



Antrag 6786-01-0179

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch
verändertem Mais (*Zea mays*)**

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 21. Mai 2007

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 *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 Reis Act1-Promotors (*Oryza sativa*) statt. Die Anwesenheit der Introns (siehe I. 1.1.) 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, eine 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 im Mais und in anderen Kulturpflanzen vorkommen. Da dem Transitpeptid (CTP2) der EPSPS aus *Arabidopsis thaliana* 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 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 *pat*-Gen

Die Expression des übertragenen Gens für PAT findet unter der Kontrolle des konstitutiven CaMV 35S-Promotors sowie des CaMV 35S-Terminators statt.

Das Gen für PAT kodiert für ein Enzym, welches Resistenz gegen den Wirkstoff L-Phosphinothricin vermittelt. Der herbizide Bestandteil von Glufosinat-Ammonium ist L-Phosphinothricin (L-PPT). In Pflanzen bindet L-PPT an das aktive Zentrum der Glutaminsynthetase, verhindert damit den Abbau überschüssigen Ammoniums in der Pflanze und bewirkt dadurch ihr Absterben. PAT wandelt die herbizide Substanz L-PPT in das unwirksame N-Acetyl-L-Phosphinothricin (N-Acetyl-L-PPT) um. Die Expression von *pat* in den 1507-Maispflanzen bewirkt somit, dass das überschüssige Ammonium weiterhin durch die Glutaminsynthetase abgebaut werden kann und dass damit die 1507-Maispflanzen gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium eine Toleranz besitzen. Freisetzungsexperimente mit 1507-Maispflanzen haben gezeigt, dass diese Toleranz auch noch bei Einsatz von 1600 g a.i./ha Glufosinat-Ammonium besteht; diese Menge übersteigt diejenige, die in der Praxis angewandt wird, um das 4-fache.

Es liegen keine Hinweise für sonstige physiologische Aktivitäten des in den 1507-Maispflanzen exprimierten PAT vor. Es ist folglich davon auszugehen, dass es neben der Bildung des PAT in den 1507-Maispflanzen und – bei Anwendung von Glufosinat-Ammonium – neben der oben beschriebenen Metabolisierung von L-PPT zu keiner weiteren Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels kommen wird. Diese Annahme stützt sich insbesondere auf die Ergebnisse der Inhaltsstoffanalytik aus Anträgen für das Inverkehrbringen. Aber auch die Bewertung der agronomischen Parameter sowie die phänotypische Charakterisierung

der 1507-Maispflanzen lassen keine Einflüsse auf die pflanzliche Entwicklung und den Metabolismus durch die Expression des PAT erkennen.

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

In Mais 59122 erfolgt die Expression von PAT aus einem nahezu identischen Genkonstrukt wie in Mais 1507, die Bewertung stimmt daher mit der für den Mais 1507 überein.

c) Das cry1F-Gen

Die Expression des übertragenen Gens für Cry1F findet konstitutiv unter der Kontrolle des ubiZM1(2)-Promoters und des ORF25PolyA-Terminators statt.

Das Gen *cry1F* kodiert für ein *Bt*-Toxin. Es liegen keine Hinweise für eine enzymatische Aktivität des in den 1507-Maispflanzen exprimierten *Bt*-Toxins vor. Es ist folglich davon auszugehen, dass es neben der Bildung des *Bt*-Toxins in den 1507-Maispflanzen zu keiner weiteren Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels kommen wird. Diese Annahme stützt sich insbesondere auf die Ergebnisse der Inhaltsstoffanalytik in Anträgen auf Inverkehrbringen. Aber auch die Bewertung der agronomischen Parameter sowie die phänotypische Charakterisierung der 1507-Maispflanzen lassen keine Einflüsse auf die pflanzliche Entwicklung und den Metabolismus durch die Expression des *Bt*-Toxins erkennen.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren sind durch die Wirkungsweise des mittels Transformation eingebrachten Cry1F 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.

d) Die cry34Ab1 und cry35Ab1-Gene

Die Expression der in den 59122-Maispflanzen enthaltenen Gene für Cry34Ab1 und Cry35Ab1 finden konstitutiv unter der Kontrolle des ubiZM1(2)- bzw des TA-PeroxidasePRO Promoters und des PIN II-Terminators statt.

Die Gene *cry34Ab1* und *cry35Ab1* kodieren für Proteine von 14 bzw. 44 kDa, welche gemeinsam eine Toxizität gegenüber sensitiven Insekten bewirken. Fütterungsversuche weisen darauf hin, dass insbesondere Larven von Käfern der Familie der Chrysomeliden (z.B. *Diabrotica* sp.) durch eine Kombination der Proteine Cry34Ab1 und Cry35Ab1 abgetötet werden.

Es liegen keine Hinweise für eine enzymatische Aktivität der in den 59122-Maispflanzen exprimierten *Bt*-Toxine vor. Es ist folglich davon auszugehen, dass es neben der Bildung des *Bt*-Toxins in den 59122-Maispflanzen zu keiner weiteren Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels kommen wird.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren sind durch die Wirkungsweise der mittels Transformation eingebrachten Cry34Ab1 und Cry35Ab1 Proteine 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.

Die Proteine CP4 EPSPS, PAT, Cry1F, Cry34Ab1 und Cry35Ab1 werden zusammen in der Hybride 59122x1507xNK603 exprimiert, CP4 EPSPS in Chloroplasten, PAT, Cry1F, Cry34Ab1 und Cry35Ab1 im Cytoplasma. Von einer gegenseitigen Beeinflussung der Proteine *in planta* ist nicht auszugehen, da eine Stoffwechselaktivität der *Bt*-Proteine nicht gegeben ist und die enzymatischen Aktivitäten von PAT und CP4 EPSPS klar begrenzt sind.

Da die Proteine ferner im Magensaft von Säugern zersetzt werden, sind keine Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt durch die gemeinsame Expression von CP4 EPSPS, PAT, Cry1F, Cry34Ab1 und Cry35Ab1 in der Hybride zu erwarten.

e) Weitere innerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Das zur Transformation von Mais 59122 verwendete Plasmid pPHP17662 enthält innerhalb der T-DNA-Border nur das Zielkonstrukt.

f) 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. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Border-Regionen wurde jedoch berichtet. Das zur Transformation von Mais 59122 verwendete Plasmid pPHP17662 enthält außerhalb der Border-Regionen unter anderem Gene für Resistenzen gegen die Antibiotika Tetracyclin und Spectinomycin.

Den Antragsunterlagen beiliegende Ergebnisse von Southern Blot-Untersuchungen zeigen, dass Bereiche außerhalb der T-DNA des Transformationsplasmids nicht in die gentechnisch veränderte Maislinie 59122 übertragen worden sind.

g) 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 Maises 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 oder das *pat*-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 den Herbizidwirkstoffen Glyphosat und Glufosinat-Amonium. 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.9. 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 zur Entsorgung vorgesehen, die gentechnisch veränderten Maispflanzen sowie die nicht gentechnisch veränderten Maispflanzen zu häckseln und in den Boden zur Verrottung einzuarbeiten. Auch wenn ein Teil der Maiskörner durch das Häckseln nicht zerstört werden sollte, so ist davon auszugehen, dass sich aus diesen unter Freilandbedingungen keine überdauerungsfähigen Pflanzen entwickeln können.

Die nicht gentechnisch veränderten Maispflanzen der Mantelsaat werden wie die gentechnisch veränderten Versuchspflanzen entsorgt.

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. 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 Antragstellerin sieht vor, um die Freisetzungsfäche einen Isolationsabstand von 200 m zu kommerziellen Maisbeständen einzuhalten sowie eine Mantelsaat aus 4 Reihen nicht gentechnisch verändertem Mais 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, *pat*-Gens, *cry1F*-Gens, *cry35Ab1*-Gens und *cry34Ab1*-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 Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologen Erbmateriale, also jedweder pflanzlichen DNA, möglich wäre.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Kopien des CP4 *epsps*-Gens, des *pat*-Gens, des *cry1F*-Gens und der *cry34Ab1*- und *cry35Ab1*-Gene, wobei die kodierende Region des *epsps*-Gens an pflanzliche Transitpeptid-Sequenzen N-terminal 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 Inaktivierung von Phosphinothricin durch Acetylierung ist ein bei Bodenmikroorganismen natürlicherweise vorkommender Prozess. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet. Diese Resistenz kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten. Selbst im Falle eines Transfers des *pat*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz dieser Resistenz in der Umwelt nicht erkennbar erhöht.

Die *cry1F*, *cry34Ab1* und *cry35Ab1* 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.

(b) Weitere innerhalb der übertragenen DNA gelegene Abschnitte

Die zur Transformation von Mais 1507, Mais NK603 und Mais 59122 übertragenen DNA-Fragmente enthalten neben den unter (a) genannten Expressionskassetten nur mehrere kürzere Nukleotidabschnitte mit den Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die für molekularbiologische Arbeiten von Bedeutung sind. Weitere Funktionen sind für diese kurzen Abschnitte nicht bekannt.

(c) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen (im Fall 59122)

Auf Grund von Untersuchungsergebnissen, die in den Antragsunterlagen dargestellt sind, ist davon auszugehen, dass die außerhalb der T-DNA-Border-Regionen liegenden Nukleinsäureabschnitte des Plasmids PHP17662 nicht in das Genom der gentechnisch veränderten Maispflanzen übertragen worden sind.