

Monitoring der Anpassung des Maiszünslers an transgenen *Bacillus thuringiensis*-Mais - Populationsgenetische Untersuchungen in ausgewählten Anbauregionen Deutschlands

Gustav-Adolf Langenbruch¹, Bernd Hommel² und Wolfgang Burgermeister³

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA),

¹ Institut für biologischen Pflanzenschutz, Heinrichstr. 243, 64287 Darmstadt,

² Institut für integrierten Pflanzenschutz,
Stahnsdorfer Damm 81, 14532 Kleinmachnow,

³ Institut für Pflanzenvirologie, Mikrobiologie und biologische Sicherheit,
Messeweg 11/12, 38104 Braunschweig

Zusammenfassung

Der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) kommt in Deutschland als E- und Z-Rasse vor, wobei fast ausschließlich die Z-Rasse schädlich wird. Das Befallsgebiet dieser Rasse hat sich in den letzten 80 Jahren erheblich ausgedehnt. Süddeutschland ist großenteils besiedelt. Der Maisanbau umfasste 1998 in Deutschland ca. 340.000 ha Körnermais und 1.240.000 ha Silomais, davon liegen etwa 120.000 ha Körnermais und 320.000 ha Silomais im Befallsgebiet. Die Ertragsverluste können im Körnermais bei 20% liegen, im Silomais wird vor allem die Ernte erheblich erschwert. Zur Bekämpfung des Maiszünslers stehen in Deutschland chemische, biologische (*Trichogramma*-Schlupfwespen) und mechanische Verfahren zur Verfügung. Der Maiszünsler wird heute auf großen Flächen ohne Einsatz chemischer Insektizide umweltfreundlich bekämpft. Allerdings bietet der *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)-Mais wirtschaftliche Vorteile.

Die bekannten *Bt*-Mais-Linien produzieren überwiegend das *Bt*-Toxin Cry 1Ab oder das nahe verwandte Cry 1Ac. Gegen Cry 1Ab sind Schädlingsresistenzen durch einen langjährigen Einsatz entsprechender *Bt*-Präparate bekannt. Auch beim Maiszünsler konnte eine solche Resistenz im Labor provoziert werden. Um eine langfristige Nutzung des *Bt*-Mais zu ermöglichen, ist seine Einbeziehung in integrierte Anbausysteme erforderlich. Um etwaig auftretende Minderempfindlichkeiten frühzeitig nachweisen zu können, sollen in dem Forschungsprojekt, das von drei Instituten der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA) beantragt wurde, die vorkommenden Maiszünsler-Populationen abgegrenzt und charakterisiert sowie ihre Basisempfindlichkeit gegenüber *Bt*-Toxinen ermittelt werden. Ferner soll versucht werden, Aussagen über die Häufigkeit des Auftretens von Resistenzallelen in einer Population zu erarbeiten und Resistenzen gegen *Bt*-Toxine durch Selektionszuchten im Labor zu provozieren und gegebenenfalls zu charakterisieren. Schließlich werden im *Bt*-Mais überlebende Maiszünsler-Larven auf ihre *Bt*-Empfindlichkeit getestet, weil sie möglicherweise zuerst eine verminderte *Bt*-Empfindlichkeit aufweisen.

Abstract

The European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) is common in Germany as E- and Z-strain. But only the Z-strain normally causes damage in maize. The infested area has expanded north in the last 80 years. Today southern Germany is nearly completely colonised. In 1998 maize was growing on 340,000 ha for grain maize and 1,240,000 ha for ensilage in whole Germany. About 120,000 ha for grain maize and 320,000 ha for ensilage had been grown in the infested area. The European corn borer can reduce yields of grain maize up to 20%. Harvesting of maize for ensilage can be extremely complicated by feeding of the caterpillars.

In Germany the European corn borer is controlled by chemical, biological (*Trichogramma* egg parasites), and mechanical methods. Today pest control on large areas is environmentally friendly done without chemical insecticides. But nevertheless *Bt* maize can have economical advantages.

The well-known events of *Bt* maize mostly produce the *Bt* toxin Cry 1Ab or the closely related toxin Cry 1Ac. It is known that some other pests are resistant against Cry 1Ab after spraying of *Bt* preparations over many years. In laboratories *Bt* resistance could be provoked in corn borer populations, as well. To ensure a long-lasting use of transgenic *Bt* maize, its incorporation into integrated cultivation systems is necessary.

A project proposed by three institutes of the Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry should enable to discover strains of European corn borer populations with a reduced susceptibility to *Bt* toxins at an early stage. These investigations should also delimit and characterise the European corn borer populations in Germany and detect their present susceptibility to *Bt* toxins, which will be the basis for further studies. Goals are to detect the frequency of occurrence of alleles of resistance in populations, to provoke resistance by selection in the laboratory and possibly to characterise the resistance. Larvae collected in *Bt* maize will be tested regarding their susceptibility to *Bt* toxins, since they may initially exhibit a reduced susceptibility.

Maiszünsler in Deutschland

Der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) ist in Europa beheimatet. Er wurde vor 1920 in die USA verschleppt. Vom Maiszünsler sind zwei Pheromonrassen bekannt: Die E-Rasse ist weit verbreitet, lebt aber in Deutschland überwiegend in Beifuß (*Artemisia vulgaris*).

Der Mais wird in Deutschland fast ausschließlich von der Z-Rasse besiedelt (Lorenz, 1993), die vermutlich vor 1920 nach Baden einwanderte. Möglicherweise kam eine Einwanderung aus Österreich in das untere Inntal hinzu. Außerdem befindet sich im Oderbruch ein altes Befallsgebiet. Wir haben es also beim Maiszünsler in Deutschland mit mindestens vier Herkünften zu tun. Hybriden zwischen E- und Z-Rasse sind bekannt.

Die wirtschaftlich bedeutende Z-Rasse des Zünslers hat heute die meisten Anbaugelände Süddeutschlands besiedelt. Die nördliche Grenze des Maiszünsler-Befallsgebiets läuft derzeit vom Saarland durch den Hunsrück längs des Rheins nach Bonn, dann südöstlich

durch den Westerwald über Schlüchtern in den Süden Thüringens. Nördlich davon gibt es einige Verbreitungseinseln, z.B. bei Fulda, bei Köthen (Sachsen-Anhalt), südlich von Berlin, im Oderbruch und in Sachsen.

Der Maiszünsler hat in Deutschland eine Generation pro Jahr. Die Falter fliegen von Juni bis August. Die Raupen fressen anfangs auf und später in der Maispflanze, vor allem im Stängel. Sie überwintern in Ernterückständen und Stoppeln auf dem Acker und verpuppen sich ab Mai in Pflanzenresten an der Bodenoberfläche. Der Ertragsverlust durch den Maiszünsler liegt in Deutschland bei starkem Befall (ab ca. 2 Larven/Stängel) im Körnermais bei etwa 20%. Im Silomais wird die Ernte bei Stängelbruch und nasser Witterung erheblich erschwert.

Die Maisanbaufläche betrug 1998 in Deutschland 343.000 ha Körnermais und 1.238.000 ha Silomais. Die Anbaufläche im Maiszünsler-Befallsgebiet dürfte bei 120.000 ha Körnermais und 320.000 ha Silomais liegen. Zur Maiszünsler-Bekämpfung wurden in den letzten Jahren etwa 34.000 ha Mais chemisch (überwiegend Pyrethroide), 6.000 ha biologisch (*Trichogramma*-Schlupfwespen) und große Flächen mechanisch (durch Häckseln und sauberes Unterpflügen der Ernterückstände) behandelt. Viele Bausteine für eine integrierte Bekämpfung sind vorhanden und werden in der Praxis genutzt. Auch *Bt*-Präparate sind zur Maiszünsler-Bekämpfung zugelassen, werden allerdings nur noch selten eingesetzt, da Schlupfwespen preiswerter und oft auch wirksamer sind.

Der Maiszünsler wird also heute in Deutschland - im Unterschied etwa zu den USA - auf großen Flächen ohne Einsatz chemischer Insektizide umweltfreundlich bekämpft. Allerdings bietet der transgene *Bt*-Mais demgegenüber betriebswirtschaftliche Vorteile.

Transgener *Bt*-Mais

Der *Bt*-Mais zeichnet sich dadurch aus, dass *Bt*-Toxin-Gene inseriert sind. Es gibt verschiedene Linien, die sich im Toxin unterscheiden: Bt 176, Bt 11 und MON 80100 exprimieren das Cry 1Ab, DBT 418 das Cry 1Ac und eine andere Linie von PGS/AgrEvo Cry 9C (Deml und Dettner, 1998). Auch die Expression ist bei den einzelnen Linien nach Ort und Stärke unterschiedlich.

Cry 1Ab ist das Toxin, gegen das 1985 die Dörrobstmotte (*Plodia interpunctella*) in Vorratslagern der USA (McGaughey, 1985) und 1988 die Kohlmotte (*Plutella xylostella*) auf den Philippinen (Kirsch und Schmitterer, 1988) und später auch auf Hawaii resistent wurden. In beiden Fällen war langjährig das gleiche *Bt*-Präparat zur Bekämpfung eingesetzt worden. In Selektionszuchten konnten in den USA auch beim Maiszünsler Resistenzen gegen dieses *Bt*-Toxin provoziert werden (Fangneng Huang *et al.*, 1997).

In Deutschland sind trotz 30jährigen Einsatzes von *Bt*-Präparaten im Pflanzenschutz - zunächst auf relativ kleinen Flächen, aber z.B. 1996 auf ca. 20.000 ha - bisher keine Resistenzen gegen *Bt*-Toxine bekannt geworden. Das ist allerdings bei einem großflächigen Anbau von transgenen *Bt*-Pflanzen aus mehreren Gründen keineswegs auszuschließen.

Cry 1Ac ist eng mit Cry 1Ab verwandt, es konkurriert teilweise mit Cry 1Ab um den gleichen Rezeptor im Mitteldarm der Raupen. Cry 9C ist nur wenig mit den vorgenannten verwandt und wurde bisher auch nicht kommerziell genutzt. Von etwaigen Resistenzen dürfte diese Linie deshalb zunächst nicht betroffen sein.

Beantragtes Projekt

Die erste Projektskizze des von der BBA beantragten BMBF-Projekts wurde im Februar 1998 eingereicht. Da parallel ein ähnliches Projekt von Schuphan und Bartsch (RWTH Aachen) vorgeschlagen wurde, waren Abstimmungen und Beschränkungen erforderlich: Die Bearbeitung der Maiszünsler-Befallsgebiete wurde aufgeteilt und die vorgesehene Methodik abgestimmt bzw. ebenfalls aufgeteilt. Bei der Durchführung zahlreicher Arbeitsschritte wird dem "EU-draft-protocol for the monitoring of European corn borer resistance to *Bt*-maize" große Bedeutung zukommen.

Es sind folgende Arbeiten vorgesehen:

- Vergleich verschiedener Biotestmethoden zur Erfassung der *Bt*-Empfindlichkeit von Maiszünsler-Herkünften;
- Ermittlung der gegenwärtig vorliegenden Basis-Empfindlichkeit einzelner Maiszünsler-Herkünfte gegenüber *Bt*-Toxinen;
- Testung von Maiszünsler-Larven aus *Bt*-Mais auf *Bt*-Empfindlichkeit;
- Haltung von Inzuchtlinien zur Erfassung der Häufigkeit von Resistenzallelen gegen *Bt*-Toxine in einer Maiszünslerpopulation (vgl. Andow *et al.*, 1998);
- Haltung von Maiszünsler-Herkünften unter *Bt*-Toxin-Selektionsdruck, um Resistenzen im Labor zu provozieren;
- Differenzierung von Rassen und Populationen mittels RAPD-PCR.

Zu einzelnen Punkten sind bereits Vorarbeiten angelaufen:

- In zwei Anbaugebieten wird der Maiszünsler-Befall von *Bt*-Mais im Vergleich zu nicht-transgenen Sorten ermittelt. Larven werden gesammelt und im Labor gehalten.
- Zur Differenzierung von Populationen konnten mittels RAPD-PCR erste Herkunftsbeziehungen bestätigt werden.
- Für einzelne Herkünfte konnte ein Befall mit Sporozoen (Mikrosporidien) nachgewiesen werden (Langenbruch und Kleespies, 1998), der Zuchten und Biotests empfindlich stören könnte.

Ziele des Projektes:

- Charakterisierung verschiedener Maiszünsler-Populationen und Abschätzung ihrer genetischen Verwandtschaft;
- Frühzeitige Nachweismöglichkeit für eine Minderempfindlichkeit gegenüber *Bt*-Toxinen in Maiszünsler-Populationen;

- Abschätzen der Wahrscheinlichkeit für eine Anpassung einer Maiszünsler-Population an *Bt*-Mais;
- Verhinderung einer ausgeprägten Resistenzentwicklung durch Einbau von *Bt*-Mais in integrierte Anbausysteme.

Schlussfolgerungen

Schädlingpopulationen können gegen *Bt*-Toxine resistent werden. Wenn transgener *Bt*-Mais langfristig widerstandsfähig gegen den Maiszünsler bleiben soll, ist seine Einbeziehung in integrierte Anbausysteme (Langenbruch und Lorenz, 1989) erforderlich. Um frühzeitig verminderte Empfindlichkeiten gegen *Bt*-Toxine aufzuspüren, ist ein Monitoring der Anpassung des Maiszünslers erforderlich. Dazu sind geeignete Methoden zu erarbeiten, die vorkommenden Maiszünsler-Populationen abzugrenzen und ihre jetzige Basisempfindlichkeit gegenüber *Bt*-Toxinen zu ermitteln. Über eine Abschätzung der Häufigkeit von Resistenzallelen in Zünsler-Populationen sollen Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer Resistenzentwicklung und den notwendigen Umfang *Bt*-freier Refugien möglich werden. Wenn sich *Bt*-Resistenzen in Selektionszuchten deutscher Herkunft im Labor provozieren lassen, könnten die Ursachen, ihre genetische Stabilität und die Wirksamkeit anderer *Bt*-Toxine geklärt werden. In der zur Zeit im versuchsweisen Anbau stehenden *Bt* 176-Linie können einige Maiszünsler-Larven überleben. Sie sollen auf *Bt*-Empfindlichkeit überprüft werden, da bei ihnen am ehesten Minderempfindlichkeiten im Freiland zu erwarten sind.

Literatur

Andow, D.A., Alstad, D.N., Pang, Y.-H., Bolin, P.C., Hutchison, W.D.:

Using an F2 Screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer. J. Econ. Entomol. 91, 579-584, 1998.

Deml, R., Dettner, K.:

Wirkungen *Bacillus thuringiensis*-Toxin-produzierender Pflanzen auf Ziel- und Nichtzielorganismen - eine Standortbestimmung. Umweltforschungsplan des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit - Gentechnik-Forschungsbericht 112 01 027 (UBA - FB 98 -051) - ISSN 0722-186X, 1998.

Fangneng Huang, Higgins, R.A., Buschman, L.L.:

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, 1997.

Kirsch, K., Schmutterer, H.:

Low efficacy of a *Bacillus thuringiensis* formulation in controlling the diamondback moth, *Plutella xylostella*, in the Philippines. J. Appl. Entomol. 105, 249-255, 1988.

Langenbruch, G.A., Kleespies, R.G.:

Die Ausbreitung des Maiszünslers und die Verbreitung seiner Mikrosporidien. Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch., Berlin-Dahlem, H. 357, 1998.

Langenbruch, G.A., Lorenz, N.:

Maiszünslerreduzierung bei der Körnermaisernte. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. (Braunschweig) 41, 140-144, 1989.

Lorenz, N.:

Untersuchungen zur Verbreitung des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) in Beifuß (*Artemisia vulgaris* L.) und Mais (*Zea mays* L.), zu Überwinterung und Falterschlupf sowie zur Überwachung seiner Z-Rasse mittels Pheromonfallen. Diss. Univ. Göttingen, 210 S., 1993.

McGaughey, W.H.:

Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 229, 193-195, 1985.