



Bescheid 6786-01-0141 / 42010.0141

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Sojabohnen
(*Glycine max* L. Merrill) GTS 40-3-2
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde
Berlin, den 01. Dezember 2003**

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

Die für die beantragte Freisetzung vorgesehenen Pflanzen sind Nachkommen der transgenen Linie GTS 40-3-2, die seit 1994 in den USA dereguliert ist. Weltweit wurden im Jahr 2002 auf ca. 36,5 Mio ha gentechnisch veränderte Sojabohnen angebaut, über 50 % der Weltjahreserzeugung stammen von transgenen Sojabohnen. Mit wenigen Ausnahmen kamen fast nur Glyphosat-tolerante Sojabohnen zum Anbau.

Für diese gentechnisch veränderte Sojabohne liegt seit 1996 eine Genehmigung für das Inverkehrbringen in der EU nach der Richtlinie 90/220/EWG vor. Diese Genehmigung umfasst

auch die Verwendung zu Futtermittelzwecken und für Nahrungsmittel. Ernteprodukte dieser Sojabohnen werden in die EU importiert und zu Futtermitteln und Nahrungsmitteln verarbeitet. Aus den bisherigen Erfahrungen im Anbau und aus der Verwendung der Ernteprodukte sind keine schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit und auf die Umwelt bekannt geworden.

(a) Das *epsps*-Gen aus dem *Agrobacterium* Stamm CP4

Das *epsps*-Gen kodiert für eine 5-Enolpyruvylshikimi-3-Phosphat-Synthase (EPSPS). Dieses Enzym katalysiert in Pflanzen und Mikroorganismen die Reaktion vom Shikimat-3-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat zum 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat, einer Zwischenstufe für die Biosynthese einiger aromatischer Verbindungen, z.B. der Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Die natürlicherweise in den Sojabohnenpflanzen vorkommende EPSPS wird durch den herbiziden Wirkstoff Glyphosat (Handelsprodukt z. B. Round up®) gehemmt. Nach Anwendung entsprechender Herbizide sterben die Pflanzen ab. Hingegen wird das entsprechende Enzym aus dem *Agrobacterium* Stamm CP4 nicht gehemmt, so dass die Biosynthese aromatischer Metabolite auch bei Behandlung der Pflanzen mit Glyphosat-haltigen Herbiziden in ausreichendem Maße aufrecht erhalten bleibt. Das *epsps*-Gen aus *Agrobacterium* Stamm CP4 wurde bei der Konstruktion des Plasmids pV-GMGT04 mit der DNA-Sequenz für das Chloroplasten-Transitpeptid (CTP) der EPSPS aus *Petunia hybrida* fusioniert. Hierdurch wird in den Pflanzenzellen der Transport der EPSPS in die Chloroplasten gewährleistet. Das Transitpeptid wird in der Regel beim Import abgespalten. Als Regulationssequenzen dienen der 35S-Promotor mit verdoppelter Enhancerregion des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) sowie das Terminationssignal des Nopalin Synthase-Gens (*nos*-Gen) aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die in den gentechnisch veränderten Sojabohnen neu gebildete CP4 EPSPS katalysiert die gleiche Reaktion wie entsprechende Enzyme, die natürlicherweise in Sojabohnen und anderen Kulturpflanzen vorkommen. Da dem Transitpeptid der EPSPS aus *Petunia hybrida* wie auch anderen derzeit bekannten Signalpeptiden, ob prozessiert oder unprozessiert, kein gesundheitsschädigendes Potential zuerkannt wird, ist davon auszugehen, dass dies auch für das Fusionsprotein aus Transitpeptid und Enzym, hier CTP und CP4 EPSPS, zutrifft.

Bei Behandlung der gentechnisch veränderter Pflanzen mit Glyphosat-haltigen Herbiziden kann es in den gentechnisch veränderten Sojapflanzen zur Bildung des Abbauproduktes Aminomethylphosphonsäure (AMPA) kommen, welches in der Folge entweder nichtselektiv an natürliche Pflanzenbestandteile gebunden oder weiter zu pflanzeigenen Stoffwechselprodukten abgebaut und dadurch dem pflanzlichen Stoffwechsel zugeführt wird.

In Unterlagen zu weiteren Freisetzungsvorhaben mit gentechnisch veränderten Pflanzen, denen das *epsps*-Gen aus *Agrobacterium* Stamm CP4 übertragen worden ist, wird auf toxikologische Studien hingewiesen, aus denen hervorgeht, dass AMPA keine toxikologisch nachteilige Wirkung auf untersuchte aquatische und terrestrische Tierarten aufweist, dass es nicht onkogen, teratogen oder mutagen ist und nur eine geringe akute Toxizität aufweist (orale LD₅₀ an Ratte von 8.300 mg/kg). Glyphosat und AMPA werden von Tieren und dem Menschen nichtmetabolisiert ausgeschieden.

Die Pflanzen und die Ernteprodukte sind nicht für den Verzehr bestimmt. Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind nach Ansicht der ZKBS durch die Wirkungsweise der mittels Transformation eingebrachten EPSPS im Rahmen der beantragten Freisetzung nicht zu erwarten.

(b) Weitere Abschnitte des Transformationsplasmids pV-GMGT04

Das für die Transformation verwendete Plasmid pV-GMGT04 leitet sich von pUC119 ab, das neben dem Replikationsursprung (*ori*) und den *lac*-Sequenzen ein Kanamycin-Resistenzgen (*npII*) enthält. Darüber hinaus enthält der Vektor pV-GMGT04 das β -Glucuronidasegen (*gus*-Gen) aus *E. coli* und zwei getrennt voneinander vorliegende Kopien der kodierenden Region des Gens für die 5-Enylpyrovyshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS) aus dem *Agrobacterium*-Stamm CP4, von dem eine Kopie N-terminal mit dem Chloroplasten-Transitpeptid (CTP) aus *Petunia hybrida* fusioniert ist.

Bedingt durch die Transformationsmethode wurde nur ein Teil des Plasmids in das Pflanzen-genom integriert. Von den genannten Elementen des Plasmids pV-GMGT04 liegt nur das *epsps*-Gen einschließlich der Kontrollelemente für die Expression und des CTP aus *P. hybrida* in das Genom der Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 integriert vor. Der Nachweis hierüber wurde durch Kreuzungsexperimente sowie durch Restriktionskartierung, DNA-Hybridisierungen, PCR-Analysen und DNA-Sequenzierungen erbracht. Die Beschreibung der in den Antragsunterlagen zusammengefassten Ergebnisse dieser Untersuchungen ist plausibel.

Das Insert, das in die transgene Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 übertragen worden ist, wurde nach der Genehmigung des Inverkehrbringens genauer untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen können wie folgt zusammengefasst werden:

- Vom 35S-Promotor des CaMV wurde ein 354 Basenpaare (bp) umfassender Teil des verdoppelten Enhancers nicht in das Sojabohnengenom übertragen. Der Promotor ist jedoch ausreichend aktiv, um den gentechnisch veränderten Sojabohnenpflanzen eine agronomisch nutzbare Toleranz gegenüber dem Herbizid Roundup zu verleihen.
- Zusätzlich zu dem vollständigen *epsps*-Gen aus dem *Agrobacterium* Stamm CP4, das Bestandteil des im Genehmigungsantrag beschriebenen Inserts ist, enthalten die Sojabohnen der Linie 40-3-2 und ihre Nachkommen zwei weitere Fragmente des *epsps*-Gens, nämlich
 - ein 72 bp großes Fragment, das getrennt von dem ursprünglich beschriebenen Insert in das Sojabohnengenom integriert wurde, jedoch bei der Vererbung zusammen mit diesem segregiert,
 - ein 250 bp großes Fragment, das sich an das 3'-Ende des Terminatorsignals des *nos*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* und eine 16 bp-Sequenz des Transformationsvektors anschließt.

In Northern Blot-Untersuchungen konnten keine mRNA-Transkripte der beiden Fragmente nachgewiesen werden. Es ist daher davon auszugehen, dass die beiden Fragmente in den gentechnisch veränderten Sojabohnen nicht exprimiert werden.

An das 3'-Ende des 250 bp großen Fragments des *epsps*-Gens schließt sich ein 534 bp langer DNA-Abschnitt an, für den bisher keine Homologie zu anderen DNA-Sequenzen nachgewiesen werden konnte. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass es sich bei diesem Abschnitt um Sojabohnen-DNA handelt, die durch den Transformationsvorgang rearrangiert wurde.

Ein Abgleich der Aminosäuresequenzen, die aus drei Leserahmen der nun nachgewiesenen Nukleinsäuresequenz abgeleitet wurden, mit einschlägigen Polypeptid-Datenbanken ergaben keine Hinweise auf signifikante Aminosäuresequenzhomologien zu bekannten Allergenen oder Toxinen.

Untersuchungen an DNA bzw. RNA von gentechnisch veränderten Sojabohnen, die 1992 für die antragsrelevanten Feldversuche angebaut worden waren, ergaben, dass die oben genannten zusätzlichen Abschnitte sowohl in den gentechnisch veränderten Pflanzen, die 1992 angebaut worden waren, als auch in den Pflanzen, die den aktuellen "Roundup Ready"-Sorten zu Grunde liegen, nachweisbar waren. Die aus den neueren Informationen abzuleitende Struktur des Inserts lag demnach bereits in den Sojabohnenpflanzen vor, deren Eigenschaften im Antrag auf Genehmigung des Inverkehrbringens (C/UK/94/M3/1) beschrieben worden waren.

(c) Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten, in das Genom integriert, in Pflanzen funktionale Regulationssequenzen. Sie regeln als Promotor und Terminator die Expression der oben genannten, zwischen ihnen liegenden kodierenden Sequenz. Weitergehende Funktionen sind nicht bekannt und weitergehende Auswirkungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen 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 gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland nicht in gleichem Maß tolerant gegenüber Glyphosat sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Dies könnte bei Anwendung Glyphosat-haltiger Herbizide zu einer Schädigung der gentechnisch veränderten Pflanzen führen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der beiden CP4 EPSPS-Gene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeneigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der Vermehrung der gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus und im Rahmen des Anbaus der gentechnisch veränderten Sojapflanzen 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 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. Aus

dem Anbau dieser gentechnisch veränderten Sojabohne in anderen Ländern der Welt und aus der Verwendung der Ernteprodukte in Futter- und Nahrungsmitteln ergaben sich keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen.

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

Die Sojabohne ist eine einjährige krautige Kulturpflanze subtropischen Ursprungs. Der Anbau ist aufgrund ihres Temperatursanspruches und der mangelnden Kältetoleranz an warme Klimate gebunden. In der europäischen Union werden nur in den südlichen Ländern, insbesondere in Italien und Frankreich, in nennenswertem Umfang Sojabohnen angebaut. Als domestizierte Pflanze ist die Sojabohne auf den Anbau durch den Menschen angewiesen, in natürlichen Floren kann sie sich nicht etablieren. Sojabohnenpflanzen sind nicht winterhart, die Samen weisen keine sekundäre Keimruhe auf. Während des Anbaus oder bei der Ernte ausgefallene Samen keimen bei ausreichender Feuchtigkeit unmittelbar nach der Ernte wieder aus. Es ist deshalb zu erwarten, dass die aufgelaufenen Pflanzen im Verlauf des Winters absterben oder im Zuge der üblichen Bodenbearbeitungsmaßnahmen zerstört werden.

Die Art der gentechnischen Veränderung, die Ergebnisse von Untersuchungen der Antragstellerin sowie die mehrjährigen Erfahrungen aus dem großflächigen Anbau dieser Pflanze in anderen Ländern geben keinen Anlass zu der Annahme, dass sich die gentechnisch veränderte Sojabohne hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu überdauern oder sich zu etablieren bzw. der Möglichkeit einer Übertragung genetischen Materials auf andere Sojabohnenpflanzen von nicht gentechnisch veränderten Sojabohnen unterscheidet.

Es ist nicht zu erwarten, dass sich die gentechnisch veränderte Sojabohne oder das übertragene Gen in europäischen Floren etablieren oder ausbreiten können. Eine Überdauerung der gentechnisch veränderten Bohnen ist ebenso wenig zu erwarten.

3.2. Pollenausbreitung

Sojabohnen sind selbstbestäubend, Fremdbestäubung ist nur in geringem Umfang (< 1%) im Feldbestand möglich. Gemäß der Richtlinie 69/208/EWG des Rates über den Verkehr mit Saatgut von Öl- und Faserpflanzen ist für Sojabohnen-Vermehrungsbestände keine Mindestentfernung zu benachbarten Sojabohnenfeldern vorgeschrieben. Die wenigen mit der Sojabohne kreuzbaren Arten (*Glycine gracilis*, *G. soja*) sind in Europa nicht heimisch, so dass Hybridisierungen nicht zu erwarten sind.

3.4 Ausbreitung von Sojabohnensamen

Eine mögliche Ausbreitung von Samen der gentechnisch veränderten Pflanzen durch Vögel unter Erhalt der Keimfähigkeit ist nahezu auszuschließen. Sollte es dennoch zu einer Samenverschleppung durch menschliche Unachtsamkeit, durch Vögel oder andere Tiere kommen, so würde es sich dabei um Einzelereignisse handeln. Aufgrund der vorstehenden Ausführungen zur Pollenausbreitung, Überdauerung und Verwilderung ist nicht zu erwarten, dass es dadurch zu einer dauerhaften Etablierung von gentechnisch veränderten Sojabohnen kommen könnte. Solche Einzelereignisse stellen keine Gefahr im Sinne des § 1 GenTG dar.

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 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 pflanzlicher DNA, möglich wäre.

(a) Das *epsps*-Gen

Das *epsps*-Gen gehört zur Grundausstattung der Pflanzen und Mikroorganismen. Das im vorliegenden Vorhaben verwendete *epsps*-Gen stammt aus einem *Agrobacterium*. *Agrobacterien* sind ubiquitär verbreitet. Nukleinsäureabschnitte, die für Chloroplasten-Transitpeptide kodieren, sind insbesondere auch für das *epsps*-Gen für einer Reihe von verschiedenen Pflanzenarten beschrieben worden. Selbst im Falle eines Transfers des *epsps*-Gens oder des *ctp*-Genabschnitts von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde sich die Gesamtfrequenz des Vorkommens dieses Gens in der Umwelt wahrscheinlich nicht erkennbar erhöhen.

(c) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der sonstigen in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus CaMV und *Agrobacterium tumefaciens*. CaMV ist ein pflanzeninfizierendes doppelsträngiges DNA-Virus, das in Pflanzen ohnehin anzutreffen ist. *Agrobacterium tumefaciens* ist ein ubiquitär verbreitetes Bodenbakterium.