

Antrag 6786-01-0185

Zusammenfassung der Risikobewertung der deutschen zuständigen Behörde der gentechnisch veränderten Organismen

NK603, MON89034, MON88017, MON89034 x MON88017, MON89034 x NK603

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

(a) Das *epsps*-Gen

Die Expression der in den gentechnisch veränderten Maispflanzen enthaltenen Gene für eine Glyphosat-tolerante EPSPS aus *Agrobacterium* sp. Stamm CP4 findet konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV und des *Act1*-Promotors aus Reis (*Oryza sativa*) statt. Die Anwesenheit der Introns in den beiden Transkriptionseinheiten zielt auf eine Steigerung der Genexpression. Die Vorschaltung des Chloroplasten-Transitpeptids der EPSPS aus *Arabidopsis thaliana* (CTP2) bewirkt den post-translationalen Import der CP4 EPSPS in die Chloroplasten und wird in der Regel beim Import abgespalten (Prozessierung).

Die endogene EPSPS wie auch die durch Transformation in die Maispflanzen eingebrachte CP4 EPSPS katalysieren im Chloroplasten die Reaktion des Shikimat-3-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat zum 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat, einer Zwischenstufe für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren und anderer aromatischer Substanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Im Gegensatz zur endogenen EPSPS wird die CP4 EPSPS durch Glyphosat nicht gehemmt.

Die im gentechnisch veränderten Mais zusätzlich exprimierte CP4 EPSPS katalysiert die gleiche Reaktion wie entsprechende Enzyme, die natürlicherweise in Mais und anderen Kulturpflanzen vorkommen. Da dem Transitpeptid (CTP2) der EPSPS aus *Arabidopsis thaliana* wie auch anderen derzeit bekannten Signalpeptiden, ob prozessiert oder unprozessiert, kein gesundheitsschädliches Potenzial zuerkannt wird, ist davon auszugehen, dass dies auch für den Komplex aus Transitpeptid und Enzym (hier CP4 EPSPS) zutrifft. Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine toxische Wirkung der neu gebildeten EPSPS erwarten lassen.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind durch die Wirkungsweise der mittels Transformation eingebrachten EPSPS nicht zu erwarten.

(b) Das *cry3Bb1*-Gen

Das *cry3Bb1*-Gen aus *Bacillus thuringiensis* ssp. *kumamotoensis* kodiert für ein Coleopteren-spezifisches Protein-Toxin (Bt-Toxin). Es liegen keine Hinweise für eine enzymatische Aktivität des in dem GVO exprimierten Proteins vor. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass es neben der Bildung des Bt-Toxins in der gentechnisch veränderten Pflanze zu keiner weiteren Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels kommt.

Die Expression des in den gentechnisch veränderten Maispflanzen zusätzlich enthaltenen Gens kodierend für eine synthetische Variante des Cry3Bb1 findet konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV statt. Das Intron des Aktin1-Gens aus Reis steigert die Effizienz der Transkription. Im alkalischen Milieu des Darmtraktes des larvalen Insektes kommt es zur Solubilisierung des sogenannten δ -Endotoxins, welches die peritrophe Membran permeiert und an spezifische Rezeptoren des Epitheliums im Mitteldarm bindet. In Folge ändert sich die Durchlässigkeit des Darms für Elektrolyte und der pH-Wert des Darmmilieus verschiebt sich. Das Insekt stellt die Nahrungsaufnahme ein und stirbt. Im Säugetier-Verdauungstrakt existieren keine Rezeptoren für das δ -Endotoxin. In Fütterungsstudien, die den Inverkehrbringensanträgen zu MON863-Mais beilagen, welcher das gleiche Protein exprimiert, sind keine Hinweise auf negative Effekte des Bt-Proteins in der Nahrung von Ratten, Hühnern und Mäusen gefunden worden.

Insbesondere die Ergebnisse der Toxizitätsstudie mit Ratten führten in der jüngsten Vergangenheit zu unterschiedlichen Interpretationen bezüglich der Sicherheit von MON863 bzw. von Cry3Bb1-Protein. Die Toxizitätsstudie stellt innerhalb der vom Antragsteller vorzulegenden Unterlagen nur einen Baustein der Sicherheitsprüfung dar. In den vom RKI und der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) durchgeführten Sicherheitsbewertungen wurden umfangreiche weitere Parameter einbezogen. Die Fütterungsstudie allein ist weder geeignet, die Sicherheit von MON863 zu belegen noch ein Risiko durch MON863 nachzuweisen. Die Wirkungsweise und das Wirkungsspektrum von Bt-Toxin sind bekannt und umfassend erforscht. MON863 sowie andere Formen von gentechnisch veränderten Bt-Mais und daraus hergeleitete Sorten sind seit mehreren Jahren außerhalb Europas auf dem Markt. Weder im Rahmen des Zulassungsverfahrens noch bei der Verwendung in Lebensmitteln oder als Futtermittel wurden bislang Risiken nachgewiesen. Hinweise auf ein allergenes Potential von Cry3Bb1 gehen aus diesen Unterlagen gleichfalls nicht hervor. Das Erntematerial aus dem Freisetzungsvorhaben ist nicht für die Verwendung als Lebensmittel oder zur Verfütterung vorgesehen.

In den USA wurde in einer zweijährigen Freilanduntersuchung der Einfluss eines Bt-Maises, der das Cry3Bb1-Protein bildet, auf die im Boden ermittelte mikrobielle Biomasse, die mikro-

bielle Aktivität und die Struktur der Bakteriengemeinschaft ermittelt. Es wurden keine Unterschiede zwischen dem gentechnisch veränderten Mais und den Kontrolllinien nachgewiesen.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren sind durch die Wirkungsweise des mittels Transformation eingebrachten Cry3Bb1-Proteins nicht zu erwarten. Aufgrund des selektiven Wirkungsmechanismus von Bt-Toxinen, u.a. durch spezifische Rezeptorbindung im Intestinaltrakt von empfindlichen Insekten, ist nicht mit einem schädlichen Einfluss der freigesetzten Maispflanzen auf die Umwelt zu rechnen.

(c) Das *cry1A.105*-Gen

Das *cry1A.105*-Gen kodiert für ein Lepidopteren-spezifisches Protein-Toxin (Bt-Toxin). Das Protein ist ein modifiziertes *Bacillus thuringiensis* Cry1A Protein, dessen Aminosäuresequenz zu 90%, 93,6% bzw. 76,7% identisch ist zu Cry1Ab, Cry1Ac bzw. Cry1F. Das Protein gliedert sich in vier Domänen, die folgenden Ursprungs sind: Domäne I und II stammen aus Cry1Ab bzw. Cry1Ac, die in diesem Teil zu 100% identisch sind. Domäne III entstammt Cry1F. Die C-terminale Domäne entstammt im Wesentlichen Cry1Ac. Es liegen keine Hinweise für eine enzymatische Aktivität des in dem GVO exprimierten Proteins vor. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass es neben der Bildung des Bt-Toxins in der gentechnisch veränderten Pflanze zu keiner weiteren Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels kommt.

Die Expression des in den gentechnisch veränderten Maispflanzen zusätzlich enthaltenen Genes kodierend für das Cry1A.105 Protein findet konstitutiv unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV statt. Das Intron des *Ract 1*- Genes aus Reis sowie die 5'-untranslatierte Region des Gens für das Chlorophyll a/b-bindende Protein (L-Cab) aus Weizen steigern die Effizienz der Transkription. Die Wirkungsweise im Darmtrakt eines larvalen Insektes entspricht der unter b) beschriebenen.

In Studien zur Toxizität und Allergenität von Cry1A.105, deren Beschreibung dem Bericht der U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 2006) zu entnehmen sind, wurden keinerlei Hinweise auf negative Effekte des Bt-Proteins gefunden. Akute Toxizitätsstudien mit Mäusen denen mittels Schlundsonden bakteriell erzeugtes Cry1A.105 verabreicht wurde, führten zu keinen Abweichungen zwischen den untersuchten Gruppen und zwei verschiedenen Kontrollgruppen bzgl. Körpergewicht, Körpergewichtszunahme sowie im pathologischen Befund. Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz zu bekannten toxischen Proteinen konnten nicht festgestellt werden. Auch das allergene Potential von Cry1A.105 wurde untersucht. *Bacillus thuringiensis* ist bisher nicht als Quelle von allergenen Proteinen in Erscheinung getreten. Ein bioinformatischer Vergleich mit bekannten, allergenen Proteinen ergab keine Ähnlichkeit bzw. Identität mit bekannten Allergenen in einem Suchraster eines 8 Aminosäuren umfas-

senden, nicht unterbrochenen Oligomeres. Zudem wird Cry1A.105 in einer Konzentration in den getesteten Maisgeweben exprimiert, die unterhalb der Konzentration von wirksamen Nahrungsmittelallergenen liegt. Cry1A.105 wird in synthetischen Verdauungssäften zersetzt und ist in Mais nicht glykosyliert. Vor diesem Hintergrund ist die Wahrscheinlichkeit einer Allergenität von Cry1A.105 als gering einzuschätzen. Das Erntematerial aus dem Freisetzungsvorhaben ist nicht für die Verwendung als Lebensmittel oder zur Verfütterung vorgesehen.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind durch die Wirkungsweise des mittels Transformation eingebrachten Cry1A.105-Proteins nicht zu erwarten.

(d) Das *cry2Ab2*-Gen

Das *cry2Ab2*-Gen ist eine synthetisch optimierte Version des Genes aus *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* und unterscheidet sich nur durch eine Aminosäure von dem bakteriellen Protein.

Die Wirkungsweise im Darmtrakt eines larvalen Insektes entspricht der unter b) beschriebenen. Aus Studien, die dem Inverkehrbringens-Antrag von Baumwolle MON15985 beilagen, ergab sich bei *in vitro* Versuchen mit simulierten Verdauungsflüssigkeiten eine vollständige Zersetzung von bakteriell produziertem Cry2Ab2-Protein, welches identisch zu dem in den gentechnisch veränderten Pflanzen produzierten war. Die Verdauungsprodukte zeigten in Applikationsexperimenten mit Insekten keine insektizide Wirkung mehr. Eine bioinformatische Datenbankanalyse erbrachte keine Ähnlichkeiten mit bekannten Tier- oder Humantoxinen. Bei Toxizitätsstudien an Mäusen konnten selbst bei den höchsten noch verfütterbaren Dosen von Cry2Ab2-Protein keine schädlichen Effekte auf die Versuchstiere festgestellt werden.

Die Expression des in den gentechnisch veränderten Maispflanzen zusätzlich enthaltenen Genes kodierend für das Cry2Ab2-Protein findet konstitutiv unter der Kontrolle des *FMV*-Promotors des Braunwurzmosaikvirus statt. Das Intron des *hsp70*-Genes aus Mais steigert die Effizienz der Transkription. Die Vorschaltung des Chloroplasten-Transitpeptids der Ribulose-1,5-Biphosphat-Carboxylase aus Mais (TS-SSU-CTP) bewirkt den post-translationalen Import von Cry2Ab2 in die Chloroplasten und wird in der Regel beim Import abgespalten (Prozessierung). Da diesem Transitpeptid wie auch anderen derzeit bekannten Signalpeptiden, ob prozessiert oder unprozessiert, kein gesundheitsschädliches Potential zuerkannt wird, ist davon auszugehen, dass dies auch für den Komplex aus Transitpeptid und Cry-Protein zutrifft.

Das Erntematerial aus dem Freisetzungsvorhaben ist nicht für die Verwendung als Lebensmittel oder zur Verfütterung vorgesehen.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind durch die Wirkungsweise des mittels Transformation eingebrachten Cry2Ab2-Proteins nicht zu erwarten.

Die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1, CP4 EPSPS werden zusammen in der Hybride MON89034 x MON88017 exprimiert, Cry2Ab2 und CP4 EPSPS in Chloroplasten, Cry1A.105 und Cry3Bb1 im Cytoplasma. Mit entsprechender Lokalisation werden in der Hybride MON89034 x NK603 die Proteine Cry1A.105, Cry2Ab2 und CP4 EPSPS exprimiert. Von einer gegenseitigen Beeinflussung der Proteine *in planta* ist nicht auszugehen, da eine Stoffwechselaktivität der Cry-Proteine nicht zu erwarten und die enzymatische Aktivität von CP4 EPSPS klar begrenzt ist. Da die Proteine ferner im Magensaft von Säugern zersetzt werden, sind Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren durch die gemeinsame Expression von Cry1A.105, Cry2Ab2, Cry3Bb1 und CP4 EPSPS in der Hybride nicht zu erwarten.

Insgesamt ist aufgrund des selektiven Wirkungsmechanismus von Bt-Toxinen, u.a. durch spezifische Rezeptorbindung im Intestinaltrakt von empfindlichen Insekten, und der begrenzten enzymatischen Aktivität der CP4 EPSPS nicht mit einem schädlichen Einfluss der freigesetzten Maispflanzen auf die Umwelt zu rechnen.

(e) Außerhalb der Zielsequenzen gelegene DNA-Abschnitte

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Borderregionen wurde jedoch berichtet.

Der für die Transformation von MON88017 benutzte Vektor PV-ZMIR39 enthält außerhalb der Borderregionen:

- das *aadA*-Gen aus *Escherichia coli* Transposon Tn7, unter der Kontrolle seines eigenen Promotors, welcher nur in Bakterien funktionsfähig ist;
- den ColE1-Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli* aus dem Plasmid pBR322 ;
- den Replikationsursprung oriV des Plasmids RK2 zur Replikation des Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*;
- die kodierende Region *rop* zur Aufrechterhaltung der Kopienzahl des Plasmids.

Nach Angabe der Antragstellerin zeigen Ergebnisse der Southern Blot-Untersuchungen, dass Bestandteile des Plasmids außerhalb der T-DNA nicht in das Genom von MON88017

übertragen worden sind. Entsprechende Southern Blot Daten lagen dem Antrag zur Freisetzung der Hybride MON88017xMON810 bei (Antrag 6786-01-0169, Stellungnahme der ZKBS v. 14. März 2006). Auf eine weitere Bewertung der Elemente kann deshalb verzichtet werden.

Der für die Transformation von MON89034 benutzte Vektor PV-ZMIR245 enthält außerhalb der T-DNA I Borderregionen:

- das *aadA*-Gen aus *Escherichia coli* Transposon Tn7, unter der Kontrolle seines eigenen Promotors, welcher nur in Bakterien funktionsfähig ist;
- den ColE1-Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli* aus dem Plasmid pBR322;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 zur Replikation des Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*;
- die kodierende Region *rop* zur Aufrechterhaltung der Kopienzahl des Plasmids

Ferner enthält es innerhalb der Borderregionen der T-DNA II:

- das *nptII*-Gen, welches für die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase II aus dem *Escherichia coli* Transposon Tn5 kodiert, unter Kontrolle des Promotors und der 5' UTR aus dem Blumenkohlmosaik-Virus (CaMV) und des Terminators des Nopalin-Synthase-Gens (*nos*) aus *Agrobacterium tumefaciens*. Dieses Gen dient als selektierbarer Marker, es vermittelt eine Resistenz gegenüber verschiedenen Aminoglycosid-Antibiotika.

Aus den mit den Antragsunterlagen vorgelegten Southern Blot-Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass Bestandteile des Plasmids außerhalb der T-DNA I einschließlich der T-DNA II nicht in das Genom von MON89034 übertragen worden sind. Auf eine weitere Bewertung der Elemente kann deshalb verzichtet werden.

Der für die Transformation von NK603 benutzte Vektor PV-ZMGT32 enthält außerhalb der Zielsequenz:

- den bakteriellen Replikationsursprung (*ori*)
- das Gen für die Neomycin-Phosphotransferase Typ II (*nptII*) aus dem *Escherichia coli* Transposon Tn5.

Vor der Transformation wurde PV-ZMGT32 mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *MluI* gespalten, um die für die Pflanzentransformation vorgesehenen Genkassetten von der übrigen Plasmid-DNA zu trennen. Außerhalb des *MluI*-Fragmentes liegende Teile des Vektors wur-

den nicht in das Genom übertragen. Auf eine weitere Bewertung der Elemente kann deshalb verzichtet werden.

(f) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Integrationsort im Chromosom bzw. von der Umgebung des Integrationsortes („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 des gentechnisch veränderten Mais 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 schließen lassen.

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 nicht grundsätzlich 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. Aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *epsps*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, liegen jedoch keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor. Auch zu in Pflanzen exprimiertem Bt-Protein liegen keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität vor.

Es ist in dem beantragten Freisetzungsvorhaben nicht vorgesehen, den gentechnisch veränderten Mais als Lebensmittel oder Futtermittel zu verwenden.

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

Maispflanzen und Maissamen sind nicht winterhart. Mais ist unter den klimatischen Bedingungen Mitteleuropas nicht überdauerungsfähig. Das in die Maispflanzen bzw. -samen eingeführte Erbmaterial verleiht eine Resistenz gegen den Befall durch bestimmte Coleopteren und Lepidopteren sowie eine Toleranz gegenüber dem Herbizidwirkstoff Glyphosat. Es ist davon auszugehen, dass die Überdauerungseigenschaften nicht verändert worden sind.

Es ist möglich, dass der gentechnisch veränderte Mais im Verlauf der Vegetationsperiode zur Körnerreife gelangt. Eine Etablierung von Durchwuchsmais ist selbst bei Körnermais, der in der Vollreife geerntet wird, in der Flora Mitteleuropas nicht beobachtet worden. Sollten nach Beendigung der Freisetzung auf der Versuchsfläche gentechnisch veränderte Maispflanzen auflaufen, so würden diese durch die in der Nebenbestimmung II.10. zur Auflage gemachte Anbaupause und Nachkontrolle erfasst und beseitigt werden. Damit wird eine zeitliche und räumliche Begrenzung des Freisetzungsvorhabens unterstützt.

Nach Abschluss der vorgesehenen Versuchsreihen ist u.a. zur Entsorgung vorgesehen, die gentechnisch veränderten Maispflanzen sowie die nicht gentechnisch veränderten Maispflanzen zu häckseln und in den Boden zur Verrottung einzuarbeiten. Körnermais soll gemahlen und in den Boden zur Verrottung eingebracht werden. Auch wenn ein Teil der Maiskörner durch das Häckseln oder Mahlen nicht zerstört werden sollte, so ist davon auszugehen, dass sich aus diesen unter Freilandbedingungen keine überdauerungsfähigen Pflanzen entwickeln können. Gleiches ist bei einem Durchgang des Häcksel- oder Mahlgutes durch den Kompostierungsprozess auf der Freisetzungsfäche bzw Fermentationsprozess in einer Biogasanlage zu erwarten.

Die nicht gentechnisch veränderten Maispflanzen der Mantelsaat sowie Mais, der in der Isolationszone von 200 m angebaut wird, sollen wie die gentechnisch veränderten Versuchspflanzen entsorgt werden.

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

Eine Übertragung der eingeführten Gene von den gentechnisch veränderten Maispflanzen auf Pflanzen anderer Arten ist nicht möglich, da Mais in der mitteleuropäischen Flora keine Kreuzungspartner besitzt. Im Folgenden wird daher nur auf eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Maispflanzen auf andere Maispflanzen eingegangen.

Maispollen wird in der Regel durch den Wind verbreitet. Dabei ist die maximale Verbringungsdistanz keineswegs identisch mit der maximalen Auskreuzungsdistanz. Das liegt an der Empfindlichkeit des Pollens gegenüber Witterungseinflüssen wie Hitze, Feuchte und UV-Strahlung, die schnell zum Absterben der Geschlechtszellen im Pollenkorn führen. Daher liegen festgestellte Verbringungsdistanzen in der Regel weit über den festgestellten Auskreuzungsdistanzen. Weiterhin ist für die Auskreuzung die Fläche der Pollendonor- und Empfän-

gerpopulation wichtig. Je kleiner z.B. die Pollendonorfläche, desto geringer die Auskreuzungsdistanzen. Ferner spielt der Blühzeitraum der Empfängerpopulation eine Rolle. Je länger die weiblichen Blüten empfängnisbereit sind, desto höher ist bei zeitgleicher Blüte die Auskreuzung. Aus diesem Grunde sind Auskreuzungsdaten aus der älteren Literatur oft nicht verwertbar, da die modernen Hochleistungssorten schmalere Zeitfenster für eine Fremdbefruchtung haben als ältere Maissorten. In neueren internationalen Studien sind daher Auskreuzungen von Flächen, die etwa 10-fach größer als die hier beantragte (0,5 ha) sind, in 200 m kaum mehr nachweisbar. Bei der Erzeugung von Hybridsaatgut von Mais wird in der Saatgutverordnung - ohne weitere Isolierungsmaßnahmen - eine Mindestentfernung von 200 m zu anderen Maisfeldern vorgeschrieben, um eine Einkreuzung durch sortenfremden Pollen ausreichend zu minimieren.

Die Nebenbestimmung II.8. sieht vor, um die Freisetzungsfäche einen Isolationsabstand von 200 m zu kommerziellen Maisbeständen einzuhalten. Ferner sieht der Antragssteller vor, eine 3 m breite Mantelsaat aus nicht gentechnisch verändertem Mais um die Freisetzungsfäche anzulegen. Durch diese Maßnahmen wird der Möglichkeit einer Pollenübertragung in andere Maisbestände ausreichend begegnet.

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

(a) Die Expressionskassetten der *epsps*-Gens, *cry3Bb1*-Gens, *cry1A.105*-Gens und *cry2Ab2*-Gens

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in das Genom 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 tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmaterial allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologen Erbmaterial, also jedweder pflanzlichen DNA, möglich wäre.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Kopien des *CP4 epsps*-Gens, des *cry3Bb1*-Gens, des *cry1A.105*-Gens und des *cry2Ab2*-Gens, wobei die kodierende Region

des *epsps*-Gens N-terminal an pflanzliche Transitpeptid-Sequenzen fusioniert ist. Solche Transitpeptid-Sequenzen wären in Bakterien funktionslos.

Die Expression Glyphosat-toleranter EPSP-Synthasen ist bei Bodenmikroorganismen ein natürlich vorkommender Prozess. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet.

Die *cry3Bb1*- und *cry2Ab2*-Gene stammen aus *Bacillus thuringiensis*, einem ubiquitär verbreiteten Bodenbakterium. Selbst im Falle eines Transfers dieser Gene von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz der Gene in der Umwelt nicht erkennbar erhöht. Ökologische Konsequenzen eines solchen Gentransfers sind nicht wahrscheinlich.

Das synthetische *cry1A.105*-Gen ist zusammengesetzt aus Genfragmenten, die für verschiedene Domänen der Proteine Cry1Ab, Cry1Ac bzw. Cry1F kodieren. Die Gene dieser Proteine sind in der Umwelt weit verbreitet, da sie aus ubiquitär im Boden vorkommenden Bakterien (*Bacillus thuringiensis*) stammen. Der Wirkmechanismus von CRY1A.105 unterscheidet sich nicht von dem anderer Lepidopteren-spezifischer Cry-Proteine. Selbst der unwahrscheinliche Fall einer Übertragung des *cry1A.105*-Genes auf Mikroorganismen führt daher zu keiner genetischen Konstellation, die anders zu bewerten wäre als die Aufnahme der entsprechenden natürlichen *cry*-Gene oder -Genfragmente. Ein Selektionsvorteil durch Aufnahme von *cry1A.105* in Folge eines horizontalen Gentransfers auf Mikroorganismen ist nicht zu erkennen.

(b) Weitere, außerhalb der T-DNA liegende DNA-Abschnitte

Den Antragsunterlagen liegen Ergebnisse von Untersuchungen bei, die hinreichend sicher belegen, dass Abschnitte außerhalb der T-DNA bzw. der Zielsequenzen nicht in das Pflanzengenom übertragen worden sind. Sollte dies wider Erwarten dennoch geschehen sein, so wäre aus einer Übertragung dieser Sequenzen keine bedeutsame Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Sequenzen zu erwarten, da sie aus Mikroorganismen stammen, die natürlicherweise in der Umwelt bereits weit verbreitet sind.

(c) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine bedeutsame Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Sequenzen nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *Agrobacterium tumefaciens*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, CaMV und FMV, und sind in Pflanzen oder im Boden häufig anzutreffen.

Ökologische Konsequenzen eines solchen Gentransfers sind daher nicht wahrscheinlich.

III.1.2.5. Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzte Agrobakterien

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Elternlinien MON89034 und MON88017 diente ein Agrobacterium-vermitteltes binäres Transformationssystem. Der jeweils verwendete Agrobacterium-Stamm enthält ein „entschärftes“ Helferplasmid, in dem die T-DNA-Region deletiert worden ist, und ein Plasmid, dessen T-DNA in das Pflanzengenom integriert werden kann. Dieser Agrobacterium-Stamm ist nicht in der Lage, Pflanzentumore zu erzeugen. Ob der gentechnisch veränderte Mais auf Abwesenheit von Agrobakterien untersucht wurde, ist nicht bekannt. Auf Grund der generativen Vermehrung über mehrere Generationen ist jedoch zu erwarten, dass die Pflanzen keine gentechnisch veränderten Agrobakterien mehr enthalten.

Selbst wenn noch wenige Agrobakterien im gentechnisch veränderten Pflanzenmaterial verblieben sein sollten, besteht kein Risiko. In Betracht zu ziehen wäre in diesem Fall die Möglichkeit einer Übertragung der Transgene durch die Agrobakterien auf andere Pflanzen. Eine solche Übertragung, wenn sie stattfände, wäre ohne weitere Auswirkungen, denn nach der Transformation einer Pflanzenzelle durch die modifizierten Agrobakterien müsste diese spontan zu einer fertilen Pflanze regenerieren, damit die Transgene an die Nachkommen weitergegeben werden können. Damit ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu rechnen.

Weiterhin wäre eine mögliche Übertragung der Transgene aus Agrobakterien durch horizontalen Gentransfer in andere Bakterien in der Umwelt in Betracht zu ziehen

Auf die möglichen Auswirkungen wurde bereits unter III.1.2.4. eingegangen.