

## **Endbericht zur Freisetzung (Freilandversuch) von gentechnisch verändertem Mais in den Jahren 2005-2007 (Az. 6786-01-0161)**

### **1 Allgemeine Informationen**

1.1 Europäische Anmeldeungsnummer: B/DE/04/161

1.2 Mitgliedsstaat, in dem die Anmeldung erfolgt ist: Deutschland

1.3 Datum und Nummer der Zustimmung: 24.05.2005, AZ. 6786-01-0161

### **2 Berichtsstatus**

Abschlussbericht nach 3. Jahr der Freisetzung

### **3 Einzelheiten der Freisetzung**

3.1 Wissenschaftliche Bezeichnung des Empfängerorganismus: *Zea mays* L., Poaceae

3.2 Transformationsereignisse:

Das Gen für eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (*epsps*), das von dem *epsps*-Gen aus *Agrobacterium* sp. Stamm CP4 abgeleitet wurde (*cp4 epsps*), 5-seitig versehen mit einer Chloroplasten-Transitpeptid-Sequenz (*ctp2*) der EPSPS aus *Arabidopsis thaliana*. Die Expression de *cp4 epsps*-Gens unterliegt der Kontrolle des promotors und Introns eines Actin-Gens (*act1*) aus Reis (*Oryza sativa*), 3-seitig wird es durch die Terminationssequenz des *nos*-Gens (*Agrobacterium tumefaciens*) komplettiert.

Das Gen für ein CRY3Bb1-Toxin (Bt-Toxin) aus *Bacillus thuringiensis* ssp *kumamotoensis* (*cry3Bb1*), 5-seitig versehen mit der Sequenz des 5'-untranslatierten Leaders des Chlorophyll a/b-bindenden Proteins aus *Triticum aestivum*. Die Expression des *cry3Bb1*-Gens unterliegt der Kontrolle des 35S-Promotors des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) mit doppeltem Enhancer und dem Intron 1 des Actin-Gens aus Reis (*Oryza sativa*) sowie des Terminationssignals des 17,3 kDa *heatshock*-Protein-Gens aus *Triticum aestivum*.

3.3 Eindeutiger Identifizierungscode: Mon 88017

3.4 Ort der Freisetzung: Flurstück 10, Flur 263, Gemarkung Schwarzenau, 97359 Schwarzenau am Main, Bayern

Größe der Freisetzungsfläche: 40.000 m<sup>2</sup>

Identität und geschätzte Zahl der genetisch veränderten höheren Pflanzen:  
GV-Fläche: 10.400 m<sup>2</sup>, ca. 100.000 Pflanzen; Fläche ohne GVO: 29.600 m<sup>2</sup>

Dauer der Freisetzung: 21.5.2007 – 08.10.2007

### **4 Alle Arten von Produkten, die der Anmelder zu einem späteren Zeitpunkt anmelden will**

keine

## **5 Art der absichtlichen Freisetzung**

Absichtliche Freisetzung für Forschungszwecke

## **6 Verfahren, Ergebnisse der Freisetzung, Management und Überwachungsmaßnahmen in Bezug auf die Risiken für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt**

### **6.1 Maßnahmen des Risikomanagements**

#### 6.1.1 Vor Aussaat/Pflanzung

- Klare Kennzeichnung des genetisch veränderten Saatguts durch entsprechende Beschriftung der Behältnisse
- Transport des genetisch veränderten Saatguts getrennt vom konventionellen Saatgut in geschlossenen Metallkisten

#### 6.1.2 Während der Aussaat/Pflanzung:

- Einsaat aller Parzellen mit genetisch veränderten Saatgut vor der Aussaat des konventionellen Saatguts
- Entleeren und Säubern der Saatmaschinen auf dem Freisetzungsgelände

#### 6.1.3 Während des Freisetzungszeitraums:

1. Isolierungsabstand von mindestens 200 m zu Feldern mit geschlechtlich kompatiblen Kulturpflanzen
2. Randstreifen mit der gleichen nicht transgenen Pflanze von mindestens 10 m Breite

#### 6.1.4: Maßnahmen nach der Ernte

- Verfahren der Ernte: Ernte des Maises als Häckselgut und Verarbeitung zu Silage, Wurzelstrünke und Stengelbasis verblieben auf dem Feld
- Silierung auf der Freisetzungsfläche
- Entsorgung der Mais-Silage in der Biogasanlage Schwarzenau, Transport mit geschlossenem Anhänger
- Säuberung aller verwendeten Maschinen auf dem Freisetzungsgelände

#### 6.1.5 Am Ende der Freisetzung:

- Pflügen des Feldes nach der Maisernte im Oktober 2007
- Monatliche Inspektionen während der Anbausaison 2008 auf Maisdurchwuchs
- Folgefrucht ist Winterweizen, sodass Maisdurchwuchs klar erkennbar ist

#### 6.1.6. Sonstige Maßnahmen: keine

#### 6.1.7 Noteinsatzplan: keiner

- Freisetzung verlief wie vorgesehen
- Es mussten keine Maßnahmen gemäß dem Noteinsatzplan nach Artikel 6 Abs. 2 Buchstabe a Ziffer vi und Anhang III.B der Richtlinie 2001/18/EG ergriffen werden

## 6.2 Maßnahmen zur Überwachung nach Beendigung der Freisetzung

Da die Freisetzung nach der Vegetationsperiode 2007 beendet ist, erfolgte 2008 keine weitere Maisaussaat. Stattdessen wurde Winterweizen eingesät, sodass bei Nachkontrollen in der Saison 2008 ein eventueller Mais-Durchwuchs ohne Probleme zu erkennen ist. Das Feld wird während der Anbausaison (Mai bis September) regelmäßig auf Durchwuchs kontrolliert. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Maispflanzen gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass kein Durchwuchs stattgefunden hat.

## 6.3 Plan und Verfahren für die Beobachtung(en)

Siehe 6.2

## 6.4 Beobachtete Auswirkungen

### Zeitlicher Verlauf der Blüte beim transgenen Mais Mon88017:

Beginn der Blüte: 31.7.- 6.8. (BBCH 51-63 in verschiedenen Parzellen)

Ende der Blüte: 9.8.-15.8. (BBCH 67-69 in verschiedenen Parzellen)

### Expressionsmuster des Cry3Bb1-Toxins in den Maispflanzen:

Das Expressionsmonitoring von Cry3Bb1 in unterschiedlichen Geweben der transgenen Mais-sorte MON 88017 wurde in den Entwicklungsstadien BBCH 19, 30, 61 und 83 am Freisetzungsort in Schwarzenau durchgeführt. Dabei wurden insgesamt 342 Gewebeproben entnommen und die Cry3Bb1-Gehalte bestimmt. Die durchschnittlichen Cry3Bb1-Gehalte in den verschiedenen Pflanzenteilen sind in Tab. 1 angegeben.

	<b>BBCH 19</b>	<b>BBCH 30</b>	<b>BBCH 61</b>	<b>BBCH83</b>
<b>Ältere Blätter</b>		31,4	20,3	9,3
<b>Jüngere Blätter</b>	43,7	32,3	29,2	30,4
<b>Stängel</b>	14,3	7,2	7,8	5,0
<b>Wurzel</b>	16,3	13,6	15,5	7,4
<b>Antheren</b>			19,5	
<b>Fruchtfaden</b>			10,6	
<b>Körner</b>			7,2	
<b>Pollen</b>				3,6

Tab. 1. Gehalte des Bt-Toxins Cry3Bb1 in µg/g FG in verschiedenen Pflanzenteilen von MON88017 während der Vegetationsperiode 2007.

### Konzentrationen des Bt-Toxins im freien Boden und in der Rhizospäre:

Die Bodenprobenahmen in 2007 erfolgten wie in den Vorjahren während der Vegetationsperiode parallel zu den Pflanzenproben in den Entwicklungsstadien BBCH 20, 30, 60 und 80 am Freisetzungsort in Schwarzenau. Zusätzlich wurden 4 Wochen nach der Ernte Bodenproben genommen und Pflanzenmaterial (Streu, Wurzelstrünke von abgeernteten Pflanzen) gesammelt. Im dritten Versuchsjahr wurde das Cry3Bb1-Protein im freien Boden nur vereinzelt und mit Werten von maximal bis zu 0,2 ng/g nachgewiesen. Die Rhizosphärenboden-Konzentrationen während der Vegetationsperiode lagen bei durchschnittlich  $0,19 \pm 0,1$  ng/g und damit zwischen den Ergebnissen der Jahr 2005 und 2006 ( $0,06 \pm 0,08$  ng/g und  $0,29 \pm 0,1$  ng/g). Dabei unterschieden sich die an den BBCH-Stadien 20 – 60 ermittelten Konzentrationen nicht signifikant voneinander. Signifikant niedrigere Werte wurden bei BBCH 80 und 4 Wochen nach der Ernte mit

durchschnittlich 0,07 ng/g und 0,08 ng/g ermittelt. Dies entspricht der Erwartung, dass das Cry3Bb1-Protein instabil ist und sich nach der Ernte in den verbleibenden Pflanzenteilen schnell zersetzt.

#### Untersuchungen zu den Effekten der transgenen Maissorte auf Nichtzielorganismen:

Die Untersuchungen zur Fraßaktivität der Boden-Mesofauna anhand von Köderstreifen fanden im Jahr zur Zeit der Maisblüte statt. Wie in den Vorjahren der Freisetzung konnten auch im dritten Versuchsjahr keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier untersuchten Maissorten festgestellt werden.

Bei den Abundanzen der Bodenorganismen Oribatiden (Hornmilben), Collembolen und Gamasiden wurden 2007 deutliche Sortenunterschiede festgestellt. Diese Unterschiede variierten jedoch bei verschiedenen Tiergruppen und können deshalb nicht als ein Effekt des Bt-Proteins gedeutet werden. Zudem war bei keiner der Tiergruppen eine signifikante Erniedrigung oder Erhöhung der Dichten oder Variabilität in MON 88017 im Vergleich zu allen anderen Maissorten zu erkennen.

Bei den Untersuchungen zur Fraßaktivität an verschiedenen Maissorten als Köder ergaben sich im Feldversuch ebenfalls lediglich Sortenunterschiede, das gleiche traf für die standardisierten Köderversuche in Mesokosmen zu.

Die Untersuchung der unspezifischen Zersetzungsleistung anhand von Minicontainern in Stäben nach Eisenbeis ergab in den ersten beiden Untersuchungsjahren keine signifikanten Unterschiede in den Zersetzungsraten der verschiedenen Maislinien. Die Daten zur Zersetzungsleistung für den Sommer 2007 und den Winter 2007/08 befinden sich noch in der Auswertung. Bisher gibt es keine Hinweise, dass die Bt-Maisstreu der Sorte MON 88017 im Freiland weniger gut zersetzt wird als Maisstreu der Nicht-Bt-Sorten. Bei der spezifischen Zersetzungsleistung bei Bt- und Nicht-Bt-Maissorten unter kontrollierten Bedingungen (Gewächshaus) war eine Verminderung der Streuabbaurate des MON 88017-Bt-Mais ebenfalls nicht zu erkennen.

Die statistische Analyse der Fänge saprophager Dipteren ergab auch in der 3. Vegetationsperiode keine Unterschiede der Schlupfdichten in den Maisvarianten.

Bei weiteren Fraßversuchen unter Laborbedingungen mit Pflanzenmaterialien aus dem Freisetzungsversuch waren die Verpuppungs- und Schlupfraten von *Lycoriella castanescens* durch die Ernährung mit Streu von Bt-Mais nicht vermindert. Das Toxin in den Pflanzenteilen des Bt-Mais beeinträchtigte die Larven der Trauermückenart *Lycoriella castanescens* bis zur getesteten Menge von 16,45 µg/g nicht in ihrer Entwicklung. Toxin aus Mon 88017 kann in Werten bis zu 263,92 ng/g in *Lycoriella castanescens*-Larven und -Puppen nachgewiesen werden.

In der dritten Anbauperiode konnte für keine der untersuchten koleopteren Prädatorentaxa (hauptsächlich Carabiden und Staphyliniden) anhand der Bodenphotoelektoren eine geringere Schlupfraten in Bt-MON 88017 nachgewiesen werden. Es wurden lediglich signifikante Unterschiede in den mittleren Schlupfraten zwischen einzelnen Maissorten festgestellt (Schlupfraten Benicia und DK5143 > MON88017 und DKC315). Die Käferdichten in den endogäischen Fallen ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Maissorten.

In einem weiteren Fraßversuchen mit der Kurzflüglerart *Atheta coriaria* Kraatz (Coleoptera: Staphylinidae) wurden Larven der Trauermückenart *Lycoriella castanescens* als Beute zugeführt, die zuvor mit Wurzelmaterial von jeweils einer der vier Maisvarianten aufgezogen worden waren. Es resultierten zwischen den 4 Gruppen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der mittleren Lebensdauer oder der mittleren Fraßleistung. Insgesamt resultierte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der mittleren Anzahl produzierter Larven pro Weibchen, aber ein signifikanter Unterschied zwischen der MON 88017 und der DKC 5143-Gruppe.

In den in den Fraßversuchen mit MON 88017 eingesetzten *A. coriaria*-Individuen konnte trotz nachgewiesener Toxingehalte im verwendeten Mais-Wurzelsubstrat sowie in den eingesetzten Beutelarven nach Ende der Fütterungsphase kein Cry3Bb1 festgestellt werden.

In Wahlfraßversuchen der Prädatorenart *Calathus fuscipes* (Carabidae) mit Bt-Mais-gefütterten und nicht-Bt-gefütterten Maiszünslerlarven war kein signifikanter Unterschied in der Anzahl gefressener Larven der beiden Gruppen zu erkennen.

Parallel wurde der Bt-Gehalt entlang der Nahrungskette untersucht. Per ELISA wurden der Mais, die Maiszünsler-Larven und die Carabiden getestet. Beim Vergleich der Mittelwerte ergab sich ein Verlauf von 7 µg/g Bt-Protein in den frischen Maisblättern, über 2 µg/g Bt-Protein in den Zünsler-Larven, zu 0,2 µg/g Bt-Protein in den Carabiden.

Im Sommer 2007 wurden erneut Carabiden lebend in den einzelnen Parzellen gefangen und im Labor per ELISA auf ihren Gehalt an Bt-Protein untersucht. Zeitpunkt der Probenahme war vor und nach der Maisblüte, Ort der Probenahme waren Bt- oder Nicht-Bt-Parzellen. In 15 % der Laufkäfer aus den Nicht-Bt-Parzellen wurde vor der Blüte das Bt-Protein nachgewiesen. Nach der Blüte konnte das Cry3Bb1 in 39% der Carabiden detektiert werden. Auch bei den in den Bt-Parzellen gesammelten Laufkäfern ergab sich eine Steigerung des prozentualen Anteils von den Messungen vor der Blüte (33% positiv) zu den ELISA Werten nach der Blüte (69% positiv). Ein ähnliches Bild zeichnet sich bei Betrachtung der absoluten Werte ab. In positiv auf Cry3Bb1 getesteten Laufkäfern aus den Nicht-Bt-Parzellen findet vor der Ernte durchschnittlich 12 ng Cry-Protein je g Carabide. Dies steigert sich nach der Blüte auf 66 ng/g. Bei den Carabiden aus den Bt-Plots wurden vor der Blüte im Mittel 26 ng/g Bt-Protein gemessen. Nach der Pollenschüttung konnten durchschnittlich 300 ng/g Cry3Bb1 nachgewiesen werden. Die Maximalpeaks lagen dabei um das 10 fache höher. Insgesamt lassen die Ergebnisse vermuten, dass der Maispollen den Gehalt an Bt-Protein in den Carabiden erhöht. Die Funde von Bt-Protein in Carabiden aus den Nicht-Bt-Plots sind durch eine Verschleppung aus Bt-Parzellen zu erklären.

Die zu den Arthropoden der Krautschicht und ihren Gegenspielern erhobenen Diversitätsdaten und Dichten zeigten wie in der vorhergehenden Vegetationsperioden zum Teil deutliche Mais-Sortenunterschiede. Diese Unterschiede können jedoch nicht als Bt-Effekt gewertet werden, da keine signifikante Erhöhung oder Erniedrigung der Dichten oder Diversität in Parzellen von MON 88017 im Vergleich zu allen anderen Maissorten festgestellt werden konnten. Über die gesamte dreijährige Versuchsperiode wird deutlich, dass es starke jährliche Schwankungen in den Dichten der verschiedenen Tiergruppen gibt, die mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die jeweiligen Wetterbedingungen zurückzuführen sind.

Im Sommer 2007 wurden wiederum Untersuchungen zur Exposition der im Maisfeld häufigen Weichwanzenart *Trigonotylus caelestialium* gegenüber dem Bt-Protein durchgeführt, die Aufschluss über den Verbleib bzw. Abbau von Cry3Bb1 in *T. caelestialium* geben sollten. Hierbei wurden Tiere lebendig im Versuchsfeld gefangen und ins Gewächshaus überführt, wo sie für eine festgelegte Zeitspanne an Bt-Mais gehalten wurden. Gruppen von mehreren Tieren wurden anschließend entweder auf nah-isogenem Mais gehalten oder für einige Tage ausgehungert. Anschließend ELISA Analysen zeigten, dass in beiden Fällen ein Nachweis von Cry3Bb1 nach 3 Tagen nicht mehr möglich war. Es wird daher davon ausgegangen, dass das Bt-Protein von den Weichwanzen schnell ausgeschieden oder in deren Verdauungssystem rapide abgebaut wird. Dies bietet eine Erklärung für Befunde aus dem Versuchsfeld von 2006, wonach in Individuen aus nicht-Bt-Parzellen keine Bt-Protein nachgewiesen werden konnte.

## 7 Schlußfolgerungen

Sowohl der phänologische Verlauf der Maisentwicklung bei MON 88017, als auch die Expressionswerte lagen in ihren jährlichen Schwankungen im Bereich der Erwartungswerte. Auch bei den Cry3BB1-Konzentrationen im Boden gab es jährliche Schwankungen, wobei sich die Werte jedoch nicht signifikant voneinander unterschieden. Im Gegensatz zu den Konzentrationen im Rhizosphärenboden zeigte sich beim freien Boden ein leichter Aufwärtstrend der Werte. Von der betreffenden Arbeitsgruppe am vTI Braunschweig wird dieser Trend auf eine starke Durchwurzelung des Bodens zurückgeführt, da während der drei Versuchsjahre kein Frucht- oder Parzellenwechsel und keine wendende Bodenbearbeitung vorgenommen wurde. Insgesamt zeigten die Untersuchungen, dass das Cry3Bb1-Protein instabil ist und sich nach der Ernte im Boden und in den verbleibenden Pflanzenteilen schnell zersetzt. Bisher gibt es keine Hinweise, dass die Bt-

Maisstreu der Sorte MON 88017 im Freiland weniger gut zersetzt wird als Maisstreu der Nicht-Bt-Sorten.

Bei den direkten und indirekten Untersuchungen an Nichtzielorganismen wurden weder bei den Dichten noch bei der Diversität offensichtliche Bt-Effekte gefunden. Obwohl die Untersuchungen alle Taxa der verschiedenen Strata der Maisbiozönose einbezogen, zeigten sich lediglich signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Maislinien. Auch bei diesen, vermutlich sortenspezifischen, Unterschieden waren keine konsistenten Trends zu beobachten. Bei Einzeluntersuchungen gab es widersprechende Ergebnisse. So traten im Bt-Mais geringere Dichten bei Carabiden auf (JKI Braunschweig), die jedoch in den Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe (RWTH Aachen) nicht bestätigt werden konnten. Auch Hinweise auf eine Vermeidung Bt-gefütterter Beutetiere ließen sich in einem Nachfolgeversuch nicht bestätigen. Insgesamt gab es auch bei den multitrophischen Untersuchungen keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Prädatoren durch Bt-haltige Beute.