



Monitoring von Schmetterlingen im Rahmen einer Umweltüberwachung von gentechnisch veränderten Pflanzen: Situation, Problematik und Konzepte

Andreas Lang
Institut für Umweltgeowissenschaften
Universität Basel
Bernoullistrasse 30
CH-4056 Basel
Schweiz
andreas.lang@unibas.ch



Am Anfang war....

Losey J.E., Raynor L.S & Carter M.E. (1999)



scientific correspondence

Transgenic pollen harms monarch larvae

Although plants transformed with genetic material from the bacterium *Bacillus thuringiensis* (Bt) are generally thought to have negligible impact on non-target organisms¹, Bt corn plants might represent a risk because most hybrids express the Bt toxin in pollen², and corn pollen is dispersed over at least 60 metres by wind³. Corn pollen is deposited on other plants near corn fields and can be ingested by the non-target organisms that consume these plants. In a laboratory assay we found that larvae of the monarch butterfly, *Danaus plexippus*, reared on milkweed leaves dusted with pollen from Bt corn, did not grow as slowly and suffered higher mortality than larvae reared on leaves dusted with untransformed corn pollen or on leaves without pollen.

Pollen for our assay was collected from N4640-Bt corn and an unmodified, untransformed hybrid, and was applied by gently tapping a quantity of pollen over milkweed (*Asclepias tuberosa*) leaves that had been lightly misted with water. Pollen density was set to visually match densities on milkweed leaves collected from corn fields. Petioles of individual leaves were placed in water-filled tubes that were taped into plastic boxes. Five three-day-old monarch larvae from our captive colony were placed on each leaf, and each treatment was replicated five times. Milkweed leaf consumption, monarch larval survival and final larval weight were recorded over four days.

Larval survival (56%) after four days of feeding on leaves dusted with Bt pollen was significantly lower than survival either on leaves dusted with untransformed pollen or on control leaves with no pollen (both 100%, $P=0.008$) (Fig. 1a). Because there was no mortality on leaves dusted with untransformed pollen, all of the mortality on leaves dusted with Bt pollen seems to be due to the effect of the Bt pollen.

There was a significant effect of corn pollen on monarch feeding behaviour ($P=0.0001$) (Fig. 1b). The mean cumulative proportion of leaves consumed per larva was significantly lower on leaves dusted with Bt pollen (19.37 ± 0.14 , $P=0.0001$) and on leaves dusted with untransformed pollen (11.12 ± 0.09 , $P=0.0007$) compared with consumption on control leaves without pollen (14.41 ± 0.08). The reduced rates of larval feeding on pollen-dusted leaves might represent a gustatory response of this highly specific herbivore to the presence of a 'non-host' stimulus. However, such a gustatory feeding deterrent alone could not explain the nearly twofold decrease in

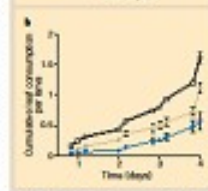
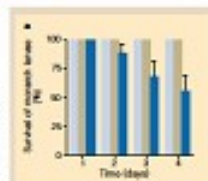


Figure 1 Survival and leaf consumption of second- to fifth-instar monarch larvae on each of three different leaf treatments: leaves with no pollen (light blue), leaves treated with untransformed corn pollen (green) and leaves dusted with pollen from Bt corn (dark blue). **a**, Mean (\pm s.e.m.) survival based on the proportion of larvae surviving in the replicates of each treatment. **b**, Mean (\pm s.e.m.) cumulative leaf consumption based on the total amount of leaf area consumed per larva in two replicates of each time point. The amount of leaf area consumed per larva in each experimental unit was calculated for each time interval by dividing the amount of leaf area consumed in that interval by the number of larvae alive during the time interval. Cumulative consumption was calculated by summing the leaf area consumed per larva at each interval. Colours of bars correspond to those of the bars in **a**.

consumption rate on leaves with Bt pollen compared with leaves with untransformed pollen ($P=0.004$).

The low consumption rates of larvae fed on leaves with Bt pollen led to slower growth rates: the average weight of larvae that survived to the end of the experiment on Bt pollen leaves (0.16 ± 0.03 g) was less than half the average final weight of larvae that fed on leaves with no pollen (0.38 ± 0.02 g, $P=0.0001$).

These results have potentially profound implications for the conservation of monarch butterflies. Monarch larvae feed exclusively on milkweed leaves⁴; the common milkweed, *A. syriaca*, is the primary host plant of monarch butterflies in the northern United States and southern Canada⁵. Milkweed frequently occurs in and around the edges of corn fields, where it is fed on by monarch larvae⁶. Corn fields

shed pollen for 8–10 days between late June and mid-August, which is during the time when monarch larvae are feeding⁷. Although the northern range of monarchs is vast, some of the summer monarch population is concentrated within the mid-western United States, a region referred to as the 'corn belt' because of the intensity of field corn production⁸. The large land area covered by corn in this region suggests that a substantial portion of available milkweeds may be within range of corn pollen deposition.

With the amount of Bt corn planted in the United States projected to increase markedly over the next few years⁹, it is imperative that we gather the data necessary to evaluate the risks associated with this new agronomy and to compare these risks with those posed by pesticides and other pest-control tactics. John E. Losey, Linda S. Raynor, Matthew E. Carter
Department of Entomology, Cornell Hall, Cornell University, Ithaca, New York 14853, USA
e-mail: jel2@cornell.edu

1. Gold, A. K., Madsen, M. & Paulsen, G. L. *International Review of Cytology* 199, 401–426 (1999).
2. Boring, L. L., Brown, D., Vanden, D., Sapping, M. & Powell, L. *Entomol. Exp. Appl.* 104, 1–10 (1999).
3. Lopez, G. S., Ziegler, R. G. & Hayes, J. W. *Ecology* 74, 470–477 (1993).
4. Robinson, J. E., Cechvala, J. & Brown, J. E. in *Biology and Conservation of the Monarch Butterfly* (eds Miller, A. & Schultz, G. P.) 101–107 (Oxford University Press, Oxford, 1995).
5. Robinson, J. E., Cechvala, J. & Brown, J. E. *Cons. Biol.* 15, 879–887 (2001).
6. Smith, J. P., Fry, T. A., Oringer, S. H. & Waps, G. L. *Entomol. Exp. Appl.* 104, 111–119 (1999).
7. Brown, J. E., Fry, T. A., Oringer, S. H., Paulsen, G. L. & Miller, A. K. *Entomol. Exp. Appl.* 104, 121–131 (1999).
8. Ashby, G. W. in *Monarchs: 50 Years of North American Plant Life* (ed. Ashby, G. W.) 101–107 (Oxford University Press, Oxford, 1995).

The mystery of female beauty

Yu and Shepard¹ have reported a preference for heavy women with high waist-to-hip ratios (WHR) in a culturally isolated population in southeast Peru. Their findings are interesting because a preference for low WHR is widespread in westernized populations². However, we disagree with their argument that cultural evolution is necessary for an adaptive interpretation of WHR preference.

WHR and waist circumference are positively correlated with testosterone and negatively associated with oestrogen³. Women with low WHR have better health and fertility than women with high WHR⁴. However, women in England and Texas with high

Was ist Bt-Mais....



Zielorganismus ein Schadschmetterling, z.B. der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*)

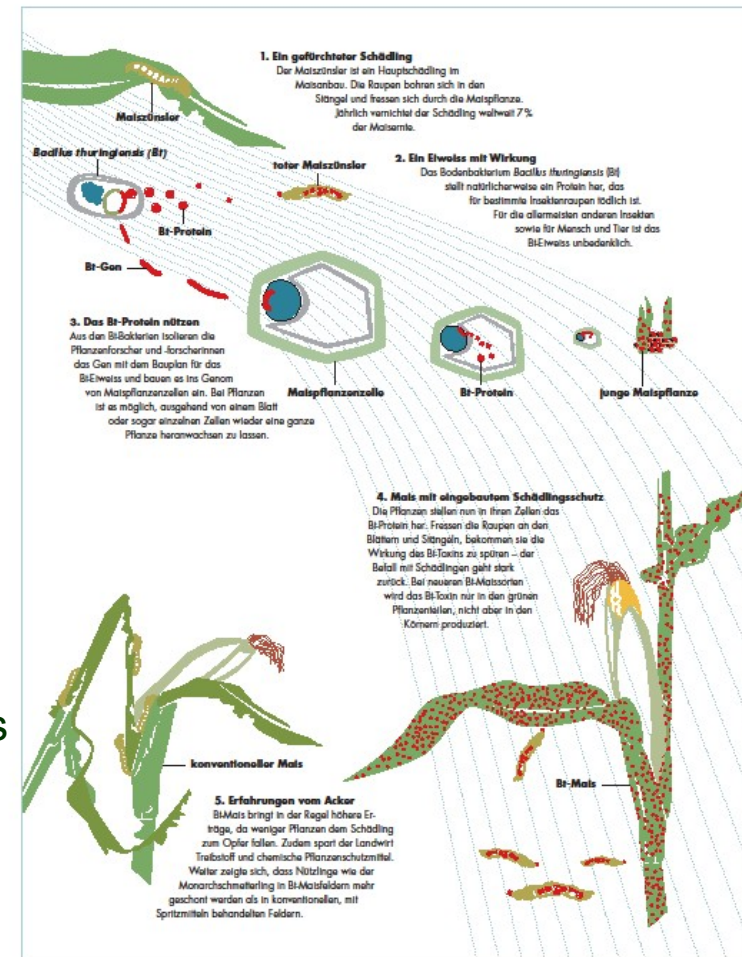
Bt = *Bacillus thuringiensis*

Transfer von Bt DNA

→ transgener insektenresistenter Bt-Mais

Bt-Mais

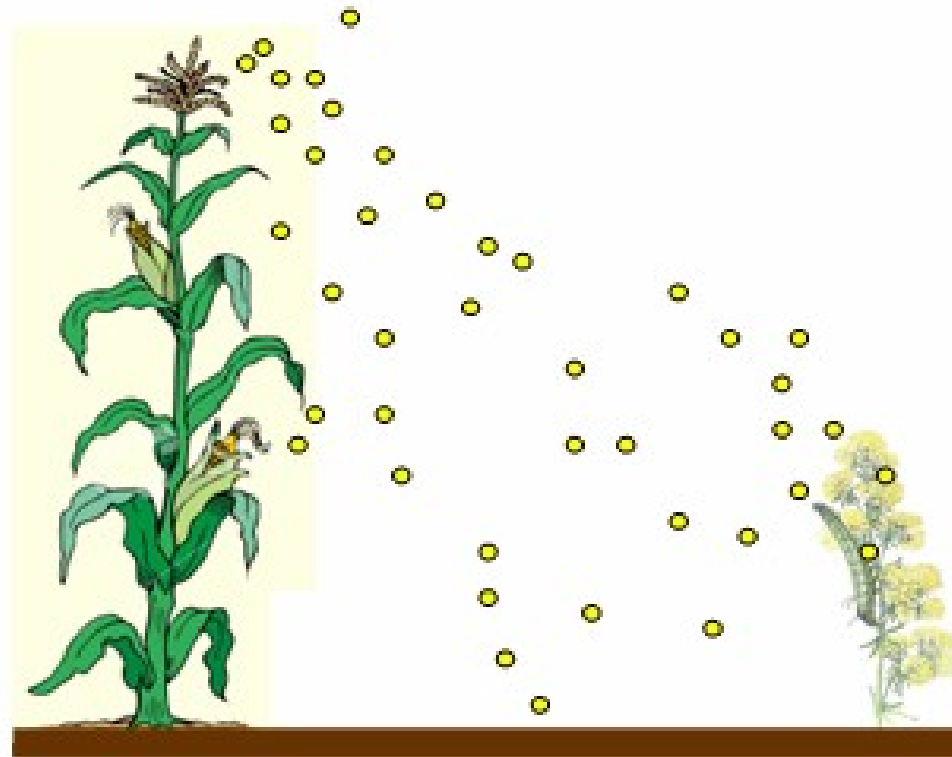
www.grauert.ch



Exposition von Nichtziel-Schmetterlingen...



Verdriftung von Bt-Maispollen
auf Wirtspflanzen von Schmetterlingsraupen

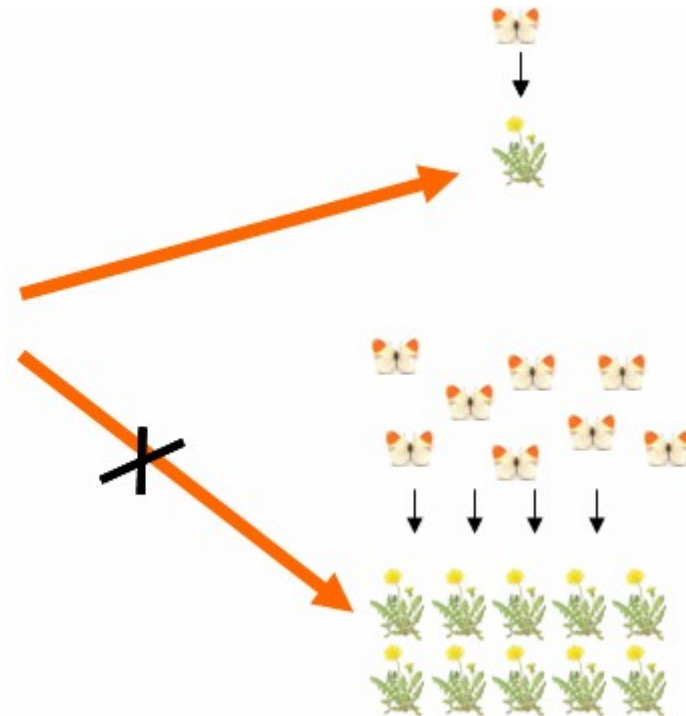


Was ist HT-Mais....

HT = Herbizidtoleranz, Toleranz gegen bestimmte Breitband-Herbizide, z.B. Glyphosat (Roundup) und Glufosinat (Liberty, Basta)



Indirekter Effekt der Herbizid-Anwendung



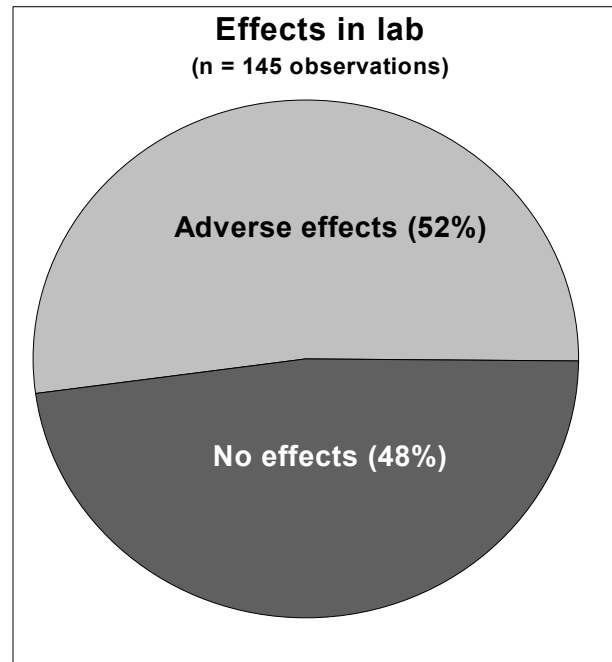
Belege für Effekte von Bt-Mais....



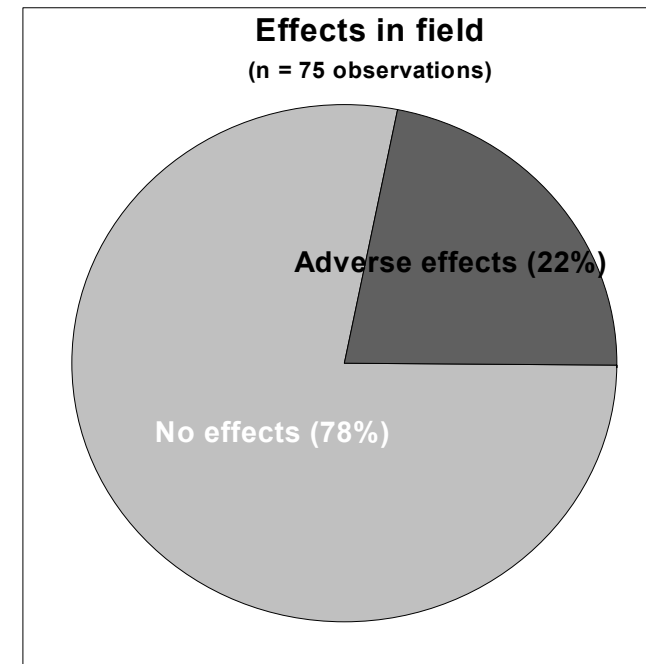
Review von Lang & Otto (2010)

A synthesis of laboratory and field studies on the effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* (Bt) maize on non-target Lepidoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 135: 121–134, 2010

Laborstudien, Schmetterlinge



Feldstudien, Schmetterlinge

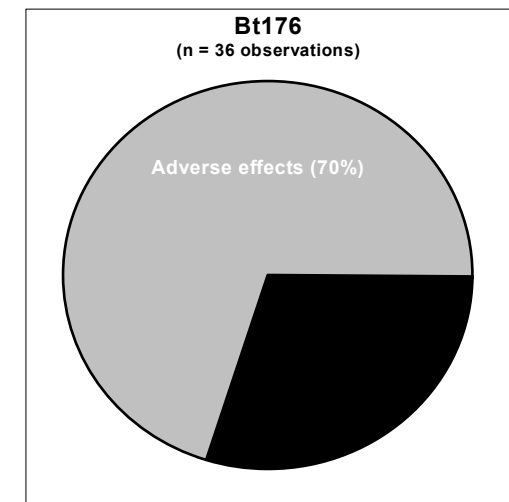
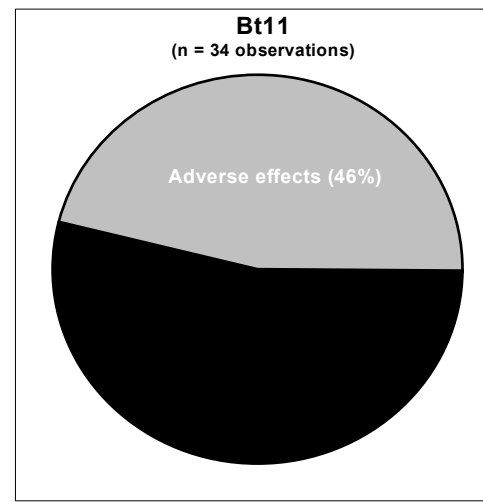
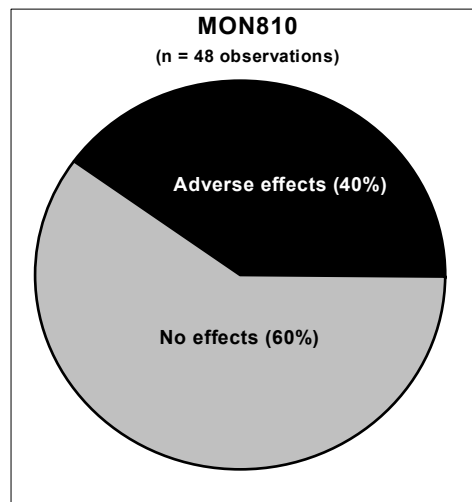


Belege für Effekte von Bt-Mais....



Review von Lang & Otto (2010)

Laborstudien, Schmetterlinge

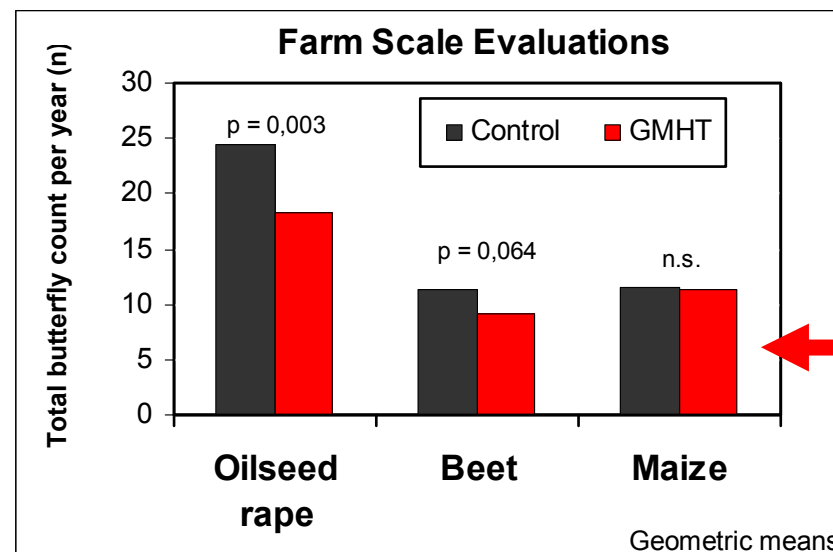


Belege für Effekte von HT-Pflanzen....

Farm Scale Evaluations in Großbritannien (HT crops)
Roy et al. (2003), Haughton et al. (2003)

Vegetationsbedeckung 19 – 25% niedriger in Feldrändern von HT-Raps and HT-Rübe, 28% höher bei HT-Mais

Blütenpflanzen bis zu 53% weniger neben HT-Raps und HT-Rübe, bis zu 118% mehr neben HT-Mais



Atrazine!

Situation in Europa....



Bt- und HT-Mais

- 21 Anträge auf Zulassung transgener Feldfrüchte zum Anbau in Europa (Juni 2010): Mais, Kartoffel, Baumwolle, Nelken, Raps, Zuckerrübe (gmo-compass.org)
- Davon 12 Anträge für Mais (= 57%): insektenresistenter Mais (IR, Bt), herbizidtoleranter Mais (HT)
- Anbau von transgenem Mais in Europa: 1 Bt-Mais zugelassen (MON810, insektenresistent), zwei weitere Bt-Mais beantragt, 3 herbizidtolerante beantragt, and 6 Mais mit HR-IR-Kombination beantragt
- Anbau 2009: Spanien 76.057 ha, Tschechische Republik 6.480 ha, Rumänien 3.244 ha, Portugal 5.094 ha, Polen 3.000 ha, Slowakei 875 ha (Quelle: transgen.de), keine Anbaugenehmigung in Frankreich, Österreich, Luxemburg, Ungarn, Griechenland und Deutschland (safeguard clauses)

Bedarf an Monitoring....



2001/18/EC, 2002/811/EC

“The objective of a monitoring plan is to: (i) confirm that any **assumption** regarding the occurrence and impact of potential adverse effects of the GMO or its use in the e.r.a. are correct, and (ii) identify the occurrence of adverse effects of the GMO or its use on human health or the environment which were not anticipated in the e.r.a.”

“Issues arising from the risk assessment that are subject to a degree of **uncertainty** may also be required as a part of the monitoring strategy. [...]

“The design of the monitoring plan should: ...incorporate general surveillance for unanticipated adverse effects and, if necessary, (case-) specific monitoring focusing on **adverse effects identified** in the e.r.a.:

[...] surveillance could, if appropriate, make use of already **established routine surveillance** practices such as the monitoring of agricultural cultivars, plant protection, or veterinary and medical products.”

Monitoring von Schmetterlingen....



Warum Schmetterlinge?

- Schädliche Effekte nachgewiesen
- Hohe Unsicherheit bzgl. dieser Effekte
- Gute Bioindikatoren
- Repräsentativ für Biodiversität
- Frühwarnsystem wg. kurzer Generationszeiten
- Guter Bearbeitungs- und Kenntnisstand
- Geeignete Monitoringmethoden
- Ausreichend Fachpersonal
- Hohe Popularität
- Anerkanntes Schutzziel

Schmetterlinge = tagaktive Arten „Tagfalter“ (ca. 200 Arten in BRD), nachaktive „Nachtfalter“ (> 1000 Arten), Kleinschmetterlinge (ca. 1000 Arten)

Monitoring von Schmetterlingen....



Monitoringmethoden für adulte „Tagfalter“

Linientranspekt

Mark-Release-Recapture (MRR)

(Malaisefallen)

(Köder)



Monitoringmethoden für nachtaktive Schmetterlinge

Lichtfang

(Malaisefallen)

(Köder)



Präimaginalstadien

Gezielte Suche nach Eiern und Raupen



Monitoring von Tagfaltern....



Aspekte / Probleme

Linientranssekt → relative Abundanzen

Mark-Release-Recapture (MRR) → absolute Abundanzen, hoher Aufwand

Starke saisonale Abundanzschwankungen durch z.B.:

- Wetter
- Tageszeit
- Erfahrung des Erfassers
- Habitatstruktur

→ Standardisierung Aufnahmebedingungen (Begehungen, Wetter, etc.)

→ Mehr Stichproben

Starke Populationsschwankungen von Jahr zu Jahr


→ Langzeitaufnahmen, ein größeres Gebiet abdeckend

Monitoring von Tagfaltern....

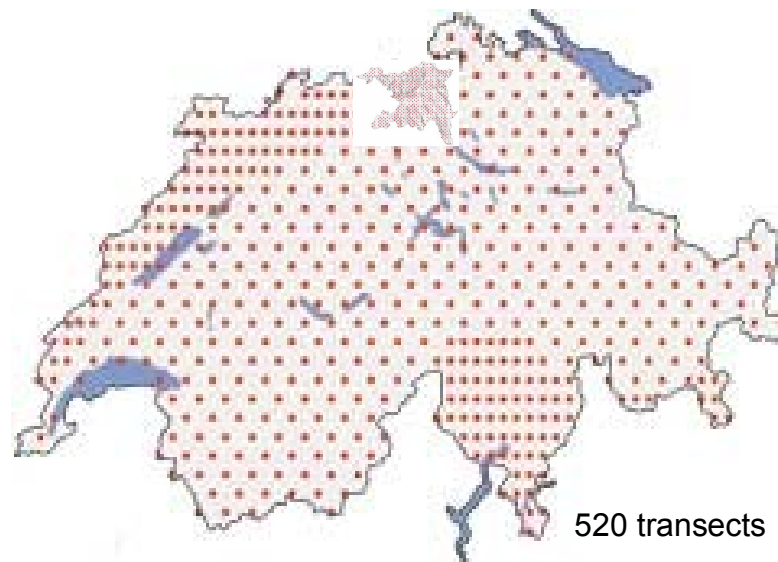


Stichprobenumfang

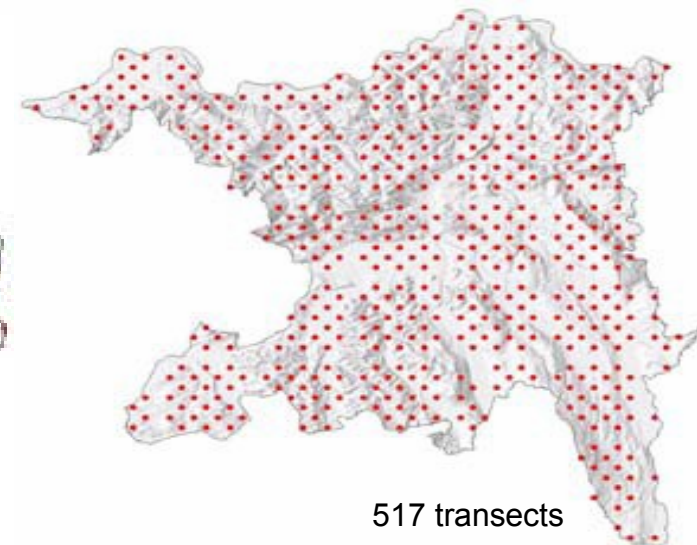
Lang & Bühler 2010
(ein Projekt des Bundesamtes
für Umwelt BAFU, Bern)



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra



BDM
(Biodiversitätsmonitoring Schweiz)



LANAG
(Langzeiterfassung der Artenvielfalt in der
Normallandschaft des Kanton Aargau)

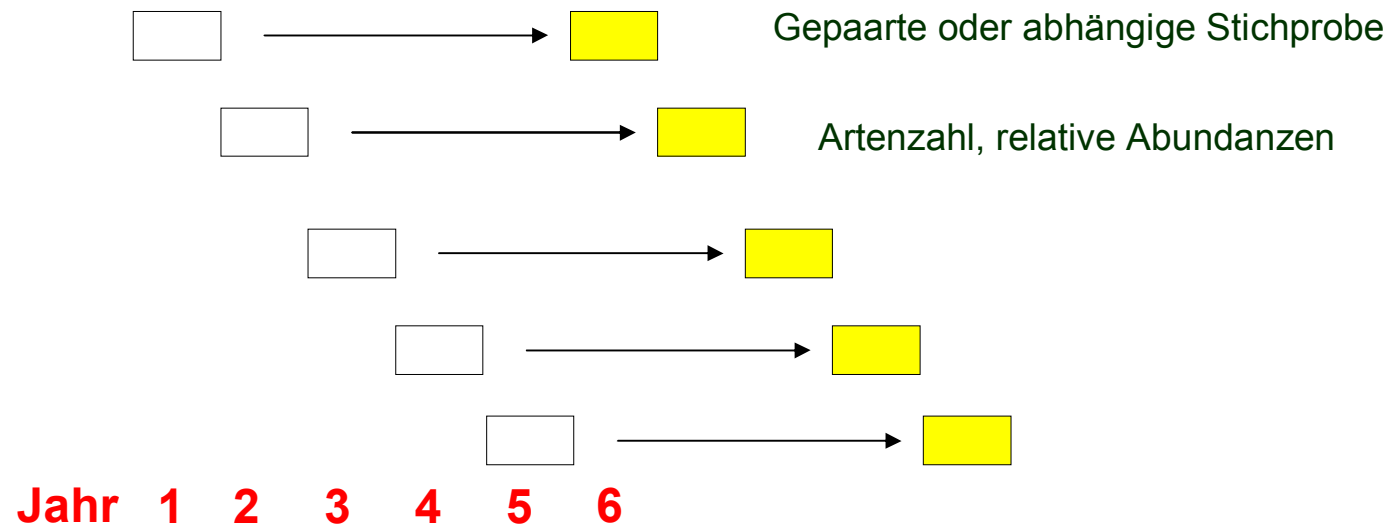
Monitoring von Tagfaltern....



Stichprobenumfang

Lang & Bühler 2010

Aufnahme der Transekte über 5 Jahre



Monitoring von Tagfaltern....



Stichprobenumfang

Lang & Bühler 2010

Analyse der Power (statistischen Mächtigkeit)

Nur Transekte in der Landwirtschaft:

→ 150 LANAG transects (1998 – 2009)

→ 54 BDM transects (2003 – 2009)

Kalkulation des benötigten Stichprobenaufwandes zur Entdeckung eines GVO-Effektes einer bestimmten Grösse

Annahmen: 80% Power, statistische Signifikanz von 5%, 2-seitiger t-Test

Getestete Szenarien: GVO-Effekte von 10%, 20%, 30%, 40% and 50% auf Artenzahl und Abundanzen



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Monitoring von Tagfaltern....



Stichprobenumfang

Lang & Bühler 2010

Verlust von 10% der Arten

BDM → circa 75 Transektpaare notwendig

LANAG → circa 220 Transektpaare notwendig

Reduktion der Abundanzen um 30%

BDM → circa 79 Transektpaare notwendig

LANAG → circa 71 Transektpaare notwendig

Reduzierung des Stichprobenumfangs durch Regionalisierung des Datensatzes, höheres α von 0.10, und einseitigen statistischen Test.

Zum Beispiel 30% Effekt auf Abundanzen:

<u>Alle Regionen</u>	<u>Flusstäler</u>	<u>Flusstäler, $\alpha = 0,10$</u>	<u>Flusstäler, $\alpha = 0.10$, 1-seitiger Test</u>
71 Transekte	39 Transekte	30 Transekte	22 Transekte

Weitere Reduktion des Stichprobenaufwandes möglich durch Analyse von Co-Variablen.



Monitoring von Tagfaltern....



Stichprobenumfang Einzelarten

30% Reduktion von Einzelarten → Präsenz-Absenz-Analyse statt Bestimmung der relativen Abundanzen

	LANAG	Präsenz/Absenz	BDM	Präsenz/Absenz
Coenonympha pamphilus	202	→ 94*	207	→ 27
Maniola jurtina	292	→ 70	72	→ 33
Inachis io	215	→ 171	345	→ 55

* Anzahl Transektpaare

Weitere Reduktion des Stichprobenaufwandes möglich durch Analyse von Co-Variablen, z.B. Vegetation, Lebensraumtypen, Nutzung.

Reduktion der Begehungen?

Bestehende Monitoringprogramme...

Tagfalter Europa

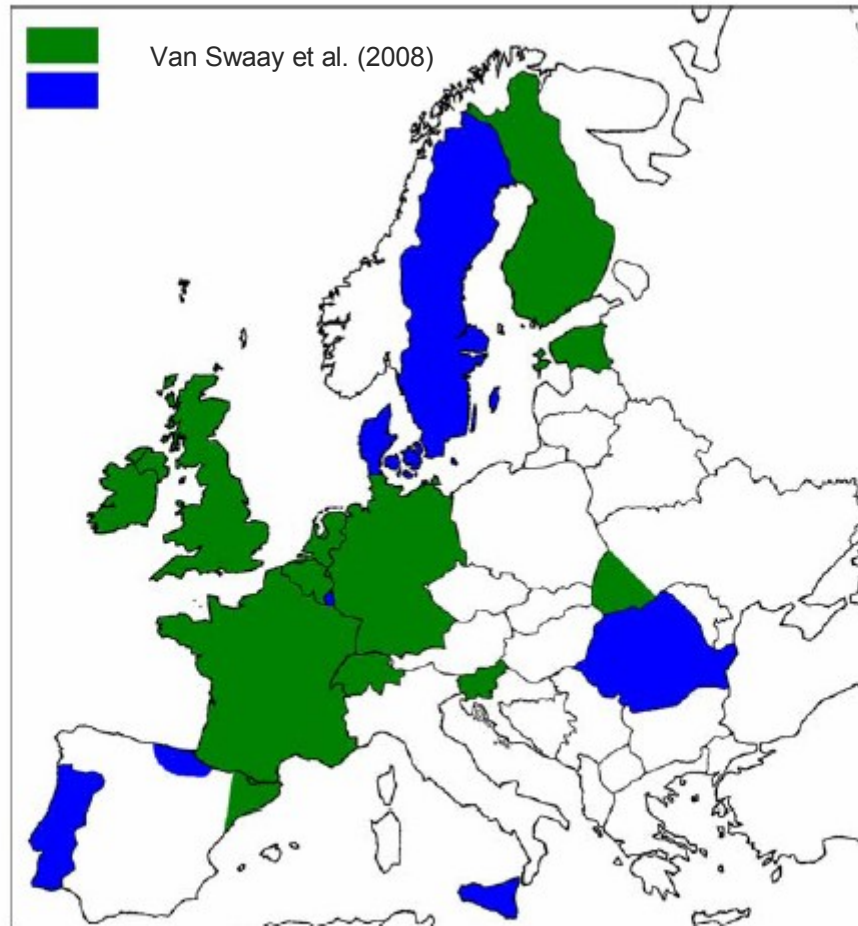


Fig. 1 Location of Butterfly Monitoring Schemes in Europe (light shading—active schemes, dark shading—planned schemes)

Tagfalter Europa



Table 1 Active butterfly monitoring schemes in Europe

Van Swaay et al. (2008)

The data from countries or regions marked by 'asterisk' were used for the Grassland Indicator (the first European Butterfly Indicator)

^a Only for *Maculinea nausithous*, *M. teleius* and *Lycena dispar* (Settele 1998)

^b Including Northrhine-Westfalia (Kühn et al. 2008; but excluding the Pfalz region, from where *Maculinea nausithous* monitoring data of Settele (1998) were used specifically for the grassland indicator)

Butterfly monitoring scheme	Year established	No. sites in recent years
United Kingdom*	1976	600
Transcarpathia (Ukraine)*	1983	20–30
Germany (Pfalz region)* ^a	1989	100
The Netherlands*	1990	700
Belgium (Flanders)*	1991	10–20
Spain (Catalunya)*	1994	50–60
Switzerland (Aargau)*	1998	100+
Finland*	1999	100
Switzerland	2000	100+
Germany (Northrhine-Westfalia)*	2001	100
France (Doubs and Dordogne)*	2001	10
Jersey (Channel Islands)	2004	25
Estonia	2004	7
Germany (entire country)	2005	450 ^b
France (entire country)	2005	75
Slovenia	2006	30
Ireland	2007	Not clear yet

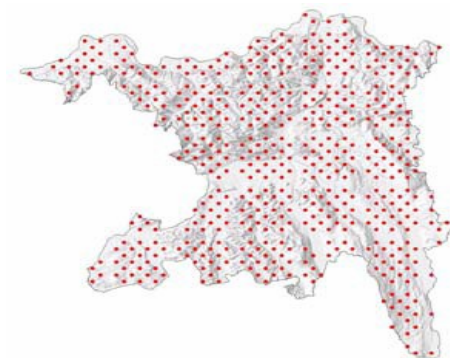
Bestehende Monitoringprogramme...

Geeignet für GVO-Monitoring?

Schweizer Biodiversitätsmonitoring BDM und LANAG sind für ein GVO-Monitoring geeignet:

- Geeignete Methoden
- Ausreichend Transekte in landwirtschaftlichen Gebieten
- vertretbarer Erfassungsaufwand

Aber zusätzlicher Aufwand notwendig für Datenanalyse, eventuell zusätzliche Transekte notwendig für Vergleich *GVO versus* Nicht-GVO, und erste Ergebnisse erst nach fünf Jahren aufgrund des 5-Jahreszyklus der Aufnahmen.



Bestehende Monitoringprogramme...



Deutsches Tagfaltermonitoring geeignet für GVO-Monitoring?

*Presserklärung des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung (UFZ)
vom 2. April 2009:*

„Tagfalter-Monitoring Deutschland ist nicht als Monitoring für gentechnisch veränderten Mais MON810 geeignet“

- Dauer der Untersuchung nicht ausreichend, um Populationsschwankungen zu interpretieren
- Kaum Transekte entlang von Ackerflächen
- Kaum Transekte im Anbaugebiet von Bt-Mais MON810

Weitere Probleme:

- BearbeiterInnen wählen Transekte
- Anzahl der Begehungen
- Anzahl der Transekte (400 – 500 deutschlandweit)
- 250m kurze Transekte
- Ungeschulte Freiwillige
- Datenfreigabe

GVO-Monitoring von Schmetterlingen...

Zusatzmodule oder spezifisches GVO-Monitoring?

VDI-Richtlinie 4330, Blatt 13

Monitoring der Wirkungen gentechnisch veränderter Organismen (GVO).
Standardisierte Erfassung von Schmetterlingen (Lepidoptera):
Transektmethode, Lichtfang und Larvalerfassung.

- Erfassungszeitraum und -häufigkeit
- Erfassungsmethoden
- Probenahme und Design
- Auswertung
- Qualitätssicherung



ICS 07.080		VDI-RICHTLINIEN		### 2010 ### 2010	
VEREIN DEUTSCHER INGENIEURE	Monitoring der Wirkungen gentechnisch veränderter Organismen (GVO) Standardisierte Erfassung von Schmetterlingen (Lepidoptera) Transektmethode, Lichtfang und Larvalerfassung Monitoring the effects of genetically modified organisms (GMO) Standardised monitoring of butterflies and moths (Lepidoptera) Transect method, light trap, and larval survey	VDI 4330	Blatt 13 / Part 13	Ausg. deutsch/englisch Issue German/English	
Die deutsche Version dieser Richtlinie ist verbindlich.		The German version of this guideline shall be taken as authoritative. No guarantee can be given with respect to the English translation.			
Inhalt	Seite	Contents	Page		
Vorbemerkung	2	Preliminary note	2		
Einleitung	2	Introduction	2		
1 Anwendungsbereich	4	1 Scope	4		
2 Begriffe	7	2 Terms and definitions	7		
3 Grundüberlegungen, Aufbau und Struktur der Erhebung	10	3 Basic considerations, structure and design of the monitoring	10		
3.1 Imaginalerhebung (Säule I)	12	3.1 Monitoring of imagoes (pillar I)	12		
3.2 Larvalerfassung	13	3.2 Larval survey	13		
4 Erfassungszeitraum und Erfassungshäufigkeit	21	4 Monitoring period and frequency	21		
5 Erfassungsmethoden	22	5 Monitoring methods	22		
5.1 Erhebungen von Arteninventar und Falterabundanz (Säule I)	22	5.1 Surveys of species inventory and abundance of imagoes (pillar I)	22		
5.2 Larvalerfassung (Säule II)	25	5.2 Larval survey (pillar II)	25		
6 Probenahme	27	6 Sampling	27		
6.1 Flächenauswahl	27	6.1 Choice of monitoring sites	27		
6.2 Power-Abschätzung	30	6.2 Power analysis	30		
7 Auswertung und Berichterstattung	31	7 Evaluation and reporting	31		
7.1 Grundlagen, Differenztests	31	7.1 Basic principles, difference tests	31		
7.2 Äquivalenztests	32	7.2 Equivalence test	32		
7.3 Populationsrends	33	7.3 Population trends	33		
7.4 Berichterstattung	35	7.4 Reporting	35		
8 Qualitätssicherung	36	8 Quality assurance	36		
Schrifttum	38	Bibliography	38		

VDI-Kompetenzfeld Biotechnologie
Ausschuss taxonomische Erhebungsmethoden
Fachbeirat Monitoring der Wirkungen von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)

VDI-Handbuch Biotechnologie, Band 1: GVO-Monitoring
VDI-Handbuch Landwirtschaft/Landtechnik

Zu beziehen durch: Available at: Bielefeld: Bertelsmann; 10772 Berlin: Alle Rechte vorbehalten / All rights reserved © Verein Deutscher Ingenieure e.V., Düsseldorf 2008
Formvermerk: 10/2007
Vervielfältigung – auch für innerbetriebliche Zwecke – nicht gestattet / Reproduction – even for internal use – not permitted

GVO-Monitoring von Schmetterlingen...

Zusammenfassung

- Exposition von Schmetterlingen gegenüber aktuellen transgenen Pflanzen (Bt-Mais, HT-Pflanzen)
- Nachgewiesene schädliche Effekte auf Schmetterlinge durch transgenen Mais
- Notwendigkeit für ein GVO-Monitoring: 1.) potentielle schädliche Effekte, 2.) Unsicherheiten der Risikoanalyse, 3.) Schmetterlinge als Schutzgut
- Erfassungsaufwand bei circa 70 – 80 Transektpaaren für Artenzahl (10% Effekt) und Gesamtabundanz (30% Effekt) ($\alpha = 0.05$, 80% power)
- Erfassungsaufwand reduzierbar durch Regionalisierung, Stratifizierung, statistische Methoden, Aufnahme von Co-Variablen.
- Höherer Erfassungsaufwand notwendig für detaillierte Analysen z.B. auf Artebene, evtl. Präsenz-Absenz-Analyse
- Bestehende “professionelle” Schmetterlingsprogramme geeignet für GVO-Monitoring, Freiwilligen-Programme nur bedingt und mit Zusatzmodulen.
- Spezifisches GVO-Monitoring, z.B. nach VDI-Richtlinie.



GVO-Monitoring von Schmetterlingen...



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!