



Antrag 6786-01-0065

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Petunien (*Petunia hybrida*) (Linie RL01-17) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde,

Berlin, den 29. April 1997

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 *A1*-Gen

Aktives Genprodukt ist eine Dihydroflavonol-4-reduktase, die das aufgrund einer Mutation im Anthocyanstoffwechsel akkumulierte Dihydrokaempferol in Leukopelargonidin umsetzt und so zu einer lachsroten Blütenfarbe (Pelargonidin) führt. Die Enzyme und Substrate dieses Stoffwechsels sind in der Natur weit verbreitet.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen werden nach Versuchsende mechanisch zerstört und flach in den Boden eingearbeitet. Sie sind nicht zum Verzehr oder zur Verfütterung vorgesehen. Selbst bei einem unbeabsichtigten Verzehr durch Tiere oder Menschen wären keine schädlichen Einwirkungen auf deren Gesundheit zu erwarten.

(b) Das *nptII*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase. Es wurde als Markergen zur Selektion transformierter Pflanzenzellen eingeführt.

Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), welche die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-OH-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika katalysiert, wodurch diese inaktiviert werden. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus. Zu den Substraten der APH(3')II-Enzyme zählen die Antibiotika Kanamycin, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamicin A und B sowie Paromomycin. Das in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsame Gentamicin und sonstige Aminoglycoside und Aminocyclitole gehören nicht zum Substratspektrum der APH(3')-II-Enzyme. In der Tiermedizin finden Kanamycin und Neomycin jedoch breite Anwendung. Aufgrund der Substratspezifität der Neomycin-Phosphotransferase ist zu erwarten, daß unter Freilandbedingungen in den gentechnisch veränderten Petunien bei fehlendem Substrat keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen. Da die betreffenden Antibiotika im Boden nicht in höheren Konzentrationen vorliegen, vermittelt die Neomycin-Phosphotransferase den gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland keinen Selektionsvorteil. Eine Toxizität des Enzyms für Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen oder den Menschen liegt nicht vor.

(c) Weitere möglicherweise übertragene DNA-Abschnitte

Die gentechnisch veränderten Petunien wurden durch Transformation mit dem Vektor p35A1 erzeugt. Auf diesem Vektor befindet sich auch noch das für die bakterielle Replikation und Selektion notwendige Fragment aus pBR322. Es enthält einen Replikationsursprung und das Gen für Ampicillinresistenz, beide aber mit Deletionen. Ein in Pflanzen funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese Sequenz nicht kodiert.

(d) Deletion

Am Integrationsort sind ca. 200 Basenpaare des Empfängergenoms deletiert. Es gibt keinen Hinweis auf funktionelle Veränderungen oder Risiken, die damit im Zusammenhang stehen könnten.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten ins Genom integriert folgende Regulationssequenzen:

- den 35S-Promotor und -terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV),
- den Promotor des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- die Terminatorregion des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden cDNAs für ein Enzym des Anthocyanstoffwechsels aus Mais und für das *nptII*-Gen in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) bis (b).

(e) Positioneffekte 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 Gewächshausbedingungen. Diesbezügliche Erfahrungen aus früheren Freisetzungsexperimenten liegen vor und können so zusammengefaßt werden: "Die Aktivität des *A1*-Gens unterliegt Schwankungen aufgrund interner Bedingungen (z.B. Alter) und aufgrund externer Bedingungen (z.B. abiotischer Faktoren). Sie wird über Methylierung reguliert." - 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 im Gewächshaus und im Freiland wurden 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 Petunien vor. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden

sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen sowie aus Freisetzungen im Ausland von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht-gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

Pollen von Petunien werden ohnehin nur in geringem Umfang durch den Wind verbreitet und spielen als Auslöser von Pollenallergien keine Rolle.

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

Die Petunie wird in Mitteleuropa seit langer Zeit als beliebte Balkonpflanze kultiviert. Eine Etablierung von Petunien in natürlichen Ökosystemen wurde dabei in Europa nicht beobachtet. Da "Petuniensamen sehr empfindlich gegen feuchte Kälte sind", wie die Antragstellerin das in sorgfältiger experimenteller Anordnung getestet hat, kommt es nirgends zu einer dauerhaften Ansiedlung. Gentechnisch veränderte Petunien mit dem *A1*-Gen zeigten bei früheren Freisetzungen eine höhere Anfälligkeit für pilzliche Pathogene als die Handelssorten.

Es ist vorgesehen, die gentechnisch veränderten Petunien nach Versuchsende in den Boden einzuarbeiten. In der folgenden Vegetationsperiode sollen Pflanzen angebaut werden, die eine Nachkontrolle auf eventuell auflaufende Petunien erlauben. Während dieser Zeit soll eventueller Wiederaufwuchs beseitigt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen durch nach der Beendigung der Demonstration möglicherweise im Boden verbliebene Samen ist allerdings nach den systematischen Erfahrungen der Antragstellerin sehr gering. Die Etablierung dieser Pflanzen kann ausgeschlossen werden.

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

Petunia besitzt im Gegensatz zu allen anderen Solanaceen ($n=12$) einen Chromosomensatz von $n=7$. Das erklärt, daß sie mit anderen Mitgliedern dieser Familie nicht kreuzbar ist. Die Antragstellerin hat eine Reihe von Solanaceen ohne Erfolg als mögliche Kreuzungspartner getestet. Pollen von Petunia werden durch Nachtfalter und evtl. einige andere Insekten übertragen. Auf der Freisetzungsfäche befinden sich außer den Kontrollpflanzen keine potentiell-

len Kreuzungspartner. Daher wird die Wahrscheinlichkeit einer Auskreuzung der Transgene 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 Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen 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 darstellen würde.

Die Antragstellerin hat zu dieser Frage systematische Untersuchungen angestellt, deren Ergebnisse folgendermaßen zusammengefaßt werden können:

Die DNA der Transgene war im Boden nicht lange nachweisbar: Von 400 Bodenproben über einen Zeitraum von zwei Jahren wurden nur in vier Fällen während des Petunienversuchs und während der ersten zwei Monate nach dem Unterpflügen der Pflanzen DNA-Fragmente gentechnisch veränderter Pflanzen im Boden nachgewiesen.

Es wurde kein Hinweis auf einen Gentransfer in Bodenbakterien gefunden.

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 Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmateriale, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre. Das Gen für ein Enzym der Anthocyansynthese stammt aus Mais und kommt in der Umwelt häufig vor. Es könnte also auch - mit weit höherer Wahrscheinlichkeit - durch horizontalen Gentransfer aus nicht gentechnisch veränderten Organismen in Mikroorganismen in der Umwelt gelangen.

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(b) bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringerer Bedeutung, werden in der Tiermedizin jedoch vielfältig angewendet. Es war somit zu prüfen, ob durch einen möglichen horizontalen Gentransfer des *nptII*-Gens der therapeutische Einsatz der betreffenden Antibiotika beeinträchtigt würde.

Der Resistenzmechanismus der Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung kommt natürlicherweise bei Bodenmikroorganismen vor. APH(3')II-Enzyme wurden zudem in klinischen Isolaten von Menschen gefunden. Die weite Verbreitung von Genen, die eine Resistenz gegen Aminoglycosid-Antibiotika vermitteln, ist durch die häufige Anwendung dieser Antibiotika sowie dadurch zu erklären, daß diese Gene oft auf Plasmiden lokalisiert

sind, wodurch eine effektive Übertragung durch Konjugation möglich ist. Selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Petunien auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Die gentechnisch veränderten Petunien enthalten wahrscheinlich einen Replikationsursprung und eine Ampicillinresistenz aus *E. coli*. Diese Sequenzen sind ganz bzw. teilweise deletiert und somit nicht funktionell. Generell gilt auch für diese Sequenzen, daß die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer ist als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen.

Auch bei einer Übertragung der sonstigen in den Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *Agrobacterium tumefaciens* und CaMV.

Agrobacterium tumefaciens ist in Böden weit verbreitet, und die genannten Sequenzen befinden sich in Wildtyp-Agrobakterien auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation ausgetauscht werden können. Bezüglich eines horizontalen Gentransfers dieser Sequenzen auf Mikroorganismen ist anzumerken, daß daher eine Übertragung der entsprechenden Sequenzen aus *Agrobacterium* weitaus wahrscheinlicher ist, als eine Übertragung aus den gentechnisch veränderten Pflanzen.

Die theoretische Möglichkeit eines Transfers der CaMV-Sequenzen aus den gentechnisch veränderten Pflanzen würde keine neue im Vergleich zur natürlicherweise vorliegenden Situation darstellen, weil CaMV als doppelsträngiges pflanzeninfizierendes DNA-Virus ohnehin in Pflanzen anzutreffen ist.