



Bescheid 6786-01-0099 / 42010.0099

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Zuckerrüben
(*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) TAD13, TAD 18, TAD28, TAD33 und TAD44
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde
Berlin, den 07. Mai 1999**

Der folgende Text fasst die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen zusammen, die für ein Freisetzungsvorhaben in Deutschland genutzt werden sollen. Der Text ist Bestandteil des Genehmigungsbescheids, der zu einem Antrag auf Genehmigung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen nach der Richtlinie 2001/18/EG und dem deutschen Gentechnikgesetz (GenTG) erteilt worden ist. Der Bescheid wurde vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als der in Deutschland nach dem Gentechnikrecht zuständigen Behörde ausgestellt und enthält die Abschnitte:

- I. Genehmigung
- II. Nebenbestimmungen
- III. Begründung
 - III.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 GenTG
 - III.1.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 1 GenTG
 - III.1.2. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG
 - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 2 GenTG
 - III.1.4. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 4 und 5 GenTG
 - III.2 Würdigung und Bescheid der Einwendungen
- IV. Kosten
- V. Rechtsbehelfsbelehrung

Nur der Bescheid ist rechtlich verbindlich. Der folgende Auszug umfasst das Kapitel III.1.2. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing-House zusammengestellt.

III.1.2.1. Bewertung der durch die übertragenen Nukleinsäuresequenzen bewirkten Veränderungen in den gentechnisch veränderten Zuckerrüben

(a) Das synthetische *pat*-Gen

Das synthetische *pat*-Gen in den gentechnisch veränderten Zuckerrüben kodiert eine Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT).

L-Phosphinothricin ist ein Glutaminsäure-Analogon und inhibiert die pflanzliche Glutaminsynthetase. Die Hemmung der Glutaminsynthetase hat durch die Akkumulation von Ammonium

den Zelltod zur Folge. Aus diesem Grund findet Phosphinothricin als Wirkstoff in dem nicht-selektiven Herbizid Basta® (bzw. Liberty®) Verwendung. Basta® enthält die Enantiomeren D- und L-Phosphinothricin im Verhältnis 1 : 1. D-Phosphinothricin wirkt nicht als Glutaminsynthetase-Hemmstoff.

Im Unterschied zu nicht gentechnisch veränderten Pflanzen, die mit Basta® behandelt werden, wird in den gentechnisch veränderten Pflanzen das L-Phosphinothricin durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase acetyliert, wodurch N-Acetyl-L-Phosphinothricin entsteht, das keine herbizide Wirkung hat. Die gentechnisch veränderten Pflanzen sind dadurch tolerant gegenüber dem Herbizid Basta®. Die Substratspezifität der Phosphinothricin-Acetyltransferase ist hoch. Selbst das Phosphinothricin-Analogon Glutamat wird kaum umgesetzt. D-Phosphinothricin wird durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase nicht metabolisiert.

Das nach der Behandlung mit Basta® in den gentechnisch veränderten Pflanzen gebildete N-Acetyl-L-Phosphinothricin wird aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit während des weiteren Pflanzenwachstums in den Pflanzen verteilt. Dabei findet durch die Zunahme der Biomasse eine Konzentrationsabnahme statt. Es gibt keine Hinweise, daß N-Acetyl-Phosphinothricin in den gentechnisch veränderten Pflanzen weiter metabolisiert wird.

Aus den auf dem Feld verbleibenden Teilen der gentechnisch veränderten Pflanzen gelangt das in diesen noch befindliche N-Acetyl-Phosphinothricin bei der Verrottung in den Boden und wird dort durch Mikroorganismen wieder in L-Phosphinothricin umgesetzt. D/L-Phosphinothricin wird im Boden, ebenfalls durch Mikroorganismen, abgebaut.

Nach den vorliegenden Daten weist N-Acetyl-L-Phosphinothricin eine deutlich geringere Toxizität als Phosphinothricin (= Wirkstoff des Herbizids Basta®) auf. Basta® ist von der Biologischen Bundesanstalt nach dem Pflanzenschutzgesetz zugelassen. Im Rahmen dieser Zulassung wurde auch eine toxikologische und ökotoxikologische Bewertung des Mittels und seiner Metabolite vorgenommen. Gefährdungen der Gesundheit von Menschen oder Tieren oder der Umwelt durch in den gentechnisch veränderten Zuckerrübenpflanzen enthaltene Rückstände oder Metabolite des Herbizids Basta® sind aufgrund der toxikologischen und ökotoxikologischen Daten von Phosphinothricin und N-Acetyl-L-Phosphinothricin nicht zu erwarten.

Schädliche Einwirkungen der in den gentechnisch veränderten Pflanzen enthaltenen Phosphinothricin-Acetyltransferase wären bei einem Verzehr von Pflanzenteilen durch Tiere oder Menschen ebenfalls nicht zu erwarten. Bei einer oralen Aufnahme wäre davon auszugehen, daß das Enzym ebenso wie Proteine im allgemeinen im Verdauungstrakt abgebaut würde.

(b) Das *dmamp1*-Gen

Das *dmamp1*-Gen aus *D. merckii* kodiert für ein cysteinreiches Polypeptid von 50 Aminosäuren mit einer errechneten Masse von ca. 5 kD. Auf Grund seiner strukturellen und funktionellen Eigenschaften wird es zur Gruppe der pflanzlichen Defensine gezählt. In einer Reihe von Pflanzenarten wurden Defensine nachgewiesen, darunter auch Zuckerrüben. Pflanzlichen Defensinen ist gemeinsam, daß sie das Wachstum von Pilzen hemmen. In *D. merckii* wird das DmAMP1 in den Samen gebildet; es schützt den sich entwickelnden Keimling vor Pilzbefall.

In den gentechnisch veränderten Zuckerrüben wird DmAMP1 unter der Kontrolle des 35S-Promotors in Verbindung mit der verdoppelten Enhancer-Region dieses Promotors exprimiert. Wie natürlicherweise in Zuckerrüben nachgewiesene Defensine wird das DmAMP1-Defensin in den gentechnisch veränderten Zuckerrüben auch in den Blättern gebildet. Untersuchungen im Gewächshaus ergaben, daß das in den Blättern der gentechnisch veränderten Zuckerrüben gebildete DmAMP1 ausreicht, um einen Pilzbefall zu vermindern.

DmAMP1 wirkt gegen eine Vielzahl von Pilzarten sowie gegen einige Bakterienarten. In den bisherigen Untersuchungen mit pflanzlichen Defensinen wurden schädliche Auswirkungen auf Zellen menschlicher und pflanzlicher Zellkulturen nicht beobachtet. Auch α -Amylasen des Verdauungstrakts von Insekten werden nicht inhibiert. Die Bewertung der durch die übertragenen Nukleinsäuresequenzen bewirkten Veränderungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen hat ergeben, daß weder Gefährdungen für Tiere, die Pflanzenteile der gentechnisch veränderten Zuckerrüben aufnehmen würden, noch gesundheitliche Gefährdungen für Menschen durch einen Verzehr von Pflanzenteilen zu erwarten wären. Auf Grund der vorliegenden Informationen sind im Rahmen der Freisetzung schädliche Einwirkungen auf die Rechtsgüter des § 1 GenTG nicht zu erwarten.

(b) Das *his3*-Gen; das *ded1*-Genfragment

Das *his3*-Gen, das aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt, wird in den gentechnisch veränderten Pflanzen durch den *his3*-Promotor und die *his3*-Terminationsregion aus *S. cerevisiae* kontrolliert.

Das *his3*-Gen kodiert das Enzym Imidazolglycerin-Phosphat-Dehydratase (IGPD), welches die Umwandlung von Imidazolglycerin-Phosphat zu Imidazolacetol-Phosphat bei der Histidin-Biosynthese katalysiert. Das *his3*-Gen wurde in den Transformationsvektor inseriert, um die Selektion transformierter Bakterien zu ermöglichen; in den gentechnisch veränderten Pflanzen hat es keine Funktion. IGPD-Enzyme kommen ubiquitär vor und sind natürlicherweise auch in Pflanzen vorhanden. Sie weisen zudem bei unterschiedlichen Organismen (Bakterien, Pilzen, Pflanzen) starke Homologien auf. Eine neue Eigenschaft wird den Pflanzen durch das *his3*-Gen somit nicht verliehen. Das *his3*-Gen ist nicht mit pflanzen-spezifischen Promotorsequenzen versehen, und laut Angaben des Antragstellers sind in Pflanzen mit dem intakten *his3*-Gen keine Transkripte nachweisbar. Es ist somit nicht damit zu rechnen, daß das *his3*-Gen in den gentechnisch veränderten Pflanzen exprimiert wird. Selbst im Falle einer Expression wäre nicht mit einer Veränderung des Stoffwechsels der Pflanzen zu rechnen.

Ein Einfluß des 6 bp der Kodierregion beinhaltenden Fragments des *ded1*-Gens aus *S. cerevisiae* auf den Stoffwechsel der gentechnisch veränderten Pflanzen ist ebenfalls nicht zu erwarten.

(c) *lacZ*- und *lacI*-Sequenzen aus *E. coli*; der Replikationsursprung des Plasmids pMB1 (*ColE1 ori*) aus *E. coli*

Eine Beeinflussung des Stoffwechsels der gentechnisch veränderten Zuckerrüben durch die Anwesenheit der *lacI*- und *lacZ*-Sequenzen sowie des Replikationsursprungs des Plasmids pMB1 ist nicht zu erwarten.

(d) In Pflanzen funktionale Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Zuckerrüben enthalten, ins Genom integriert, als in Pflanzen funktionale Regulationssequenzen aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), dem Tobacco Mosaic Virus (TMV), aus *Agrobacterium tumefaciens*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. Diese Sequenzen regeln die Expression der oben genannten Gene. Weitergehende Funktionen sind nicht bekannt, weitergehende Auswirkungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten.

(f) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Insertionsort im Chromosom bzw. von der Umgebung des Insertionsorts ("Positionseffekt"). Unter Freilandbedingungen kann die Expressionsstärke zudem durch Umwelteinflüsse, z. B. durch die Temperatur, beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall könnte dies dazu führen, daß die gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland nicht in gleichem Maß tolerant gegenüber Glyphosat sind, wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Dies könnte bei Anwendung von Basta® (bzw. Liberty®) zu einer Schädigung der gentechnisch veränderten Pflanzen führen. Eine verringerte Pilzresistenz könnte bei Pilzbefall Ertragsverluste der gentechnisch veränderten Pflanzen nach sich ziehen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der Verwendung der gentechnisch veränderten Pflanzen im Rahmen von Gewächshausversuchen wurden jedoch nach Angaben des Antragstellers keine Beobachtungen gemacht, die auf ein solches Ereignis hindeuten.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Im beantragten Freisetzungsversuch kommen die gentechnisch veränderten Zuckerrübenpflanzen nicht zur Blüte und somit auch nicht zur Pollenbildung. Aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen sowie aus Freisetzungen anderer gentechnisch veränderter Pflanzen, die das *pat*-Gen exprimieren, ergaben sich keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen. Der Antragsteller weist auf Untersuchungen zum Vergleich der Aminosäure-Sequenz des DmAMP1-Peptids mit denen bekannter Allergene hin. Sie hätten keine Hinweise auf ein für den Menschen allergenes oder toxikologisch relevantes Potential des DmAMP1 ergeben.

III.1.2.2. Bewertung der Fähigkeit der gentechnisch veränderten Zuckerrübenpflanzen, im Freiland zu überdauern oder sich zu etablieren; Entsorgung

Eine Verbreitung gentechnisch veränderter Zuckerrüben außerhalb der Versuchsflächen ist aufgrund der vorgesehenen Maßnahmen ebensowenig zu erwarten wie eine Überdauerung oder eine Etablierung gentechnisch veränderter Zuckerrüben.

Die freigesetzten Zuckerrüben sollen gegen Ende der Vegetationsperiode im vegetativen Stadium maschinell geerntet und geköpft werden. Nach gegebenenfalls erforderlicher Probenahme (z. B. zur Rückstands- oder Inhaltsstoffbestimmung in geeigneten Labors) sollen die verbleibenden Rüben und sonstigen Pflanzenteile mit einer geeigneten Methode (z. B. durch Häckseln und flaches Einarbeiten oder durch Fräsen) auf dem Acker inaktiviert werden. Bei dieser Vorgehensweise ist nicht zu erwarten, daß sich aus dem auf dem Feld verbleibenden Material gentechnisch veränderte Pflanzen regenerieren.

Sollte unter dem zur Laboranalyse bestimmten Pflanzenmaterial noch vermehrungsfähiges Material vorhanden sein, ist es unter Sicherheitsaspekten als ausreichend anzusehen, wenn die Vermehrungsfähigkeit bei der Aufarbeitung zur Analyse beseitigt wird. Im übrigen bringt der Analyseprozeß die Inaktivierung notwendigerweise mit sich.

Die gentechnisch veränderten Rüben sollen entsprechend der guten landwirtschaftlichen Praxis der Versuchsdurchführung behandelt und angebaut werden. Zu einer Samenbildung im Verlaufe der Versuche wird es nicht kommen, da die Pflanzen nicht zur Blüte gelangen werden. Zuckerrübensamen sind unter Umständen, insbesondere bei Einarbeiten in tiefere Bodenschichten, über viele Jahre keimfähig. Nach allgemeiner landwirtschaftlicher Anbauverfahren kann jedoch davon ausgegangen werden, daß ausgebrachtes Saatgut, das nicht keimt, tot und daher auch in einem nachfolgenden Jahr nicht mehr keimfähig ist. Sollten dennoch einige keimfähige Samen im Boden überdauern, was zu einem Auftreten gentechnisch veränderter Zuckerrübenpflanzen nach Beendigung der Freisetzung führen könnte, so würden diese Pflanzen durch die in der Nebenbestimmung II.8. vorgeschriebene Nachkontrolle erfaßt werden. Selbst im Falle der Verbreitung einzelner gentechnisch veränderter Zuckerrübensamen wäre keine unkontrollierbare Ausbreitung gentechnisch veränderter Pflanzen zu erwarten. Einen Selektionsvorteil besitzen diese Pflanzen gegenüber anderen Pflanzen nur dort, wo Glufosinat (Phosphinothricin) als Herbizidwirkstoff zur Anwendung kommt. Durch mechanische Maßnahmen (z.B. Hacken) bzw. durch andere Herbizidwirkstoffe als Glufosinat könnten die Pflanzen zerstört werden.

III.1.2.3. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Gene von den gentechnisch veränderten Zuckerrübenpflanzen durch Pollen auf andere Pflanzen

Zuckerrüben sind zweijährige Pflanzen, die in der Regel erst nach einer Kälteinduktion im zweiten Jahr blühen. Der Antragsteller sieht vor, die Zuckerrüben Ende des ersten Jahres im vegetativen Stadium zu ernten. Eventuell während der Freisetzung auf den Freisetzungspartellen auftretende Schosserrüben sind leicht erkennbar und werden vor der Blüte vernichtet. Eine Verbreitung von Pollen gentechnisch veränderter Zuckerrüben ist deshalb im Rahmen der beantragten Freisetzung nicht zu erwarten.

III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von den gentechnisch veränderten Zuckerrüben über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind in Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen folgern, daß eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbak-

terien prinzipiell möglich sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, daß ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellen würde.

Soweit anzunehmen ist, daß ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Samenpflanzen und Bakterien tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, daß das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmateriale, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

Die Inaktivierung von Phosphinothricin durch Acetylierung ist ein bei Bodenmikroorganismen natürlicherweise vorkommender Prozeß. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet. Diese Resistenz kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten. Selbst im Falle eines Transfers des *pat*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz dieser Resistenz in der Umwelt nicht erkennbar erhöht.

Pflanzliche Defensin-Gene wurden in einer Vielzahl von Pflanzenarten nachgewiesen. Sie sind weit verbreitet. Die Übertragung der Eigenschaft wäre also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Organismen möglich.

Das *his3*-Gen aus *S. cerevisiae* kodiert ein Enzym (Imidazolglycerin-Phosphat-Dehydratase, IGPD), das für die Biosynthese des Histidins notwendig ist und bei Mikroorganismen ubiquitär vorkommt. Die Homologie der verschiedenen IGPD-Enzyme ist zudem hoch. Sollte ein Transfer des *his3*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen erfolgen, würden diese dadurch über keine neuen Eigenschaften verfügen.

Die Kodierregionen des *lacZ*-Gens und des *lacI*-Gens aus *E. coli* sind unvollständig, so daß kein funktionsfähiges Genprodukt gebildet werden kann. Dies wäre auch in Bakterien, die diese Gene durch einen horizontalen Gentransfer erhalten würden, der Fall.

Das pMB1-Replikon gehört zum Typ der ColE1-Plasmide, die einen auf einige gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich haben. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und nahe verwandten Bakterienarten, wie z.B. *Serratia* oder *Salmonella*, replizieren. In den meisten gram-negativen Bodenbakterien erfolgt keine Replikation. In Enterobakterien treten ColE1-Plasmide recht häufig auf. Ein Gentransfer ausgehend von Enterobakterien auf andere Bakterien ist als weitaus wahrscheinlicher anzusehen als ein horizontaler Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien. Es ist deshalb nicht zu erwarten, daß die eventuelle Präsenz des Replikationsursprungs von pMB1 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

Auch bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Sequenzen nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus CaMV, TMV, *A. tumefaciens*, *E. coli* und *S. cerevisiae*. CaMV und TMV sind pflanzeninfizierende Viren, die in Pflanzen weit verbreitet sind. Auch *A. tumefaciens* als phytopathogenes Bakterium, *E. coli* und *S. cerevisiae* sind in der Umwelt weit verbreitet.