



Antrag 6786-01-0178

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch verändertem

Weizen (*Triticum aestivum*)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 23. November 2006

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 HvSUT1-Gen**

Das *HvSUT1*-Gen kodiert für ein Transportmolekül der Zellmembran, welches Saccharose (Rohrzucker) unter Energieaufwand gegen einen Konzentrationsgradienten über Zellmembranen hinweg transportiert. Saccharose-Transporter gehören zur Transportprotein Grundausstattung vermutlich aller höheren Pflanzen, da Saccharose die universelle Transportform der Photoassimilate darstellt. Boten-RNA kodierend für das HvSUT-Protein wurde in Geweben von Gerste gefunden, die als zentraler Austauschpunkt zwischen dem maternalen (Mutterpflanze) und dem filialen (Korn) Teil der Pflanze gelten. Die Induktion des *HvSUT1* Genes geht einher mit der Erhöhung des Zuckergehaltes im sich bildenden Korn, des Auftretens von an der Stärkebildung beteiligten Enzymen sowie der Stärkeakkumulation im Endosperm während der Kornbildungsphase. Daher scheint das HvSUT1-Protein ein wichtiges Kontrollelement für den Saccharoseimport in das Endosperm zu sein. Die Funktion und Wirkungsweise des Genes ist durch Expressionsstudien in der Bäckerhefe genau untersucht worden. Eine über den Transport von Zucker hinausgehende Funktion ist nicht bekannt.

In den gentechnisch veränderten Pflanzen wird die Expression des Gens vom *Hordein B1*-Promotor- und Terminator des *HordeinB1*-Gens aus Gerste kontrolliert. Dieser Promotor vermittelt die Akkumulation von Hordein, einem Speicherprotein in reifen Körnern von Gerste. Die Expression des eingebrachten Fremdgens wurde über RT-PCR vermittelte mRNA-Detektion in unreifen Samen der gentechnisch veränderten Pflanzen nachgewiesen.

Das Gen wurde mit einer Kopie in das Genom der Weizenlinie HOSUT übertragen, wie *Southern blot*-Untersuchungen an Nachkommen der Transformanten ergaben.

Saccharosetransporter aus Weizen in sich entwickelnden Körnern wurden bereits beschrieben. Die Expression von *HvSUT1* im Weizen führt somit nicht zu einer Einführung einer prinzipiell neuen Eigenschaft in die gentechnisch veränderten Pflanzen. Das Protein wird natürlicherweise in Gerstenkörnern gebildet, welche für Verzehr und Verfütterung als unbedenklich anzusehen sind. Es nicht bekannt, ob durch eine Verstärkung des Saccharoseeinstroms in das sich entwickelnde Korn neben der festgestellten Erhöhung des Proteingehaltes hinausgehende Effekte im Stoffwechsel verursacht werden. Von der Bildung einer neuen Stoffgruppe durch die Expression des Transporters ist jedoch nicht auszugehen. Über allergene oder toxische Eigenschaften dieser Transportproteine wurde bisher nicht berichtet.

Die Aktivität des im gentechnisch veränderten Weizen neu gebildeten Transportproteins wird als Ursache für die erhöhte Proteineinlagerung im Samen angenommen. *HvSUT1*-exprimierende Weizenpflanzen (Linie HOSUT) zeigen im Gewächshaus keinen unterschiedlichen Habitus im Vergleich zu gentechnisch nicht veränderten Kontrolllinien. Der hier freizusetzende gentechnisch veränderte Weizen ist nicht für den Verzehr vorgesehen, das Vorhaben ist sehr klein. Schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen und die Umwelt sind unter diesen Bedingungen nicht zu erwarten.

(b) **Das VfAAP1-Gen**

Das *VfAAP1*-Gen aus *Vicia faba* kodiert für eine Aminosäure-Permease. Aminosäuren stellen die hauptsächliche Transportform organisch gebundenen Stickstoffes in den meisten höheren Pflanzen dar. Aminosäure-Permeasen transportieren Aminosäuren aus den pflanzlichen Leitgeweben in den Symplasten von Pflanzenzellen. Sie werden in unterschiedlichem Ausmaß entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert und weisen unterschiedliche Affinitäten für die verschiedenen Aminosäuren auf. Aminosäurepermeasen wurden in einer Vielzahl von Pflanzen beschrieben und sind vermutlich in allen höheren Pflanzen anzutreffen. Im Spenderorganismus *Vicia faba* wird das *VfAAP1*-Gen vor allem zu Beginn der Entwicklung in Speicherparenchymzellen der Kotyledonen exprimiert.

Die stärkste Expression korrespondiert mit der Bildung von Speicherproteintranskripten. VfAAP1 vermittelt den Transport einer Reihe von Aminosäuren (vor allem Cystein, Arginin, Glutamin, Serin, Leucin, Methionin, Histidin, Glycin und Threonin) mit deutlichem Schwerpunkt auf Cystein. Das VfAAP1-Protein ist durch heterologe Expressionstudien in der Bäckerhefe biochemisch genau charakterisiert.

In dem gentechnisch veränderten Weizen wird die Expression des VfAAP1-Gens in der Linie SUTAP vom SUT1-Promotor aus Gerste sowie dem gen-eigenen Terminationssignal kontrolliert. In der Linie XAP erfolgt die Kontrolle durch den 1Ax1-Promotor aus Weizen und den Terminator der Octopin-Synthetase aus *Agrobacterium tumefaciens*. Beide Promotoren führen zu einer Endosperm-spezifischen Expression des VfAAP1-Genes. In unreifen Samen der für die Freisetzung bestimmten gentechnisch veränderten Weizenlinien wurde die Expression des Gens mittels quantitativer RT-PCR belegt. Die Expression in weiteren Pflanzenteilen wurde bislang nicht untersucht.

Das Gen wurde mit einer Kopie in das Genom der Weizenlinie SUTAP und XAP übertragen, wie *Southern blot*-Untersuchungen an Nachkommen der Transformanten ergaben.

Bei Pflanzen der gentechnisch veränderten Weizenlinien SUTAP und XAP wurden in Gewächshausuntersuchungen keine Unterschiede zu gentechnisch nicht veränderten Pflanzen im Habitus, Samenmorphologie und Keimfähigkeit festgestellt. Die Linien SUTAP und XAP blühen im Gewächshaus 2-3 Wochen eher als Pflanzen der Linie HOSUT und gentechnisch nicht veränderte Kontrolllinien. Sie akkumulieren eine erhöhte Menge an Protein im Samen.

Das Zielgen VfAAP1 stammt aus *Vicia faba* (Ackerbohne oder Dicke Bohne). Als Körnerleguminose wird sie in Deutschland auf ca. 21.000 ha (2004) angebaut. Verwendet wird sie vor allem als eiweißreiches Viehfutter (Ackerbohne) oder als Gemüse (Dicke Bohne). Unter Beachtung der üblichen Zubereitungsformen sind humantoxische Wirkungen der Dicken Bohne nicht bekannt. Der Verzehr oder die Verfütterung von Weizen oder weiterer Pflanzenteile der gentechnisch veränderten Pflanzen ist im Rahmen dieses Freisetzungsvorhabens nicht vorgesehen. Durch das Fremdgen wird keine grundlegend neue Eigenschaft in die Empfängerpflanze eingeführt, da Aminosäurepermeasen ubiquitär in höheren Pflanzen vorhanden sind. Von der Bildung einer neuartigen Substanzklasse in der Pflanze ist durch die Expression von VfAAP1 nicht auszugehen.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung durch die Bildung der Aminosäure-Permease der Ackerbohne in Weizensamen sowie dem damit verbundenen erhöhten Proteingehalt der Weizensamen nicht zu erwarten.

(c) Das *bar*-Gen

Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* kodiert für eine Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (PAT) und steht unter Kontrolle des *Ubi-1*-Promotors aus Mais und der 35S Terminationssequenz des Cauliflowermosaicvirus. Das Markergen bewirkt eine Toleranz gegen Phosphinothricin (Glufosinat), den Wirkstoff des Herbizids Basta[®], und wurde für Selektionszwecke bei der Herstellung der gentechnisch veränderten Pflanzen übertragen. In der Linie HOSUT wurden mehrere Kopien des *bar* Gens inseriert, die Anzahl der Kopien des *bar*-Gens in den Linien SUTAP und XAP wurde nicht ermittelt. In der Linie HOSUT wird das *bar*-Gen nicht exprimiert, vermutlich durch Cosuppression.

L-Phosphinothricin ist ein Glutaminsäure-Analogon und inhibiert die pflanzliche Glutaminsynthetase. Die Hemmung der Glutaminsynthetase hat durch die Akkumulation von Ammonium den Zelltod zur Folge. Aus diesem Grund findet Phosphinothricin als Wirkstoff in dem nicht-selektiven Herbizid Basta[®] Verwendung. Basta[®] enthält die Enantiomeren D- und L-Phosphinothricin im Verhältnis 1 : 1. D-Phosphinothricin wirkt nicht als Glutaminsynthetase-Hemmstoff.

Im Unterschied zu nicht gentechnisch veränderten Pflanzen, die mit Basta[®] behandelt werden, würde in den gentechnisch veränderten Pflanzen im Falle einer Behandlung mit Basta das L-Phosphinothricin durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase acetyliert, wodurch N-Acetyl-L-Phosphinothricin entsteht, das keine herbizide Wirkung hat. Die gentechnisch veränderten Pflanzen sind dadurch tolerant gegenüber dem Herbizid Basta[®]. Die Substratspezifität der Phosphinothricin-Acetyltransferase ist hoch. Selbst das Phosphinothricin-Analogon Glutamat wird kaum umgesetzt. D-Phosphinothricin wird durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase nicht metabolisiert.

Aus den auf dem Feld verbleibenden Teilen der gentechnisch veränderten Pflanzen würde das in diesen noch befindliche N-Acetyl-Phosphinothricin bei der Verrottung in den Boden gelangen und dort durch Mikroorganismen wieder in L-Phosphinothricin umgesetzt werden. D/L-Phosphinothricin wird im Boden, ebenfalls durch Mikroorganismen, abgebaut.

Nach den vorliegenden Daten weist N-Acetyl-L-Phosphinothricin eine deutlich geringere Toxizität als Phosphinothricin (= Wirkstoff des Herbizids Basta[®]) auf. Basta[®] ist von der Biologischen Bundesanstalt bzw. dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit nach dem Pflanzenschutzgesetz zugelassen. Im Rahmen dieser Zulassung wurde auch eine toxikologische und ökotoxikologische Bewertung des Mittels vorgenommen.

Schädliche Einwirkungen der in den gentechnisch veränderten Pflanzen enthaltenen Phosphinothricin-Acetyltransferase wären bei einem Verzehr von Pflanzenteilen durch Tiere oder Menschen ebenfalls nicht zu erwarten. Bei einer oralen Aufnahme wäre davon auszugehen, dass das Enzym ebenso wie Proteine im Allgemeinen im Verdauungstrakt abgebaut würde.

Die Phosphinothricin-Acetyltransferase besitzt keine der für allergene Proteine aus Nahrungsmitteln typischen Eigenschaften (Hitzestabilität, Stabilität im Verdauungstrakt) sowie keine Sequenzhomologie zu bekannten Allergenen. Im Rahmen des Freisetzungsversuches ist laut Antrag nicht geplant, Basta® als Herbizid einzusetzen.

(d) Weitere DNA-Abschnitte der eingesetzten Transformationsplasmide

Für die Transformation mittels Mikroprojektil-Beschuss wurden die intakten Transformationsplasmide eingesetzt. Es ist daher nicht auszuschließen, dass weitere DNA-Abschnitte der Plasmide in den gentechnisch veränderten Weizen übertragen worden sein könnten.

Plasmid pJFBar

Das zur Transformation der Weizenpflanzen verwendete Plasmid pJFBar leitet sich von dem binären Vektor pPZP111 ab und enthält außerhalb der Borderregionen die folgenden genetischen Elemente:

- ein bakterielles Chloramphenicolacetyltransferase-Gen (Cm^R -Gen, *cat*-Gen) für Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol;
- die *bom*-Sequenz aus pBR322 zur Mobilisierung des Plasmids aus *E. coli* in *Agrobacterium tumefaciens*;
- die Replikationsursprünge ColE1 und pVS1 zur Replikation in *E. coli* bzw. *Agrobacterium*.

Angaben zur erfolgten Übertragung des Chloramphenicolacetyltransferase-Gens liegen dem Antrag nicht bei. Da dieses Gen jedoch unter der Kontrolle eines prokaryotischen Promotors steht, ist nicht davon auszugehen, dass das Gen im Falle einer erfolgten Übertragung in Pflanzen exprimiert wird. Auswirkungen auf den pflanzlichen Stoffwechsel sind daher nicht zu erwarten. Es gibt keinerlei Hinweise dafür, dass die Replikationsregionen von ColE1 und pVS1 sowie die *bom*-Sequenz in höheren Pflanzen eine Funktion haben.

Plasmid HOSUT/pPZP200

Das zur Transformation der Weizenpflanzen verwendete Plasmid HOSUT/pPZP200 leitet sich von dem binären Vektor pPZP200 ab. Es enthält außerhalb der Borderregionen die folgenden genetischen Elemente:

- ein bakterielles Aminoglykosid-3"-Adenyltransferase-Gen (Sp/Sm^R -Gen, *aadA*-Gen) für Resistenz gegenüber den Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin;
- die *bom*-Sequenz aus pBR322 zur Mobilisierung des Plasmids aus *E. coli* in *Agrobacterium tumefaciens*;
- die Replikationsursprünge ColE1 und pVS1 zur Replikation in *E. coli* bzw. *Agrobacterium*.

Das *aadA*-Gen konnte in der mit diesem Plasmid transformierten Linie HOSUT über Southern Blot Analyse nicht nachgewiesen werden. Die übrigen Elemente sind wie bei dem Plasmid pJFBar zu beurteilen.

Plasmide SUTAP/pUC18 und XAP/pUC19

- Das *amp^r*-Gen kodierend für eine β -Lactamase
- Nukleotide des *lacZ*-Gens aus *E. coli*
- Replikationsursprung ColE1 (*ori*)

Das *amp^r*-Gen kodierend für eine β -Lactamase konnte durch Southern Blot Analyse im Genom der Linien XAP27 sowie SUTAP-78 nachgewiesen werden. Auf Grund der vorliegenden Informationen ist nicht auszuschließen, dass auch die Linien SUTAP-60 und -69 das *amp^r*-Gen integriert haben könnten. Alle oben genannten Abschnitte sind für die Expression bzw. Genregulation in Bakterien bestimmt und haben in Pflanzen keine Funktion. Im Falle einer Übertragung dieser DNA-Abschnitte in das Genom des gentechnisch veränderten Weizens wäre nicht mit ihrer Expression zu rechnen. Schädliche Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt sind daher nicht zu erwarten.

(e) 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 Eigenschaften der gentechnisch veränderten Pflanzen 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 Weizenpflanzen im Gewächshaus wurde bei den Linien SUTAP und XAP ein um drei Wochen früheres Blühen im Vergleich zur Linie HOSUT und nicht gentechnisch veränderten Kontrolllinien festgestellt. Weder die Keimfähigkeit der Samen, deren Morphologie noch der Gesamthabitus der Pflanze waren verändert. Die Untersuchung des genannten Phänotyps des Frühblühens ist auch Ziel der Freisetzung.

Eine um drei Wochen frühere Blüte wäre eine züchterisch erwünschte Eigenschaft und von landeskulturellem Wert, eine Gefährdung für Mensch, Tier und Umwelt ist daraus nicht ableitbar.

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. Die in den gentechnisch veränderten Weizen gebildeten Transportproteine gehört zu einer Gruppe, die zur Transporter Grundausstattung aller stoffwechselaktiven Organismen gehört. Über allergene Wirkungen oder toxische Eigenschaften dieser Proteingruppe wurde bisher nicht berichtet. Auf Grund der zentralen Funktion im Stoffwechsel vieler Organismengruppen ist für die Transporterproteine kein erhöhtes allergenes Potenzial zu erwarten. Eine Verwendung von Produkten des Versuchs für die menschliche Ernährung oder zur Verfütterung ist nicht vorgesehen.

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

Weizen ist eine alte Kulturpflanze; als Wildform ist hexaploider Weizen nicht bekannt. Er kommt nur in der Nachbarschaft zu landwirtschaftlichen Anbauflächen, vereinzelt an Wegrändern und auf Ruderalflächen als Unkraut vor. Weizen ist eine konkurrenzschwache Pflanze, in natürlichen, intakten Pflanzengesellschaften ist eine Etablierung von Weizen nicht bekannt. Die Erfahrungen aus den Gewächshausversuchen erbrachten keine Hinweise darauf, dass sich der gentechnisch veränderte Weizen aufgrund der gentechnischen Veränderungen in seiner Fähigkeit, sich in der Umwelt zu etablieren, von nicht gentechnisch verändertem Weizen unterscheidet.

Nach Beendigung der generativen Phase sterben Weizenpflanzen ab. Neue Pflanzen können aus den gebildeten Samen entstehen. Die Samen (Körner) werden während der Ernte aus den Ähren gedroschen. Sie sind nach Eintritt in eine sekundäre Keimruhe unter günstigen Bedingungen bis zu 2 Jahre im Boden überdauerungsfähig, ohne ihre Keimfähigkeit einzubüßen. Unter günstigen Bedingungen können sie in folgenden Kulturpflanzenbeständen keimen. Aus der gentechnischen Veränderung ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine gegenüber nicht gentechnisch verändertem Weizen veränderte Überdauerungsfähigkeit.

Die Antragstellerin hat vorgesehen, die Ähren des gentechnisch veränderten Weizens und der nicht gentechnisch veränderten Kontrollpflanzen von Hand rechtzeitig so zu ernten, dass spontanem Samenausfall vorgebeugt werden. Geerntetes und für die Analysen nicht benötigtes Pflanzenmaterial soll autoklaviert werden. Nach der Ernte und dem vorgeschriebenen Abbrennen des Strohs ist vorgesehen, die noch verbliebenen Pflanzenreste zu zerkleinern und mit dem Grubber flach in den Boden einzuarbeiten.

Im Anschluss an das Freisetzungsvorhaben soll die Versuchsfläche entweder brach gelegt oder mit einer Kulturart bestellt werden, die das Erkennen von ggf. auflaufendem Weizen ermöglichen würde. Auflaufende Weizenpflanzen sollen im Zuge der vorgesehenen Anbaupause während der Nachkontrolle vor der Blüte entfernt werden. In die Nachkontrolle ist ein 3 m breiter Streifen im Anschluss an die Mantelsaat einzubeziehen. Die Anbaupause und die Nachkontrolle sind zu verlängern, falls im letzten Jahr der Freisetzung noch Weizendurchwuchs beobachtet wurde.

Die Antragstellerin berichtet, bei den bisher mit dem gentechnisch veränderten Weizen durchgeführten Untersuchungen und Beobachtungen der morphologischen Eigenschaften der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen keine Unterschiede zwischen den gentechnisch veränderten und nicht gentechnisch veränderten Pflanzen gefunden zu haben. Die Linien SUTAP und XAP blühen im Gewächshaus etwa 3 Wochen eher als die Linie HOSUT und nicht gentechnisch veränderte Vergleichslinien. Hinweise auf eine erhöhte Vitalität und Fertilität des gentechnisch veränderten Weizens, die eine Überdauerung oder Verwilderung der gentechnisch veränderten Pflanzen begünstigen würden, liegen jedoch nicht vor. Demzufolge ist die Möglichkeit, dass der gentechnisch veränderte Weizen im Freiland überdauert oder sich auf diesem Wege Pflanzen etablieren, äußerst gering.

Mit der Entwicklung der gentechnisch veränderten Weizenpflanzen wird die Erwartung verbunden, durch einen erhöhten Samenproteingehalt einen in der Futterqualität hochwertigeren Samen ernten zu können.

Es gibt keine Hinweise darauf, dass die generelle Konkurrenzschwäche der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen gegenüber Wildpflanzenarten durch diese Eigenschaft verändert würde. Aus den genannten Gründen ist daher weder eine Etablierung noch eine unkontrollierte Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen zu erwarten.

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

Weizen (*Triticum aestivum*) ist die bedeutendste Kulturpflanze der gemäßigten Breiten. Er ist ein einjähriges, meist unbegranntes Ährengras mit Sommer- und Winterformen. Die aufrechte Ährenspindel des Weizens ist zweizeilig alternierend mit Ährchen besetzt, in denen 3-6 zwittrige Blüten sitzen, von denen nur etwa 3 Samen ansetzen. Die Blühphase der Einzelblüte ist mit ca. 1 Stunde sehr kurz. Durch die zeitlich versetzte Abfolge des Blühbeginns der einzelnen Blüten eines Ährchens, der gesamten Ähre und der verschiedenen Ähren einer Pflanze am Haupt- und den diversen Nebentrieben kann die Blühzeit aller Blüten einer Weizenpflanze über eine Woche betragen. In der Regel tritt Selbstbestäubung noch vor der Blütenöffnung ein, doch ist in gewissem Umfang, beeinflusst vom Genotyp und den klimatischen Bedingungen zur Blütezeit, Fremdbefruchtung möglich. Diese wird mit etwa 1-3 % angegeben, bei trockener und warmer Witterung kann die Fremdbefruchtung bei manchen Genotypen auch höher sein. Nach Rückfrage beim Bundessortenamt gibt dieses den Fremdbefruchtungsanteil der in Deutschland angebauten Sorten mit 1-3% an.

Weizenpollen wird vom Wind verbracht, doch wird die Möglichkeit der Verbreitung durch das hohe Gewicht der Pollenkörner und die Möglichkeit der Fremdbestäubung durch die vergleichsweise geringe Pollenproduktion eingeschränkt. Außerdem ist Weizenpollen nur über eine sehr kurze Zeit befruchtungsfähig. Unter optimalen Bedingungen liegt die Befruchtungsfähigkeit bei etwa 3 Stunden, unter Feldbedingungen bei weniger als 30 Minuten. Untersuchungen zur Pollenausbreitung von Weizen zeigten einen Samenansatz von ca. 10 % an pollensterilen Weizenpflanzen, die ca. 30 m von der Pollenquelle entfernt angebaut worden waren. In Feldstudien wurde dagegen ermittelt, dass bereits nach 1 m bis 3 m der Samenansatz an pollensterilen Weizenpflanzen auf 10 % zurückgegangen war.

Die weiteste, bisher dokumentierte Auskreuzung wurde mittels eines biologischen Detektionssystems im Rahmen eines Experimentes mit 300 m festgestellt, darüber hinaus sind Auskreuzungen nach Kenntnisstand des BVL nicht nachgewiesen. Die Auskreuzungsrate lag in dem genannten Fall bei 0.005%.

Die Saatgutverordnung sieht als Maßnahme zur Abschirmung von unerwünschten Einkreuzungen in Weizenvermehrungsflächen die Anlage eines Trennstreifens (ohne Angabe einer Breite) zu benachbarten Getreidebeständen vor. Weitere Mindestabstände sind nicht einzuhalten. Das Saatgut für Hybridweizensorten, die in Deutschland zugelassen sind, wird im Ausland erzeugt. Die notwendige Pollensterilität ist nicht genetisch bedingt, sondern wird durch den Einsatz von in Deutschland nicht zugelassenen Gametoziden erreicht. Aus der Möglichkeit des Anbaus von Hybridweizen ist deshalb kein erhöhtes Auskreuzungspotential abzuleiten.

Der in unseren Breiten überwiegend angebaute Weizen (*Triticum aestivum*, Brotweizen) ist hexaploid. Als weitere Formen werden mit regionalen Schwerpunkten noch Hartweizen (*Triticum durum*, tetraploid, für Teigwaren) und gelegentlich Spelzweizen, (*Triticum spelta*, Dinkel, Grünkern, hexaploid, z. B. für Graupen, Grieß) angebaut. Andere Weizenformen, wie Rauheizen (*Triticum turgidum*, tetraploid), Emmer (*Triticum dicoccum*, tetraploid) oder Einkorn (*Triticum monococcum*, diploid) sind wohl nur vereinzelt auf landwirtschaftlich genutzten Flächen zu finden. Pollensteriler Weizen wird nicht für Anbauzwecke genutzt.

Als wichtige Kulturpflanze ist Weizen seit langer Zeit Gegenstand von Kreuzungsversuchen zwischen Weizen und Kreuzungspartnern innerhalb und außerhalb der Gattung *Triticum*. Hexaploide Weizenformen und –arten sind fertil miteinander kreuzbar. Dagegen ist die Fertilität der F1 aus Kreuzungen zwischen hexa- und tetraploiden Arten häufig stark eingeschränkt, Nachkommen aus Kreuzungen von hexa- und diploiden Arten sind in der Regel steril. Eine Ausnahme bildet hier *T. aestivum* x *T. turgidum* (tetraploid), deren F1 fertil ist.

Von den als mögliche Kreuzungspartner für Gattungsbastarde von *T. aestivum* im Konsensus-Dokument der OECD genannten Pflanzenarten kommen in Deutschland Arten von *Agropyron*, *Elymus*, *Hordeum*, *Leymus*, *Setaria* und *Sorghum* sowie *Secale cereale* (Roggen) und Triticale, darüber hinaus auch von *Aegilops* vor. Kreuzungen zwischen den genannten Arten und Formen des Weizens und den übrigen Arten führen häufig überhaupt nur unter Anwendung besonderer Techniken (Bestäubung per Hand, männlich sterile Linien, *embryo-rescue*-Methoden) zu (meist sterilen) Nachkommen.

Die Möglichkeit des Auftretens von Spontanhybriden unter Freilandbedingungen wird als sehr gering angesehen. Dazu tragen neben der genetisch bedingten Inkompatibilität der Kreuzungspartner weitere Anforderungen bei, die für eine erfolgreiche Hybridisierung unter Freilandbedingungen erfüllt sein müssen, wie die zeitlich synchrone Blühphase beider Partner. Agrotriticum, ein Gattungsbastard aus *Triticum aestivum* und *Agropyron spec.*, der mit beiden Eltern rückkreuzbar sein soll, wird in Deutschland nicht angebaut. Das spontane Auftreten des Kreuzungshybrids aus Roggen und Weizen (Triticale) ist nur aus sehr alten Publikationen bekannt, was wahrscheinlich mit der vermehrten Offenblütigkeit der damals verwendeten Kultivare zusammenhängt. In den beschriebenen Fällen war der Roggen der Pollendonator und der Weizen der Pollenakzeptor. Von einem spontanen Auftreten von Triticale in benachbarten Roggenfeldern ist daher nicht auszugehen. Natürlich auftretende Hybride zwischen Kulturweizen und Kulturgerste bzw. Kulturhafer sind nicht bekannt.

Die laut Antragsunterlagen vorgesehenen Maßnahmen in Verbindung mit den Nebenbestimmungen dieses Genehmigungsbescheids stellen sicher, dass zu weiteren Flächen, die mit Weich- oder Hartweizen bestellt werden, ein Abstand von mindestens 120 m eingehalten wird. Diese Maßnahmen sind Ansicht aller beteiligten Einrichtungen ausreichend, um die Möglichkeit von Auskreuzungen in benachbarte Kulturpflanzenbestände zu reduzieren.

Sollte es trotz der vorgesehenen Maßnahmen und unter Berücksichtigung der biologischen Eigenschaften des Weizens zu einer Auskreuzung der gentechnischen Veränderungen in Arten der genannten Pflanzengattungen kommen, die für den Verzehr genutzt werden (z. B. Roggen, Gerste), so wären daraus auf Grund der unter III.1.2.1. (a)-(d) ausgeführten Bewertung der übertragenen Eigenschaften keine schädlichen Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt abzuleiten. Ggf. dennoch stattgefundenene einzelne Bastardierungsereignisse zwischen den gentechnisch veränderten Pflanzen und Wildpflanzen würden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu einer Ausbreitung der übertragenen Fremdgene in Wildpflanzenpopulationen führen, da dafür anschließende Rückkreuzungen des Bastards mit der Wildpflanzenart erforderlich wären.

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 *HvSUT1*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene Gen *HvSUT1* stammt aus Gerste. Diese ist als Kulturpflanze weit verbreitet. Für dieses Gen ist also auch die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Organismen gegeben.

(b) Das *VfAAP1*-Gen

Aminosäuretransporter sind ebenfalls in Pflanzen ubiquitär vorhanden. Das in den Weizen übertragene Gen stammt aus Ackerbohne (*Vicia faba*), die in Deutschland weitläufig angebaut wird. Auch für dieses Gen ist die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Organismen gegeben.

(c) Das *bar*-Gen

Die Inaktivierung von Phosphinothricin durch Acetylierung ist ein bei Bodenmikroorganismen natürlicherweise vorkommender Prozess. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet. Auch für das *bar*-Gen ist also die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen gegeben. Selbst im Falle eines Transfers des *bar*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz dieser Resistenz in der Umwelt nicht erkennbar erhöht.

(d) Weitere auf den Transformationsplasmiden gelegene DNA-Abschnitte

Die gentechnisch veränderten Weizenpflanzen können folgende genetische Elemente enthalten, die auf den verwendeten Plasmiden liegen:

- ein bakterielles Chloramphenicolacetyltransferase-Gen (Cm^R -Gen, *cat*-Gen) für Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Chloramphenicol;
- das β -Lactamase-Gen für Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin;
- das Gen für das α -Fragment der β -Galaktosidase aus *E. coli*
- die *bom*-Sequenz und die *nic*-Sequenz aus pBR322 zur Mobilisierung des Plasmids aus *E. coli* in *Agrobacterium tumefaciens*;
- die Replikationsursprünge ColE1 und pVS1 zur Replikation in *E. coli* bzw. *Agrobacterium*.

Teile des Plasmides pUC18 oder pUC19 (ori of replication).

Das Cm^R -Gen stammt aus dem Transposon Tn9 und kodiert für eine Acetyltransferase, die eine Acetyl-CoA-abhängige Acetylierung des Antibiotikums Chloramphenicol katalysiert und damit dessen antibakterielle Wirkung aufhebt (Proctor and Rownd, 1982). Chloramphenicol wird aufgrund des Risikos, aplastische Anämie hervorzurufen, humantherapeutisch heute nur noch in sehr wenigen Fällen eingesetzt und ist in der EU für die Anwendung an Tieren zur Erzeugung von Nahrungsmitteln nicht zugelassen. Chloramphenicol-resistente Mikroorganismen sind in der Umwelt weit verbreitet. Das Cm^R -Gen wurde von der ZKBS in ihrer Stellungnahme vom 6.7.1999 zur biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen in die Gruppe I derjenigen Antibiotika-Resistenzgene eingeordnet, die (a) in Boden- und Enterobakterien bereits weit verbreitet sind und (b) deren relevante Antibiotika keine oder nur geringe therapeutische Bedeutung in der Human- bzw. Veterinärmedizin besitzen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass - wenn überhaupt - das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen keine Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt zur Folge hat.

Das β -Lactamase Gen ist weit verbreitet in Mikroorganismen. Etwa 35% aller klinischen *E. coli* -Isolate aus Menschen sind resistent gegen Ampicillin, davon 90% auf Grund eines β -Lactamase vermittelten Wirkmechanismus. Ebenso weisen 74% aller *E. coli*-Isolate aus Rindern und Schweinen eine Ampicillin-Resistenz auf.

Die ZKBS stellt in ihrer Stellungnahme vom 6.7.1999 zur biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen das *amp^r*-Gen in die Gruppe II derjenigen Antibiotikaresistenz--Genen, die (a) in Mikroorganismen verbreitet sind und (b) deren relevante Antibiotika nur noch in Teilbereichen der Human- bzw. Veterinärmedizin therapeutische Anwendung finden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass – wenn überhaupt - das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen nur sehr geringe Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt zur Folge hat.

Das Wissenschaftliche Gremium für gentechnisch veränderte Organismen (GMO-Panel) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat in seinem Gutachten über die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen als Markergene in gentechnisch veränderten Pflanzen vom 2. April 2004 das *Cm^R*-Gen und das *amp^r*-Gen in die Gruppe derjenigen Gene eingeordnet, die auf experimentelle Freilandversuche beschränkt werden und nicht in gentechnisch veränderten Pflanzen vorliegen sollten, die in Verkehr gebracht werden sollen. Es ist auch zu berücksichtigen, dass der beantragte Freisetzungsvorhaben nur auf einer sehr begrenzten Fläche für einen begrenzten Zeitraum stattfinden soll.

Das α -Peptid des lacZ-Gens für eine β -Galaktosidase: Die „multiple cloning site“ von pUC18/19 befindet sich innerhalb der für das α -Fragment der β -Galaktosidase aus *E. coli* kodierenden Sequenz. Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das α -Fragment allein ist enzymatisch nicht aktiv. Zudem wäre das α -Fragment in dem gentechnisch veränderten Weizen durch Insertion des in die „multiple cloning site“ klonierten Gens 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.

Die Replikationsregion des Plasmids pVS1 aus *Pseudomonas aeruginosa* mit der genetischen Information für Replikation und Stabilität ermöglicht die Replikation des Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. Auch für diese Nukleinsäureabschnitte ist 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.

Das pUC-Replikon 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 Bakterienspezies, 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 pUC im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

(e) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *Zea mays*, *Triticum aestivum*, *Hordeum vulgare*, *Agrobacterium tumefaciens* und dem Cauliflower Mosaic Virus. CaMV ist ein pflanzeninfizierendes, doppelsträngiges DNA-Virus, das in Pflanzen weit verbreitet ist. *A. tumefaciens* ist ebenfalls ubiquitär in der Umwelt vorkommend. In Wildtyp-Agrobakterien befinden sich die genannten Sequenzen auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation zwischen verschiedenen Rhizobiaceen ausgetauscht werden können. Mais, Gerste und Weizen sind als landwirtschaftliche Nutzpflanzen in den Anbauregionen weltweit verbreitet.

(f) Weitere DNA-Sequenzen

Durch den Einsatz der Mikroprojektil-Beschuss-Technik zur Transformation können weitere Fragmente der zur Transformation eingesetzten Plasmide in das Genom der gentechnisch veränderten Weizenpflanzen integriert worden sein. Diese sind nicht kodierend und ohne regulatorische Funktion, eine Übertragung durch horizontalen Gentransfer in Mikroorganismen wäre daher nicht von Bedeutung.