



Antrag 6786-01-0195

Zusammenfassung der Risikobewertung der gentechnisch veränderten Organismen

Weizen (*Triticum aestivum*) KP4-Greina-16 und KP4-Golin-5

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 13. Mai 2008

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 *kp4*-Gen

Das *kp4*-Gen entstammt dem Genom eines doppelsträngigen RNA-Virus, welches im Gewebe von bestimmten Pilzstämmen des Maisbeulenbrandes (*Ustilago maydis*) auftritt. Die Wirkung des *kp4*-Gens wurde zuerst in Hefen entdeckt, wo es in Folge der Genexpression zur Abtötung von Konkurrenzhefestämmen kommt. Vermittelt wird dieser Phänotyp durch das Genprodukt KP4 (Killer-Protein 4). *Ustilago*-Stämme, die das RNA-Virus beherbergen, wurden daher in Folge auch als Killer-Stämme bezeichnet. Mittlerweile wurde festgestellt, dass bei *Ustilago* durch KP4 inaktivierte Pilzzellen nach Zugabe von externem Calcium in der Lage sind, weiter zu wachsen. KP4 führt also in *Ustilago* offensichtlich zu einer reversiblen Hemmung des Hyphenwachstums, nicht aber zur Abtötung von Konkurrenzstämmen. Die Wirkungsweise des KP4-Toxins beruht auf einer Blockierung von spannungsabhängigen L-Typ Calcium-Kanälen. Dabei bindet KP4 kompetitiv an Calcium-Bindungsstellen dieses Kanaltyps und blockiert damit den Calciumtransport. In Pilzen ist Calcium an der Fruchtkörperentwicklung, dem Hyphenwachstum und der cAMP-Regulierung beteiligt. In „whole cell patch clamp“-Experimenten wurde eine Wirkung des KP4-Toxins auf die Permeabilität von pilzlichen, aber auch von Säugetier-Calciumkanälen nachgewiesen. Gleichwohl ist eine toxische Wirkung *in vivo* bisher nur bei *Ustilago*-Stämmen nachgewiesen. Der Nachweis eines Einflusses von KP4 etwa auf andere Pilze, z.B. der Gattung *Aspergillus*, *Fusarium* oder *Penicillium* sowie auf verschiedene Bakterien gelang bisher nicht. KP4 hat auch keinen Einfluss auf die Lebensfähigkeit von pflanzlichen Zellen, wie etwa von Mesophyll-Zellkulturen aus Tabak, noch auf Zellen tierischen Ursprungs, wie etwa auf Zellen der Hamsterzelllinie CHO-K1 oder auf Zellen aus menschlichem Nierengewebe. Inkubationen von neonatalen Herzzellen mit KP4 führten nicht zu morphologischen Veränderungen der Organellstrukturen. Ferner liegen Experimente vor, die die Zersetzung von KP4 in simulierter Magenflüssigkeit und damit einhergehend einen Verlust der fungiziden Wirkung zeigen. Hitze einwirkung führt zur raschen Inaktivierung des Proteins. KP4 weist darüber hinaus keine Aminosäuremotive auf, die aus nachgewiesenen Allergenen bekannt sind.

Southern Blot-Untersuchungen zur Ermittlung der übertragenen Kopienanzahl ergaben, dass in der Linie KP4-„Greina 16“ zwei Kopien des *kp4*-Genes und in der Linie KP4-„Golin 5“ mehr als zwei Kopien des *kp4*-Genes vorhanden sind.

Ob in den gentechnisch veränderten Weizenpflanzen die Expression von KP4 über die beabsichtigte Wirkung hinausgehende Effekte im pflanzlichen Stoffwechsel verursacht, ist bislang nicht untersucht worden. Der hier freizusetzende gentechnisch veränderte Weizen ist nicht für den Verzehr oder eine Verfütterung vorgesehen, das Vorhaben ist sehr kleinflächig.

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Untersuchungen, der geplanten Sicherheitsmaßnahmen und der Größe des Vorhabens sind schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen und die Umwelt nicht zu erwarten.

(b) Das *bar*-Gen

Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* kodiert für eine Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (PAT) und steht unter Kontrolle des Actin-Promotors aus Mais und der 35S-Terminationssequenz des Cauliflower-Mosaikvirus. Das Markergen bewirkt eine Toleranz gegen Phosphinothricin (Glufosinat), den Wirkstoff des Herbizids Basta[®], und wurde für Selektionszwecke bei der Herstellung der gentechnisch veränderten Pflanzen übertragen.

In der Linie KP4-„Greina 16“ wurden mehrere Kopien des *bar* Gens inseriert, die Anzahl der Kopien des *bar*-Gens in den Linie KP4-„Golin 5“ wurde nicht ermittelt.

L-Phosphinothricin ist ein Glutaminsäure-Analogon und inhibiert die pflanzliche Glutaminsynthetase. Die Hemmung der Glutaminsynthetase hat durch die Akkumulation von Ammonium-Ionen den Zelltod zur Folge. Aus diesem Grund findet Phosphinothricin als Wirkstoff in dem nicht-selektiven Herbizid Basta[®] 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, würde in den gentechnisch veränderten Pflanzen im Falle einer Behandlung mit Basta[®] 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.

Aus den auf dem Feld verbleibenden Teilen der gentechnisch veränderten Pflanzen würde das in diesen noch befindliche N-Acetyl-Phosphinothricin bei der Verrottung in den Boden gelangen und dort durch Mikroorganismen wieder in L-Phosphinothricin umgesetzt werden können. 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 bzw. dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit nach dem Pflanzenschutzgesetz zugelassen. Im Rahmen dieser Zulassung wurde auch eine toxikologische und ökotoxikologische Bewertung des Mittels vorgenommen.

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. Die Phosphinothricin-Acetyltransferase besitzt keine der für allergene Proteine aus Nahrungsmitteln typischen Eigenschaften (Hitzebeständigkeit, Stabilität im Verdauungstrakt) sowie keine Sequenzhomologie zu bekannten Allergenen. Im Rahmen des Freisetzungsvorganges ist laut Antrag nicht geplant, Basta® als Herbizid einzusetzen.

(c) Weitere DNA-Abschnitte der eingesetzten Transformationsplasmide

Für die Transformation mittels Mikroprojektil-Beschuss wurden die intakten Transformationsplasmide eingesetzt. Die zur Transformation der Weizenpflanzen verwendeten Plasmide pAct::*bar* und pUbi::*kp4* leiten sich von dem Plasmid pUC19 ab. Auf Grund der vorliegenden Informationen ist nicht auszuschließen, dass Teile der übrigen DNA-Abschnitte des Plasmids pUC19 in diese Linie übertragen wurden. Dieses enthält:

- Das *bla*-Gen kodierend für eine β -Lactamase,
- Nukleotide des *lacZ*-Gens aus *E. coli*,
- den Replikationsursprung ColE1 (*ori*).

Das *bla*-Gen konnte durch Southern Blot-Analyse im Genom der Linie KP4-„Greina 16“ nachgewiesen werden. Die Linie KP4-„Golin 5“ wurde nicht untersucht. Von einer Anwesenheit der genannten Elemente muss aber auch hier ausgegangen werden. Die Elemente sind für die Expression in Bakterien bestimmt und haben in Pflanzen keine Funktion. Im Falle einer Übertragung dieser DNA-Abschnitte in das Genom des gentechnisch veränderten Weizens wäre nicht mit ihrer Expression zu rechnen. Schädliche Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt sind daher nicht zu erwarten.

(d) 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 Pflanzen 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 Weizenpflanzen im Gewächshaus und im Freiland wurde keine im Vergleich von konventionellen Vergleichspflanzen veränderter Phänotyp beobachtet. Weder die Form und Rate der Fortpflanzung, der Verbreitung noch die Überdauerungsfähigkeit der Pflanzen waren verändert.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor und wurden zuerst beim Mais nachgewiesen. 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. Das in den gentechnisch veränderten Weizen gebildete KP4-Protein gehört zu einer Gruppe von Proteinen, die im Mais-Pilz *Ustilago maydis* gebildet wird. Über allergene Wirkungen ist nichts bekannt. Cytostatische Eigenschaften dieser Proteingruppe konnten nur auf andere *Ustilago*-Stämme nachgewiesen werden. Eine Verwendung von Produkten des Versuchs für die menschliche Ernährung oder zur Verfütterung ist nicht vorgesehen.

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

Weizen ist eine alte Kulturpflanze; als Wildform ist hexaploider Weizen nicht bekannt. Er kommt nur in der Nachbarschaft zu landwirtschaftlichen Anbauflächen, vereinzelt an Wegrändern und auf Ruderalflächen als Unkraut vor. Weizen ist eine konkurrenzschwache Pflanze, in natürlichen, intakten Pflanzengesellschaften ist eine Etablierung von Weizen nicht bekannt. Die Erfahrungen aus den Gewächshausversuchen und im Freiland erbrachten keine Hinweise darauf, dass sich der gentechnisch veränderte Weizen aufgrund der gentechnischen Veränderungen in seiner Fähigkeit, sich in der Umwelt zu etablieren, von nicht gentechnisch verändertem Weizen unterscheidet.

Nach Beendigung der generativen Phase sterben Weizenpflanzen ab. Neue Pflanzen können aus den gebildeten Samen entstehen. Die Samen (Körner) werden während der Ernte aus den Ähren gedroschen. Sie sind nach Eintritt in eine sekundäre Keimruhe unter günstigen Bedingungen bis zu 2 Jahre im Boden überdauerungsfähig, ohne ihre Keimfähigkeit einzubüßen. Unter günstigen Bedingungen können sie in folgenden Kulturpflanzenbeständen keimen. Aus der gentechnischen Veränderung ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine gegenüber nicht gentechnisch verändertem Weizen veränderte Überdauerungsfähigkeit.

Die Antragstellerin hat vorgesehen, dass geerntetes und für die Analysen nicht benötigtes Pflanzenmaterial in einer Biogasanlage entsorgt werden soll. Nach der Ernte ist vorgesehen, die noch verbliebenen Pflanzenreste zu zerkleinern und mit der Scheibenegge flach in den Boden einzuarbeiten. Nach dieser Behandlung auflaufendes Getreide wird noch im selben Jahr mit einem Herbizid behandelt.

Im Anschluss an das Freisetzungsvorhaben soll die Versuchsfläche mit einer Kulturart bestellt werden, die das Erkennen von ggf. auflaufendem Weizen ermöglichen würde. Auflaufende Weizenpflanzen sollen im Zuge der vorgesehenen Anbaupause während der Nachkontrolle vor der Blüte abgetötet werden. In die gemäß der Nebenbestimmung II.12. durchzuführende zweijährige Nachkontrolle ist ein 3 m breiter Streifen im Anschluss an die Mantel Saat einzubeziehen. Die Anbaupause und die Nachkontrolle sind zu verlängern, falls im letzten Jahr der Freisetzung noch Weizendurchwuchs beobachtet wurde (Nebenbestimmung II.12.).

Die Antragstellerin berichtet, bei den bisher mit dem gentechnisch veränderten Weizen durchgeführten Untersuchungen und Beobachtungen der morphologischen Eigenschaften der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen keine Unterschiede zwischen den gentechnisch veränderten und nicht gentechnisch veränderten Pflanzen gefunden zu haben. Hinweise auf eine erhöhte Vitalität und Fertilität des gentechnisch veränderten Weizens, die eine Überdauerung oder Verwilderung der gentechnisch veränderten Pflanzen begünstigen würden, liegen nicht vor. Demzufolge ist die Möglichkeit, dass der gentechnisch veränderte Weizen im Freiland überdauert oder sich auf diesem Wege Pflanzen etablieren, äußerst gering.

Ziel des Versuches ist es u.a. zu testen, ob der Weizen durch die gentechnische Veränderung eine erhöhte Resistenz gegen den Flugbrandpilz *Ustilago tritici* aufweist. Es gibt keine Hinweise darauf, dass die generelle Konkurrenzschwäche der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen gegenüber Wildpflanzenarten durch diese Eigenschaft verändert würde. Aus den genannten Gründen ist daher weder eine Etablierung noch eine unkontrollierte Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen zu erwarten.

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

Weizen (*Triticum aestivum*) ist die bedeutendste Kulturpflanze der gemäßigten Breiten. Er ist ein einjähriges Ährengras mit Sommer- und Winterformen. Die aufrechte Ährenspindel des Weizens ist zweizeilig alternierend mit Ährchen besetzt, in denen 3-6 zwittrige Blüten sitzen, von denen nur etwa 3 Samen ansetzen. Die Blühphase der Einzelblüte ist mit ca. 1 Stunde sehr kurz. Durch die zeitlich versetzte Abfolge des Blühbeginns der einzelnen Blüten eines Ährchens, der gesamten Ähre und der verschiedenen Ähren einer Pflanze am Haupt- und den diversen Nebentrieben kann die Blühzeit aller Blüten einer Weizenpflanze über eine Woche betragen. In der Regel tritt Selbstbestäubung noch vor der Blütenöffnung ein, doch ist in gewissem Umfang, beeinflusst vom Genotyp und den klimatischen Bedingungen zur Blütezeit, Fremdbefruchtung möglich. Diese wird mit etwa 1-3 % angegeben, bei trockener und warmer Witterung kann die Fremdbefruchtung bei manchen Genotypen auch höher sein. Nach Rückfrage beim Bundessortenamt gibt dieses den Fremdbefruchtungsanteil der in Deutschland angebauten Sorten mit 1-3 % an.

Weizenpollen wird vom Wind verbracht, doch wird die Möglichkeit der Verbreitung durch das hohe Gewicht der Pollenkörner und die Möglichkeit der Fremdbestäubung durch die vergleichsweise geringe Pollenproduktion eingeschränkt. Außerdem ist Weizenpollen nur über eine sehr kurze Zeit befruchtungsfähig. Unter optimalen Bedingungen liegt die Befruchtungsfähigkeit bei etwa 3 Stunden, unter Feldbedingungen bei weniger als 30 Minuten. Eine ermittelte Auskreuzungsdistanz ist stets eine Funktion der Feldgröße von Pollenempfänger- und Spenderpflanze, da diese das zur Verfügung stehende Pollengemisch und damit das Verhältnis der miteinander konkurrierenden Eigen- und Fremdpollen beeinflusst. Bei einem großflächig angebauten Pollendonator ist die Wahrscheinlichkeit des Auffindens von Pollen aus dieser Quelle in einer gewissen Entfernung höher als bei einem kleinflächig angebauten Donor.

Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen zur Auskreuzung bei Weizen. So wurden verschiedene Sommerweizensorten auf ihre Auskreuzungseigenschaften untersucht. Auch bei Varietäten mit hohen Auskreuzungsraten wurden jedoch keine Auskreuzungen jenseits von 33 m festgestellt. In einer Untersuchung zu Auswirkungen einer desintegrativen Vermehrungsweise wurden acht verschiedene Weizenakzessionen über 24 Vermehrungszyklen untersucht. Bei dieser Vermehrungsweise liegen die Vermehrungspartellen für die verschiedenen Weizenakzessionen nur wenige Meter voneinander entfernt. In diesen Untersuchungen wurde DNA-Material aus den aktuellen Beständen und aus 50 Jahre alten Rückstellproben über eine Mikrosatellitenanalyse verglichen. Trotz der beschriebenen Anbauweise ergaben sich auch bei 24 Anbauzyklen keine molekularen Hinweise auf eine Auskreuzung, die die Integrität und genetische Stabilität der Akzessionen beeinflusst hätte. Die weiteste nach

Kenntnisstand des BVL nachgewiesene Auskreuzung aus nicht kommerziellem Anbau wurde mit 300 m und einer Auskreuzungsrate von 0,005% nachgewiesen. Hier lag die Donorfläche bei 2500 qm, also immer noch um einen Faktor von fast 35 größer als im vorgesehenen Versuch (72m² je Standort und Jahr). Interessanter noch als die maximal ermittelte Auskreuzungsdistanz sind bei dieser Untersuchung die ermittelten Auskreuzungswerte in verschiedener Entfernung vom Pollendonorfeld. Dabei fällt auf, dass ab einer Entfernung von 40 m die Genflussraten bei den meisten untersuchten Himmelsrichtungen bei 0 liegen und jedenfalls in Einzelfällen 0,03% nicht übersteigen. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass bei einer 35-fachen Verkleinerung der Pollendonorfläche diese Werte überschritten würden. Einer Minimierung der Auskreuzung wäre folglich ausreichend Rechnung getragen, wenn ein 50 m Abstand gewahrt würde. Berichte von Auskreuzungen in 2,7 km Entfernung vom Pollendonor existieren, sind aber auf den beantragten kleinflächigen Freisetzungsvorversuch nicht übertragbar. Diese Auskreuzungen wurden von Pollendonorflächen in einer Größe von 22 bzw. 33 ha ermittelt. Die mit Pollendonor bestandenen Flächen dieser Untersuchungen sind somit etwa 3000- bzw. 4500-mal größer als die für den Freisetzungsvorversuch vorgesehenen Flächen.

Die Saatgutverordnung sieht als Maßnahme zur Abschirmung von unerwünschten Einkreuzungen in Weizenvermehrungsflächen die Anlage eines Trennstreifens (ohne Angabe einer Breite) zu benachbarten Getreidebeständen vor. Weitere Mindestabstände sind nicht einzuhalten.

Das Saatgut für Hybridweizensorten, die in Deutschland zugelassen sind, wird im Ausland erzeugt. Untersuchungen zur Pollenausbreitung bei emaskuliertem Weizen, wie er für Hybridsaatgut nötig ist, zeigten einen Samenansatz von ca. 10 % an pollensterilen Weizenpflanzen, die ca. 30 m von der Pollenquelle entfernt angebaut worden waren. In Feldstudien wurde dagegen ermittelt, dass bereits nach 1 m bis 3 m der Samenansatz an pollensterilen Weizenpflanzen auf 10 % zurückgegangen war. Die notwendige Pollensterilität ist nicht genetisch bedingt, sondern wird durch den Einsatz von in Deutschland nicht zugelassenen Gametoziden erreicht. Aus der Möglichkeit des Anbaus von Hybridweizen ist deshalb kein erhöhtes Auskreuzungspotential abzuleiten.

Der in unseren Breiten überwiegend angebaute Weizen (*Triticum aestivum*, Brotweizen) ist hexaploid. Als weitere Formen werden mit regionalen Schwerpunkten noch Hartweizen (*Triticum durum*, tetraploid, für Teigwaren) und gelegentlich Spelzweizen, (*Triticum spelta*, Dinkel, Grünkern, hexaploid, z. B. für Graupen, Grieß) angebaut. Andere Weizenformen, wie Rauheizen (*Triticum turgidum*, tetraploid), Emmer (*Triticum dicoccum*, tetraploid) oder Einkorn (*Triticum monococcum*, diploid) sind wohl nur vereinzelt auf landwirtschaftlich genutzten Flächen zu finden. Pollensteriler Weizen wird nicht für Anbauzwecke genutzt.

Als wichtige Kulturpflanze ist Weizen seit langer Zeit Gegenstand von Kreuzungsversuchen zwischen Weizen und Kreuzungspartnern innerhalb und außerhalb der Gattung *Triticum*. Hexaploide Weizenformen und –arten sind fertil miteinander kreuzbar. Dagegen ist die Fertilität der F1 aus Kreuzungen zwischen hexa- und tetraploiden Arten häufig stark eingeschränkt, Nachkommen aus Kreuzungen von hexa- und diploiden Arten sind in der Regel steril. Eine Ausnahme bildet hier *T. aestivum* x *T. turgidum* (tetraploid), deren F1 fertil ist.

Von den als mögliche Kreuzungspartner für Gattungsbastarde von *T. aestivum* im Konsensus-Dokument der OECD genannten Pflanzenarten kommen in Deutschland Arten von *Agropyron*, *Elymus*, *Hordeum*, *Leymus*, *Setaria* und *Sorghum* sowie *Secale cereale* (Roggen) und Triticale, darüber hinaus auch von *Aegilops* vor. Kreuzungen zwischen den genannten Arten und Formen des Weizens und den übrigen Arten führen häufig überhaupt nur unter Anwendung besonderer Techniken (Bestäubung per Hand, männlich sterile Linien, *embryo-rescue*-Methoden) zu (meist sterilen) Nachkommen. Die Möglichkeit des Auftretens von Spontanhybriden unter Freilandbedingungen wird als sehr gering angesehen. Dazu tragen neben der genetisch bedingten Inkompatibilität der Kreuzungspartner weitere Anforderungen bei, die für eine erfolgreiche Hybridisierung unter Freilandbedingungen erfüllt sein müssen, wie die zeitlich synchrone Blühphase beider Partner. Agrotriticum, ein Gattungsbastard aus *Triticum aestivum* und *Agropyron spec.*, der mit beiden Eltern rückkreuzbar sein soll, wird in Deutschland nicht angebaut. Das spontane Auftreten des Kreuzungshybrids aus Roggen und Weizen (Triticale) ist nur aus sehr alten Publikationen bekannt, was wahrscheinlich mit der vermehrten Offenblütigkeit der damals verwendeten Kultivare zusammenhängt. In den beschriebenen Fällen war der Roggen der Pollendonator und der Weizen der Pollenakzeptor. Von einem spontanen Auftreten von Triticale in benachbarten Roggenfeldern ist daher nicht auszugehen. Natürlich auftretende Hybride zwischen Kulturweizen und Kulturgerste bzw. Kulturhafer sind nicht bekannt.

Die laut Antragsunterlagen vorgesehenen Maßnahmen in Verbindung mit den Nebenbestimmungen dieses Genehmigungsbescheids stellen sicher, dass zu weiteren Flächen, die mit Weich- oder Hartweizen, Roggen oder Triticale bestellt werden, ein Abstand von mindestens 50 m eingehalten wird. Diese Maßnahmen sind ausreichend, um die Möglichkeit von Auskreuzungen in benachbarte Kulturpflanzenbestände zu minimieren.

Sollte es trotz der vorgesehenen Maßnahmen und unter Berücksichtigung der biologischen Eigenschaften des Weizens zu einer Auskreuzung der gentechnischen Veränderungen in Arten der genannten Pflanzengattungen kommen, die für den Verzehr genutzt werden (z. B. Roggen), so wären daraus auf Grund der unter III.1.2.1. (a)-(d) ausgeführten Bewertung der übertragenen Eigenschaften keine schädlichen Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt abzuleiten. Ggf. dennoch stattfindende einzelne Bastardierungsereignisse zwischen den gentechnisch veränderten Pflanzen und Wildpflanzen würden mit hoher

Wahrscheinlichkeit nicht zu einer Ausbreitung der übertragenen Fremdgene in Wildpflanzenpopulationen führen, da dafür anschließende Rückkreuzungen des Bastards mit der Wildpflanzenart erforderlich wären.

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

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in den Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Beweise für eine unter natürlichen Bedingungen im Freiland 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 Mikroorganismen 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 Erbmaterial, also jedweder pflanzlichen DNA, möglich wäre.

(a) Das *kp4*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene Gen stammt aus einem doppelsträngigen RNA-Virus, welches symbiotisch vergesellschaftet mit einem pilzlichen Schadorganismus des Mais (Maisbeulenbrand) verbreitet in Maiskulturen zu finden ist. Für dieses Gen ist also auch die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Organismen gegeben.

(b) Das *bar*-Gen

Die Inaktivierung von Phosphinothricin durch Acetylierung ist ein bei Bodenmikroorganismen natürlicherweise vorkommender Prozess. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet. Auch für das *bar*-Gen ist also die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen gegeben. Selbst im Falle eines Transfers des *bar*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz dieser Resistenz in der Umwelt nicht erkennbar erhöht.

(c) Weitere auf den Transformationsplasmiden gelegene DNA-Abschnitte

Die gentechnisch veränderten Weizenpflanzen können folgende genetische Elemente enthalten, die auf den verwendeten Plasmiden liegen:

- Das β -Lactamase-Gen für Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin,
- das Gen für das α -Fragment der β -Galaktosidase aus *E. coli*,
- die Replikationsursprünge ColE1 zur Replikation in *E. coli*,
- weitere Teile des Plasmides pUC19.

Das β -Lactamase Gen ist weit verbreitet in Mikroorganismen. Etwa 35% aller klinischen *E. coli*-Isolate aus Menschen sind resistent gegen Ampicillin, davon 90% auf Grund eines β -Lactamase vermittelten Wirkmechanismus. Ebenso weisen 74% aller *E. coli*-Isolate aus Rindern und Schweinen eine Ampicillin-Resistenz auf. Jüngste Studien zu Antibiotikaresistenzen von Mikroorganismen in der Umwelt zeigen, dass ein hoher Anteil von Bodenbakterien natürlicherweise gegen ein breites Spektrum von β -Lactam-Antibiotika resistent ist, welches unter anderem durch Polymorphismus des *bla*-Genes in diesen Mikroorganismen begründet ist. Weiterhin zeigen jüngste Ergebnisse von Feldstudien, dass z.B. eine 10-jährige Monokultur von gentechnisch verändertem Mais, welcher das *bla*-Gen enthält, an der Verbreitung der natürlich vorkommenden, bodenbakteriellen Antibiotika-Resistenzen im Vergleich zum konventionellen Anbau nichts ändert.

Die ZKBS ordnet in ihrer Stellungnahme vom 6.7.1999 zur biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen das β -Lactamase-Gen in die Gruppe II derjenigen Antibiotikaresistenz-Gene ein, die (a) in Mikroorganismen verbreitet sind und (b) deren relevante Antibiotika nur noch in Teilbereichen der Human- bzw. Veterinärmedizin therapeutische Anwendung finden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass – wenn überhaupt - das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen nur sehr geringe Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt zur Folge hat. Diese Einschätzung wurde im Jahre 2007 bestätigt.

Das Wissenschaftliche Gremium für gentechnisch veränderte Organismen (GMO-Panel) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat in seinem Gutachten über die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen als Markergene in gentechnisch veränderten Pflanzen vom 2. April 2004 das β -Lactamase-Gen in die Gruppe derjenigen Gene eingeordnet, die auf experimentelle Freilandversuche beschränkt werden und nicht in gentechnisch veränderten Pflanzen vorliegen sollten, die in Verkehr gebracht werden sollen. Es ist auch zu berücksichtigen, dass der beantragte Freisetzungsversuch nur auf einer begrenzten Fläche für einen begrenzten Zeitraum stattfinden soll.

Das α -Peptid des *lacZ*-Gens für eine β -Galaktosidase beinhaltet die „multiple cloning site“ von pUC18/19. Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das α -Fragment alleine ist enzymatisch nicht aktiv. Zudem wäre das α -Fragment in dem gentechnisch veränderten Weizen durch Insertion des in die „multiple cloning site“ klonierten Gens unterbrochen, so dass kein funktionsfähiges Genprodukt gebildet werden kann. Dies wäre auch in Bakterien, die das Gen durch einen horizontalen Gentransfer erhalten würden, der Fall.

Das pUC-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 Bakterienspezies, 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 pUC im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

(d) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *Zea mays*, *Oryza sativa* und dem Cauliflower-Mosaikvirus. CaMV ist ein pflanzeninfizierendes, doppelsträngiges DNA-Virus, das in Pflanzen weit verbreitet ist. Mais und Reis sind als landwirtschaftliche Nutzpflanzen in den Anbauregionen weltweit verbreitet.

(e) Weitere DNA-Sequenzen

Durch den Einsatz der Mikroprojektil-Beschuss-Technik zur Transformation können weitere Fragmente der zur Transformation eingesetzten Plasmide in das Genom der gentechnisch veränderten Weizenpflanzen integriert worden sein. Diese sind nicht kodierend und ohne regulatorische Funktion, eine Übertragung durch horizontalen Gentransfer in Mikroorganismen wäre daher nicht von Bedeutung.