



Antrag 6786-01-0075

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten

Zuckerrüben (*Beta vulgaris* L.) (Transformanten T 210-3 und T 219-5)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde,

Berlin, den 05. März 1998

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 Zuckerrübenpflanzen

(a) Das Hüllproteingen des BNYVV

Die gentechnisch veränderten Zuckerrüben enthalten die cDNA des Hüllproteingens mit dem Anfang des readthrough-Anteils des BNYVV. Die cDNA soll den gentechnisch veränderten Pflanzen eine Resistenz gegen das BNYVV verleihen.

Das Genom der meisten europäischen Isolate des BNYVV besteht aus vier einzelsträngigen Plus-Strang RNA-Molekülen. Die für eine Infektiösität notwendigen Funktionen sind auf den vier RNAs verteilt. So befindet sich auf der RNA1 das Gen für die Replikase; die RNA2 trägt Informationen für das Hüllprotein, eine für die Enkapsidierung wichtige Domäne, die Vektor-Übertragbarkeit sowie die Ausbreitung von Zelle zu Zelle; die RNA3 ist an der Ausprägung von Blatt-Symptomen und der Proliferation in Wurzeln beteiligt; die RNA4 spielt eine wichtige Rolle bei der Vektor-Übertragbarkeit unter natürlichen Bedingungen. Eine Pathogenität des Hüllproteins bzw. des verkürzten readthrough-Proteins allein kann somit ausgeschlossen werden.

Das unter der Kontrolle des CaMV-Promotors exprimierte Hüllprotein-Gen bewirkt eine Konzentration an Hüllprotein in dem gentechnisch veränderten Pflanzengewebe, die weit unter der Konzentration in BNYVV-infizierten Pflanzen liegt. Ein Unterschied zwischen der Situation bei natürlicher Infektion und bei den gentechnisch veränderten Pflanzen besteht allerdings in der Verteilung des Hüllproteins in der Pflanze. Dieses wird in den gentechnisch veränderten Pflanzen in jeder Zelle gebildet, während es bei natürlicher nicht-systemischer Infektion von Zuckerrüben in den Seiten- und Pfahlwurzeln sowie im oberen Rübenkörper auftritt. Es kommen jedoch auch unter natürlichen Bedingungen systemisch erkrankte Pflanzen vor, bei denen das Virus und damit das Virushüllprotein dann auch in den grünen Pflanzenteilen zu finden ist. Somit entsteht durch die gentechnische Veränderung qualitativ keine grundlegend neue Situation im Vergleich zur natürlichen Infektion.

(b) Das *nptII*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase und 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. Die in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsamen Gentamicine und sonstigen 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 *Beta*-Rüben 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) Das *uidA*-Gen (*gus*-Gen)

Das *gus*-Gen aus *E. coli*, das in der Transformante T 219-5 enthalten ist, steht unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV und der NOS-Terminatorsequenz aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Das *gus*-Gen wurde als Reporter-gen zum histochemischen Nachweis einer erfolgreichen Transformation in das Zuckerrübengenom eingeführt. Um eine Genexpression in Bakterien zu verhindern, wurde das Gen mit einem Intron aus dem Gen *ST-LS1* aus der Kartoffel versehen. Das Enzym β -Glucuronidase spaltet Glucuronide und wird in Geweben von Vertebraten und Invertebraten und in Bakterien gefunden. Auch Pflanzen besitzen eine geringe endogene β -Glucuronidase-Aktivität, die jedoch durch geeignete Verfahren unterdrückt werden kann. Nach der Zugabe eines entsprechenden Substrates kann die Enzymaktivität im transgenen Gewebe nachgewiesen werden. Es ist nicht zu erwarten, daß Pflanzen durch die Expression des *gus*-Gens einen Selektionsvorteil erhalten.

Sollten Teile der Pflanzen von Tieren verzehrt werden, so wären keine schädlichen Auswirkungen zu erwarten, da davon auszugehen wäre, daß das GUS-Enzym im Verdauungstrakt abgebaut würde.

(d) Die kodierende Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase, *lacI*-Sequenzen

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden Vektoren (pBIN19, pBI121) verwendet, bei denen sich die „multiple cloning site“ innerhalb der kodierenden Sequenz des α -Fragments der β -Galaktosidase aus *E. coli* befindet.

Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das physiologisch wichtigste Substrat ist Lactose, die zu Galaktose und Glucose hydrolysiert wird. Als α -Teil werden die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren der β -Galaktosidase bezeichnet. Das α -Teil alleine ist enzymatisch nicht aktiv, eine Komplementation in geeigneten Wirten ist jedoch möglich.

Durch die Insertion des cp-Gens bzw. des cp-Gens und des *gus*-Gens in die „multiple cloning site“ wurde die für das α -Teil der β -Galaktosidase kodierende Sequenz unterbrochen, so daß sie in dieser Form u. a. in *E. coli*-Bakterien nicht mehr für ein komplementationsfähiges α -Teil kodieren kann. Die unterbrochene Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase steht unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Ein funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese Sequenz nicht kodiert. Veränderungen in den gentechnisch veränderten Zuckerrüben-Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins dieser Sequenz sind nicht zu erwarten.

In den gentechnisch veränderten Pflanzen befinden sich wahrscheinlich außerdem auch 5'- und 3'-Sequenzen des Repressor-Gens *lacI*. Diese 5'- und 3'-Sequenzen sind jedoch durch die *lacZ*- und M13 *ori*-Sequenzen voneinander getrennt. Eine Funktionsfähigkeit der *lacI*-Sequenzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen ist nicht zu erwarten.

(e) M13-Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten der Vektoren pBIN19 und pBI121 erzeugt wurden, enthalten wahrscheinlich zwei Fragmente aus

M13mp19, nämlich ein 440 bp großes Fragment, das einen Teil eines offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfaßt, sowie ein 433 bp großes Fragment, das den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält.

Sollte es in den gentechnisch veränderten Zuckerrüben zu einer Transkription des Fragments des offenen Leserahmens des Strukturproteins kommen, würde dies nicht in einem funktionalen Protein resultieren, da das Fragment nur für 167 Aminosäuren von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Pflanzen aufgrund der Anwesenheit dieses Fragments sind daher nicht zu erwarten. Der Replikationsursprung von M13 bewirkt die Replikation des Phagen in *E. coli*, wenn *E. coli* mit M13-, f1- oder fd-Phagen infiziert ist. Eine Funktionsfähigkeit des Replikationsursprungs in Pflanzen ist nicht zu erwarten.

(f) Das Fragment des *ocd*-Gens

Die Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten der Vektoren pBIN19 und pBI121 erzeugt wurden, enthalten wahrscheinlich ein Fragment des *ocd*-Gens (Ornithin-Cyclodeaminase), welches sich zwischen dem 3'-Ende der translatierten Sequenz des *nptII*-Gens und der NOS-Terminatorsequenz befindet. Da diese Sequenz als Teil der mRNA des *nptII*-Gens transkribiert wird, jedoch hinter dem Terminationskodon des *nptII*-Gens liegt, ist nicht zu erwarten, daß die Sequenz translatiert wird.

(g) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der TL-DNA des Plasmids pTiT37 aus *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirkten, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamm vorhandenen Helferplasmids pEHA101, das nicht in die Pflanzen übertragen wurde, die Integration der zwischen den Borderregionen liegenden Gene in Chromosomen der Zuckerrübenpflanzen. Diese Borderregionen des Ti-Plasmids sind in den gentechnisch veränderten Pflanzen funktionslos und lassen keine Veränderungen in den Pflanzen erwarten.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten in das Genom integriert folgende, in Pflanzen funktionale Regulationssequenzen:

- den 35S-Promotor des Cauliflower mosaic virus (CaMV) (nicht in Nachkommen der Transformante T210-3),
- den doppelten 35S-Promotor (35SS) des CaMV,
- den Promotor des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- die 35S-Terminatorregion des CaMV,
- die Terminatorregion des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden kodierenden Sequenzen des BNYVV-Hüllproteins, der Neomycin-Phosphotransferase und der β -Glucuronidase in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Bildung dieser Proteine in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) bis (c).

(h) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel werden bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegenden Sequenzen ins Pflanzengenom integriert. Eine Übertragung von Sequenzen jenseits der Borderregionen wurde jedoch im Einzelfall berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden. In der Risikobewertung werden deshalb auch jene Bereiche der zur Transformation der Zuckerrüben verwendeten Vektoren berücksichtigt, die jenseits der T-DNA-Borderregionen lokalisiert sind. Hierbei handelt es sich insbesondere um folgende Sequenzen:

- (i) das *nptIII*-Gen (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;
- (ii) der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- (iii) die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RK2;
- (iv) der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- (v) ein nicht-funktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- (vi) das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- (vii) das Transposon IS1 innerhalb des *nptIII*-Gens;
- (viii) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Da das *nptIII*-Gen (i) unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht, ist nicht davon auszugehen, daß es in Pflanzen exprimiert würde. Eine Auswirkung des Gens auf den pflanzlichen Stoffwechsel wäre auch im Falle einer Expression des Gens nicht zu erwarten. Die Replikationsursprünge *oriV* (ii) bzw. *oriT* (iii) des Plasmids RK2 ermöglichen die Replikation des Plasmids in einem weiten Wirtsbereich gram-negativer Bakterien bzw. seinen konjugativen Transfer, sofern die Mobilisierungsfunktionen durch ein Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden. Es gibt keine Hinweise dafür, daß die Replikationsursprünge von RK2, der Replikationsursprung von pMB1 (viii) oder die übrigen DNA-Abschnitte bakteriellen Ursprungs (iv, v, vi, vii) in höheren Pflanzen eine Funktion hätten. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (v) bzw. unterbrochen (vi).

(i) 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 gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland nicht in gleichem Maß resistent gegenüber dem BNYVV sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten. Auch im Hinblick auf die übrigen übertragenen Eigenschaften kann aus einer veränderten Expressionsstärke kein Risiko für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren abgeleitet werden.

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 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 natürli-

cherweise 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 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 im Gewächshaus und im Freiland sowie aus Freisetzungen anderer gentechnisch veränderter Pflanzen, die die entsprechenden Gene unter der Kontrolle nicht-gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

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

Am Standort „Oberviehhausen“ sollen nur vegetative Pflanzen angebaut werden. Am Standort „Wetze“ werden zusätzlich zu den ausgebrachten Samen im Laufe des Versuchs Samen an den vernalisierten Pflanzen in den Selbstungs-, Kreuzungs- und Vermehrungspartellen (s. u.) entstehen.

Die vegetativ angebauten Zuckerrübenpflanzen sollen gegen Ende der Vegetationsperiode maschinell geerntet werden. Ein Anteil der geernteten Rüben soll zu Analysezwecken (Ermittlung von Qualitätsparametern) in Laboratorien gebracht werden. Sollte unter dem zur Laboranalyse bestimmten Pflanzenmaterial noch vermehrungsfähiges Material vorhanden sein, ist es unter Sicherheitsaspekten als ausreichend anzusehen, wenn die Vermehrungsfähigkeit im Zuge der Analyse beseitigt wird. Hierzu ist z. B. das Nachköpfen der Rübenkörper im Rübenlabor eine geeignete Maßnahme. Im übrigen bringt der Analyseprozeß die Inaktivierung notwendigerweise mit sich.

Nicht benötigtes Erntematerial (Rübenkörper) und sonstiges nicht verwertetes vegetatives Pflanzenmaterial der gentechnisch veränderten Rüben soll gehäckselt und auf der Versuchsfeldfläche eingearbeitet werden. Bei dieser Vorgehensweise ist nicht zu erwarten, daß sich aus diesem Material gentechnisch veränderte Pflanzen regenerieren.

Die gentechnisch veränderten Rüben sollen mit Drillmaschinen oder mit der Hand ausgesät werden. Vernalisierte Rüben sollen ausgepflanzt werden. Zu einer Samenbildung an den vegetativ angebauten Pflanzen wird es nicht kommen, da die Pflanzen nicht zur Blüte gelangen werden. Zuckerrübensamen sind unter Umständen, insbesondere bei Einarbeiten in tiefere Bodenschichten, über viele Jahre keimfähig. Nach allgemeiner landwirtschaftlicher Anbauverfahren kann jedoch davon ausgegangen werden, daß ausgebrachtes Saatgut, das nicht keimt, tot und daher auch in einem nachfolgenden Jahr nicht mehr keimfähig ist.

Am Standort „Wetze“ werden zusätzlich zu den ausgebrachten Samen im Laufe des Versuchs Samen an den vernalisierten Pflanzen in den Selbstungs-, Kreuzungs- und Vermehrungspartellen entstehen. Das gentechnisch veränderte Versuchssaatgut wird maschinell oder von Hand geerntet und anschließend in eine gentechnische Anlage gebracht. Die Reste der generativen Pflanzenteile sollen nach der Ernte autoklaviert oder gedämpft werden.

Durch diese Art der Entsorgung wird sichergestellt, daß der Anbau der vegetativen Rüben nicht zu einer Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland führen wird. Bei den an den generativen Pflanzen gebildeten Samen ist jedoch davon auszugehen, daß solche Samen in den Boden gelangen werden. Die in der Nebenbestimmung II.8. enthaltene Auflage soll gewährleisten, daß in den Boden gelangte Samen nicht durch anschließende Bodenbearbeitungen in eine Tiefe gelangen, in der sie längere Zeit überdauern könnten. Dennoch im Boden überdauernde Samen würden zu einem Auflaufen gentechnisch veränderter Pflanzen in den Folgejahren führen. Diese Pflanzen würden durch die von der Antragstellerin vorgesehene Nachkontrolle erfaßt werden und vor der Blüte entfernt werden. Die Nachkontrolle auf den Parzellen für die Saatgutproduktion verlängert sich bei Auflaufen von gentechnisch veränderten Zuckerrübenpflanzen im letzten Jahr des Kontrollzeitraums um jeweils ein weiteres Jahr.

Aus den genannten Gründen sind die laut Antrag vorgesehenen Maßnahmen in Verbindung mit den Nebenbestimmungen dieses Bescheids ausreichend, um eine Etablierung der freigesetzten gentechnisch veränderten Pflanzen selbst zu verhindern und eventuell auftretende gentechnisch veränderte Durchwuchspflanzen zu erfassen und zu beseitigen. Selbst im Falle der Verbreitung einzelner gentechnisch veränderter Samen als Folge des Versuchs wäre keine unkontrollierbare Ausbreitung gentechnisch veränderter Pflanzen zu befürchten, da diese durch mechanische Maßnahmen (Hacken) bzw. durch Herbizide zerstört werden könnten.

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

Zuckerrüben sind mit allen Arten der Sektion Beta kreuzbar. Als mögliche Kreuzungspartner kommen in Deutschland die kultivierten *Beta*-Arten (u. a. Mangold, Runkelrübe, Rote Bete) sowie Wildrüben (*Beta vulgaris* ssp. *maritima*) vor. Wildrüben wachsen in Deutschland nur auf Helgoland und gelegentlich in Küstenregionen von Schleswig-Holstein. Weiterhin treten in Rübenanbaugebieten einjährige „Unkrautrüben“ auf, die nach neuen molekulargenetischen Untersuchungen auf Kreuzungen zwischen Zuckerrüben und Wildrüben zurückgehen, die in den Saatgutproduktionsgebieten (z. B. Südfrankreich, Italien) als Folge von Polleneinstäubungen stattfinden können.

Zuckerrüben gehören zu den Fremdbefruchtern, Selbstbefruchtung kommt jedoch auch vor. Die Bestäubung wird hauptsächlich durch den Wind vollzogen, eine Bestäubung durch Insekten hat nur eine geringe Bedeutung. Eine Pollenverbreitung durch den Wind kann über mehrere Kilometer erfolgen. Bei Versuchen zur Ausbreitung von Zuckerrübenpollen in Dänemark und Belgien zeigte sich jedoch, daß die Frequenz einer Pollenübertragung bereits innerhalb der ersten 100 m um die Pollenquelle deutlich abnahm (beispielsweise in einem Versuch von 32% auf 3%), und daß die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Befruchtung bei ausreichend vorhandenem, eigenem befruchtungsfähigen Pollen der jeweiligen Empfängerpflanzen erheblich reduziert war.

Am Standort Oberviehhausen sollen die gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zur Blüte gelangen, so daß sich die Frage einer Pollenübertragung auf andere Pflanzen an diesem Standort nicht stellt. Am Standort Wetze sollen die in den Selbstungs-, Kreuzungs- und Vermehrungsparzellen angebauten Pflanzen blühen und Samen ansetzen. Insgesamt sollen an diesem Standort pro Jahr maximal 10.000 gentechnisch veränderte Rübenpflanzen zur Blüte gelangen.

Es sollen Selbstungen, Kreuzungen und Vermehrungen durchgeführt werden. Gleichzeitig sollen nicht-transgene Vergleichspflanzen geselbstet und gekreuzt werden. Werden an demselben Standort Selbstungen und Kreuzungen durchgeführt, so wird der Selbstungsblock vom Kreuzungsblock durch eine Hanfummantelung isoliert.

Vermehrungen, z. B. zur Produktion von Saatgut für Sortenanmeldungen, sollen immer an separaten Standorten erfolgen. Diese werden so isoliert, daß gewährleistet wird, daß im Umkreis von 1000 m keine Produktion von Basissaatgut oder zertifiziertem Saatgut von Futterrüben oder Zuckerrüben stattfindet.

Vorstufenvermehrungen von Linien finden in 2 x 8 m großen Foliengewächshäusern statt. Pro Gewächshaus werden max. 45 Pflanzen angebaut. Vermehrungen zur Produktion von Basissaatgut können alternativ in großen Foliengewächshäusern von ca. 300 m² Grundfläche durchgeführt werden. Pro Haus werden max. 800 Pflanzen angebaut.

Nach der Verordnung über den Verkehr mit Saatgut landwirtschaftlicher Arten und von Gemüsearten (Saatgutverordnung) ist zur Erzeugung von Basissaatgut für Rüben eine Mindestentfernung von 1000 m zu Bestäubungsquellen der Gattung *Beta* einzuhalten. Dieser Isolationsabstand von 1000 m zu Saatgutproduktionsfeldern ist in der Antragstellung für den Standort Wetze vorgesehen. Die Nebenbestimmung II.6. legt fest, daß Flächen, auf denen gentechnisch veränderte Rüben offen zur Blüte gelangen, durch eine 5 m breite Hanfbepflanzung bzw. gegebenenfalls zusätzlich durch das Aufstellen von Bastmatten oder Trennwänden abzuschirmen sind. Darüberhinaus wird in der Nebenbestimmung II.6. festgelegt, daß während der Blüte gentechnisch veränderter Zuckerrüben Schosser aller mit der Zuckerrübe kreuzbaren *Beta vulgaris*-Formen in einem Umkreis von 1000 m um die Freisetzungsfelder zu entfernen sind. Diese Maßnahmen dienen dem Zweck, eine Übertragung von Pollen der gentechnisch veränderten Pflanzen auf andere Pflanzen zu verringern. Sie gehen über die in der Saatgutverordnung verlangten Anforderungen hinaus.

Durch die vorgesehenen bzw. zusätzlich zur Auflage gemachten Isolations- und Abschirmmaßnahmen wird eine eine Pollenverbreitung und damit eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Pflanzen außerhalb der Versuche wirksam minimiert. Ausgeschlossen werden kann solch eine Übertragung jedoch nicht.

Sollte ein Pollentransfer von den gentechnisch veränderten Zuckerrüben auf Wildrüben stattfinden, würden die entsprechenden Kreuzungsnachkommen voraussichtlich eine Resistenz gegen das BNYVV und gegen bestimmte Aminoglycosid-Antibiotika aufweisen. Es ist nicht davon auszugehen, daß Zuckerrüben oder Unkrautrüben aufgrund einer Resistenz gegenüber dem BNYVV oder gegenüber den in Frage kommenden Antibiotika veränderte pflanzensoziologische Eigenschaften entwickeln und andere Biotope besiedeln könnten. Da Resistenzen gegen BNYVV bei Wildrüben natürlicherweise auftreten können, würde diese Eigenschaft den Wildrüben keinen grundsätzlich neuen Selektionsvorteil verschaffen. Eine Resistenz gegen Aminoglycosid-Antibiotika stellt unter Freilandbedingungen keinen Selektionsvorteil dar.

Bezüglich einer möglichen Einkreuzung in andere kultivierte Formen von *Beta vulgaris* ist zu berücksichtigen, daß dies nicht zu einer zahlenmäßig bedeutsamen Verbreitung der Fremdgene führen würde, da solche Pflanzen im allgemeinen nur vegetativ angebaut werden. Die Erzeugung von Zuckerrübensaatgut für kommerzielle Zwecke findet in maritimen Klimagebieten (Südfrankreich, Poebene, Südengland) statt. Ein Anbau anderer Formen von *Beta vulgaris* (Mangold, Rote Beete) zum Zweck einer privaten Saatgutvermehrung ist unüblich, jedoch nicht auszuschließen. Selbst im Falle einer Einkreuzung der Fremdgene z. B. in

Mangold oder Rote Beete und einem Verzehr solcher Pflanzen wäre aus den unter III.1.2.1. dargelegten Gründen nicht mit einer gesundheitlichen Gefährdung zu rechnen.

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

Die eingeführten Sequenzen sind integriert in Chromosomen der Empfängerorganismen. 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.

Soweit anzunehmen ist, daß ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Samenpflanzen 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 Erbmaterial, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

Eine Übertragung des BNYVV-Hüllprotein-Gens in Mikroorganismen würde diesen keinen ersichtlichen Selektionsvorteil vermitteln. Ohne Selektionsdruck ist eine Ausbreitung dieses Gens unter Mikroorganismen nicht wahrscheinlich. Sollte es dennoch in den Mikroorganismen erhalten bleiben, ist wegen des mangelnden Selektionsvorteils nicht mit ökologischen Folgen zu rechnen.

Das in die Zuckerrübenpflanzen übertragene β -Glucuronidase-Gen (*gus*-Gen) aus *E. coli* wurde mit einem Intron aus dem *ST-LS1*-Gen der Kartoffel versehen, um eine Expression in Bakterien zu verhindern. β -Glucuronidase-Gene kodieren für β -D-Glucuronosid-Gluconohydrolasen, die Glucuronide hydrolytisch spalten. Sie sind in der Natur weit verbreitet und werden z.B. in Vertebraten, Invertebraten, Bakterien und auch in Pflanzen gefunden. Es wäre somit nicht zu erwarten, daß ein Gentransfer des *gus*-Gens von den gentechnisch veränderten Zuckerrübenpflanzen auf Mikroorganismen das Vorkommen dieses Gens spürbar erhöhen würde. Außerdem könnte das Gen in Bakterien erst nach einem Rekombinationsereignis, das das Intron entfernt, exprimiert werden.

Die durch die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(b) bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringer Bedeutung, werden in der Tiermedizin jedoch vielfältig angewendet. Es war somit zu prüfen, ob durch einen möglichen horizontalen Gentransfer des *aptII*-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 Zuckerrüben auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Das Gen für das α -Fragment der β -Galaktosidase ist 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 gleiche gilt für die 3'- und 5'-Sequenzen des *lacI*-Gens.

Eine ähnliche Situation liegt bei dem Fragment des Gens für ein Strukturprotein des Phagen M13 und bei dem Fragment des *ocd*-Gens vor. Mit einer Funktionsfähigkeit dieser Fragmente in Bakterien ist nicht zu rechnen. Bei dem Fragment des *ocd*-Gens kommt noch hinzu, daß dieses Fragment wie unter III.1.2.1.(f) erläutert, wahrscheinlich nicht translatiert würde.

Die gentechnisch veränderten Zuckerrüben enthalten wahrscheinlich den Replikationsursprung von M13. M13 zählt zu den F-spezifischen *E. coli*-Phagen. Für diesen Replikationsursprung ist somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen.

Die zur Regulation der übertragenen Gene in die Zuckerrüben eingeführten Sequenzen stammen aus *Agrobacterium tumefaciens* und CaMV. Bezüglich eines horizontalen Gentransfers dieser Sequenzen auf Mikroorganismen ist anzumerken, daß *Agrobacterium tumefaciens* in Böden weit verbreitet ist und 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 diesen Pflanzen würde keine neue im Vergleich zur natürlicherweise vorliegenden Situation darstellen, weil CaMV als doppelsträngiges pflanzeninfizierendes DNA-Virus ohnehin in Pflanzen anzutreffen ist.

In der Regel werden bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegenden Sequenzen ins Pflanzengenom integriert. Eine Übertragung von Sequenzen jenseits der Borders kann jedoch aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden. Im vorliegenden Fall könnten durch Übertragung von außerhalb der Borderregionen gelegenen Sequenzen folgende DNA-Abschnitte in die gentechnisch veränderten Pflanzen integriert worden sein:

- (i) das *nptIII*-Gen aus *Streptococcus faecalis* (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;
- (ii) der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- (iii) die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RK2;
- (iv) der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- (v) ein nicht-funktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- (vi) das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- (vii) das Transposon IS1 innerhalb des *nptIII*-Gens;
- (viii) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Das *nptIII*-Gen (i), das mit seinem eigenen Promotor in den gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten sein könnte, verleiht nach Literaturangaben nicht nur eine Resistenz gegen Kanamycin und Neomycin, sondern auch gegenüber dem Antibiotikum Amikacin. Amikacin ist in Deutschland nicht als Tierarzneimittel zugelassen, wird jedoch in der Humantherapie verwendet. Für den Einsatz in der Humantherapie stellt es ein wichtiges Reserveantibiotikum dar. Resistenzen gegenüber Amikacin sind bisher nicht weit verbreitet. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen-DNA auf Mikroorganismen und der Abwesenheit eines Selektionsdrucks auf den Freisetzungsf lächen ist jedoch

nicht davon auszugehen, daß die Präsenz dieses Gens in den gentechnisch veränderten Zuckerrüben zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen wird.

RK2 gehört zu einer Gruppe von broad host range-Plasmiden (u. a. RP1, RP4, R18, R68), die in einer Vielzahl gram-negativer Bakterien replizierbar sind. Für die aus RK2 stammenden DNA-Abschnitte (ii bis vi) ist somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (v) bzw. unterbrochen (vi).

Das Insertionselement IS1 (vii) tritt natürlicherweise bei verschiedenen Arten der Enterobacteriaceae auf. Es wurde beispielsweise bei Arten der Gattungen *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia* und *Salmonella* gefunden. Pro Bakteriengenom können bei IS1 mehr als 40 Kopien vorliegen. Kopien von IS1 können sowohl chromosomal als auch plasmidal lokalisiert sein und wurden auch in Prophagen nachgewiesen. Es ist anzunehmen, daß eine Ausbreitung dieses Insertionselements über horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien leicht möglich ist. Im Vergleich hierzu ist eine theoretisch denkbare Ausbreitung über einen horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen vernachlässigbar gering.

Das pMB1-Replikon (viii) 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 Bakterienarten, 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 pMB1 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

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

Zur Erzeugung der Originaltransformanten, von denen die freizusetzenden gentechnisch veränderten Zuckerrübenpflanzen abstammen, wurden sterile Keimblätter mit Agrobakterien inokuliert, die die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen der entsprechenden binären Vektorplasmide enthielten. Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. er ist nicht mehr zur Tumorentstehung befähigt. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Die freizusetzenden Pflanzen sind außerdem über Samen vermehrt worden. Durch diese generative Vermehrung sind ggf. nach der Antibiotikabehandlung noch verbliebene Agrobakterien aus den gentechnisch veränderten Zuckerrübenlinien entfernt worden.