behandlungswiederholung wurden zusätzlich 50 frisch geschlüpfte Arbeiterinnen in jedes Kleinvolk eingebracht. Da die Futtersaftdrüsen nach etwa 10 Tagen maximal entwickelt sind, wurde der Versuch nach dieser Zeit abgebrochen. Von jeder Behandlung wurden 24 Bienen seziiert und die entnommene Futtersaftdrüse gefriergetrocknet.



Abb. 4: Kleinvölker in Liebfelder Kästchen mit einer Wabe aus Apidea-Befruchtungskästchen.

Es zeigte sich in diesem Experiment, dass weder der Bt-Maispollen noch das Bt-Toxin nach einer Fütterungszeit von 10 Tagen irgendwelche Auswirkungen auf die Entwicklung der Futtersaftdrüsen zeigten (Abb. 5). Auch die Überlebensrate der Bienen war mit 82.1% für den Bt-Pollen und 89.7% für das Bt-Toxin nicht von der Kontrolle (81.2%) verschieden. Im Gegensatz hierzu verminderte die Behandlung frischgeschlüpfter Bienen mit SBTI (0,1 und 1%) über 10 Tage das mittlere Trockengewicht der Futtersaftdrüsen und den mittleren Durchmesser der einzelnen Drüsensäckchen signifikant (Abb. 5). In der hohen Konzentration (1%) verminderte SBTI auch die Menge der aufgenommenen Zuckerlösung und hemmte die Brutaufzucht. Im Gegensatz hierzu unterschied sich die Pollenaufnahme während des Experiments nicht signifikant zwischen den Behandlungen. Insgesamt wurden in der 1% SBTI Behandlung am Ende des Experimentes nach 10 Tagen nur drei verdeckelte Brutzellen gefunden, während dies in allen anderen Behandlungen zwischen 39 und 140 waren.

Da über die Futtersaftdrüsen möglicherweise auch die von den transgenen Pflanzen gebildeten Toxine an die Larven weitergegeben werden könnten, wurde versucht, diese mit molekularen Methoden nachzuweisen. Hierfür wurde ein ‚ELISA‘ Test eingesetzt mit dem über spezifische Antikörper das Bt-Toxin nachgewiesen werden kann. Mit diesem Test waren sehr geringe Mengen von Bt-Toxin in den Futtersaftdrüsen der mit Bt-Zuckerlösung gefütterten Bienen zu finden. Die Konzentration des Bt-Toxins im Gewebe der Futtersaftdrüse betrug nur etwa ein Tausendstel der Konzentration, die den Bienen verfüttert wurde. Da in den Drüsen der mit Bt-Pollen gefütterten Bienen keine Spuren des Toxins nachgewiesen wurden, ist davon auszugehen, dass die Übertragung des Bt-Toxins über die Futtersaftdrüsen auf die Brut unwahrscheinlich ist oder gegebenenfalls nur in äusserst geringen Mengen erfolgt.

Schlussfolgerung

Die Studie zum Pollenkonsum hat gezeigt, wie wichtig genaue Daten zur Exposition der Bienen gegenüber den von transgenen Pflanzen gebildeten Toxinen sind, und dass die Exposition für die Larven bisher deutlich überschätzt wurde. Da die Pollenaufnahme der Honigbienenlarven nur minimal ist, schliessen wir, dass sie insektiziden Proteinen weit weniger ausgesetzt sind als die Adulten. In einer zweiten Studie konnten wir zeigen, dass die Pollen der Bt-Maissorte MON 810 sowie auch das entsprechende Toxin (Cry1Ab) in hohen Konzentrationen keine negativen Auswirkungen auf die Entwicklung der Futtersaftdrüse haben.

Insgesamt haben die bisher eingesetzten Bt-Toxine auch in vielfach überhöhten Konzentrationen keine negativen Effekte auf Bienen gezeigt, wobei vor allem die Sterberate aber auch andere Parameter wie das Suchverhalten untersucht wurden. Damit in Übereinstimmung sind die bisher zum Thema erschienenen Publikationen zum Schluss gekommen, dass die Bt-Toxine und die entsprechenden transgenen Pflanzen für Bienen ungefährlich sind^(8, 9, 10). Aufgrund des speziellen Wirkungsmechanismus‘ der Bt-Toxine, welche an spezifische Rezeptoren im Darm andocken müssen,

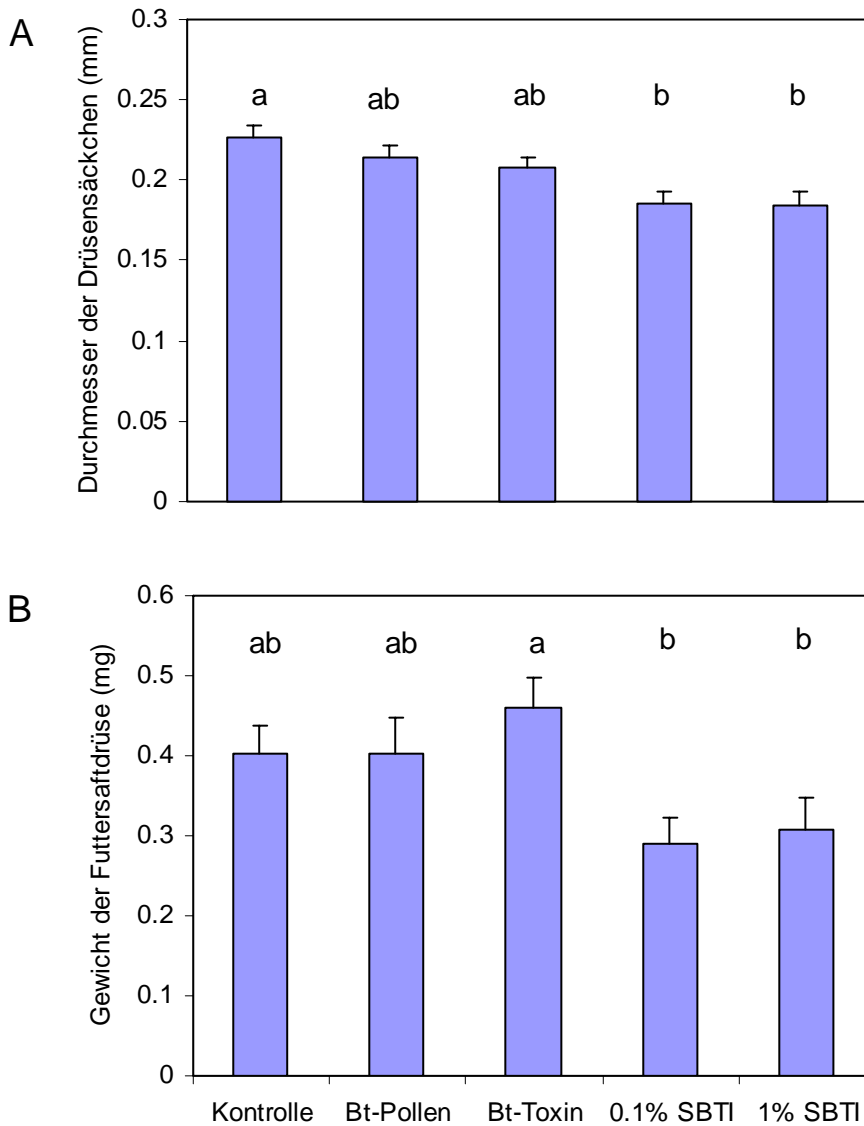


Abb. 5: Mittlerer Durchmesser der einzelnen Drüsensäckchen (A) bzw. mittleres Trockengewicht (B) der Futtersaftdrüse in Abhängigkeit der Behandlung (n = 120). Gleiche Buchstaben über den Balken zeigen, dass keine signifikanten Unterschiede vorhanden sind; bei unterschiedlichen Buchstaben sind die Werte signifikant verschieden.

um ihre Wirkung zu entfalten, sind auch Langzeiteffekte des Bt-Mais auf Bienen sehr unwahrscheinlich. Die in diesem Projekt gewonnenen Erkenntnisse füllen Lücken im vorhandenen Wissen und stimmen mit den bisherigen Schlussfolgerungen der zum Thema transgene Pflanzen und Bienen durchgeführten Studien überein.

Danksagung:

Wir möchten Hans-Ueli Thomas (Zürich) für das Überlassen der Bienenvölker herzlich danken. Nicole Kalberer danken wir für die Unterstützung bei den Experimenten und Lena Obrist für das Durchführen der ELISA Tests. Dieses Projekt wurde mitfinanziert durch das Bundesamt für Umwelt (BAFU).

Literatur

1. Babendreier D., Kalberer N., Romeis J., Fluri P., Bigler F. (2004) Pollen consumption in honey bee larvae: a step forward in the risk assessment of transgenic plants. *Apidologie* 35 (3) 293-300.
2. Babendreier D., Kalberer N., Romeis J., Fluri P., Bigler F. (2005) Influence of transgenic Bt-Pollen, pure Bt-toxin and proteinase inhibitor (SBTI) ingestion on survival and development of the hypopharyngeal gland in the honeybee. *Apidologie* 36 (4) 585-594.
3. Wille H., Wille M., Kilchenmann V., Imdorf A., Bühlmann G. (1985) Pollenernte und Massenwechsel von drei *Apis mellifera* Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren. *Rev. Suisse Zool.* 92 (4) 897-914.
4. Alfonsus E.C. (1933) Zum Pollenverbrauch des Bienenvolkes. *Arch. Bienenkde.* 14 (5) 220-223.
5. Imdorf A., Rickli M., Kilchenmann V., Bogdanov S., Wille H. (1998) Nitrogen and mineral constituents of honey bee worker brood during pollen shortage. *Apidologie* 29 (4) 315-325.
6. Simpson J. (1955) The significance of the presence of pollen in the food of worker larvae of the honeybee, *Quart. J. Microscop. Sci.* 96 (1) 117-120.
7. Malone L.A., Tregidga E.L., Todd J.H., Burgess E.P.J., Philip B.A., Markwick N.P., Poulton J., Christeller J.T., Lester M.T., Gatehouse H.S. (2002) Effects of ingestion of a biotin-binding protein on adult and larval honey bees. *Apidologie* 33 (5) 447-458.
8. Malone L.A., Pham-Delegue, M.H. (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp.). *Apidologie* 32 (4) 287-304.
9. Keil S., Romeis J., Bigler F., Fluri P. (2002) Abschätzung des Risikos von transgenen Pflanzen für Honigbienen. *Schweiz. Bienenztg.* 125 (1) 20-27.
10. Malone L.A. (2004) Potential effects of Gm crops on honey bee health. *Bee World* 85 (2) 29-36.