

# Sind Honigbienen durch den Einsatz von insektenresistenten transgenen Pflanzen einem Risiko ausgesetzt?

Sabine Keil, Jörg Romeis, Peter Fluri\* und Franz Bigler  
Eidgenössische Forschungsanstalt für Agrarökologie und Landbau (FAL),  
Zürich-Reckenholz, CH-8092 Zürich

\*Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft (FAM), Zentrum für Bienenforschung,  
Liebefeld, CH-3003 Bern

*Transgene Pflanzen mit schädlings- und krankheitsresistenten Eigenschaften enthalten fremde Gene, die ursprünglich aus anderen Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen stammen und in das Erbgut eingebaut werden. Diese Gene können beispielsweise Proteine bilden, die genetisch veränderte Pflanze vor Insektenfrass oder Pilzbefall schützen. Ziel ist es, den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln zu verringern und dadurch ein niedrigeres Gefährdungspotential für die Umwelt, den Anwender und den Konsumenten zu erreichen.*

Transgene Pflanzen müssen, wie jedes neue Pflanzenschutzmittel, vor dem kommerziellen Einsatz hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen auf Nicht-Zielorganismen (z.B. Honigbienen) getestet werden. Für die Honigbiene gilt dies aufgrund ihrer ökologischen und wirtschaftlichen Bedeutung im Besonderen. Hinzu kommt, dass die Toxine in allen Pflanzenzellen und somit auch im Pollen, der neben Nektar die Nahrungsgrundlage für Bienen bildet, vorhanden sein können. Im Nektar von transgenen Pflanzen konnten die transgenen Proteine bisher nicht nachgewiesen werden (Malone & Pham-Delègue, 2001). Die vorliegende Literaturübersicht fasst die veröffentlichten Erkenntnisse zum Gefährdungspotential von insektenresistenten transgenen Pflanzen auf Bienen zusammen. Da diese Pflanzen Proteine bilden, die sich gegen Insekten richten, sind Effekte auf Nicht-Zielinsekten, wie z.B. Bienen, am ehesten zu erwarten. Demgegenüber ist das Gefährdungspotential von krankheits- oder herbizidresistenten transgenen Pflanzen auf Bienen als geringer einzuschätzen. Bienen kommt aber auch sonst in der aktuellen Debatte zur Risikoabschätzung von transgenen Pflanzen eine grosse Bedeutung zu da sie an der Verteilung von transgenem Pflanzenmaterial (Pollen) beteiligt sind, welches eventuell zur Auskreuzung der transgenen Pflanzen führen kann. Eine Studie, die grosse Aufmerksamkeit erregte, wies darauf hin, dass es eventuell im Bienendarm zu einer Übertragung von transgenem Material (aus Pollen) auf Mikroorganismen kommen kann (horizontaler Gentransfer) (Reiche *et al.*, 1998). Dieser Sachverhalt konnte bisher jedoch noch nicht endgültig geklärt werden.

Aus der Ernährungsbiologie der Honigbiene ergibt sich, dass grundsätzlich alle Entwicklungsstadien mit dem Toxin in Kontakt kommen können, wenn es im Pollen enthalten ist. Pollen wird von Arbeiterinnen gesammelt und zur weiteren Verarbeitung in den Stock gebracht. Die Höhe des Pollenbedarfes richtet sich nach dem Alter der Biene und ihrer Funktion innerhalb des Volkes. So ist der Pollenbedarf, den eine Biene in ihrer Entwicklung hat, nicht konstant über ihre gesamte Lebensdauer, sondern an das jeweilige Stadium und an die Kaste gebunden. Ein hoher Pollenbedarf besteht bei heranwachsenden Larven sowie bei jungen Arbeiterinnen. Letztere benötigen Protein für die Ausbildung der Futtersaftdrüsen, des Fettkörpers und anderer Organe. Da Sammelbienen Pollen zur Fütterung der Brut und der adulten Bienen in den Stock bringen, kann eine potentielle Gefährdung aller Entwicklungsstadien und



Blühende Rapsfelder können eine ergiebige Nahrungsquelle für blütenbesuchende Insekten sein. Bienenvölker decken manchmal einen namhaften Teil ihres Bedarfes an Pollen und Nektar aus dieser Tracht.

Kasten (Arbeiterinnen, Drohnen, Königin) nicht ausgeschlossen werden.

Die Bienenlarve wird in den ersten 3 bis 4 Tagen mit Futtersaft versorgt. Ältere Larven bekommen auch Pollen und Honig bzw. Nektar. Adulte Bienen vollenden ihre Entwicklung innerhalb von 8-10 Tagen. In dieser Zeit ist die innere Entwicklung (Drüsen, Fettkörper) von der Pollenversorgung abhängig. Wie wichtig die ausreichende Versorgung mit Pollen bei jungen Arbeiterinnen ist, zeigt sich auch an der Lebensspanne, da unter Pollenmangel gehaltene Jungbienen kürzer leben (Maurizio, 1950). Der Pollenbedarf der adulten Bienen ist eng an die jeweilige Tätigkeit gebunden und nimmt mit zunehmenden Alter ab (Hrassnigg & Crailsheim, 1998). Pollen wird von den Arbeiterinnen jedoch nicht nur konsumiert, sondern auch mit Honig und Speichel weiterverarbeitet und dadurch lagerfähig gemacht.

Der gesamte Polleneintrag pro Bienenvolk variiert erheblich, nämlich zwischen 10 und 26 kg pro Jahr (Wille *et al.*, 1985a). Pro Biene wurde ein Pollenbedarf von 163 mg bzw. 36 mg reines Pollenprotein ermittelt (Wille *et al.*, 1985b).



Vorratswabe. Während Zeiten mit grossem Pollenangebot legen die Bienen Vorräte an, die Wochen bis Monate später konsumiert werden.

Die Pollen stammen im Laufe eines Jahres in der Regel von sehr vielen verschiedenen Pflanzenarten. Bei einer Untersuchung im Schweizerischen Mittelland stammten 51% der Gesamternte des Polleneintrags eines Jahres jedoch von wenigen Massentrachten: Mais, Raps, Ahorn, Spitzwegerich, Löwenzahn und Weide (Wille *et al.*, 1985a).

Dieser kurze Einblick in die Ernährungsbiologie der Honigbiene zeigt, dass die Möglichkeiten mit transgenem Pollen in Kontakt zu kommen, zahlreich sind. In der folgenden Übersicht werden die bisherigen Studien über den Einfluss insektenresistenter transgener Pflanzen auf die Honigbiene diskutiert. Hierbei ist zu betonen, dass die meisten Studien mit dem reinen Toxin und nicht mit transgenen Pflanzen durchgeführt wurden.

<b>Glossar</b>	
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Bodenbakterium, das für Insekten giftige Proteine bildet
Genexpression	Umsetzung der genetischen Information in ein Protein
Gen	kleinste Informationseinheit des Erbmateriale
Herbizid	chemisches Pflanzenschutzmittel, das zur Bekämpfung von Unkraut eingesetzt wird
Horizontaler Gentransfer	Transfer genetischer Information zwischen Organismen durch Überspringen der Kreuzungsschranken
Protease-Inhibitor	Hemmer von Darmenzymen, die beim chemischen Aufschluss von Proteinen von Bedeutung sind
Protein	Eiweiss
Toxin	Giftstoff
transgen	Bezeichnung von Organismen, in deren Genom mittels gentechnischer Methoden ein oder mehrere Gene eines anderen Organismus eingebaut wurden

# Wirkung transgener Pflanzen

## a) *Bacillus thuringiensis* (Bt) - Toxine

*Bacillus thuringiensis* (Bt) ist ein Bodenbakterium, das verschiedene, für bestimmte Insektenordnungen toxische Proteinkristalle produziert. Je nach Bt- Subspecies (als Cry bezeichnet) wirken diese Proteinkristalle spezifisch auf Lepidopteren (Schmetterlinge), Coleopteren (Käfer) oder Dipteren (Zweiflügler, z.B. Fliegen). Die Bt-Toxine wirken auf das Verdauungssystem der Insekten ein, wodurch es zur Einstellung der Nahrungsaufnahme kommt. In den handelsüblichen Bt-Spritzmitteln liegen die Toxine in einer inaktiven Form vor und werden nach der Nahrungsaufnahme erst im Darmmilieu aktiviert. Bt-Spritzmittel werden schon seit einigen Jahren erfolgreich im Pflanzenschutz eingesetzt und gelten als nützlingsschonend. Da die Anwendung der Bt-Spritzmittel häufig nach der Blüte stattfindet, die Persistenz der Bakterien in der Umwelt gering ist und die Toxine in ihrer inaktiven Form vorliegen, wird die Gefährdung für Bienen und andere blütenbesuchende Insekten im allgemeinen als gering eingestuft. Transgene Pflanzen dagegen, denen ein Bt-Gen transferiert wurde, exprimieren diese toxischen Proteine in der Regel in allen Pflanzenteilen und somit auch im Pollen. Im Unterschied zu den Bt-Spritzmitteln liegen die toxischen Bt-Genprodukte in den transgenen Pflanzen schon in ihrer aktiven Form vor.

### Versuche mit gereinigtem Bt-Toxin

Die gereinigten Toxine sind in mehreren Studien hinsichtlich ihrer Toxizität auf Bienen getestet worden. Untersuchungen mit gereinigtem CryIAc Toxin (wirksam gegen Lepidopteren) aus transgener Baumwolle ergaben keine signifikante Wirkung auf die Mortalität von Larven und adulten Honigbienen (Sims, 1995). Die getestete Konzentration überstieg diejenige in den Pollen transgener Baumwolle um mehr als das 100fache. Larven im Alter von 1-3 Tagen erhielten die Toxinlösung (Toxin in destilliertem Wasser) in den Brutwaben während adulten Bienen eine Honig-Wasser-Lösung mit zugesetztem Toxin verabreicht wurde. Übereinstimmend mit diesen Resultaten sind Untersuchungen, die mit gereinigtem CryIIA Toxin (wirksam gegen Lepidopteren und Dipteren) und entsprechend dem in transgener Baumwolle produziertem Proteingehalt, durchgeführt wurden (Sims, 1997). Sowohl bei Larven (2-3 Tage alt) als auch bei Adulten (3 Tage alt) wurde keine erhöhte Mortalität nach Aufnahme des CryIIA Proteins festgestellt.

In einer weiteren Studie wurde gereinigtes CryIIIB Toxin (wirksam gegen Coleopteren) in Zuckerlösung an adulte Honigbienen verfüttert. Das Toxin hatte keine Wirkung auf die Brutentwicklung, die Überlebensraten der Larven sowie das Puppengewicht (Arpaia, 1996).

In einer anderen Studie wurde gereinigtes CryIBa Toxin (wirksam gegen Lepidopteren) in drei Konzentrationen in ein Pollen enthaltendes Nährmedium gemischt und frisch geschlüpften Honigbienen während 7 Tagen verabreicht (Malone *et al.*, 1999). Die Resultate ergaben hinsichtlich der Lebensdauer und der Futteraufnahme keine Unterschiede zu den Bienen, die Pollenfutter ohne Bt-Toxin bekamen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde Arbeiterinnen 7 Tage lang Pollenfutter mit Zusatz von gereinigtem CryIBa Toxin verabreicht. Die farblich markierten Bienen wurden anschliessend in ihren Stock zurückgebracht und wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Lebensdauer und Flugaktivität gegenüber Kontrolltieren auf, die toxinfreies Futter bekommen hatten (Malone *et al.*, 2001).



Bienenlarven vermehren ihr Körpergewicht während der sechstägigen Fressphase um rund das tausendfache. Dabei nehmen sie mit dem Futtersaft eine Eiweissmenge auf, die in rund 160 mg Pollen enthalten ist. Sammelbienen tragen diese Menge in rund 8 Pollensammelflügen ein (20 mg Pollen pro Flug).

## Versuche mit Pollen von transgenen Bt-Pflanzen

Es liegt bisher nur eine Studie vor, in der Pollen von gentechnisch veränderten Bt-Pflanzen an Bienenlarven verfüttert wurde (Ahl-Goy *et al.*, 1995). Die Larven (4 Tage alt) wurden mit Bt-Pollen bzw. mit Pollen von nicht-transformierten Maispflanzen in den Brutwaben gefüttert. Es konnte kein Effekt von Bt-Maispollen auf die Entwicklung der Bienen festgestellt werden. Die Überlebensrate der Larven in der Kontrollgruppe war mit 65 % jedoch deutlich niedriger als die der Larvengruppe (95 %), die das Toxin verabreicht bekommen hatte. Aufgrund der eingeschränkten Methodenbeschreibung in der Publikation können diese Daten nicht interpretiert werden.

In einem Halbfreiland-Versuch unter Verwendung eines Tunnelzeltes wurde der Einfluss von transgenen Bt-Maispflanzen (CryIAb) auf Mortalität, Brutentwicklung und Sammelverhalten bei Honigbienen untersucht (Schur *et al.*, 2000). Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet konnten keine negativen Effekte des Bt-Maispollens auf die Bienen festgestellt werden, aber es zeigte sich am ersten Versuchstag auch hier eine auffällig hohe Mortalität der unbehandelten Kontrolltiere im Vergleich zu den behandelten Tieren. Die Methodenbeschreibung ist hier ebenfalls für eine aussagekräftige Bewertung nicht ausreichend.

## b) Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitoren (PI) sind Enzymhemmer und können pflanzlichen, tierischen oder mikrobiischen Ursprungs sein. In Insekten bewirken sie nach Aufnahme eine Hemmung der Verdauungsenzyme (Proteasen) im Darm, so dass das Futter nicht vollständig verwertet werden kann und Mangelerscheinungen auftreten, die schliesslich zum Tod führen können. Protease-Inhibitoren werden je nach ihren Bindungsaktivitäten in 4 Hauptgruppen eingeteilt (Tab. 1).

Tabelle 1. Übersicht Protease-Inhibitoren

<b>Bindungstyp</b>	<b>Protease-Inhibitor</b>
Serin-Typ	BBI (Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor)
	BPTI or Aprotinin (Bovine pancreatic trypsin inhibitor)
	CpTI (Cowpea trypsin inhibitor)
	POT-I (Potato Proteinase inhibitor I)
	POT-II (Potato Proteinase inhibitor II)
	SBTI (Soybean Kunitz trypsin inhibitor)
Cystein-Typ	Cystatin (chicken egg white cystatin)
	OC-I (Oryzacystatin)
Aspartyl-Typ	
Metallo-Typ	

Je nach Bindungsspezifität des PI und der Zusammensetzung der Darmenzyme einer bestimmten Insektenart kann die Hemmung ein oder mehrere Enzyme betreffen. Im Fall der Honigbiene spielen proteolytische Enzyme, wie z. B. Serinproteasen, eine wichtige Rolle bei der Proteinspaltung, während Cysteinproteasen nicht gefunden werden konnten (Jimenez & Gilliam, 1989). Mit einer Wirkung der PI vom Serin-Typ auf die Darmenzymaktivität der Bienen kann daher gerechnet werden. Bisher wurden noch keine Untersuchungen mit transgenen PI-Pflanzen hinsichtlich ihrer Wirkung auf Nicht-Zielorganismen durchgeführt. Für die Untersuchungen bezüglich der Wirkungen von PI auf Honigbienen wurde ausschliesslich gereinigtes Protein verwendet. Versuche mit PI-Pflanzen bzw. mit Pollen von PI-Pflanzen wurden nicht durchgeführt.

## Wirkung auf Überlebensrate und Lebensdauer

*PI vom Serin-Typ:* Die akute Toxizität der PI auf Honigbienen wurde in Kurz- und Langzeittests untersucht und anhand der Überlebensrate und der Lebensdauer bestimmt. In mehreren Kurzzeitstudien (Dauer < 4 Tage) konnten keine schädigenden Effekte der PI gefunden werden. Die Zugabe von BBI aus Sojabohnen führte nach 4 Tagen bei Sammelbienen (Alter unbekannt) in keiner der getesteten Dosierungen zu einer erhöhten Mortalität (Belzunces *et al.*, 1994). Andere Tests mit BBI in hohen Konzentrationen zeigten ebenfalls keine toxische Wirkung auf adulte Bienen (Alter unbekannt). Diese Konzentrationen lagen weit über dem Toxingehalt, der in transgenen Pflanzen zu erwarten ist (Bonadé-Bottino *et al.*, 1998). In einer weiteren Studie wurden 2 Wochen alte Bienen mit BBI (in Zuckerlösung) gefüttert. Die behandelten Tiere unterschieden sich hinsichtlich ihrer Überlebensrate nicht von denen der unbehandelten Kontrollgruppe (Girard *et al.*, 1998). In einer Langzeitstudie (80 Tage) mit BBI in der höchsten getesteten Konzentration führte die Zugabe des PI bei frischgeschlüpften Arbeiterinnen zu einer erhöhten Mortalität (Pham-Delègue *et al.*, 2000).

Die Verabreichung einer hohen Konzentration von BPTI führte nach 8-16 Tagen zu einer erhöhten Mortalität bei frisch geschlüpften Bienen (Malone *et al.*, 1995). In einer Langzeitstudie (60 Tage) wurden ebenfalls toxische Effekte gefunden. Die Zugabe dieses PI in hohen Konzentrationen hatte eine Verkürzung der Lebensdauer behandelter Bienen zur Folge, während niedrigere Konzentrationen keine Wirkung hatten (Burgess *et al.*, 1996).

In einer weiteren Studie mit einem PI vom Serin-Typ, CpTI, konnte weder nach Verabreichung über das Futter noch nach Injektion eine Beeinträchtigung in der Lebensdauer von adulten Bienen (15 Tage alt) innerhalb von 2 Tagen festgestellt werden (Picard-Nizou *et al.*, 1997). Eine Kurzzeitstudie berichtet über die signifikante Reduktion der Lebensdauer bei frischgeschlüpften Bienen, die POT-I und POT-II (aus Kartoffeln) bekommen hatten (Malone *et al.*, 1998). Der Protease-Inhibitor SBTI bewirkte in einer erhöhten Konzentration bei frischgeschlüpften Bienen nach 8-16 Tagen eine zunehmende Mortalität (Malone *et al.*, 1995). In einer Langzeitstudie traten bei frischgeschlüpften Bienen toxische Effekte 60 Tage nach Aufnahme dieses PI auf (Burgess *et al.*, 1996). Zu ähnlichen Resultaten kommen die Autoren einer weiteren Studie, in der über eine erhöhte Mortalität bei mit SBTI behandelten Arbeiterinnen nach 80 Tagen berichtet wird (Pham-Delègue *et al.*, 2000).

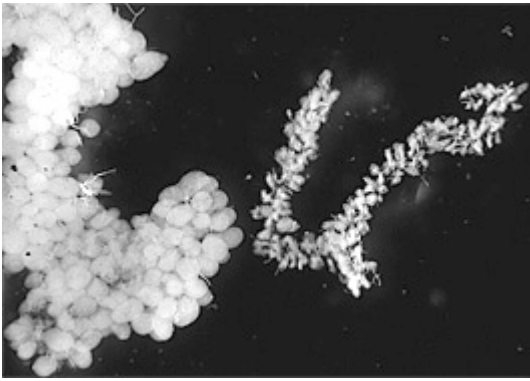
In einigen Studien wurde direkt nachgewiesen, dass die Aktivität der Darmenzyme bei Aufnahme von PI des Serin-Typs herabgesetzt wird (Belzunces *et al.*, 1994; Burgess *et al.*, 1996; Malone *et al.*, 1995, 1998). Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass die Biene in der Lage ist, der verminderten Enzymaktivität beispielsweise durch Bildung weiterer Verdauungsenzyme entgegenzuwirken (Girard *et al.*, 1998).

*PI vom Cystein-Typ:* Die Überlebensraten von 2 Wochen alten Bienen, die Cystatin oder OC-I in Zuckerlösung bekamen, unterschieden sich nicht von denen der unbehandelten Kontrollgruppe (Girard *et al.*, 1998). Hinsichtlich der Darmenzymaktivität konnte ebenfalls kein Einfluss der beiden PI gefunden werden (Girard *et al.*, 1998).

Die Studien machen deutlich, dass nur im Falle der PI vom Serin-Typ toxische Effekte auf Bienen gefunden werden konnten, während PI vom Cystein-Typ in keiner der bisher durchgeführten Tests einen Einfluss auf die Lebensdauer hatten. Jedoch trat eine schädigende Wirkung der PI vom Serin-Typ nur ein, wenn hohe Konzentrationen verabreicht wurden, die in diesem Masse aber nicht in den transgenen Pflanzen zu erwarten sind. Es ist allerdings festzustellen, dass die Untersuchungen ausschliesslich mit adulten Bienen



Nach dem Schlüpfen fressen junge Bienen während einigen Tagen nochmals intensiv Pollen und bilden dabei Organe wie die Futtersaftdrüsen oder den Fettkörper voll aus.



Futtersaftdrüsen im Vergleich: 12 tägige Ammenbiene (links) und 24 tägige Sammelbiene (rechts). Voraussetzung für die Drüsenentwicklung ist eine ausreichende Pollenaufnahme durch die jungen Bienen.

durchgeführt wurden, obwohl die Pollenaufnahme (Futtersaftgemisch, u.a. Pollen) bereits im Larvenstadium beginnt und Larven somit ebenfalls einer Gefährdung durch transgenen Pollen ausgesetzt sein könnten.

### Wirkung auf das Lernverhalten

Neben Untersuchungen über die direkte Toxizität der Protease-Inhibitoren und dem physiologischen Einfluss auf die Darmenzyme, wurde auch die Wirkung auf das Lernverhalten der Bienen geprüft. Im Lernversuch macht man sich die Tatsache zunutze, dass Bienen ihre Zunge ausfahren, wenn sie mit einer Zuckerlösung in Kontakt kommen. Wird ihnen gleichzeitig ein bestimmter Duftstoff angeboten, lernen sie den Geruch mit der Belohnung (Zuckerlösung) zu assoziieren. Der Lerneffekt tritt dann ein, wenn sie die Mundwerkzeuge anschliessend nur aufgrund des angebotenen Duftstoffes ausfahren.

*PI vom Serin-Typ:* In einem Lernversuch führte die 15-tägige Fütterung von BBI in einer hohen Konzentration zu einer signifikanten Reduktion des Lernverhaltens, während schwächere Dosierungen keinen Einfluss hatten (Pham-Delègue *et al.*, 2000). Demgegenüber zeigte BBI keine Wirkung, wenn die Tiere zunächst mit toxinfreiem Futter aufgezogen wurden und den PI im Alter von 14-16 Tagen im Lernversuch verabreicht bekamen (Girard *et al.*, 1998). CpTI in hohen Konzentrationen löste dagegen Veränderungen des Lernverhaltens bei Arbeiterinnen (14-16 Tage alt) aus (Picard-Nizou *et al.*, 1997). Der Inhibitor SBTI hatte keinen Einfluss auf das Lernvermögen der Bienen (Pham-Delègue *et al.*, 2000).

*PI vom Cystein-Typ:* Es konnte weder nach Zugabe von Cystatin noch nach OC-I eine Veränderung des Lernvermögens bei 14-16 Tage alten Bienen festgestellt werden (Girard *et al.*, 1998). Eine Mischung von OC-I und BBI zeigte ebenfalls in keiner der getesteten Konzentrationen eine Wirkung auf das Lernverhalten, wenn den Bienen dieses Toxin 15 Tage lang verabreicht wurde (Pham-Delègue *et al.*, 2000).

Die bisherigen Studien lassen darauf schliessen, dass ein Effekt auf das Lernverhalten der Bienen nur von PI hervorgerufen werden kann, die dem Serin-Typ angehören.

## Diskussion

Die vorliegenden Studien über den Effekt transgener Bt-Pflanzen bzw. ihrer Produkte auf Bienen zeigen, dass unter Laborbedingungen bis jetzt keine schädigenden Effekte aufgetreten sind. Demgegenüber wurden toxische Effekte von gereinigtem PI auf Bienen im Labortest gefunden. Aufgrund der Daten lässt sich bisher wenig über den Einfluss unter natürlichen Bedingungen (Bienenstock) sagen, da die Übertragbarkeit der durchgeführten Studien auf die Situation im Feld nicht gegeben ist. Dies liegt unter anderem daran, dass ein Grossteil der Untersuchungen im Labor und mit dem gereinigten Toxin durchgeführt wurde. Hinzu kommt, dass bisher nur wenige Untersuchungen mit Bienenlarven vorliegen, obwohl auch dieses Entwicklungsstadium bereits den transgenen Proteinen ausgesetzt sein kann. Die Ernährungsbiologie der Bienen zeigt, dass ein Kontakt mit transgenem Pollen und eine eventuelle Gefährdung grundsätzlich bei allen Larven- und Adultstadien sowie Kasten gegeben ist, da die Aufnahme von Pollen die wichtigste Proteinquelle darstellt. Bei jungen Arbeiterinnen beispielweise ist der Pollenbedarf wegen der Futtersaftdrüsenentwicklung besonders hoch. Bisherige Fütterungsversuche mit transgenen Produkten berücksichtigen diese Aspekte zu wenig. Zwar wurden auch junge Arbeiterinnen getestet, jedoch erhielten diese das Toxin gelöst in Zuckerlösung und nicht in Form von transgenem Pollen. Letzteres ist umso wichtiger, da bisher nicht klar ist, ob und wie sich die Toxizität des transgenen Pollens ver-

ändert, wenn dieser von der Ammenbiene vorverdaut und an Larven und andere Stockbienen verfüttert wird.

Die bisherigen Versuche mit Toxinen von *Bacillus thuringiensis* lassen den vorläufigen Schluss zu, dass die Möglichkeit einer Gefährdung von Bienen durch Bt als gering einzustufen ist. In keiner der durchgeführten Bienenstudien konnte eine Beeinträchtigung der Lebensdauer nach Aufnahme des Toxins festgestellt werden. Jedoch wurden die Untersuchungen auch hier meist mit Adulten unterschiedlichen Alters und nur wenige mit Larven unter Verwendung des gereinigten Toxins durchgeführt. Gegenwärtig sind Bt-Pflanzen die einzigen insektenresistenten Pflanzen, die kommerziell angebaut werden. Ob jedoch letztendlich davon ausgegangen werden kann, dass kein Risiko von Bt-Pflanzen auf Bienen vorliegt, kann bisher nicht abschliessend beantwortet werden, da zu wenig Untersuchungen mit transgenen Produkten, z.B. Pollen, und den besonders gefährdeten Larvenstadien durchgeführt wurden. Die beiden einzigen Studien, die mit transgenen Bt-Pflanzen gemacht wurden, zeigen zwar ebenfalls keinen toxischen Effekt für die getesteten Stadien, jedoch ist in beiden Fällen die Methodenbeschreibung ungenau und die hohen Mortalitäten der jeweiligen Kontrollgruppen stellen die Relevanz der Ergebnisse in Frage.

Laborstudien mit Protease-Inhibitoren zeigen, dass diese Toxine in ihrer gereinigten Form toxisch auf Bienen wirken können. Untersuchungen mit transgenen PI-Pflanzen (und z.B. mit Pollen) fehlen bisher. In Langzeitstudien konnte eine Beeinträchtigung der Lebensdauer bei Bienen festgestellt werden, wenn hohe PI-Konzentrationen in den Futterlösungen verabreicht wurden. Es scheint naheliegend, dass Serin-PI einen toxischen Effekt hervorrufen können, denn Serinproteasen herrschen im Verdauungssystem der Bienen vor. Cysteinproteasen konnten dagegen nicht gefunden werden (Jimenez & Gilliam, 1989). Einige Studien haben gezeigt, dass geringe Konzentrationen von Serin-PI einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben können, ohne jedoch die Mortalität zu erhöhen. Zusätzlich wurde das Lernverhalten der Bienen nach Zugabe einiger PI vom Serin-Typ negativ beeinflusst, während dieser Effekt nach Verabreichung von PI des Cystein-Typs nicht beobachtet werden konnte.

In einem kürzlich erschienenen Übersichtsartikel über die Wirkung transgener Produkte auf Honigbienen und Hummeln betonen die Autorinnen, dass Informationslücken über den exakten Toxingehalt in transgenen Produkten derzeit das grösste Hindernis in der Planung geeigneter Toxizitätstests mit Bienen darstellen (Malone & Pham-Delègue, 2001). Hierin und im Fehlen von Standardtests sehen sie die Grenzen der Aussagekraft bisher durchgeführter Untersuchungen. Ebenfalls verweisen sie auf die Notwendigkeit detaillierterer Studien u.a. mit Larven, Tests mit anderen Kasten (Überlebensdauer und Fertilität der Königin, Drohnen) sowie auf die Untersuchung der Futtersaftdrüsenentwicklung der Arbeiterinnen. Vorausgehend sollte die Frage geklärt werden, welcher Toxinkonzentration das jeweilige Entwicklungsstadium (und Kaste) wirklich ausgesetzt ist, da sich der Pollenbedarf im Entwicklungszyklus ändert. Weiterhin müssen die im Labor gefundenen Resultate möglichst im Halbfreilandtest bzw. im Feld mit transgenen Pflanzen anstatt mit gereinigten Proteinen durchgeführt und überprüft werden. Bei der Auswahl transgener Pflanzen sollte ausserdem die Blütenattraktivität berücksichtigt werden. So haben Studien mit transgenem Raps gezeigt, dass sowohl das Nektarvolumen als auch die Nektarqualität verändert sein könnte (Picard-Nizou *et al.*, 1995).



Maispollen wird von Honigbienen im Juli – August oft intensiv gesammelt und kann bis zu 30 % der Jahrespollenernte eines Volkes ausmachen. (Foto J. Hättenschwiler)

## Schlussfolgerungen

1. Die bisherigen Versuche mit Bt-Pflanzen und gereinigtem Bt-Toxin haben keine schädliche Wirkung auf Honigbienen gezeigt.
2. In Laborstudien mit bestimmten gereinigten Protease-Inhibitoren konnte eine toxische Wirkung auf Bienen nachgewiesen werden.
3. In den Versuchen wurde nur ein Teil der Entwicklungsstadien getestet obwohl die Ernährungsbiologie der Biene deutlich macht, dass grundsätzlich alle Stadien und Kasten mit transgenem Material (Pollen) in Kontakt kommen können.
4. Die vorliegenden Studien erlauben keine abschliessende Beurteilung der Risiken von insektenresistenten transgenen Pflanzen auf Honigbienen.

## Zusammenfassung

Die Einführung transgener Pflanzen zur Bekämpfung von Schadinsekten wirft die Frage auf, welche Wirkung diese auf nützliche Insekten, wie z.B. Honigbienen, haben können. In diesem Zusammenhang wurden in den letzten Jahren mehrere Studien über den Einfluss transgener Pflanzen auf Bienen publiziert. Im vorliegenden Übersichtsartikel werden Studien vorgestellt, die den Einfluss von *Bacillus thuringiensis* (Bt) -Toxinen und Protease-Inhibitoren (PI) auf Bienen untersuchten. Die getesteten Effekte umfassen den Einfluss auf die Lebensdauer, auf die Aktivität von Verdauungsenzymen sowie auf das Lernverhalten der Honigbienen. Die Mehrzahl der Studien wurde unter Laborbedingungen durchgeführt, wobei die Toxizität der transgenen Pflanzen bzw. der gereinigten Proteine in Kurz- und Langzeittests untersucht wurde. Während die Untersuchungen mit Bt-Pflanzen oder mit ihren Produkten bisher keine schädigenden Wirkungen auf Honigbienen ergaben, konnten im Labor toxische Effekte von PI in gereinigter Form gefunden werden. Da für die Verdauungsvorgänge im Bienendarm vor allem Enzyme vom Serin-Typ von Bedeutung sind, haben PI, die gegen diese Enzyme gerichtet sind, den grössten Einfluss. Die vorliegenden Studien erlauben keine abschliessende Beurteilung der Risiken von insektenresistenten transgenen Pflanzen auf Honigbienen.

## Literatur

- Ahl Goy, P., Warren, G., White, J., Privalle, L. Fearing, P. and Vlachos, D. (1995) Community impact: effects on microorganisms or insects. *Mitteilungen der Biologischen Bundesanstalt Berlin* **309**, 50-53.
- Arpaia, S. (1996) Ecological impact of Bt-transgenic plants: 1. Assessing possible effects of CryIIIB toxin on honey bee (*Apis mellifera* L.) colonies *Journal of Genetics and Breeding* **50**, 315-319.
- Belzunces, L.P., Lenfant, C. di Pasquale, S. and Colin, M.E. (1994) In vivo and in vitro effects of wheat germ agglutinin and Bowman-Birk soybean trypsin inhibitor, two potential transgene products, on midgut esterase and protease activities from *Apis mellifera*. *Comparative biochemistry and Physiology* **109 B**, 63-69.
- Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Jouanin, L., Le Métayer, M., Picard-Nizou, A.-L., Sandoz, G., Pham-Delègue, M.-H. and Jouanin, L. (1998) Effects of transgenic oilseed rape expressing proteinase inhibitors on pest and beneficial insects. *Acta Horticultura* **459**, 235-239.
- Burgess, E.P.J., Malone, L.A. and Christeller, J.T. (1996) Effects of two proteinase inhibitors on the digestive enzymes and survival of honey bees (*Apis mellifera*) *Journal of Insect Physiology* **42**, 823-828.
- Girard, C., Picard-Nizou, A.-L., Grallien, E., Zacommer, B., Jouanin, L. and Pham-Delègue, M.-H. (1998) Effects of proteinase inhibitor ingestion on survival, learning abilities and digestive proteinases of the honeybee. *Transgenic Research* **7**, 239-246.
- Hrassnigg, N. & Crailsheim, K. (1998) The influence of brood on the pollen consumption of worker bees (*Apis mellifera* L.) *Journal of Insect Physiology* **44**, 393-404.
- Jimenez, D.R. & Gilliam, M. (1989) Age-related changes in midgut ultrastructure and trypsin activity in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **20**, 287-303.



- Malone, L.-A., Giaccon, H.A., Burgess, E.P.J., Maxwell, J.Z., Christeller, J.T. and Laing, W.A. (1995) Toxicity of trypsin endopeptidase inhibitors to honey bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology* **88**, 46-50.
- Malone, L.-A., Burgess, E.P.J., Christeller, J.T. and Gatehouse, H.S. (1998) In vivo responses of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *Journal of Insect Physiology* **44**, 141-147.
- Malone, L.-A., Burgess, E.P.J. and Stefanovic, D. (1999) Effects of a *Bacillus thuringiensis* toxin, two *Bacillus thuringiensis* biopesticide formulations, and a soybean trypsin inhibitor on honey bee (*Apis mellifera* L.) survival and food consumption. *Apidologie* **30**, 465-473.
- Malone, L.A., Burgess, E.P.J., Gatehouse, H.S., Voisey, C.R., Tregidga, E.L. and Philip, B.A. (2001) Effects of ingestion of a *Bacillus thuringiensis* toxin and a trypsin inhibitor on honey bee flight activity and longevity. *Apidologie* **32**, 57-68.
- Malone, L.A. & Pham-Delègue, M.-H. (2001) Effects of transgene products on honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus* sp). *Apidologie* **32**, 1-18.
- Maurizio, A. (1950) The influence of pollen feeding and brood rearing on the length of life and physiological condition of the honeybee. *Bee world* **31**, 9-12.
- Pham-Delègue, M.-H., Girard, C., Le Métayer, M., Picard-Nizou, A.-L., Hennequet, C., Pons, O. and Jouanin, L. (2000) Long-term effects of soybean protease inhibitors on digestive enzymes, survival and learning abilities of honeybees. *Entomologia Experimentalis and Applicata* **95**, 21-29.
- Picard-Nizou, A.L., Pham-Delègue, M.H., Kerguelen, V., Douault, P., Marilleau, R., Olsen, L., Grison, R., Toppan, A. and Masson, C. (1995) Foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) on transgenic oilseed rapoe (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Transgenic Research* **4**, 270-276.
- Picard-Nizou, A.-L., Grison, R., Olson, L., Pioche, C., Arnold, G. and Pham-Delègue, M.H. (1997) Impact of proteins used in plant genetic engineering: toxicity and behavioral study in the honeybee. *Journal of Economic Entomology* **90**, 1710-1716.
- Reiche, R., Horn, U., Wölfl, St., Dorn, W. und Kaatz, H.H. (1998) Die Honigbiene als Vektor der Genübertragung von transgenen Pflanzen in die Umwelt. *Apidologie* **29**, 401-402.
- Schur, A., Tornier, I. und Neumann, C. (2000) Bt-Mais und non Bt-Mais: Vergleichende Untersuchungen an Honigbienen (Tunnelzeltversuch), 47. Jahrestreffen der Bienenforschungsinstitute, 3.-5. April 2000, Blaubeuren, Deutschland (Poster).
- Sims, S.R. (1995) *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CryIA(c)) protein expressed in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. *Southwestern Entomologist* **20**, 493-500.
- Sims, S.R. (1997) Host activity spectrum of the CryIIA *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* protein: effects on Lepidoptera, Diptera, and non-target arthropods. *Southwestern Entomologist* **22**, 395-404.
- Wille, H., Wille, M., Kilchenmann, V., Imdorf, A. und Bühlmann, G. (1985 a) Pollenernte und Massenwechsel von drei *Apis mellifera*-Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren. *Revue Suisse de Zoologie* (4), 897-914.
- Wille, H., Imdorf, A., Bühlmann, G., Kilchenmann, V. und Wille, M. (1985 b) Beziehung zwischen Polleneintrag, Brutaufzucht und mittlerer Lebenserwartung der Arbeiterinnen in Bienenvölkern (*Apis mellifica*). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen. Gesellschaft* **58**, 205-214.