



Antrag 6786-01-0203

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Petunien

(*Petunia hybrida*) T16

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 27. Juli 2009

Hinweis zu diesem Dokument:

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 Pflanzen

(a) Das *aadA* Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *aadA*-Gen [*ant(3'')*-Ia; Strep^R/Spec^R] stammt aus dem Plasmid R538-1 von *E. coli*. Das Gen kodiert für eine Aminoglycosid-Adenyltransferase welche die 3''-Hydroxyl-Position von Streptomycin bzw. die 9-Hydroxyl Position von Spectinomycin modifiziert. Das übertragene *aadA*-Gen steht unter der Kontrolle des 16S *rrn*-Promotors aus *B. napus* und der ribosomalen Bindungsstelle des *N. tabacum rbcL*-Gens sowie des Terminators des *psbC*-Gens aus *B. napus*.

Das *aadA*-Gen vermittelt eine Resistenz gegen Streptomycin und Spectinomycin. Das Vorkommen des *aadA*-Gens wurde in einer Vielzahl von Bakterien in verschiedenen Medien wie Boden, Abwasser, Meerwasser, Nahrungsmitteln, klinischen Proben und Fäzes nachgewiesen. Bakterien mit einer Resistenz gegenüber Streptomycin/Spectinomycin sind in der Umwelt weit verbreitet. Eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten.

Diese Antibiotika werden nur begrenzt in der Humanmedizin eingesetzt, besitzen aber durchaus noch für die Behandlung der Tuberkulose (Streptomycin) oder der Gonorrhoe (Spectinomycin) humanmedizinische Bedeutung, wenn Mittel mit geringerer potentieller Toxizität nicht eingesetzt werden können.

Die gentechnisch veränderten Petunien sollen nur auf einer begrenzten Fläche für einen begrenzten Zeitraum freigesetzt werden. Eine Verwendung der Pflanzen als Tierfutter oder für die menschliche Ernährung ist ausgeschlossen. Aufgrund der sehr geringen Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen-DNA auf Mikroorganismen und der Abwesenheit eines Selektionsdrucks auf den Freisetzungsf lächen ist nicht davon auszugehen, dass die Präsenz des *aadA*-Gens in den gentechnisch veränderten Petunien zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen würde.

Für das *aadA*-Gen hat die ZKBS in ihrer Stellungnahme vom Dezember 2008 festgestellt, dass vor dem Hintergrund der Unwahrscheinlichkeit des horizontalen Gentransfers zwischen Pflanzen und Mikroorganismen sowie der bereits bestehenden Verbreitung des *aadA*-Gens in der Umwelt das Vorhandensein des *aadA*-Gens im Genom der gentechnisch veränderter Pflanzen keine Auswirkung auf die Verbreitung dieses Antibiotika-Resistenzgenes in der Umwelt zur Folge hat.

Das GMO-Panel der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit hat in seinem Gutachten über die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen als Markergene in gentechnisch veränderten Pflanzen vom 26. März 2009 festgestellt, dass nach dem derzeitigen

Kenntnisstand nicht mit negativen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt durch eine Übertragung des *aadA*-Gens von Pflanzen auf Bakterien zu rechnen ist.

Es ist nicht zu erwarten, dass Pflanzen durch die Expression des *aadA*-Gens aus *E. coli* einen Selektionsvorteil erhalten, da eine Exposition der Pflanzen gegenüber Streptomycin oder Spectinomycin im landwirtschaftlichen oder natürlichen Ökosystem nicht zu erwarten ist.

(b) Das *uidA*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *uidA*-Gen aus dem Bakterium *E. coli* kodiert für das Enzym β -Glucuronidase. Das übertragene *uidA*-Gen steht unter der Kontrolle des 16S *rrn*-Promotors und der ribosomalen Bindungsstelle des *rbcL*-Gens aus *N. tabacum* sowie des Terminators des *psbA*-Gens aus *N. tabacum*. Das Enzym β -Glucuronidase spaltet Glucuronide und wird in Geweben von Vertebraten, Invertebraten und in Bakterien gefunden. Nach der Zugabe eines entsprechenden Substrats kann die Enzymaktivität im genetisch veränderten Gewebe durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden. Es wurde als Markergen zur Identifikation transformierter Pflanzenzellen eingeführt.

Es ist nicht zu erwarten, dass Pflanzen durch die Expression des *uidA*-Gens aus *E. coli* einen Selektionsvorteil erhalten, da es keine Hinweise darauf gibt, dass das Enzym β -Glucuronidase in Pflanzen an Stoffwechselwegen beteiligt sein könnte, welche Auswirkungen auf die Überdauerungs- oder Ausbreitungsfähigkeit haben.

(c) Weitere innerhalb des übertragenen DNA-Abschnitts gelegene Elemente

Das zur Transformation der Petunienpflanzen verwendete Plasmid enthält innerhalb des für eine homologe Rekombination vorgesehenen DNA-Abschnitts neben den angesprochenen Genen die zur Expression nötigen regulatorischen Sequenzen der 16S *rrn*-Promotoren aus Tabak und Raps sowie der ribosomalen Bindungsstelle des *rbcL*-Gens aus Tabak und den Terminatoren der *psbC*- und *psbA*- Gene aus Raps bzw. Tabak. Diese Sequenzen sind nicht kodierend und regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden DNA-Sequenzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Weitergehende Funktionen sind nicht bekannt, weitergehende Auswirkungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten.

(d) Außerhalb des für eine homologe Rekombination vorgesehenen DNA-Abschnitts gelegene Sequenzen

Die Transformation der Petunien T16 erfolgte mit Hilfe von Partikelbeschuss. Hierbei wurde das Plasmid pUM73(AD) zur Beschichtung der Partikel eingesetzt. Eine Übertragung von weiteren DNA-Sequenzen dieses Plasmids kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen.

Das Transformationsplasmid pUM73(AD) ist ein Derivat des Vektors pBR322 und enthält außerhalb des für eine homologe Rekombination vorgesehenen DNA-Abschnitts folgende genetische Elemente:

- Tetracyclinresistenzgen *tetA*
- Ampicillinresistenzgen *bla*_{TEM-1}
- Replikationsstartpunkt *ori*
- Repression der Plasmidreplikation *rop-Gen*

Die für eine homologe Rekombination vorgesehenen Sequenzen bestehen aus folgenden Elementen:

- Gen für die ϵ - und β -Untereinheit der ATP-Synthase aus Tabak *atp ϵ -atp β*
- Gen für die große Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase aus Tabak *rbcL*
- Gen für eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Tabak *accD*

Eine Übertragung von Fragmenten des Plasmids pUM73(AD), welche außerhalb der homologen Sequenzen der *rbcL*- und *accD*-Gene liegen, durch ein einfaches Crossover konnte durch die Southernblot Analysen ausgeschlossen werden. Zugleich wurde nachgewiesen, dass die Petunie T16 homoplasmatisch ist.

Eine Übertragung der Vektorfragmente *atp ϵ -atp β* , *tetA*, *bla*_{TEM-1}, *ori* und *rop* auf die Plastiden-DNA der Petunie T16 ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht erfolgt.

Zum Nachweis, dass weder das bakterielle Ampicillinresistenz Gen *bla*_{TEM-1} noch das Tetracyclinresistenzgen *tetA* ins Kerngenom der Pflanze übertragen wurde, hat die Antragstellerin PCR- Analysen vorgelegt. Diese Analysen ergaben, dass weder das Gen *bla*_{TEM-1} noch das Gen *tetA* in der zur Freisetzung beantragten Transformante vollständig enthalten sind.

Für die weiteren Sequenzen des Vektorplasmids wurde kein Nachweis ihrer An- bzw. Abwesenheit in den gentechnisch veränderten Pflanzen durchgeführt. Der Risikoabschätzung wird daher zugrunde gelegt, dass sie in den Pflanzen enthalten sein können.

Die genannten Abschnitte außerhalb der für eine homologe Rekombination geeigneten Region sind für die Expression in Bakterien bestimmt und haben in Pflanzen keine Funktion. Eine Bildung signifikanter Mengen funktionsfähiger Genprodukte basierend auf diesen Sequenzen ist in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten, da sie nicht unter

der Kontrolle pflanzenspezifischer Promotoren stehen und nicht der pflanzlichen Codonnutzung angepasst sind.

(e) 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 Eigenschaften der gentechnisch veränderten Petunienpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. 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 bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen wurden jedoch 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 sichere Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Da die Pflanzen nicht als Lebens- oder Futtermitteln genutzt werden und nur auf einer begrenzten Fläche angebaut werden, ist nicht mit Risiken durch eine potentiell allergene Wirkung zu rechnen.

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

Petunien sind nicht winterfest. Trotz einzelner Berichte einer Überdauerung des Winters ist bisher in Mitteleuropa keine dauerhafte Einbürgerung von Petunien beobachtet worden. In gezielten Versuchen zur Erhöhung der Frosttoleranz von Petunien konnte die Frosttoleranz von -4°C im Wildtyp auf -6°C bis -8°C in gentechnisch veränderten Petunien geringfügig erhöht werden. Eine substantielle Erhöhung der Frosttoleranz durch unerwartete Effekte aufgrund der gentechnischen Veränderung der hier beantragten Petunien wird daher als unwahrscheinlich erachtet.

In Versuchen des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung konnte gezeigt werden, dass auch Petuniensamen nach einer Inkubation in feuchtem Medium und Frost unter -4°C nicht mehr keimfähig sind.

Aus der Beobachtung von Freisetzungsversuchen des Max-Planck-Institutes für Züchtungsforschung ist weiterhin bekannt, dass nach dem Unterpflügen von Petunien vor oder nach dem ersten Frost im Folgejahr keine auskeimenden Petunien beobachtet werden konnten.

Auf Grund der zuvor genannten Eigenschaften von Petunien sowie unter Berücksichtigung der gentechnischen Veränderung ist nicht zu erwarten, dass Petunien an diesem Standort überdauern oder sich etablieren können. Sollten nach einem milden Winter trotzdem Petunien aus überwinterten Samen auf den Freisetzungsfeldern auflaufen, würden sie im Zuge der Nachkontrolle erfasst und vernichtet werden.

Eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit oder der Umwelt wäre damit nicht verbunden.

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

Pollen von Petunien werden in erster Linie durch Insekten, insbesondere Nachtfalter und evtl. einige andere Insekten übertragen. Wildformen der Gattung sind ebenso wie andere wild wachsende Kreuzungspartner in Europa nicht bekannt.

Es ist also davon auszugehen, dass die Möglichkeit einer ungewollten Auskreuzung nur für kultivierte Petunien besteht. In Versuchen des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung wurde die Auskreuzung aus gentechnisch veränderten Petunien in unmittelbar benachbarte Empfängerpflanzen untersucht. Hierbei wurde eine sehr geringe Rate von Einkreuzung aus Nachbarbeständen nachgewiesen. Die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung der gentechnisch veränderten Eigenschaft durch Pollenübertragung wird weiterhin dadurch minimiert, dass die genetische Veränderung im Plastidengenom der Pflanze lokalisiert ist. Die Verer-

bung des Plastidengenoms erfolgt in der Familie *Solanaceae* grundsätzlich nur über maternale Vererbung.

Auf der Freisetzungsfäche befinden sich außer den Empfängerpflanzen keine potentiellen Kreuzungspartner. Der minimale Abstand zu kultivierten Petunien außerhalb der Versuchsfäche beträgt laut Antragstellerin 100 m. Der nächste Zierpflanzenbetrieb ist nach Angaben der Antragstellerin etwa 5 km vom Gelände des beabsichtigten Freilandversuches entfernt. Da der genannte Betrieb Petunien aus Samen und Stecklingen anzieht, jedoch kein Saatgut vermehrt oder züchtet (Saatzucht), ist eine Verbreitung potentieller Kreuzungsprodukte nicht zu erwarten.

In Anbetracht der geringen Kreuzungswahrscheinlichkeit bei Petunien in Verbindung mit der geringen Wahrscheinlichkeit einer Übertragung von gentechnisch veränderten Plastiden durch Pollen wird eine Übertragung der gentechnischen Eigenschaft durch Pollen auf Petunien außerhalb der Versuchsanlage als verschwindend gering erachtet.

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

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in das Plastidengenom der Empfängerorganismen integriert. Beweise für eine unter natürlichen Bedingungen stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und ihrer Expression in Mikroorganismen liegen nicht vor. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen jedoch folgern, dass auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien 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 Pflanzen und Bakterien oder Pflanze und Viren tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austausches von heterologem Erbmaterial allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmaterial, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

(a) Das *aadA*-Gen

Die ZKBS hat Antibiotikaresistenzmarkergene in gentechnisch veränderten Pflanzen in ihrer Stellungnahme vom Dezember 2008 generell und ohne Unterscheidung verschiedener Gruppen in die Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen einbezogen.

Gleichzeitig sind in diese Sicherheitsbewertung neue wissenschaftliche Erkenntnisse eingeflossen. Dies hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass solche Ereignisse von horizontalem Gentransfer, falls sie stattfinden, in ihrem Gewicht vernachlässigbar sind gegenüber den natürlichen Prozessen ihrer Übertragung und Neuentstehung und der natürlichen Präsenz der betrachteten Resistenzgene in der vorhandenen Mikroorganismen-Gesellschaft.

Auch die Stellungnahme der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority, EFSA) kommt zu dem Schluss, dass der derzeitige Kenntnisstand nahelegt, dass durch den Transfer des *aadA*-Gens von Pflanzen auf Bakterien keine Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt zu erwarten sind.

Aufgrund der weiten Verbreitung des *aadA*-Gens bei Mikroorganismen wäre selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers keine erkennbare Erhöhung der Gesamtfrequenz des Gens zu erwarten.

(b) Das *uidA*-Gen

Das *uidA*-Gen, das aus *E. coli* stammt, ist ein Bestandteil des für die Transformation verwendeten Plasmids pUM73(AD) und kann als Reporter gen eingesetzt werden. Das Enzym β -Glucuronidase spaltet Glucuronide und wird in Geweben von Vertebraten und Invertebraten und auch in Bakterien gefunden. Auch Pflanzen besitzen eine geringe endogene β -Glucuronidase-Aktivität. Bei Mikroorganismen sind Glucuronidasen weit verbreitet, so dass hier, selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers, keine erkennbare Erhöhung der Gesamtfrequenz des Gens eintreten würde.

(c) Weiter genetische Elemente des Transformationsvektors pUM73(AD)

Ein vollständige Übertragung der auf dem Transformationsvektor pUM73(AD) lokalisierten Gene für Tetracyclinresistenz *tetA* und Ampicillinresistenz *bla*_{TEM-1} konnte durch PCR-Analyse ausgeschlossen werden. Das Tetracyclinresistenzgen auf dem Transformationsvektor pUM73(AD) ist ohnehin nicht funktionsfähig, da es durch die Insertion eines DNA-Abschnittes unterbrochen wurde. Sollten dennoch Teile der Antibiotikaresistenzgene in das Kerngenom der Petunie T16 übertragen worden sein, so ist nicht davon auszugehen, dass diese funktional wären.

Auch für die *tetA*- und *bla*_{TEM-1}-Gene hat die ZKBS in ihrer Stellungnahme vom Dezember 2008 festgestellt, dass vor dem Hintergrund der Unwahrscheinlichkeit des horizontalen Gentransfers zwischen Pflanzen und Mikroorganismen sowie der bereits bestehenden Verbreitung der Gene in der Umwelt das Vorhandensein dieser Gene im Genom der gentechnisch

veränderter Pflanzen keine Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt zur Folge hätte.

Die Übertragung der auf dem Transformationsvektor pUM73(AD) liegenden genetischen Elemente *ori*, *rop*, *atp ϵ -atp β* , *rbcL* und *accD* kann nicht ausgeschlossen werden.

Für den Replikationsursprung *ori* zur Plasmidreplikation und das *rop*-Gen zur Regulierung der Replikation des Plasmids in *E. coli* ist die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen.

Die Gene für die ϵ - und β -Untereinheit der ATP-Synthase *atp ϵ -atp β* , die große Untereinheit der Ribulose-Bisphosphat-Karboxylase *rbcL* und eine Untereinheit der Acetyl-CoA-Karboxylase *accD* stammen aus Tabak und kommen darüber hinaus in nur wenig veränderter Form in vielen höheren Pflanzen vor.

Auch bei einer Übertragung dieser Gene ist eine bedeutsame Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Sequenzen nicht zu befürchten. Diese Gene stammen aus weit verbreiteten Pflanzen und Mikroorganismen. Konsequenzen für ökosystemare Prozesse eines solchen Gentransfers sind nicht wahrscheinlich.