



Antrag 6786-01-0083

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten

Rapspflanzen (*Brassica napus* L.)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde,

Berlin, den 29. April 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 Rapspflanzen

(a) Das Acyl-[ACP] Thioesterase-Gen (C/FatB3)

Acyl-[ACP] Thioesterasen hydrolysieren bei der Fettsäurebiosynthese die Thioesterbindung zwischen dem ACP (Acyl Carrier Protein) und der synthetisierten Acylkette. Substrate des durch das Acyl-[ACP] Thioesterase-Gen C/FatB3 kodierten Enzyms aus *Cuphea lanceolata* sind Capryl- und Palmityl-[ACP]. Als Folge der Bildung dieses Enzyms enthält das in den Samen der gentechnisch veränderten Rapspflanzen gebildete Öl die normalerweise im Rapsöl nicht vorkommende Fettsäure Caprinsäure (C_{10:0}) und vermehrt Palmitinsäure (C_{16:0}).

Die Expression des in den gentechnisch veränderten Rapspflanzen enthaltenen Gens C/FatB3 wird durch seinen samenspezifischen Promotor und sein Terminationssignal gesteuert. Durch die Vorschaltung des vierfachen Enhancers des 35S-Promotors des CaMV vor den Promotor soll in einem weiteren Konstrukt die Expression verstärkt werden.

Die in den gentechnisch veränderten Rapspflanzen neu gebildete Acyl-[ACP] Thioesterase katalysiert dort die gleiche Reaktion wie entsprechende Enzyme, die natürlicherweise in den Samen anderer Pflanzenarten (Wild- und Kulturpflanzen) vorkommen. Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine toxische Wirkung des Enzyms oder des neuen Stoffwechselprodukts erwarten lassen. Die neu bzw. in erhöhter Konzentration im Rapsöl auftretenden Fettsäuren Caprinsäure und Palmitinsäure kommen natürlicherweise in anderen pflanzlichen Ölen vor, die der menschlichen Ernährung dienen (z. B. Kokosöl).

(b) Das Oleatdesaturase-Gen in Antisense-Orientierung

Durch die Expression subgenischer Bereiche eines Oleatdesaturase-Gens (E12) aus *B. napus* in Antisense-Orientierung ist die Desaturierung von Ölsäure (C_{18:1}) zu Linolsäure (C_{18:2}) in den gentechnisch veränderten Rapspflanzen gehemmt. Als Ergebnis sind der Ölsäuregehalt in den Samen dieser Rapspflanzen erhöht und der Linol- sowie der Linolensäuregehalt verringert. Gesteuert wird die Expression des Antisense-Konstruktes vom Promotor des C/FatB4-Gens aus *C. lanceolata* und dem entsprechenden Terminationssignal. Ölsäure ist Bestandteil von Ölen, die der menschlichen Ernährung dienen. Größere Polypeptide werden von dem übertragenen DNA-Abschnitt in Antisense-Orientierung nicht kodiert.

(c) Das Lysophosphatidsäure-Acyltransferase-Gen aus *Limnanthes douglasii* (LdLPAAT)

Mit einem Anteil von etwa 50 % am Ölgehalt der Rapssamen ist Erucasäure die charakteristische Fettsäure von traditionellem Raps. Seit Mitte der 70er Jahre konnten als Ergebnis konventioneller pflanzenzüchterischer Bemühungen erucasäurefreie Sorten entwickelt werden, die die Nutzung von Rapsöl als Nahrungsmittel (z. B. Margarine, Speiseöle) ermöglicht. Erucasäurehaltiges Rapsöl ist für die menschliche Ernährung nicht geeignet, es findet jedoch im technischen, kosmetischen und pharmazeutischen Bereich vermehrt Anwendung. Ziel pflanzenzüchterischer Bemühungen ist es deshalb, neben erucasäurefreien Sorten Rapsorten mit einem möglichst hohen Gehalt an Erucasäure für den Nichtlebensmittel-Bereich zu entwickeln.

Die Lysophosphatidsäure-Acyltransferase aus *L. douglasii* (LdLPAAT) katalysiert spezifisch die Verknüpfung von Erucasäure an die sn-2-Position von Lysophosphatidsäure. Die Expression des Gens erfolgt unter der Kontrolle des samenspezifischen Promotors und Terminationssignals des pNa-Napin-Gens aus *B. napus*. Als Ergebnis der Transformation wird in den Samen der gentechnisch veränderten Rapspflanzen Trierucin gebildet, wodurch der Erucasäure-Gehalt in Rapssamen erhöht werden soll. Es ist wegen ihrer grundlegenden Funktion im Primär-Stoffwechsel zu erwarten, daß Lysophosphatidsäure-Acyltransferasen in der

Natur weit verbreitet sind und regelmäßig mit der Nahrung aufgenommen werden. Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine toxische Wirkung des Enzyms erwarten lassen.

(d) Das β -Ketoacyl-[ACP] Synthase-Gen aus *B. napus* (KAS)

Ketoacyl-Synthasen (KAS), die in den Plastiden aktiv sind, kondensieren in der Fettsäurebiosynthese Acyl-Reste mit einem Malonyl-[ACP]-Rest unter CO_2 -Abgabe zu 3-Ketoacyl-[ACP] und führen damit zur Fettsäure-Kettenverlängerung. An der Membran des endoplasmatischen Retikulums katalysieren weitere Ketoacyl-Synthasen (Elongasen) die Bildung längerer Fettsäuren durch Verlängerung der aus den Plastiden exportierten Ölsäure. KAS sind Schlüsselenzyme der Fettsäurebiosynthese. Sie sind ubiquitär verbreitet und werden regelmäßig mit der Nahrung aufgenommen. Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine toxische Wirkung des Enzyms erwarten lassen.

(e) Das Lysophosphatidsäure-Acyltransferase-Gen aus *B. napus* (*BnLPAAT*)

Das LPAAT-Gen aus *B. napus* kodiert ebenfalls eine Lysophosphatidsäure-Acyltransferase (*BnLPAAT*), die jedoch, anders als die o. g. *LdLPAAT*, keine spezifischen Fettsäuren mit der sn-2-Position von Lysophosphatidsäure verknüpft. Als Folge der Transformation der Rapspflanzen mit einem Antisense-Konstrukt des *BnLPAAT*-Gens soll die Expression der endogenen LPA-Acyltransferase reduziert und somit die Verknüpfung von unspezifischen Fettsäuren an die sn-2-Position von Lysophosphatidsäure verringert werden. Die gleichzeitige Expression von *LdLPA*-Acyltransferase soll stattdessen durch die spezifische Bindung von Erucasäure an diese Position die Bildung von Trierucin in diesem gentechnisch veränderten Raps fördern.

(f) 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 Rapspflanzen 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.

(g) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der T_L -DNA des Plasmids pTiB6S3 aus *Agrobacterium tumefaciens*. Abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamm vorhandenen Helferplasmids pMP90RK, das nicht in die Pflanzen übertragen wurde, bewirkten diese Sequenzen die Integration der zwischen den Borderregionen liegen-

den Gene in Chromosomen der Rapspflanzen. Diese Borderregionen der Ti-Plasmide sind in den gentechnisch veränderten Rapspflanzen funktionslos und lassen keine Veränderungen in den Pflanzen erwarten.

Als Regulationselemente wurden, neben dem 35S-Promotor und -Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), die Promotoren und die Terminatorsignale des *C/FatB3*-Gens, des *C/FatB4*-Gens (beide aus *C. lanceolata*), des pNa-Napin-Gens aus *B. napus* bzw. der Dc3-Promotor aus *Daucus carota* in Verbindung mit dem Ω -Leader des Tobacco Mosaic Virus (TMV) in die gentechnisch veränderten Rapspflanzen übertragen. Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden kodierenden Sequenzen der übertragenen Gene 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 (f).

(h) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel werden bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegenden DNA-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 des zur Transformation des Rapses verwendeten Vektors berücksichtigt, die jenseits der T-DNA-Borderregionen lokalisiert sind. Hierbei handelt es sich insbesondere um folgende DNA-Abschnitte:

- Das *aadA*-Gen

Das *aadA*-Gen kodiert für das Enzym Streptomycin-Adenyltransferase und ist als Markergen Bestandteil des Vektors pRE1, aus dem die einzelnen zur Transformation des Rapses verwendeten Vektoren entwickelt wurden.

Die Streptomycin-Adenyltransferase ist eine Aminoglycosid-3-Adenyltransferase (AAD(3'')(9)), die die Adenylierung der 3''-OH-Gruppe des N-Methyl-L-Glucosamin-Ringes von Streptomycin bzw. der 9-Hydroxylgruppe von Spectinomycin katalysiert, wodurch diese inaktiviert werden. Das Enzym zeichnet sich durch hohe Substratspezifität aus. Zu den Substraten des AAD(3'')(9)-Enzyms zählen Streptomycin und Spectinomycin. In der Humanmedizin findet Streptomycin nur noch in Spezialindikationen Anwendung (z.B. Tuberkulose).

Das *aadA*-Gen steht unter der Kontrolle eines prokaryotischen Promotors. Es ist deshalb nicht zu erwarten, daß dieses Gen in Pflanzen exprimiert wird. Auswirkungen auf den pflanzlichen Stoffwechsel sind daher ebensowenig zu erwarten wie Auswirkungen auf Menschen oder Tiere nach einem eventuellen Verzehr der gentechnisch veränderten Pflanzen oder von Teilen der Pflanzen.

- Die Replikationsursprünge des Plasmids pRE1

Die für die Erzeugung der gentechnisch veränderten Rapspflanzen verwendeten Plasmide leiten sich vom Plasmid pRE1 ab. Sie besitzen außerhalb der T-DNA neben dem Replikationsursprung von ColE1 zur Replikation in *E. coli* die Replikationsregion des Plasmids pVS1 aus *Pseudomonas aeruginosa*, Stamm PAT, mit der genetischen Information für Replikation und Stabilität. Das Plasmid pVS1 hat einen engen Wirtsbereich (z.B. *Pseudomonas*-Arten, *Aeromonas formicans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhizobium leguminosarum*), in *E. coli* ist es nicht stabil. Die Replikationsregion des Plasmids pVS1 dient im vorliegenden Fall der Replikation des binären Vektors in *A. tumefaciens*.

Es gibt keinerlei Hinweise dafür, daß die Replikationsregionen von ColE1 und pVS1 in höheren Pflanzen eine Funktion haben.

(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 Maße die erwarteten Fettsäuren bilden wie im Gewächshaus. 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 Vermehrung der gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus und bei den bisherigen Freisetzungen von einigen der Rapslinien mit gentechnisch vermittelten Veränderungen der Speicherlipid-Zusammensetzungen 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 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 ist die Expression der übertragenen Gene und Genfragmente des Fettsäurestoffwechsels durch die Verwendung von samenspezifischen Promotoren auf die Stadien der Samenentwicklung und der Samenreife beschränkt.

Die Expression des *nptII*-Gens wird vom konstitutiven 35S-Promotor des CaMV reguliert. Aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus sowie aus Freisetzungen anderer gentechnisch veränderter Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle dieses Promotors exprimieren, liegen keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

Die Expression des *aadA*-Gens wird von prokaryotischen Regulationselementen kontrolliert. Eine Expression in pflanzlichen Geweben ist deshalb nicht zu erwarten.

Ein gegenüber nicht gentechnisch veränderten Rapspflanzen verändertes allergenes Potential ist deshalb für die zur Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten.

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

Eine Verbreitung gentechnisch veränderter Rapspflanzen außerhalb der Versuchsfläche ist aufgrund der vorgesehenen Maßnahmen zur Minimierung einer Ausbreitung durch Pollen oder Samen nicht zu erwarten (siehe hierzu die Versuchsbeschreibung im Antrag, die Nebenbestimmungen II.5 bis II.7. sowie die Ausführungen unter III.1.2.3.).

Sommerraps ist eine einjährige, Winterraps eine überjährige Pflanze. Nach der generativen Phase stirbt die Pflanze ab, nur aus den gebildeten Samen können neue Pflanzen entstehen. Rapsamen können, wenn sie in tiefere Bodenschichten gelangen und eine sekundäre Keimruhe eintritt, im Boden mehr als 20 Jahre überdauern. Neuere Untersuchungen zeigen, daß eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der Speicherlipide der Samen Einfluß auf die Überdauerungsfähigkeit von Rapsamen nehmen kann. Ob die in diesen gentechnisch veränderten Rapsamen gebildete Caprinsäure, die verstärkte Bildung von Palmitin-, Öl- bzw. Erucasäure oder die verminderte Bildung von Linol- und Linolensäure tatsächlich Einfluß auf die Überdauerungsfähigkeit nehmen, ist derzeit jedoch nicht bekannt.

Auf jeden Fall kann die Überdauerung von Samen des gentechnisch veränderten Rapses und von ggf. gebildeten Rapsbastarden dadurch minimiert werden, daß jeweils im Anschluß an die Ernte durch geeignete Maßnahmen ausgefallene Samen noch während der gleichen Vegetationsperiode zur Keimung gebracht werden. Die daraus auflaufenden Pflanzen können leicht zerstört werden. Entsprechende Maßnahmen sind von der Antragstellerin vorgehen.

Nach Durchführung dieser Maßnahmen dennoch im Boden verbliebene Rapsamen und ggf. Samen von Rapsbastarden gelangen im Verlauf der vorgesehenen üblichen landwirtschaftlichen Nutzung durch Bodenbearbeitung wieder in die Nähe der Bodenoberfläche und können keimen. Die daraus entstehenden Pflanzen werden durch die von der Antragstellerin vorgesehene Kontrolle innerhalb der Fruchtfolgen und während der mehrjährigen Anbaupause für Raps bzw. durch die in der Nebenbestimmung II.7. zur Auflage gemachten Maßnahmen und die Nachkontrolle nach Versuchsende erfaßt und zerstört. Sollten im letzten Jahr der Nachkontrolle noch mehr als durchschnittlich 5 gentechnisch veränderte Rapspflanzen oder Rapsbastarde pro 150 m² auftreten, so ist die Nachkontrolle um ein Jahr zu verlängern. Durch diese Anbaupause sowie die während des Versuches durchgeführten Kontrollmaßnahmen wird gewährleistet, daß die ggf. nachwachsenden Rapspflanzen und Rapsbastarde erfaßt werden können.

Einzelne gentechnisch veränderte Raps sämlinge, die nach Ende der Nachkontrolle auf der Versuchsfläche auflaufen könnten, stellen weder bezüglich einer Pollenübertragung auf andere Pflanzen (siehe III.1.2.3.) noch bezüglich einer längerfristigen Etablierung ein Problem dar.

Raps kommt - außerhalb des landwirtschaftlichen Anbaus - nur auf bzw. in der Nachbarschaft zu Anbauflächen, z. B. auf Wegrändern und Ruderalflächen, als Unkraut vor. In natürlichen, intakten Pflanzengesellschaften kann sich Raps nicht etablieren.

Es ist nicht davon auszugehen, daß die gentechnisch veränderten Rapspflanzen durch die eingebrachten gentechnischen Veränderungen veränderte pflanzensoziologische Eigenschaften entwickeln und andere Biotope besiedeln können. Sie besitzen keinen erkennbaren Selektionsvorteil gegenüber anderen Pflanzen. Deshalb ist auch im Falle des noch vereinzelt Auflaufens gentechnisch veränderter Raps sämlinge und eventuell möglicher Pollenübertragung auf nicht gentechnisch veränderte Pflanzen eine nachhaltige, dauerhafte Verbreitung des gentechnisch veränderten Rapses nicht zu erwarten und die räumliche und zeitliche Begrenzung der Freisetzung hinreichend gewährleistet.

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

Innerhalb von Rapsbeständen findet zu etwa zwei Dritteln Selbstbestäubung und zu etwa einem Drittel Fremdbestäubung statt. Dieser Rapspollen wird vorwiegend durch Insekten, insbesondere Bienen, und über geringere Entfernungen auch durch den Wind verbreitet. Bei

der landwirtschaftlichen Saatguterzeugung werden, um unerwünschte Fremdeinstäubung zu minimieren, gemäß Saatgutverordnung Isolationsabstände von 100 m bei zertifiziertem Saatgut bzw. 200 m bei Basissaatgut verlangt.

Die Antragstellerin hat bei diesem Freilandversuch für die gentechnisch veränderten Rapspflanzen einen Mindestabstand von 50 m in Verbindung mit einer 2 m breiten Mantelsaat aus nicht gentechnisch veränderten Rapspflanzen oder von 100 m ohne Mantelsaat zu benachbarten Rapsfeldern vorgesehen. Entsprechend den Bestimmungen der Nebenbestimmung II.6 ist bei einem Isolationsabstand von 50 m eine Mantelsaat von 6 m Breite anzulegen. Es ist jedoch davon auszugehen, daß Rapspollen durch Insekten in geringem Umfang auch über den vorgesehenen Isolationsabstand hinausgetragen werden kann.

Die Versuchsfläche wird von der Antragstellerin für die Freisetzung von anderen gentechnisch veränderten Rapspflanzen genutzt. Kreuzbestäubungen zwischen den verschiedenen gentechnisch veränderten Pflanzen sind nicht auszuschließen. Durch die von der Antragstellerin vorgesehenen Maßnahmen in Verbindung mit den in den Nebenbestimmungen formulierten Auflagen ist jedoch hinreichend sichergestellt, daß die möglicherweise auftretenden Pflanzen mit unbeabsichtigten Kombinationen verschiedener gentechnischer Veränderungen kontrolliert und entfernt werden.

In der näheren Umgebung der Freisetzungsfäche befinden sich keine weiteren Pflanzenzuchtbetriebe. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß in der Umgebung der Freisetzungsfäche Raps aus selbstgeerntetem Saatgut als Zwischenfrucht zur Gründüngung oder zur Grünfütterproduktion nachgebaut wird. Bei dieser Art des einmaligen Nachbaus kommen die Pflanzen in der Regel nicht zur Blüte. Eine Erzeugung und Verbreitung von gentechnisch verändertem Saatgut kann auf diese Weise daher nicht erfolgen.

Die Folge einer Befruchtung einzelner Blüten von nicht gentechnisch verändertem Raps und eines einmaligen Nachbaus dieses Raps wäre das vorübergehende Vorkommen einzelner Rapspflanzen mit verändertem Fettsäuremuster in den Rapssamen in der Umgebung der Freisetzungsfäche. Da die übertragenen Eigenschaften keinen erkennbaren Selektionsvorteil verleihen, sind Risiken für die Umwelt oder die Landwirtschaft daraus nicht abzuleiten.

Bei der Gewinnung von Rapsöl (z. B. auch für Nahrungsmittel) aus Samen, die durch Bestäubung einzelner Rapsblüten mit Pollen der gentechnisch veränderten Rapspflanzen hervorgegangen sein könnten, würden die gebildeten Enzyme zusammen mit den übrigen Proteinen vom Öl getrennt. Die Proteine würden in dem Preßrückstand, dem sog. "Ölkuchen", verbleiben, der als Viehfutter verwendet wird. Für Nahrungsmittel verwendetes Öl unterliegt strengen Qualitätskontrollen, die u. a. auch den Gehalt an Erucasäure ermitteln. Caprinsäure und Ölsäure sind auch Bestandteil von Ölen und Fetten anderer Herkunft, die der menschlichen Ernährung dienen. Schädliche Einwirkungen auf die Gesundheit des Menschen sind deshalb aus der möglichen Bestäubung einzelner Blüten mit Pollen der gentechnisch veränderten Rapspflanzen nicht zu erwarten.

Zur gleichen Art wie der Raps gehört die Kohlrübe (*B. napus* var. *napobrassica*). Es ist davon auszugehen, daß Raps und Kohlrübe miteinander kreuzbar sind.

Bei der Kohlrübe handelt es sich um eine zweijährige Pflanze, die im ersten Jahr eine Hypokotylknolle ausbildet, jedoch erst im zweiten Jahr blüht. Bei einem Anbau für den Verkauf und Verzehr werden die Pflanzen im ersten Jahr geerntet. Eine Befruchtung mit Pollen von gentechnisch verändertem Raps wäre dann möglich, wenn Kohlrüben zum Zwecke der Saatgutgewinnung (z. B. für den Eigenbedarf) zum Blühen gebracht würden. Kohlrüben und Raps sind, obwohl sie zur gleichen Art gehören, morphologisch deutlich verschieden (Raps bildet keine Hypokotylknolle aus). Es ist davon auszugehen, daß Bastarde aus der Befruchtung von Kohlrüben durch Rapspollen in ihrem Erscheinungsbild von Kohlrüben deutlich verschieden wären. Da untypische Pflanzen nicht zur weiteren Vermehrung von Kohlrüben her-

angezogen würden, ist nicht zu erwarten, daß gentechnisch veränderte Bastarde zum Verzehr kommen oder für eine weitere Saatgutproduktion genutzt würden.

Es gibt unter den Brassicaceen mehrere Arten, die mit Raps eng verwandt sind; diese kommen als mögliche Kreuzungspartner in Betracht. Raps (*B. napus*) ist ein Bastard aus Rübsen (*B. rapa*) und Kohl (*B. oleracea*) und deshalb - mit den nachfolgend genannten Einschränkungen - mit diesen Arten prinzipiell kreuzbar.

Hybride aus *B. napus* und *B. oleracea* konnten experimentell erzeugt werden, indem Embryonen aus den Samenanlagen herauspräpariert und auf Nährmedien zu Pflanzen regeneriert werden ("embryo rescue"). Ein spontanes Entstehen solcher Hybriden unter Freilandbedingungen wurde bisher jedoch nicht beobachtet.

Rübsen (*B. rapa* ssp. *oleifera*) wird als Kulturpflanze zur Ölgewinnung und als Zwischenfrucht angebaut und kommt außerhalb des Anbaus verwildert an vom Menschen beeinflussten Standorten (Ruderalstandorte, Wegränder, Feldränder) vor. Bastarde aus *B. napus* x *B. rapa* treten sporadisch in Rapsfeldern auf, wenn bei der Vermehrung des Rapsaats eine Befruchtung mit Pollen von *B. rapa* stattgefunden hat.

Bezüglich der möglichen Folgen der Befruchtung von einzelnen Blüten nicht gentechnisch veränderter Rübsenpflanzen gelten die oben genannten Ausführungen zum Raps entsprechend. Hinzu kommt, daß die Fertilität primärer Bastarde aus *B. rapa* und *B. napus* in der Regel eingeschränkt ist. Sie sind anorthoploid und durch eine starke Funktionsreduktion der Gameten infolge unregelmäßiger meiotischer Verteilung der Chromosomen gekennzeichnet. Nachkommen aus solchen Gameten sind aneuploid, in der Regel schwachwüchsig und besitzen wiederum eine geringe Fertilität.

Als Kreuzungspartner für Raps sind einige weitere Brassicaceen in Betracht zu ziehen, wie Sarepta-Senf (*B. juncea*), Schwarzer Senf (*B. nigra*), Weißer Senf (*Sinapis alba*), Ackersenf (*S. arvensis*), Retticharten (*Raphanus sativus*), Hederich (*R. raphanistrum*), Grauer Bastardsenf (*Hirschfeldia incana*) und Meerkohl (*Crambe maritima*). Aufgrund der geringen Chromosomenhomologie dieser Pflanzenarten mit Raps treffen für Bastarde dieser Pflanzen mit Raps die oben für *B. rapa* und *B. oleracea* gemachten Aussagen in noch stärkerem Maß zu. Eine Ausnahme bilden lediglich amphidiploide Hybride, die bei der experimentellen Kreuzung von Raps mit verwandten Brassicaceen erhalten werden. Diese Hybride, die wahrscheinlich aus unreduzierten Gameten der Elternpflanzen hervorgehen, weisen eine nur leicht eingeschränkte Pollenfertilität auf. Auch wenn es vereinzelt zu Hybridisierungen zwischen den gentechnisch veränderten Rapspflanzen und diesen Brassicaceen kommen sollte, läßt dies wegen der geringen Wahrscheinlichkeit keine Ausbreitung des gentechnisch übertragenen Erbmateri als in Wildpflanzenpopulationen befürchten.

Für alle theoretisch möglichen Hybriden aus den gentechnisch veränderten Pflanzen und nicht gentechnisch veränderten Kultur- oder Wildpflanzen gilt, daß das veränderte Fettsäuremuster in den Samen der gentechnisch veränderten Pflanzen keinen Selektionsvorteil erkennen läßt. Die Befürchtung der unbeabsichtigten Verbreitung solcher Pflanzen ist daraus nicht abzuleiten.

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 in Chromosomen 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 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 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.

Alle übertragenen Gene und Genfragmente des Fettsäure-Stoffwechsels werden unter der Kontrolle von samenspezifischen Regulationssequenzen exprimiert. Gene, die Enzyme mit der gleichen Funktion kodieren, kommen zudem natürlicherweise in einer Reihe von Pflanzenarten vor.

Das Acyl-[ACP] Thioesterase-Gen enthält mehrere Introns. Selbst im Falle einer Übertragung des Gens auf Mikroorganismen wäre daher nicht mit der Bildung des entsprechenden Enzyms in den Mikroorganismen zu rechnen.

Die Oleatdesaturase-Genfragmente und das *BnLPAAT*-Gen wurden in Antisense-Orientierung übertragen und verleihen Mikroorganismen nach einem horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen keinen erkennbaren Selektionsvorteil.

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(f) 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 dem gentechnisch veränderten Raps auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Entsprechendes gilt für das außerhalb der T-DNA-Borderregionen lokalisierte *aadA*-Gen, dessen Übertragung in das Pflanzengenom nach den Angaben in den Antragsunterlagen nicht ausgeschlossen werden kann. Das *aadA*-Gen kodiert für das Enzym Streptomycin-Adenyltransferase.

Die zur Regulation des übertragenen *nptII*-Gens stammen aus CaMV, der zur Verstärkung der Expression in einem Konstrukt verwendete Ω -Leader aus TMV. Die theoretische Möglichkeit eines Transfers der CaMV- oder der TMV-Sequenzen aus diesen Pflanzen würde keine neue im Vergleich zur natürlicherweise vorliegenden Situation darstellen, weil beide als pflanzeninfizierende Viren ohnehin in Pflanzen anzutreffen sind.

Die Plasmide pNBM99-CIFatB3, pNBM99-EnCIFatB3, pHS124, pHS126, pHS127, pRESS, pNKAT55, pRST55, pALM1 und pALM2, die für die Erzeugung der gentechnisch veränderten Rapspflanzen verwendet wurden, besitzen außerhalb der T-DNA neben dem Replikationsursprung von ColE1 zur Replikation in *E. coli* die Replikationsregion des Plasmids pVS1 aus *Pseudomonas aeruginosa*, Stamm PAT, mit der genetischen Information für Replikation und Stabilität. Diese Replikationsursprünge können in den gentechnisch veränderten Raps-

pflanzen chromosomal integriert worden sein (siehe III.1.2.1. (h)). In den gentechnisch veränderten Pflanzen sind diese Nukleinsäuresequenzen funktionslos; in bestimmten Bakterien ist hingegen eine Funktion als Replikationsursprung zu erwarten.

Das ColE1-Replikon hat einen auf einige gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und nahe verwandten Bakterien, 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 ColE1 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

Die Replikationsregion des Plasmids pVS1 dient im vorliegenden Fall der Vermehrung des binären Vektors in *A. tumefaciens*. Die zur Transformation verwendeten Vektoren sind mobilisierbar, besitzen jedoch kein eigenes Transfersystem. Da der konjugative Austausch von Nukleinsäuren zwischen Mikroorganismen weit verbreitet ist, ist nicht zu erwarten, daß die verwendete Replikationsregion von pVS1 aus den gentechnisch veränderten Pflanzen zur Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Rapspflanzen wurden verwundete pflanzliche Explantate mit Agrobakterien inokuliert, die die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen des binären Vektorplasmids 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 Tumorinduktion befähigt. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt.

Das zur Freisetzung vorgesehene Saatgut der gentechnisch veränderten Rapslinien wird durch Kreuzungen oder Selbstbestäubungen gewonnen. Durch diese generativen Phasen sind ggf. nach der Antibiotikabehandlung noch verbliebene Agrobakterien aus den gentechnisch veränderten Rapslinien entfernt worden.