



Bescheid 6786-01-0205 / 42010.0205

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffeln
(*Solanum tuberosum*) AM04-1020
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde
Berlin, den 06. April 2010**

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) Die Fragmente der kodierenden Region eines Kartoffel-Stärkesynthasegens („granule bound starch synthase“, GBSS) in sense und antisense-Orientierung (als „inverted repeat“)

Das Fragment der kodierenden Region des Kartoffel-Stärkesynthasegens gbss in sense- und antisense-Orientierung (als „inverted repeat“) wird unter der Kontrolle des kartoffeleigenen gbss-Promotors vorwiegend in den Kartoffelknollen exprimiert. In den gentechnisch veränderten Pflanzen wird die Bil-

dung einer doppelsträngigen RNA bewirkt, als Folge wird das endogene Transkript des entsprechenden Gens inaktiviert und so die Bildung des Enzyms GBSS verhindert.

Infolge der Abnahme an GBSS-Protein wird in den Knollen eine Stärke mit einem geringeren Amyloseanteil synthetisiert. Die Reduktion des Amyloseanteils wurde von der Antragstellerin durch Jodfärbung der Stärkekörner und spektrophotometrisch bestimmt.

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln werden in dem zur Genehmigung beantragten Freisetzungsvorhaben nicht zur Herstellung von Lebensmitteln oder Futtermitteln verwendet. Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung durch die Veränderung der Zusammensetzung der Stärke in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen nicht zu erwarten. Neue Proteine werden infolge dieser gentechnischen Veränderung in den Pflanzen nicht gebildet.

(b) Das ahas-Gen

Zur Selektion von Transformanten wurde ein ahas-Gen aus einer *Arabidopsis thaliana*-Mutante unter der Kontrolle des nos-Promotors und des nos-Terminators aus *Agrobacterium tumefaciens* verwendet. Das ahas-Gen kodiert für das Enzym Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS), auch als Acetolactat-Synthase (ALS) bezeichnet, das in Pflanzen die ersten Schritte im Biosyntheseweg der Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin katalysiert, nämlich die Reaktion von zwei Pyruvat-Molekülen zu 2-Acetolactat bzw. die Reaktion von Pyruvat mit 2-Ketobutyrat zu 2-Acetohydroxybutyrat.

AHAS ist das Zielenzym für verschiedene Klassen von Herbizidwirkstoffen, darunter Sulfonylharnstoff-Derivate und Imidazolinone. Die Wirkung der Herbizide beruht auf einer Störung der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren, was zum Absterben der Pflanzen führt.

Aus einer *A. thaliana*-Mutante wurde ein Gen für eine AHAS-Variante isoliert, die aufgrund einer geringeren Affinität zu den Herbizidwirkstoffen den Pflanzen eine Herbizidtoleranz verleiht. Diese Variante unterscheidet sich von der Wildtyp-AHAS durch einen Aminosäureaustausch (S653N, d. h. Asparagin statt Serin in Position 653).

Die herbizidtolerante AHAS-Variante katalysiert in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen die gleichen Reaktionen wie die entsprechenden kartoffeleigenen Enzyme. Mit dem Entstehen neuer Stoffwechselprodukte in den gentechnisch veränderten Kartoffeln aufgrund der Expression des ahas-Gens aus *A. thaliana* ist nicht zu rechnen. Risiken für die Umwelt oder die menschliche Gesundheit als Folge der Übertragung dieses Gens sind im Rahmen der geplanten Versuchsdurchführung nicht zu erwarten.

(c) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Border-Regionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Von Übertragungen von DNA-Abschnitten jenseits der Border-Regionen wurde jedoch in der Literatur berichtet.

Die gentechnisch veränderte Kartoffellinie wurde durch Transformation mit dem Plasmid pAP4 erhalten. Dieses Plasmid enthält außerhalb der Border-Regionen:

- das aadA-Gen für eine Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin,
- die bom-Site aus pBR322 zur Mobilisierung des Plasmids von Escherichia coli nach A. tumefaciens,
- die Replikationsursprünge Typ ColE1 und pVS1-repA zur Replikation in E. coli bzw. A. tumefaciens, sowie die sta (stability)-Region aus pVS1.

Durch real time-PCR wurde - unter Verwendung von einem Primer-Probe-Set an der rechten Border-Region und einem an der linken Border-Region - gezeigt, dass es in den zur Freisetzung vorgesehenen Linien weder zu einer Integration von Plasmidsequenzen über die rechte T-DNA-Border noch über die linke Border hinaus gekommen ist. Das Primer-Probe-Set an der rechten Border-Region ist gegen eine interne Sequenz des aadA-Gens gerichtet. Es ist davon auszugehen, dass die oben aufgeführten Sequenzen, insbesondere das aadA-Gen, in den gentechnisch veränderten Linien nicht enthalten sind.

(d) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert worden sind, 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 Kartoffelpflanzen 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 auf, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die 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. Die Acetohydroxysäure-Synthase ist nicht als Protein mit allergenem Potential beschrieben. Es ist in dem zur Genehmigung beantragten Freisetzungsvorhaben nicht vorgesehen, die gentechnisch veränderten Kartoffeln als Lebensmittel oder Futtermittel zu verwenden. Pollen von Kartoffelpflanzen wird nur in gerin-

gem Umfang durch den Wind verbreitet und spielt als Auslöser von Pollenallergien generell keine nennenswerte Rolle.

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

Kartoffeln befinden sich in Mitteleuropa seit mehreren hundert Jahren im landwirtschaftlichen Anbau. Auf landwirtschaftlich genutzten Flächen können in Abhängigkeit von den Temperaturen im Winter nach Kartoffelanbau im Folgejahr Durchwuchskartoffeln auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen oder Samen hervorgegangen sind. Eine Etablierung von Kartoffeln in natürlichen Ökosystemen wurde in Europa nicht beobachtet, da Kartoffeln gegenüber Wildpflanzen konkurrenzschwach und außerdem nicht frostresistent sind. Kartoffeln werden zwar gelegentlich außerhalb kultivierter Flächen angetroffen, jedoch nur auf nicht-natürlichen Standorten wie Wegrändern und anderen Ruderalflächen. Auch an solchen Standorten kommt es wegen der fehlenden Frosthärte der Kulturkartoffeln nicht zu einer dauerhaften Ansiedlung.

Die Knollen der gentechnisch veränderten Versuchspflanzen sollen maschinell geerntet, in geschlossene und gekennzeichnete Behältnisse verpackt und zur Lagerung, Analyse oder Entsorgung in entsprechende S1-Anlagen gebracht werden. Überschüssiges Knollenmaterial wird durch geeignete Methoden, z. B. Dämpfen, Autoklavieren, Verbrennen oder Fermentation in einer Biogasanlage, inaktiviert. Das Kartoffelkraut soll zum Verrotten auf den Freisetzungsf lächen verbleiben.

Kartoffelpflanzen können blühen und Beeren bilden. Dass unter den mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen überwintern, und dass aus ihnen Pflanzen aufwachsen, ist jedoch wenig wahrscheinlich. Es ist vorgesehen, die oberirdischen Teile der Kartoffelpflanzen vor der Ernte mechanisch oder chemisch abzutöten. Dadurch wird auch einem Heranreifen von Samen entgegengewirkt. Um Durchwuchs zu minimieren, soll im Anschluss an die Ernte eine flache Bodenbearbeitung erfolgen, anschließend ist vorgesehen, die Fläche mit einer Scheibenegge zu bearbeiten, um an der Oberfläche liegende Kartoffelknollen weitgehend zu zerkleinern und damit der Fäulnis preiszugeben. Sollten Knollen oder Samen im Boden verbleiben, würden aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die Nachkontrolle erfasst. Die Fruchtfolge wird so gestaltet, dass es auf den einzelnen Freisetzungsf lächen im folgenden Jahr nicht zu einem Nachbau von Kartoffeln kommt. Während der Nachkontrolle nach Beendigung der Freisetzung sind auf den zu kontrollierenden Flächen keine Pflanzen oder nur solche Pflanzen anzubauen, welche die Nachkontrolle nicht behindern. Falls aus bei der Ernte nicht erfassten Knollen oder aus Samen gentechnisch veränderte Kartoffelpflanzen auflaufen, können diese erkannt und durch in der Landwirtschaft übliche Maßnahmen inaktiviert werden. Die Antragstellerin sieht hierzu vor, in Absprache mit der Überwachungsbehörde eine Bekämpfung durch geeignete Herbizide vorzunehmen. Tritt Durchwuchs auf, so wird die Nachkontrolle verlängert und die Freisetzungsf läche wird ein weiteres Jahr auf Durchwuchs kontrolliert.

In bisherigen Versuchen der Antragstellerin zeigte die gentechnisch veränderte Kartoffellinie keine spezifischen Habitusveränderungen. Es ergaben sich keine Hinweise darauf, dass zwischen der gentechnisch veränderten Linie und konventionellen Kartoffelsorten wesentliche Unterschiede bestehen,

die über das Ziel der gentechnischen Veränderung hinausgehen. Im Rahmen der bisherigen Versuche wurden auch Untersuchungen zur Überwinterungsfähigkeit der gentechnisch veränderten Kartoffeln durchgeführt. Selbst wenn es zu einer Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderung gekommen wäre, so würde dies durch die vorgesehene Anbaupause für Kartoffeln, die durchzuführende Nachkontrolle und durch die vorgesehenen Isolationsmaßnahmen ausreichend berücksichtigt.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Vergleich zu konventionellen Kulturkartoffeln veränderte pflanzenökologische Eigenschaften aufweisen und natürliche Ökosysteme besiedeln können. Selbst wenn es zu einer Vertragung von Beeren, Samen oder Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen durch Tiere kommen sollte, ist daher eine Etablierung der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in der Umwelt nicht zu erwarten.

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

Versuche zur Kreuzung von Kartoffeln mit in Mitteleuropa vorkommenden Solanaceen waren erfolglos. Unter Freilandbedingungen fand keine Einkreuzung von gentechnisch veränderten Kartoffeln in *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) statt. Auch nach künstlicher Pollenübertragung auf *S. nigrum* wurden keine lebensfähigen Samen erhalten. Eine Regeneration einiger Hybriden, die sich allerdings als steril erwiesen, war nur mit Hilfe artifizieller Methoden ("embryo rescue") unter Bedingungen möglich, die in der Natur nicht auftreten. Kartoffeln und *Solanum dulcamara* (Bittersüßer Nachtschatten) erwiesen sich als streng bilateral inkompatible Arten; bei Kreuzungsversuchen kam es nicht zu einer Befruchtung der Samenanlagen. Auch mit der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) ist die Kartoffel nicht kreuzbar.

Im Folgenden wird daher nur auf eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen auf andere Kartoffelpflanzen eingegangen. Pollen von Kartoffelpflanzen können durch Insekten oder durch den Wind übertragen werden. Eine Übertragung durch Wind erfolgt jedoch nur über kurze Entfernungen. Die Vermehrung von Kartoffeln erfolgt in der landwirtschaftlichen Praxis vegetativ über Knollen, d. h. nicht über Samen.

Die zur Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zeigten in bisherigen Versuchen keine signifikanten Habitusveränderungen gegenüber konventionellen Vergleichslinien. Sollte es zu einer Pollenübertragung auf Kartoffelpflanzen kommen, so ist dadurch nicht mit schädlichen Einwirkungen zu rechnen, da Pflanzgut für den landwirtschaftlichen Anbau von Kartoffeln vegetativ vermehrt wird. Eine Pollenübertragung hätte damit keine Auswirkungen auf das Anbauergebnis. Auch zum Verzehr gelangen lediglich Kartoffelknollen. Der in dem zur Genehmigung beantragten Versuch vorgesehene Abstand von mindestens 10 m zwischen den Freisetzungsfeldern und landwirtschaftlichen Nutzflächen mit nicht gentechnisch veränderten Kartoffeln wird als ausreichend angesehen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass aus möglicherweise gebildeten Samen Pflanzen auflaufen, ist, wie weiter oben bereits ausgeführt, unter den gegebenen klimatischen Bedingungen gering. Sollten dennoch aus

Samen Pflanzen aufwachsen, würden sie auf landwirtschaftlich genutzten Flächen im Rahmen einer Fruchtfolge durch die üblichen feldbaulichen Maßnahmen eliminiert.

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 die Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Nachweise für eine unter natürlichen Bedingungen stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und deren Expression in Mikroorganismen liegen nicht vor. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen jedoch folgern, dass eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, dass ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellt.

Soweit anzunehmen ist, dass ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Pflanzen und Bakterien tatsächlich stattfinden kann, 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 jedem heterologen Erbmateriale, also jedweder pflanzlichen DNA, möglich wäre.

(a) Die Fragmente der kodierenden Region eines Kartoffel-Stärkesynthasegens („granule bound starch synthase“, GBSS)

Die Nukleotidsequenzen stammen aus Kartoffeln, kommen also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher genauso aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen. Auswirkungen durch eine Übertragung dieser Nukleotidsequenzen auf Mikroorganismen sind nicht zu erwarten.

(b) Das ahas-Gen

Aus induzierten und erworbenen Mutationen hervorgegangene, herbizidtolerante Varianten von AHAS-Enzymen sind in verschiedenen Pflanzenarten bekannt. Die AHAS-Enzyme von Enterobacteriaceen weisen natürlicherweise häufig eine um bis zu zwei Größenordnungen geringere Sensitivität gegenüber Sulfonylharnstoff- und Imidazolinon-Herbiziden auf als die entsprechenden pflanzlichen Enzyme. Das Isoenzym AHAS II aus *E. coli* ist z. B. ähnlich tolerant gegenüber Sulfonylharnstoff-Derivaten wie die in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen gebildete AHAS-Variante S653N.

Die Verbreitung von Genen für herbizidtolerante AHAS-Varianten könnte mit weit höherer Wahrscheinlichkeit durch Übertragung zwischen Bakterien oder durch horizontalen Gentransfer aus nicht gentechnisch veränderten Pflanzen erfolgen.

(c) Regulationssequenzen

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 *A. tumefaciens* und der Kartoffel. *A. tumefaciens* ist in der Umwelt weit verbreitet, und die genannten Sequenzen befinden sich in Wildtyp-Agrobakterien auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation zwischen verschiedenen Rhizobiaceen ausgetauscht werden können.

(c) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Für die zur Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Kartoffellinien wurde durch real time-PCR gezeigt, dass es weder zu einer Integration von Plasmidsequenzen über die rechte T-DNA-Border noch über die linke Border hinaus gekommen ist.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen diente ein Agrobacterium-vermitteltes binäres Transformationssystem. Es wurde gezeigt, dass die zur Freisetzung vorgesehene Linie keine Backbone-Sequenzen des zur Transformation verwendeten Vektors enthält. Es ist davon auszugehen, dass die Pflanzen frei von den zur Transformation verwendeten Agrobakterien sind.

Der verwendete Agrobacterium-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. er ist nicht mehr zur Tumorinduktion befähigt. In dem unwahrscheinlichen, aber theoretisch denkbaren Fall der Übertragung der eingeführten Fremdgene durch solche Agrobakterien in eine Zelle einer anderen Pflanze, müsste diese Zelle spontan zu einer ganzen, fertilen Pflanze regenerieren, damit die Fremdgene in Keimzellen gelangen würden. Nur auf diese Weise könnten diese Gene an die Nachkommen der Pflanze weitergegeben werden. Damit ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu rechnen.

Unter der Annahme, dass ein Vorhandensein geringer Mengen rekombinanter Agrobakterien in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht auszuschließen sei, wäre ferner eine mögliche Übertragung der in den Agrobakterien enthaltenen binären Plasmide durch Konjugation auf in der Umwelt vorkommende Wildtyp-Agrobakterien (*A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes*) in Betracht zu ziehen, die dann wiederum möglicherweise die Fremdgene auf einzelne Zellen anderer Pflanzen übertragen könnten. Im Fall einer Infektion und nachfolgenden Transformation durch Wildtyp-*A. tumefaciens* bzw. *A. rhizogenes* entsteht aus der transformierten Pflanzenzelle ein Tumor ("Wurzelhalsgalle" bzw. "hairy roots"). Die Bildung einer Pflanze aus einem solchen Tumor ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu erwarten.