

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA)
Institut für biologischen Pflanzenschutz, Darmstadt¹⁾
Institut für integrierten Pflanzenschutz, Kleinmachnow²⁾

Untersuchungen zur frühzeitigen Entdeckung einer Resistenzentwicklung des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) gegenüber dem *B.t.*-Mais-Toxin Cry1Ab

Studies on the early detection of resistance development of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) to the *B.t.*-corn-toxin Cry1Ab

Renate Kaiser-Alexnat¹⁾, Thomas Meise¹⁾, Gustav-Adolf Langenbruch¹⁾, Bernd Hommel²⁾ und Jürg Huber¹⁾

Zusammenfassung

Um eine Resistenzentwicklung des Maiszünslers gegenüber *B.t.*-Mais frühzeitig erkennen zu können, wurden Altlarven in *B.t.*-Mais-Feldern im Oderbruch gesammelt und einem F₂-Screening unterzogen. In den Jahren 2001, 2002 und 2003 wurden insgesamt ca. 1,8 Mio. Maispflanzen durchsucht und dabei 1855 Larven gefunden. Mit den resultierenden Faltern wurden Einzelpärchen (PG) gebildet, deren Nachkommen als isogene Linien weitergezüchtet wurden, um mit den gewonnenen F₁-Faltern Geschwister-Paarungen anzusetzen. Die frisch geschlüpften F₂-Larven dieser Paarungen wurden einem Biotest unterzogen, um ihre Reaktion gegenüber dem *B.t.*-Toxin Cry1Ab festzustellen. Überlebende F₂-Larven wurden weitergezüchtet und in den Folge-Generationen (z. T. bis F₆) weiteren Biotests unterzogen. Als Fazit bleibt festzuhalten, dass unter den insgesamt 826 untersuchten Ausgangslarven aus *B.t.*-Mais-Feldern keine resistenten Maiszünslers gefunden wurden.

Stichwörter: Maiszünslers, *Ostrinia nubilalis*, *B.t.*-Mais, *B.t.*-Toxin Cry1Ab, Resistenzentwicklung, F₂-Screening, Biotest

Abstract

For the early detection of resistance development of the European corn borer to *B.t.*-corn, late instar larvae were collected in *B.t.*-corn fields in a German area called Oderbruch and tested in an F₂-screening. In 2001, 2002 and 2003 a total of about 1.8 Mio. maize plants were checked and 1855 larvae found. With the resulting butterflies single pairs (PG) were formed, the progenies were bred as isogenic strains and with the resulting F₁-butterflies pairs were formed. The early 1st instar F₂-larvae of these pairs were tested in bioassays for their reaction to the *B.t.*-toxin Cry1Ab. Surviving F₂-larvae were bred in the following generations (partly up to F₆) and tested in further bioassays. As a result, it can be concluded, that among the 826 original larvae from *B.t.*-corn-fields examined, no resistant European corn borer individuals were found.

Key words: European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, *B.t.*-corn, *B.t.*-toxin Cry1Ab, resistance development, F₂-screen, bioassay

1 Einleitung

Der Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*; Lepidoptera) ist bislang der wirtschaftlich bedeutendste Schädling im Maisanbau in Deutschland. Um 1910 wurde er von Europa in die USA verschleppt und führt auch dort zu erheblichen Ertragsverlusten. Im Gegensatz zu weiten Teilen der USA durchläuft der Maiszünslers in Deutschland nur eine Generation im Jahr, wobei er als Altlarve in den Maisstopplern überwintert.

Zur Bekämpfung des Maiszünslers stehen dem Landwirt verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Eine indirekte, aber sehr wirkungsvolle Methode stellt die mechanische Bekämpfung der Altlarven durch Schlegeln und sauberes Unterpflügen der Ernterückstände dar. Auch die Einhaltung eines weiträumigen Fruchtwechsels kann zur deutlichen Schadensminderung beitragen. Für die direkte Bekämpfung stehen chemische und biologische Möglichkeiten zur Verfügung. Zur biologischen Bekämpfung des Maiszünslers werden *Bacillus thuringiensis*-(*B.t.*-) Präparate aufgrund der geringeren Effizienz nur selten, *Trichogramma*-Schlupfwespen zurzeit aber auf über 10 000 Hektar pro Jahr eingesetzt.

Eine weitere Bekämpfungsmöglichkeit stellt der Anbau von *B.t.*-Mais dar. Bei dem hier relevanten *B.t.*-Mais handelt es sich um transgenen Mais, auf den eine Gensequenz des insektenpathogenen *Bacillus thuringiensis* übertragen wurde, die für die Bildung des *B.t.*-Toxins Cry1Ab codiert. Dieses Toxin besitzt insektizide Wirksamkeit gegen Larven zahlreicher Schmetterlingsarten. Der *B.t.*-Mais produziert also sein eigenes Insektizid. Mit dem Anbau von *B.t.*-Mais wächst jedoch auch die Gefahr, dass es infolge des hohen Selektionsdrucks zur Resistenzentwicklung des Maiszünslers gegenüber dem *B.t.*-Toxin Cry1Ab kommt.

Lange Zeit wurde angenommen, dass sich gegenüber *B.t.*-Präparaten – wie sie in der biologischen Schädlingsbekämpfung eingesetzt werden – keine Resistenzen entwickeln würden, da sie neben verschiedenen Toxinen auch wirksame Bakterien-Sporen enthalten und meist zeitlich begrenzt eingesetzt werden. Doch 1985 berichtete MCGAUGHEY über *B.t.*-Resistenzen im Vorratsschutz und kurz darauf wurde der erste Fall einer Lepidopteren-Resistenz gegen *B.t.*-Präparate im Feld bekannt (TABASHNIK et al., 1990). Auch im Labor wurden verschiedene Lepidopteren nach fortgesetztem Selektionsdruck resistent gegen *B.t.*-Toxine

(FERRÉ und VAN RIE, 2002). In den USA konnten mit einem *B.t.*-Präparat im Labor sogar Resistenzen beim Maiszünslers provoziert werden (HUANG et al., 1997, 1999).

Um eine Resistenzentwicklung des Maiszünslers infolge großflächigen Anbaus von *B.t.*-Mais zu vermeiden, wird in den USA im Rahmen von Resistenzmanagement-Programmen die „Refugien/Hoch Dosis“-Strategie verfolgt. Diese Strategie basiert auf einer hohen Toxin-Expression im transgenen Mais (mindestens 25-mal höher als die LC_{99,9} empfindlicher Larven) und einer möglichst großen toxfreien Refugienfläche (mindestens 20%). Außerdem wird bei dieser Strategie vorausgesetzt, dass in der Schädlingspopulation das Vorkommen von Resistenzallelen ein sehr seltenes Ereignis darstellt (Resistenzallelfrequenz < 10⁻³) und rezessiv vererbt wird (GOULD, 1998; ONSTAD und GUSE, 1999). Sobald Resistenzen auftreten, muss die „Refugien/Hoch Dosis“-Strategie als nicht ausreichend gelten und die weitere Vorgehensweise darauf abgestimmt werden. Eine angemessene Reaktion setzt jedoch voraus, dass die Entwicklung von Resistenzen so früh wie möglich erkannt wird. Das Vorkommen und die Häufigkeit von Resistenzallelen in einer Maiszünslers-Population kann mit dem so genannten F₂-Screening erfasst werden (ANDOW und ALSTAD, 1998; ANDOW et al., 1998).

Mit den hier vorgestellten Untersuchungen sollten im Rahmen des BMBF-Projektes „Untersuchungen zur frühzeitigen Entdeckung einer Resistenzentwicklung des Maiszünslers gegen *B.t.*-Toxine und zur Aufklärung der Resistenzmechanismen“ resistente Larven selektiert werden. Dazu wurde nach dem F₂-Screening verfahren. Durch das Sammeln der Larven in *B.t.*-Mais-Feldern sollte die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden resistenter Larven erhöht werden. Eine Berechnung der Resistenzhäufigkeit (ANDOW und ALSTAD 1998; ANDOW et al., 1998; VENETTE et al., 2002) war somit kein vorrangiges Ziel der vorliegenden Untersuchungen.

2 Material und Methoden

2.1 Grundsätzliche Überlegungen zur Vorgehensweise

Theoretisch müssten Maiszünslers, die in *B.t.*-Mais-Feldern überleben, resistent gegenüber dem *B.t.*-Mais-Toxin Cry1Ab sein. Das ist praktisch jedoch nicht zwangsläufig der Fall, weil zum einen der Toxin-Gehalt der *B.t.*-Mais-Pflanzen schwanken kann und zum anderen durch Saatgutverunreinigungen bis zu 2% Nicht-*B.t.*-Mais-Pflanzen im Bestand enthalten sein können. Da die Larven aber teilweise ihre Wirtspflanzen wechseln, können auch die in Nicht-*B.t.*-Mais-Pflanzen gefundenen Tiere vorher an *B.t.*-Mais gefressen haben. So ist bei den in *B.t.*-Mais-Feldern gefundenen Maiszünslers-Larven aufgrund des Selektionsdrucks am ehesten mit Resistenzen zu rechnen.

Je nach genetischem Charakter der gesammelten Ausgangspopulation können verschiedene Szenarien zugrunde gelegt werden. Wenn kein Resistenzgen in der gesammelten Population eingefangen würde, wären alle Nachkommen anfällig. Wenn jedoch mindestens ein Resistenzgen in der gesammelten Population vorhanden wäre, so käme es zur Aufspaltung von resistenten Individuen.

Der einfachste Fall wäre gegeben, wenn die Resistenz monogen vererbt würde. Je nach Vererbungsmodus des Resistenzgens wären dann unterschiedliche Szenarien zu erwarten. Würde es sich um ein dominantes Resistenzgen handeln, so könnte sich die Resistenz relativ schnell in der Population durchsetzen. Auch bei einem intermediären Erbgang käme es rasch zur Durchsetzung von resistenten Individuen, weil die Heterozygoten einen Selektionsvorteil gegenüber den homozygot Anfälligen hätten. Wenn die Resistenz dagegen, wie angenommen, auf einem rezessiven

Gen beruhen würde, könnte sich der potentielle Selektionsvorteil in den Heterozygoten nicht auswirken und träte nur bei Homozygoten phänotypisch in Erscheinung, sodass sich resistente Tiere nur langsam durchsetzen würden. Im ungünstigsten Fall, im Hinblick auf die Nachweisbarkeit, würde bei einer Kreuzung im Labor nur ein Resistenzallel in nur einem Elternteil vorliegen. Dann würden erst durch Geschwisterkreuzungen über zwei Generationen Homozygote und damit phänotypisch nachweisbare resistente Larven auftreten. In der F₂-Population käme es dann zu einer Aufspaltung von 16:1, d. h. von 16 F₂-Larven wäre eine Larve homozygot resistent (vgl. Abb. 1).

Zum Auffinden solcher homozygot resistenten Tiere (*rr*) sind verschiedene Vorgehensweisen denkbar. Wenn in der Ausgangspopulation schon eine gewisse Anreicherung an Resistenzgenen vorhanden wäre, könnte eine freie Paarung aller Falter aus Larven vom *B.t.*-Mais-Feld mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit zum gewünschten Ziel führen. Die frisch geschlüpften Larven würden dann mittels Biotest sofort einer Selektion auf Resistenz unterzogen.

Da der genetische Hintergrund der Ausgangspopulation jedoch nicht bekannt war, bestand der sicherste und gleichzeitig aufwendigste Weg zur Erkennung vorhandener Resistenzen darin, die gesammelten Larven einem F₂-Screening zu unterziehen. Dazu wurden mit den Faltern der ersten Generation (Eltern-Generation) zunächst Einzelpaare gebildet. Die daraus resultierenden Larven (F₁-Generation) wurden als isogene Linien weitergezüchtet, um mit den F₁-Faltern Geschwister-Paarungen vorzunehmen. Die daraus wiederum hervorgehenden Larven (F₂-Generation) wurden mittels Biotest auf Resistenz getestet (Bild zur Methodik siehe unter <http://www.biosicherheit.de/mais/212.doku.html>).

2.2 Sammlung von Altlarven in *B.t.*-Mais-Feldern

Im Rahmen der Sortenzulassung und zur Ermöglichung wissenschaftlicher Untersuchungen durfte *B.t.*-Mais in den vergangenen Jahren in Deutschland auf einigen hundert Hektar angebaut werden. Da im Oderbruch zurzeit der intensivste Maiszünslers-Befall in Deutschland auftritt, dort aber auch in einzelnen Lagen in jedem Jahr *B.t.*-Mais angebaut wurde, erfolgten im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen umfangreiche Maiszünslers-Sammelaktionen in dieser Region. So wurden im Herbst der Jahre 2001, 2002 und 2003 *B.t.*-Mais-Felder auf Altlarven abgesehen (Tab. 1).

Bei den ersten dieser Sammelaktionen in *B.t.*-Mais-Feldern im Oderbruch wurden im Herbst 2001 ca. 190 000 Pflanzen durchsucht und 141 Larven gefunden (vgl. MEISE, 2003). Die Befallskontrolle in einem benachbarten Nicht-*B.t.*-Mais-Feld wies mit durchschnittlich 0,5 Larven pro Pflanze auf einen mittleren Befallsdruck hin.

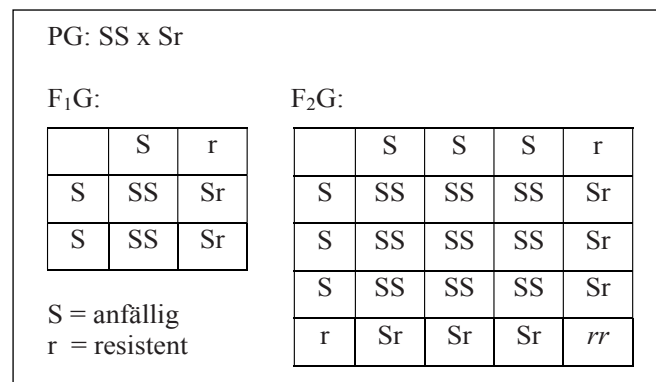


Abb. 1. Vererbung einer rezessiven Resistenz in einem Elternteil mit einem Allel.

Tab. 1. Bilanz der Maiszünsler-Sammelaktionen in *B.t.*-Mais-Feldern im Oderbruch

	2001	2002	2003	Gesamt
Durchsuchte Pflanzen	191 410	760 000	800 000	1 751 410
Gesammelte Larven	141	805	909	1855
Anzahl Larven/ 1000 Pflanzen	0,74	1,06	1,14	1,06

Im Herbst 2002 folgte eine weitere Maiszünsler-Sammelaktion. In den Sorten „MEB307BT“ (Ausgangssorte „Monumental“) und „Novelis“ (Ausgangssorte „Nobilis“; beide Event MON 810) wurden insgesamt ca. 760 000 Pflanzen durchsucht und dabei 805 Larven gefunden. Obwohl die durchsuchten Pflanzenzahlen bei beiden Sorten etwa gleich hoch waren, wurden in „MEB307BT“ 26 % und in „Novelis“ 74 % der Larven gefunden. Der Befall in benachbarten Nicht-*B.t.*-Mais-Feldern war mit durchschnittlich 3,1 Larven pro Pflanze sehr hoch.

Die Maiszünsler-Sammelaktion im Herbst 2003 wurde in einem *B.t.*-Mais-Feld durchgeführt, das in direkter Nachbarschaft zu den Feldern des Vorjahres lag und mit der Sorte „MEB307BT“ bestellt war. In den schätzungsweise 800 000 durchsuchten Pflanzen wurden 909 Larven gesammelt.

Die Bilanz aller Maiszünsler-Sammelaktionen in *B.t.*-Mais-Feldern im Oderbruch zeigt, dass insgesamt ca. 1,8 Millionen Pflanzen durchsucht und dabei 1855 Larven gefunden wurden. Im Durchschnitt mussten also ca. 1000 Pflanzen durchsucht werden, um eine Larve zu finden (Tab. 1).

Von jeder Pflanze, in der Larven gefunden wurden, wurde auch eine Blattprobe genommen und nach spätestens 24 h beim Institut für integrierten Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Kleinmachnow eingefroren. Die Vorgehensweise beruht weitestgehend auf den Versuchen mit den Larven aus 2001, die bei MEISE (2003) beschrieben sind. Aus den Erfahrungen von 2001 wurde aber das Verfahren zum Teil abgeändert, sodass sich die im Folgenden beschriebenen Details hauptsächlich auf die in 2002 und 2003 gesammelten Larven beziehen. Auf die Unterschiede zwischen den Versuchen von 2001 bzw. 2002 und 2003 wird nur eingegangen, wenn dadurch die Aussagen zur Resistenzermittlung betroffen sind.

2.3 Überwinterung der Altlarven im Gewächshaus

In einem Maisfeld sind mit vertretbarem Aufwand nur Altlarven zu sammeln. Diese sind bereits auf eine Diapause eingestimmt und müssen deshalb zunächst überwintert werden. Dazu wurden die Larven über Winter in einem unbeheizten Gewächshaus einzeln in Bellaplast-Döschen mit Handtuchpapier und gelochten Deckeln gehalten.

Nach Abzug der Larven, die beim Auffinden bereits tot waren bzw. beim Freilegen aus den Maisstängeln zerschnitten wurden, sowie den kleinen Larven, die kurz nach der Sammelaktion starben, lebten vor Winter noch 661 Larven von der Sammelaktion im Herbst 2002 und 737 Larven von der Sammelaktion im Herbst 2003. Im darauf folgenden Frühjahr lebten von den Maiszünslern aus 2002 noch 589 Larven und von denen aus 2003 noch 531 Larven (Tab. 6).

2.4 Identifikation von *B.t.*-Mais-Pflanzen mit einem Schnelltest

Um festzustellen, ob die Pflanzen, in denen Larven gefunden wurden, das *B.t.*-Toxin tatsächlich exprimieren, wurde mit den eingefrorenen Blattproben ein *B.t.*-Schnelltest der Firma „GeneScan Analytics GmbH“ durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass 30 % der 465 Blattproben aus 2002 und 88 % der 389 Blattpro-

ben aus 2003 von Nicht-*B.t.*-Mais-Pflanzen stammten. Die in 2003 gefundenen Larven lebten also hauptsächlich auf Nicht-*B.t.*-Mais-Pflanzen.

2.5 Zuchtarbeiten im Frühjahr

Da die Larven Wasser aufnehmen müssen, um sich verpuppen zu können, wurde das Handtuchpapier in den Überwinterungsdöschen befeuchtet. Die Larven aus 2002 wurden bei steigenden Außentemperaturen und einer einsetzenden Regenperiode am 28. 04. 03 alle gleichzeitig befeuchtet. Aufgrund der zeitlichen Begrenzung des Forschungsprojektes mussten die Zuchtarbeiten mit den Larven aus 2003 früher einsetzen. Wegen der relativ hohen Außentemperaturen (ca. 12–15 °C) und dem vorhergesagten erneuten Kälteeinbruch wurden sie am 06. 02. 04 aus dem Gewächshaus in einen Klimaschrank mit 15 °C überführt. Ab dem 09. 02. 04 wurde dann jeweils im Abstand von einer Woche ein Viertel der Larven befeuchtet und in einem Klimaschrank mit 25 °C gehalten, sodass im Laufe von vier Wochen alle Larven aus 2003 gestaffelt „aufgeweckt“ wurden.

Die ersten Puppen der Maiszünsler aus 2002 wurden am 23. 05. 03, die ersten Puppen von Maiszünslern aus 2003 – aufgrund des vorzeitigen „Aufweckens“ – bereits am 23. 02. 04 beobachtet. Bei Ersteren hatten sich bereits eine Woche später fast alle Larven verpuppt, während sich die Verpuppungsphase bei Letzteren durch das gestaffelte „Aufwecken“ über einen Monat hinzog.

Nach dem Übergang in die Verpuppungsphase wurde das Handtuchpapier entfernt, der Boden des Döschens mit einem Rundfilter bedeckt und ein Einzeldöschen, das mit zehnpromittiger Zuckerlösung getränkte Watte enthielt, dazugestellt, sodass die Falter direkt nach dem Schlupf trinken konnten.

2.6 Einzelpärchen in der Eltern-Generation

Als Vorbereitung für die Paarungen wurden Pflanzschalen mit Wasser gefüllt, Drahtgitter in die Pflanzschalen gelegt und Handtuchpapier darauf ausgebreitet. Die Zuchtzyylinder (Höhe 19,5 cm; Durchmesser 11,5 cm) wurden innen mit Filterpapier ausgekleidet und zusammen mit Zuckerlösung auf die vorbereiteten Gitter gestellt. Die zu paarenden Falter wurden mit CO₂ ruhig gestellt, zügig in die Zuchtzyylinder überführt und diese dann mit Klarsichtfolie überspannt.

In der Eltern-Generation (Parental-Generation, PG) wurden Einzelpaarzuchten vorgenommen, d. h. je ein Männchen und ein Weibchen wurden zusammen gehalten. Bei der Auswahl der Kreuzungspartner wurde so vorgegangen, dass in erster Präferenz Falter aus Larven von *B.t.*-Mais-Pflanzen zusammengeführt wurden. Auf diese Weise wurde eine Rangfolge erstellt, bei der im ungünstigsten Fall wenigstens ein Falter aus *B.t.*-Mais an der Kreuzung beteiligt sein sollte. Bei den Maiszünslern aus 2002 konnten zusätzlich auch alle Paarungen mit Faltern von Larven aus Nicht-*B.t.*-Mais-Pflanzen durchgeführt werden.

Die erste Eiablage wurde meist 2 bis 5 Tage nach dem Ansetzen der Paarungen abgenommen. Die Eiabnahme erfolgte mindestens zweimal pro Woche in möglichst gleichmäßigem Abstand. Nach der Eiabnahme wurden die Zuchtzyylinder wieder mit frischem Filterpapier ausgekleidet und mit Folie überspannt. Die Eigelege wurden aus den Folien und Filterpapieren ausgeschnitten, in Petrischalen gelegt, Nährmedium zugegeben, mit leicht befeuchtetem doppeltem Handtuchpapier und Deckel abgedeckt und bei 25 °C und 18 Stunden Langtag im Klimaschrank gehalten.

Bei den Maiszünslern aus 2002 schlüpfen die ersten Falter am 04. 06. 03. Anfangs schlüpfen erwartungsgemäß hauptsächlich Männchen. An Pfingsten (8./9. 06. 2003) war der Höhepunkt des Falterschlupfs und damit der Paarungen. Aufgrund der anhaltend hohen Außentemperaturen (z. T. weit über 30 °C) verlief der Fal-

terschlupf innerhalb eines sehr kurzen Zeitraums, sodass die Paarungen sehr gut koordiniert werden konnten. Mit den Maiszünslern aus 2002 wurden insgesamt 271 Zuchtzyylinder mit Einzelpärchen angesetzt, von denen 40 keine Eiablage hatten. Unter Berücksichtigung sonstiger Verluste (17 Falter sind z. B. trotz Vorsichtsmaßnahmen weggefliegen) gab es 214 Einzelpärchen mit Eiablage.

Aufgrund des verkürzten Versuchszeitraums und der stark reduzierten Arbeitskapazität musste mit den Maiszünslern aus 2003 in der Eltern-Generation abweichend vorgegangen werden. Die Falter aus Larven, die erwiesenermaßen aus *B.t.*-Mais-Pflanzen stammten (Schnelltest), wurden untereinander als Einzelpärchen gepaart. Wenn für diese „wichtigen Falter“ drei Tage nach ihrem Schlupf kein gleichwertiger Partner vorhanden war, wurde auf einen Partner aus Nicht-*B.t.*-Mais-Pflanzen – ebenfalls vom *B.t.*-Mais-Feld – zurückgegriffen. In der Zeit vom 08. 03. 04 bis 29. 03. 04 konnten so insgesamt 33 Einzelpärchen angesetzt werden, wobei aus 4 Einzelpärchen keine Eiablagen und aus einem Einzelpärchen nur eine geringe Eiablage hervorgingen.

Bei den Maiszünslern aus 2003 wurden die verbleibenden Falter aus Nicht-*B.t.*-Mais-Pflanzen in Gruppen zu je 20 Weibchen und 20 Männchen zusammgelegt. Vom 23. 03. 04 bis 31. 03. 04 wurden 8 Gruppenpaarungen (A bis H) angesetzt. Um möglicherweise vorhandene dominante und intermediäre Resistenzgene sowie eine Anreicherung von rezessiven Resistenzen erkennen zu können, wurden die resultierenden Larven (F_1 -Larven) sofort einem Biotest unterzogen.

2.7 Weiterzucht von isogenen Linien in der F_1 -Generation

Im weiteren Zuchtverlauf wurden alle Larven einer Kreuzungskombination als isogene Linien gehalten, wobei die Zucht zunächst in Petrischalen und später in Gerda-Dosen erfolgte. Die zeitaufwendige Versorgung der Larven umfasste mindestens zweimal wöchentlich das Füttern mit Nährmedium, die Befeuchtung des Papiers, die Kontrolle auf Pilzbewuchs sowie das regelmäßige Absammeln von Puppen bzw. Faltern. Außerdem wurden tote Larven auf Befall mit Mikrosporidien untersucht. Das verwendete Nährmedium enthielt in 680 ml Wasser, 2 g Benzoesäure, 1 g Nipagin, 1 g Sorbinsäure, 16 g Agar-Agar, 28 g Weizenkeime, 30 g Hefe, 112 g Maisgrieß, 6 g Ascorbinsäure, 2 g Vitamine und 2 g eines Antibiotikums (zunächst „Frisomycin“, später „Terramycin-Hen N“).

Bei den Maiszünslern aus 2002 wurden am 14. 07. 03 und bei denen aus 2003 am 24. 04. 04 die ersten Puppen beobachtet. Die Puppen wurden in Bellaplast-Döschen gesammelt. Nach dem Schlüpfen wurden die männlichen und weiblichen Falter einer isogenen Linie bis zur Paarung – ebenfalls in Bellaplast-Döschen – getrennt gehalten.

Die F_1 -Generation umfasste bei den Maiszünslern aus 2002 insgesamt 191 und bei denen aus 2003 weitere 37 Zuchtlinien, von denen 29 auf Einzelpärchen und 8 auf Gruppenpaarungen basierten.

2.8 Ansetzen von F_1 -Geschwister-Paarungen

Für das F_2 -Screening wurden Resistenztests mit 100 F_2 -Larven angestrebt, die von 10 F_1 -Paaren stammen sollten. Daher wurden 10 Weibchen und 10 Männchen einer Zuchtlinie in einem Zuchtzyylinder zusammengeführt.

Am 30. 07. 03 wurde der erste Zuchtzyylinder mit F_1 -Faltern von Maiszünslern aus 2002 angesetzt. Für jede Linie der F_1 -Generation sollte möglichst nur ein Zuchtzyylinder angelegt werden. Weil aber die Zuchten zeitweise ins Stocken gerieten, wurden auch Zuchtzyylinder mit weniger als 10 Männchen und 10 Weibchen angesetzt. Um dennoch Biotests mit F_2 -Larven von der an-

gestrebten Falterzahl durchführen zu können, wurden insgesamt 430 Zuchtzyylinder erforderlich.

Mit den F_1 -Faltern von Maiszünslern aus 2003 wurden je zwei Zuchtzyylinder bei den 29 Linien aus Einzelpärchen und je drei Zuchtzyylinder bei den 8 Linien aus Gruppenpaarungen angesetzt, sodass insgesamt weitere 82 Zuchtzyylinder in dieser Saison angesetzt wurden.

Bei den Maiszünslern aus 2002 wurden am 04. 08. 03 und bei denen aus 2003 am 11. 05. 04 die ersten Eigelege von F_1 -Faltern abgenommen. Die Eipapiere wurden zweimal wöchentlich entnommen. Auch diese Eigelege, die für den Biotest vorgesehen waren, wurden in Petrischalen überführt und mit leicht befeuchtetem, doppeltem Handtuchpapier und Deckel verschlossen. Sie wurden jedoch nicht mit Nährmedium gefüttert, da dies die Wirkung des Toxins entscheidend beeinflussen würde. Ein gleichmäßiger Schlupf der Larven wurde durch Aufteilen der Eigelege in Klimaschränke mit abgestuften Temperaturen (z. B. 18 °C, 21 °C und 25 °C) angestrebt. Am 08. 08. 03 schlüpften die ersten F_2 -Larven von Maiszünslern aus 2002 und am 21. 05. 04 die von 2003.

2.9 Biotests mit F_2 -Larven

Die frisch geschlüpften Larven der F_2 -Generation wurden einem Biotest unterzogen, um ihre Reaktion gegenüber dem *B.t.*-Toxin Cry1Ab zu überprüfen. Von jeder isogenen Linie sollten 100 F_2 -Larven auf Toxin getestet werden und zusätzliche Larven als Kontrolle mitgeführt werden. Dazu wurden Raster der Firma „Color-Dec“ (Italien) verwendet, die Testmöglichkeiten für 8 Quadrate à 16 Larven bieten. Wegen der Übersichtlichkeit und besseren Handhabbarkeit wurden 6 Quadrate (96 Larven) für das Screening auf Resistenz und die restlichen 2 Quadrate (32 Larven) für die Kontrolle eingesetzt.

Die Einzeltöpfchen wurden zunächst mit 1 ml Nährmedium befüllt. Beim Kochen des Nährmediums wurde im Gegensatz zur Anzucht der Larven die Agar-Menge auf 8 g reduziert, damit sich auf der Oberfläche keine Erhöhungen bilden, auf denen die Larven sich dem Toxin entziehen könnten. Außerdem wurde hier kein Antibiotikum eingesetzt.

Für die Biotests wurde von Dr. J. JEHL (DLR Rheinpfalz, Neustadt/Weinstraße) ein in *E. coli* produziertes und trypsiniertes *B.t.*-Toxin Cry1Ab bereitgestellt. Weil die verschiedenen Toxin-Chargen bei den Biotests mit Maiszünslern aus 2001 eine unterschiedliche Wirksamkeit aufwiesen (MEISE, 2003), wurde für das Screening des Zuchtmaterials aus 2002 und 2003 eine einheitliche Toxin-Charge (vom 03. 03. 03 mit 2 mg/ml) verwendet.

Die Toxin-Lösung – bestehend aus CAPS-Puffer (50 mM CAPS; pH 10,5) und Toxin – wurde stets frisch angesetzt. Jeweils 100 µl reinen CAPS-Puffers (bei der Kontrolle) bzw. in CAPS-Puffer gelösten Toxins wurden auf die Oberfläche des Nährmediums aufgetragen (Oberflächen-Applikation). Nach dem Pipettieren wurde die Toxin-Lösung durch horizontales Schwenken der Raster gleichmäßig auf dem Nährmedium verteilt. Sobald die aufgebrauchte Flüssigkeit getrocknet war, wurden die Raster bis zur weiteren Verwendung kurzfristig im Kühlschrank aufbewahrt.

Die frisch geschlüpften F_2 -Larven wurden mit einem Pinsel in die Einzeltöpfchen der vorbereiteten Raster überführt, diese dann mit selbstklebenden Spezialdeckeln der Firma „Color-Dec“ verschlossen und bei 25 °C und 18 Stunden Licht/Tag gehalten. Nach sieben Tagen erfolgte die erste Bonitur des Zustandes der Larven in Form einer alternativen Reaktionsbeurteilung (lebend, ja oder nein).

Der Umfang sämtlicher durchgeführter Biotests belief sich in der Saison 2003 auf ca. 55 000 Larven und in der Saison 2004 auf

Toxin-Dosis		LC-Wert	Überlebensrate (nach 7 Tagen)
<i>B.t.-Toxin-Charge von Meise (2003)</i>			
0,30 µg/cm ²	→	LC ₉₀	→ 10%
<i>B.t.-Toxin-Charge vom 03.03.03</i>			
0,30 µg/cm ²	→	LC ₉₁	→ 9%
0,35 µg/cm ²	→	LC ₉₃	→ 7%
0,60 µg/cm ²	→	LC ₉₆	→ 4%

Abb. 2. Dosis-Wirkungs-Tests mit der Laborzucht.

ca. 22 000 Larven. In diesen Zahlen sind nicht nur die Larven auf Toxin (in der F₁, F₂ usw.), sondern auch die Kontroll-Larven ohne Toxin und die Larven für die Dosis-Wirkungs-Tests, also alle in der jeweiligen Saison getesteten Larven, enthalten. Hinzu kamen ca. 3000 getestete Larven der Maiszünslers aus 2001, sodass insgesamt ca. 80 000 Larven im Biotest untersucht wurden (Tab. 6).

3 Ergebnisse

3.1 Dosis-Wirkungs-Tests mit der Laborzucht

Um die Wirksamkeit der Toxin-Chargen zu testen und festzustellen, mit welcher Toxin-Dosis bei den Biotests mit F₂-Larven gearbeitet werden sollte, wurden umfangreiche Dosis-Wirkungs-Tests mit der Laborzucht durchgeführt. Bei dem Toxin, das für die Biotests mit F₂-Larven von Maiszünslern aus 2001 verwendet wurde, ergab sich nach 7 Tagen eine LC₅₀ von 0,044 (0,018–0,107) µg/cm². Das Toxin, das für die Biotests mit F₂-Larven von Maiszünslern aus 2002 und 2003 vorgesehen war, führte zu einer LC₅₀ von 0,036 (0,027–0,045) µg/cm².

3.2 Biotests mit Maiszünslern aus 2001

Die Biotests mit F₂-Larven von Maiszünslern aus 2001 wurden mit einer Toxin-Dosis von 0,3 µg/cm² durchgeführt. Bei

dem hierfür ermittelten LC-Wert von minimal 90 % wurden nach 7 Tagen 10 % Überlebende erwartet (Abb. 2). Von den 3102 getesteten F₂-Larven lebten nach 7 Tagen noch 321 Tiere (10,3 %), also genau so viele Tiere wie erwartet (Tab. 5). Die Versuche wurden aber über weitere 14 Tage fortgeführt, um sicherzugehen, dass die Larven gegen die Toxin-Dosis resistent sind.

3.3 Biotests mit Maiszünslern aus 2002

Weil nicht abzusehen war, wie die Testtiere im Vergleich zur homogeneren Laborzucht reagieren, wurden die ersten Biotests mit Maiszünslern aus 2002 zunächst mit moderaten Toxin-Dosen von 0,3 bzw. 0,35 µg/cm² angesetzt, die nach der Mortalität im Vorversuch etwa einer LC₉₁ bzw. LC₉₃ entsprachen. Nach 7 Tagen wurde also mit 9 % bzw. 7 % Überlebenden gerechnet (Abb. 2). Tatsächlich gab es aber mehr überlebende F₂-Larven. Daher wurden die weiteren Biotests mit einer Toxin-Dosis von 0,6 µg/cm² durchgeführt. Das entsprach im Vorversuch einer LC₉₆ nach 7 Tagen, also 4 % Überlebenden (Abb. 2). Von den ca. 21 000 F₂-Larven, die auf 0,6 µg/cm² getestet wurden, lebten nach 7 Tagen noch 629 Tiere (3 %), also etwas weniger Tiere als erwartet (Tab. 2).

3.4 Biotests mit Maiszünslern aus 2003

3.4.1 Biotests mit F₁-Larven

Theoretisch könnten auch bei rezessivem Erbgang auf dem *B.t.*-Mais-Feld bereits heterozygot resistente Tiere vorliegen, die zufällig gepaart wurden und von denen dann einige Nachkommen in der F₁ reinerbig resistent und damit im Biotest erkennbar wären. Wenn die Resistenzgene dominant oder intermediär wären, würden sie sogar generell bereits in der F₁ sichtbar.

Bei den Maiszünslern aus 2003 wurden daher mit F₁-Larven der Gruppenpaarungen von Faltern aus Larven von Nicht-*B.t.*-Pflanzen im *B.t.*-Mais-Feld Biotests durchgeführt. Von jeder Zuchtlinien, gingen ca. 500 F₁-Larven in einen Biotest mit einer Toxin-Dosis von 0,6 µg/cm² und Oberflächenapplikation. Insgesamt wurden 3822 Tiere auf Resistenz gegenüber dem *B.t.*-Toxin Cry1Ab getestet. Nach 7 Tagen überlebten aber nur 5 Larven, die zudem sehr schwach waren und nach weiteren 7 Tagen eingingen (Tab. 3). Die F₁-Larven, die nicht in den Biotest gingen, wurden bis zur F₂ weitergezüchtet.

Tab. 2. Biotests mit F₂-Larven von Maiszünslern aus 2002

Toxin-Dosis (µg/cm ²)	Anzahl untersuchter F ₂ -Larven	Überlebende F ₂ -Larven nach 7 Tagen		Überlebende F ₂ -Larven nach 14 Tagen		Überlebende Kontroll-Larven (ohne Toxin) nach 7 Tagen
		Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	
0,30	1 536	261	17 %	48	3,1 %	81 %
0,35	5 376	753	14 %	185	3,4 %	89 %
0,60	20 965	629	3 %	66	0,3 %	81 %

Tab. 3. Biotests mit F₁-Larven von Maiszünslern aus 2003 in Nicht-*B.t.*-Pflanzen vom *B.t.*-Mais-Feld

Zuchtlinien	Anzahl untersuchter F ₁ -Larven	Überlebende F ₁ -Larven* nach 7 Tagen		Überlebende F ₁ -Larven* nach 14 Tagen		Überlebende Kontroll-Larven (ohne Toxin) nach 7 Tagen
		Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	
A	478	0	0	0	0	99 %
B	475	0	0	0	0	97 %
C	478	0	0	0	0	98 %
D	473	0	0	0	0	94 %
E	479	1	0,2	0	0	96 %
F	479	3	0,6	0	0	97 %
G	480	0	0	0	0	96 %
H	480	1	0,2	0	0	92 %
Gesamt	3 822	5	0,1	0	0	96 %

* bei einer Toxin-Dosis von 0,6 µg/cm²

Tab. 4. Biotests mit F₂-Larven von Maiszünslern aus 2003

	Anzahl untersuchter F ₂ -Larven	Überlebende F ₂ -Larven* nach 7 Tagen		Überlebende F ₂ -Larven* nach 14 Tagen		Überlebende Kontroll-Larven (ohne Toxin) nach 7 Tagen
		Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil	
Einzelpaare	5088	37	0,7 %	4	0,08 %	76 %
Gruppenpaare	2304	13	0,6 %	0	0 %	85 %
Gesamt	7392	50	0,7 %	4	0,05 %	80 %

* bei einer Toxin-Dosis von 0,6 µg/cm²

Tab. 5. Bilanz der Biotests mit F₂-Larven von Einzelpaaren

Sammeljahr	Toxin-Dosis (µg/cm ²)	Anzahl untersuchter F ₂ -Larven	Überlebende F ₂ -Larven nach 7 Tagen		Überlebende F ₂ -Larven nach 14 Tagen	
			Anzahl	Anteil	Anzahl	Anteil
2001	0,3*	3102	321	10,3 %	41	1,3 %
2002	0,6**	20965	629	3,0 %	66	0,3 %
2003	0,6**	5088	37	0,7 %	4	0,08 %

*Toxin-Charge von MEISE 2003, ** Toxin-Charge vom 03. 03. 03

3.4.2 Biotests mit F₂-Larven

Sowohl von den Einzel- als auch Gruppenpaarungen gingen F₂-Larven in den Biotest. Von den 5088 untersuchten F₂-Larven von Einzelpaaren überlebten nach 7 Tagen 37 Larven. Das entspricht einem Anteil von nur 0,7 %. Von den 2304 untersuchten F₂-Larven von Gruppenpaaren überlebten 13 Larven. Das sind 0,6 % der untersuchten Tiere (Tab. 4). Die Werte liegen deutlich unter dem Erwartungswert von 4 % für den nicht kritischen Fall, d. h. wenn keine Resistenz vorhanden wäre.

3.5 Bilanz aller Biotests mit F₂-Larven von Einzelpaaren

Wie oben bereits ausgeführt, überlebten von den getesteten F₂-Larven aus 2001 mit 10,3 % genau so viele Tiere wie erwartet. Betrachtet man die Biotests mit F₂-Larven von Einzelpaaren, die auf Maiszünslern von 2002 und 2003 zurückgehen und auf 0,6 µg/cm² getestet wurden, so müssten im nicht kritischen Fall, d. h. wenn keine Resistenz vorliegt, nach 7 Tagen noch 4 % der Larven leben (Abb. 2). Bei den Maiszünslern aus 2002 überlebten von den ca. 21 000 getesteten Larven 3 % der Tiere. Das stimmt mit dem Erwartungswert sehr gut überein bzw. liegt sogar noch etwas darunter. Von den 5088 untersuchten Larven von Maiszünslern aus 2003 überlebten 37 Larven, also nur 0,7 %. Dieser Wert liegt noch weiter unter dem Erwartungswert (Tab. 5).

3.6 Weiteres Vorgehen in den Folge-Generationen

Alle F₂-Larven, die eine vierzehntägige Toxinbehandlung überlebten, wurden auf Normalmedium überführt und weitergezüchtet (vgl. Tab. 2 und 4). Wenn die Larven den Biotest überlebt hätten, weil sie tolerant bzw. resistent gegenüber dem *B.t.*-Mais-Toxin Cry1Ab waren, so müssten auch ihre Nachkommen – zumindest teilweise – den Biotest überleben (Abb. 3).

Mit den Überlebenden der Biotests mit Maiszünslern aus 2002 konnten in den Folge-Generationen 85 weitere Einzelpärchen angesetzt werden, wobei nur in 31 Fällen Eiablagen zu verzeichnen waren, was eine Spätwirkung der Toxinbehandlung darstellen könnte. Auch die daraus resultierenden Larven wurden einem Biotest unterzogen und die Überlebenden weitergezüchtet. Doch auch in den Folge-Generationen überlebten nur vereinzelt Larven.

Insgesamt gingen aus den Biotests mit Maiszünslern aus 2002 in den Folge-Generationen nur 12 Überlebende hervor, die alle auf zwei Paarungen zurückzuführen waren. Am Ende der Untersuchungsreihe blieben zwei Männchen übrig, die mit je einem Weibchen aus der Laborzucht gepaart wurden. Die resultieren-

den Tiere (F₅-Larven) wurden ohne Biotest durchgezüchtet und mit ihren Geschwistern gepaart. Von jeder dieser beiden Kombinationen wurden schließlich ca. 1000 Larven (F₆-Larven) im Biotest auf Toxin (0,6 µg/cm²) gesetzt. Die einzigen 3 Larven, die nach 7 Tagen noch lebten, waren eine Woche später tot, sodass keine Nachkommen der Maiszünslern aus 2002 mehr vorliegen (Tab. 6).

Auch die vier F₂-Larven, die die Biotests mit Maiszünslern aus 2003 überlebten, wurden nach 14 Tagen auf Normalmedium überführt und weitergezüchtet. Aus den zwei verbleibenden Larven, die beide aus der gleichen Inzuchtlinie hervorgingen, entwickelten sich Puppen. Doch nur aus einer Puppe ging ein lebensfähiges Weibchen hervor, das mit einem Männchen aus der Laborzucht gepaart wurde. Es kam zu einer sehr guten Eiablage und die sich entwickelnden Larven (F₃-Larven) wurden ohne Biotest durchgezüchtet. Mit den F₃-Faltern wurden schließlich 9 Geschwister-Paarungen (jeweils 10 ♀ × 10 ♂) angesetzt. Die resultierenden F₄-Larven wurden weiteren Biotests unterzogen.

Dazu wurden neben den Biotests in Rastern mit oberflächlich appliziertem *B.t.*-Toxin (0,6 µg/cm²) auch Biotests auf Blattstücken der *B.t.*-Mais-Sorte „Novelis“ bzw. der isogenen Sorte

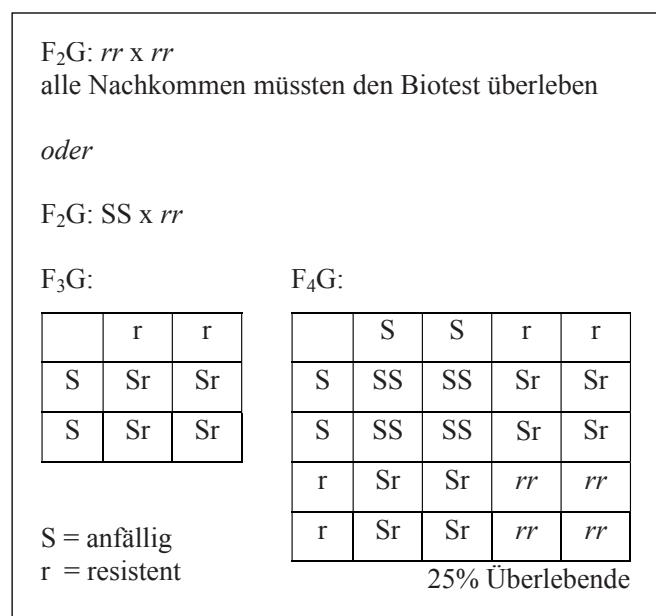


Abb. 3. Weitere Vererbung bei monogen rezessivem Resistenzgen in überlebenden F₂-Larven.

Tab. 6. Gesamtbilanz des F₂-Screenings mit Maiszünslern aus *B.t.*-Mais-Feldern im Oderbruch

Anzahl	MZ 2001	MZ 2002	MZ 2003	Gesamt
Durchsuchte Pflanzen	191 410	760 000	800 000	1 751 410
Gefundene Larven	141	805	909	1 855
Larven vor Winter	141	661	737	1 539
Larven nach Winter	102	589	531	1 222
PG-Einzelpärchen	62	271	33	366
F ₁ -Inzuchtlinien	36	191	29	256
F ₁ -Geschwister-Paarungen	332	430	58	820
Ausgangslarven vom <i>B.t.</i> -Mais-Feld	66	382	58	506
Untersuchte Larven sämtlicher Biotests	3 102	55 000	22 000	80 102
Überlebende				
F ₂ -Larven*, **	**0	*66	*4	70
Paarung mit überlebenden F ₂ -Larven	–	85	1	86
Biotests bis Generation	–	F ₆	F ₄	F ₄ /F ₆
Überlebende	keine	keine	keine	keine

** nach 21 Tagen bei einer Toxin-Dosis von 0,3 µg Toxin/cm² (Toxin-Charge siehe MEISE 2003)

* nach 14 Tagen bei einer Toxin-Dosis von 0,6 µg Toxin/cm² (Toxin-Charge vom 03. 03. 03)

„Nobilis“ als Kontrolle durchgeführt. Von jeder Geschwister-Paarung wurden 2 Raster mit dem oben beschriebenen Biotest angesetzt, sodass 1728 (= 9 Paarungen × 2 Raster × 96 Larven) F₄-Larven auf dem *B.t.*-Toxin Cry1Ab getestet wurden. Zusätzlich wurden von jeder Geschwister-Paarung Biotests in Glasröhrchen mit Blattstücken (ca. 7,5 × 2,5 cm) der *B.t.*-Mais-Sorte „Novelis“ angesetzt, sodass weitere 675 (= 9 Paarungen × 15 Röhrchen × 5 Larven) F₄-Larven direkt auf *B.t.*-Mais getestet wurden. Als Kontrolle wurden 576 (= 9 Paarungen × 2 Raster × 32 Larven) F₄-Larven in Rastern ohne Toxin und 225 (= 9 Paarungen × 5 Röhrchen × 5 Larven) F₄-Larven auf Nicht-*B.t.*-Mais-Blattstücken der Sorte „Nobilis“ mitgeführt.

Bei den 1728 F₄-Larven, die in Rastern getestet wurden, überlebten nach 7 Tagen nur 9 Larven (0,5%), die nach weiteren 7 Tagen tot waren. Die Kontrollen auf Blattstücken der Nicht-*B.t.*-Sorte „Nobilis“ zeigten eine durchschnittliche Überlebensrate von 86%. Von den 675 F₄-Larven auf *B.t.*-Mais-Blattstücken überlebten keine Larven, sodass es nach 14 Tagen auch von den Maiszünslern aus 2003 keine Überlebenden mehr gab (Tab. 6).

Im Gegensatz zu den Maiszünslern aus 2002 und 2003 wurden die F₂-Larven der Maiszünslern aus 2001 noch eine Woche länger auf Toxin gehalten. Nach 21 Tagen Inkubationszeit gab es keine Überlebenden, sodass keine Tests in den Folge-Generationen vorgenommen wurden.

In den 3 Jahren 2001–2003 wurden also auf *B.t.*-Mais-Feldern im Oderbruch rund 1,8 Millionen Pflanzen abgesucht und darin 1855 Larven gefunden, von denen 1222 den Winter überlebten und davon wiederum 506 erfolgreich in den Inzuchtlinien weitergeführt werden konnten (Tab. 6). Bei dem nachfolgenden Screening auf Resistenz in den Generationen F₂–F₄ bzw. F₆ konnten aber keine Resistenzallele nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden im Jahr 2003 die Nachkommen von 320 Larven in F₁ und F₂ auf Resistenz untersucht, ohne dass entsprechende Resistenzallele erkennbar waren.

4 Diskussion

Der Maiszünsler ist auch in den USA einer der bedeutendsten Schädlinge im Maisanbau. Zu seiner Bekämpfung wird dort auf etwa einem Drittel der Maisanbaufläche *B.t.*-Mais angebaut. Die Nachhaltigkeit des Bekämpfungserfolges mit *B.t.*-Mais hängt von der Stabilität der Empfindlichkeit des Maiszünslers gegen-

über dem *B.t.*-Mais-Toxin Cry1Ab ab. Sobald der Maiszünsler eine Resistenz gegenüber *B.t.*-Mais entwickelt und diese Resistenz sich in der Schädlingpopulation ausbreitet, verlieren die entsprechenden *B.t.*-Mais-Sorten ihre Bedeutung. Um eine derartige Entwicklung zu verzögern oder gar zu verhindern, wird in den USA ein Resistenzmanagement auf der Basis der „Refugien/Hoch Dosis“-Strategie durchgeführt. Eine wichtige Voraussetzung für das erfolgreiche Resistenzmanagement ist das regelmäßige, anbaubegleitende Resistenzmonitoring, durch das die Entwicklung einer möglichen Schädlingresistenz frühzeitig erkannt werden soll.

In den USA wurden unter Freilandbedingungen bislang noch keine *B.t.*-Mais-resistenten Maiszünslern gefunden. Da in Deutschland jedoch andere landwirtschaftliche Verhältnisse als in den USA vorliegen, sind hier entsprechende Untersuchungen erforderlich. Grundsätzlich ist die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer Resistenz in Europa als höher einzustufen, weil der Zünsler hier endemisch ist. Aus der Verschleppung in die USA könnte ein genetischer Flaschenhals entstanden sein, sodass die europäischen Maiszünslern über eine breitere genetische Variabilität verfügen dürften.

Bislang wurde *B.t.*-Mais in Deutschland nur zu Versuchszwecken angebaut. Im Rahmen der hier vorgestellten Untersuchungen wurden in den Jahren 2001–2003 *B.t.*-Mais-Felder im Oderbruch genutzt, um festzustellen, ob hier bereits eine Resistenz des Maiszünslers gegenüber dem *B.t.*-Mais-Toxin Cry1Ab erkennbar ist. Dazu wurden im Herbst 2003 zum dritten Mal in Folge Altlarven des Maiszünslers gesammelt und einem F₂-Screening unterzogen, ohne dass resistente Maiszünslern gefunden werden konnten.

Mit der Methodik des F₂-Screenings könnte theoretisch eine „eingefangene Resistenz“ selbst im „worst case“, im Hinblick auf die Nachweisbarkeit, d. h. bei monogen rezessiver Resistenz in nur einem Elternteil mit nur einem Allel, nachgewiesen werden. Das Auftreten von Nicht-*B.t.*-Pflanzen und Pflanzen mit geringer Toxin-Expression im *B.t.*-Mais-Feld erhöht jedoch den Aufwand für ein F₂-Screening mit Nachkommen von Überlebenden in *B.t.*-Mais-Feldern. Durch die mit der notwendigen Überwinterung und Züchtung unvermeidlich verbundene Mortalität vermindert sich auch die Zahl der testbaren Individuen deutlich. So konnten von den 1855 gefundenen Larven nur 506 über Einzelpaarzuchten und Isolinien als F₂-Larven sowie weitere 320 über Gruppenpaarungen als F₁- und F₂-Larven untersucht werden.

Sobald es zu einem umfangreicheren *B.t.*-Maisanbau kommen sollte, wird ein Resistenzmonitoring unverzichtbar. Bei der hier angewandten Methodik handelt es sich um die empfindlichste, gleichzeitig aber auch aufwendigste Vorgehensweise, die es ermöglichen soll, sehr frühzeitig eine Resistenz zu erkennen. Eine regelmäßige Überprüfung der Empfindlichkeit von Larven einer regionalen Maiszünslernpopulation gegenüber einem bestimmten *B.t.*-Toxin im Vergleich zu der vor Einführung von *B.t.*-Mais (Basisempfindlichkeit) ist die Grundlage eines Monitorings, dient aber nicht der frühzeitigen Entdeckung einer Resistenz. Um den Aufwand zu reduzieren, wird diskutiert, die hier beschriebene Methode mit einer sorgfältigen Ermittlung der Befallsentwicklung im *B.t.*-Mais im Vergleich zu benachbarten Nicht-*B.t.*-Flächen zu kombinieren. Bei der Überschreitung eines Befallsgrenzwertes von z. B. 1% sollte sich eine Empfindlichkeitsprüfung im Labor anschließen. Wenn man sich für die vergleichsweise einfache Überwachung der Befallsentwicklung entscheidet, muss man berücksichtigen, dass der Landwirt nur nach einer genauen Schulung und mit erhöhtem Zeitaufwand in der Lage ist, beispielsweise einen 1%igen Maiszünslern-Befall, rechtzeitig festzustellen. Es stellt sich die Frage, ob ein Landwirt dies leisten

kann. Außerdem wären zu diesem Zeitpunkt bereits zahlreiche resistente Tiere vorhanden, die aufwendig bekämpft werden müssten.

Dass bisher keine Resistenz gefunden wurde, kann als Bestätigung dafür gewertet werden, dass es in dem untersuchten Gebiet entweder keine Resistenzallele gibt oder aber diese äußerst selten sind. Auch von ANDOW et al. (1998) und bei dem F₂-Screening von BOURGET et al. (2003) mit Maiszünslern aus Frankreich und dem Maisgürtel in den USA wurden keine Resistenzallele gegenüber *B.t.*-Mais gefunden.

Wenn bislang weder in den USA noch in Europa resistente Maiszünslern gefunden wurden, ist das jedoch keine Gewähr dafür, dass dies auch zukünftig so bleibt. Mit einem *B.t.*-Präparat konnten im Labor Resistenzen beim Maiszünslern provoziert werden. Bei transgenen *B.t.*-Pflanzen ist theoretisch sogar eher mit Resistenzen zu rechnen als bei Spritzungen mit *B.t.*-Präparaten, weil sie nur ein Toxin enthalten, das Toxin über die gesamte Vegetationsperiode wirkt und wesentlich höhere Toxinkonzentrationen eingesetzt werden.

Nach dem Aufkommen und der Verbreitung von resistenten Maiszünslern gegenüber dem *B.t.*-Mais-Toxin Cry1Ab würden die entsprechenden *B.t.*-Mais-Sorten an Bedeutung verlieren. Durch die Einführung neuer Sorten mit anderen *B.t.*-Toxinen (z. B. Cry9C, JANSSENS et al., 1997) könnte evtl. noch ein zeitlicher Vorsprung erzielt werden, doch wäre dann mit neuen Resistenzen oder sogar Kreuzresistenzen zu rechnen. Im Hinblick auf eine mögliche Resistenzentwicklung sollte daher die Ressource *B.t.*-Mais zur Bekämpfung des Maiszünslers verantwortungsbewusst eingesetzt werden. Das heißt, der Anbau sollte ausschließlich in extremen Befallsgebieten und bei gleichzeitiger Anwendung der „Refugien/Hoch Dosis“-Strategie sowie einem Monitoring der Resistenzentwicklung erfolgen. Die für die Durchführung der „Refugien/Hoch Dosis“-Strategie vorhandenen Konzepte und Verfahren aus den USA sind nicht ohne weiteres auf die Agrarstrukturen in Deutschland anwendbar. Sie sollten daher auf der Grundlage der „guten fachlichen Praxis“ weiterentwickelt werden, wobei Überlegungen zur Koexistenz Berücksichtigung finden sollten.

Danksagung

Innerhalb des Rahmenprogramms „Biotechnologie – Chancen nutzen und gestalten“ förderte das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) den Forschungsverbund „Sicherheitsforschung und Monitoringmethoden zum Anbau von *B.t.*-Mais“, zu dem auch das hier vorgestellte Teilprojekt (Nr. 0 31 26 31 G) gehörte. Dem BMBF danken wir daher für die Bereitstellung der Forschungsmittel. Die beteiligten Landwirte im Oderbruch gewährten den Zugang zu ihren Flächen und die tatkräftige Helferschar vom BBA-Institut für integrierten Pflanzenschutz in Kleinmachnow ermöglichte die umfangreichen Sam-

melaktionen, wofür wir allen besonders danken. Frau Dr. R. G. KLEESPIES, BBA, Darmstadt, danken wir für die Anleitung zur Kontrolle des Gesundheitszustandes der Zuchten. Unser Dank gilt auch Herrn Dr. J. JEHLE, DLR Rheinpfalz, Neustadt/Weinstraße, der das *B.t.*-Toxin Cry1Ab im Rahmen des *B.t.*-Mais-Verbundes bereitstellte. Weiterhin danken wir allen Mitarbeitern des BBA-Instituts für biologischen Pflanzenschutz in Darmstadt, insbesondere den technischen Assistentinnen H. MAUL, U. KLEEFELDT, B. FRANK und B. LÖBER, für die vielfältige Unterstützung.

5 Literatur

- ANDOW, D. A., D. N. ALSTAD, 1998: F₂ screen for rare resistance alleles. *J. Econ. Entomol.* **91**, 572–578.
- ANDOW, D. A., D. N. ALSTAD, Y.-H. PANG, P. C. BOLIN, W. D. HUTCHISON, 1998: Using an F₂ screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* **91**, 579–584.
- BOURGUET, D., J. CHAUFAX, M. SÉQUIN, C. BUISSON, J. L. HINTON, T. J. STODOLA, P. PORTER, G. CRONHOLM, L. L. BUSCHMAN, D. A. ANDOW, 2003: Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theor. Appl. Genet.* **106**, 1225–1233.
- FERRÉ, J., J. VAN RIE, 2002: Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* **47**, 501–533.
- GOULD, F., 1998: Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* **43**, 701–726.
- HUANG, F., L. L. BUSCHMANN, R. A. HIGGINS, W. H. MCGAUGHEY, 1999: Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science* **284**, 965–967.
- HUANG, F., R. A. HIGGINS, L. L. BUSCHMANN, 1997: Baseline susceptibility and changes in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* under selection pressure in European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **90**, 1137–1143.
- JANSSENS, S., A. VAN VLIET, C. DICKBURT, L. BUYSSE, C. PIENS, B. SAEY, A. DE WULF, V. GOSSELÉ, A. PAEZ, E. GÖBEL, M. PEFFEROEN, 1997: Transgenic corn expressing a Cry9C insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* protected from European corn borer damage. *Crop Science* **37** (5), 1616–1624.
- MCGAUGHEY, W. H., 1985: Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* **229**, 193–195.
- MEISE, T., 2003: Monitoring der Resistenzentwicklung des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*, Hübner) gegenüber Bt-Mais. Dissertation der Universität Göttingen, 152 Seiten.
- ONSTAD, D. W., C. A. GUSE, 1999: Economic analysis of transgenic maize and nontransgenic refuges for managing European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **92**, 1256–1265.
- TABASHNIK, B. E., N. L. CUSHING, N. FINSON, M. W. JOHNSON, 1990: Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond-back moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **83** (5), 1671–1676.
- VENETTE, R. C., R. D. MOON, W. D. HUTCHISON, 2002: Strategies and statistics of sampling for rare individuals. *Annu. Rev. Entomol.* **47**, 143–174.

Zur Veröffentlichung angenommen: 15. Februar 2005

Kontaktanschrift: Dr. Renate Kaiser-Alexnat, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstraße 243, 64287 Darmstadt, E-Mail: R.Kaiser-Alexnat@bba.de