



Bescheid 6786-01-0210 / 42010.0210

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde**

Berlin, den 25. Mai 2012

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. 2 GenTG
 - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 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.1.3. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing-House zusammengestellt.

III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG

Die gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG geforderte Genehmigungsvoraussetzung, dass nach dem Stand der Wissenschaft im Verhältnis zum Zweck der Freisetzung unvermeidbare schädliche Einwirkungen auf die in § 1 Nr. 1 GenTG bezeichneten Rechtsgüter nicht zu erwarten sind, ist erfüllt, wie im Folgenden begründet wird.

III.1.3.1. Bewertung der durch die übertragenen Nukleinsäuresequenzen bewirkten Veränderungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen

(a) Das *gfp*-Gen

Fluoreszierende Proteine sind stabile Proteine, die sich als Reporter zum Nachweis von Genexpression und Proteinlokalisierung in lebenden Zellen nach Anregung mit UV-Licht eignen. Reportergene werden vielfältig in Organismen und Zellkulturen eingesetzt. Das *Green Fluorescent protein* (GFP) aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* wird unter anderem in gentechnisch veränderten Pflanzen, (phytopathogenen) Pilzen, Nematoden, Mäusen und Zebrafischen als Reporterprotein gebildet. Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Vitalität dieser Organismen liegen nicht vor. In einer Fütterungsstudie mit Nagern wurde gezeigt, dass von GFP keine gesundheitlichen Risiken ausgehen. Aus einem Vergleich der Aminosäuresequenz mit der bekannter Allergene sowie aus dem Stabilitätstest von GFP in simulierter Magenflüssigkeit ergeben sich keine Hinweise auf ein allergenes Potential von GFP (Richards *et al.*, 2003).

Vor dem Hintergrund der vorliegenden Untersuchungen, der bereits in der gentechnisch veränderten Pflanze angelegten sowie im Rahmen der Versuchsdurchführung geplanten Sicherheitsmaßnahmen und der Größe des Vorhabens sind schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen und die Umwelt als Schutzgüter des § 1 Nr. 1 GenTG nicht zu erwarten. Weitere Sicherheitsmaßnahmen sind nach dem Stand von Wissenschaft und Technik daher nicht erforderlich.

(b) Das *aadA*-Gen

Nach § 6 Abs. 1 Satz 2 GenTG, der 2005 in Umsetzung von Artikel 4 der Freisetzungsrichtlinie 2001/18 eingefügt wurde, ist in der Risikobewertung eine Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in gentechnisch veränderten Organismen, die Resistenz gegen in der ärztlichen oder tierärztlichen Behandlung verwendete Antibiotika vermitteln, im Hinblick auf die Identifizierung und die schrittweise Einstellung der Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in gentechnisch veränderten Organismen, die schädliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt haben können, für die Freisetzung bis zum 31. Dezember 2008 besonders zu berücksichtigen. Nach dem 1. Januar 2009 ist danach die Verwendung solcher Antibiotikaresistenzmarker bei Freisetzungen nicht mehr zulässig. Vor diesem Hintergrund wird das in die Tabakplastiden übertragene *aadA*-Gen wie folgt bewertet.

Das in die Tabakplastiden übertragene *aadA*-Gen [*ant*(3'')-Ia; Strep^R/Spec^R] stammt aus dem Plasmid R-538-1 von *E. coli*. Das Gen kodiert für das Enzym Aminoglycosid-3'-

Adenyltransferase welche die 3"-Hydroxyl-Position des N-Methyl-L-Glucosamin-Rings von Streptomycin bzw. die 9-Hydroxyl Position von Spectinomycin modifiziert. Das übertragene *aadA*-Gen steht unter der Kontrolle des Promoters und Terminators des plastidären *psbA*-Gens aus *N. tabacum*.

Das *aadA*-Gen vermittelt eine Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin. Das Vorkommen des *aadA*-Gens wurde in einer Vielzahl von Bakterien in verschiedenen Medien wie Boden, Abwasser, Meerwasser, Nahrungsmitteln, klinischen Proben und Fäzes nachgewiesen. Bakterien mit einer Resistenz gegenüber Streptomycin/Spectinomycin sind in der Umwelt weit verbreitet. Eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten.

Diese Antibiotika werden nur begrenzt in der Humanmedizin eingesetzt, besitzen aber durchaus noch für die Behandlung der Tuberkulose (Streptomycin) oder der Gonorrhoe (Spectinomycin) humanmedizinische Bedeutung, wenn Mittel mit geringerer potentieller Toxizität nicht eingesetzt werden können.

Die gentechnisch veränderten Tabakpflanzen sollen auf einer begrenzten Fläche für einen begrenzten Zeitraum freigesetzt werden. Eine Verwendung der Pflanzen als Tierfutter oder für die menschliche Ernährung ist ausgeschlossen. Aufgrund der sehr geringen Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen-DNA auf Mikroorganismen und der Abwesenheit eines Selektionsdrucks auf den Freisetzungsf lächen ist nicht davon auszugehen, dass die Präsenz des *aadA*-Gens in den gentechnisch veränderten Tabakpflanzen zu einer messbaren Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen würde.

Für das *aadA*-Gen hat die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) in ihrer Stellungnahme vom Dezember 2008 festgestellt, dass vor dem Hintergrund der Unwahrscheinlichkeit des horizontalen Gentransfers zwischen Pflanzen und Mikroorganismen sowie der bereits bestehenden Verbreitung des *aadA*-Gens in der Umwelt das Vorhandensein des *aadA*-Gens im Genom der gentechnisch veränderter Pflanzen keine Auswirkung auf die Verbreitung dieses Antibiotika-Resistenzgenes in der Umwelt zur Folge hat.

Das GMO-Panel der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat in seinem Gutachten über die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen als Markergene in gentechnisch veränderten Pflanzen vom 26. März 2009 festgestellt, dass nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht mit negativen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt durch eine Übertragung des *aadA*-Gens von Pflanzen auf Bakterien zu rechnen ist.

Es ist nicht zu erwarten, dass Pflanzen durch die Expression des *aadA*-Gens aus *E. coli* einen Selektionsvorteil erhalten, da eine Exposition der Pflanzen gegenüber Streptomycin oder Spectinomycin im landwirtschaftlichen oder natürlichen Ökosystem nicht zu erwarten ist.

Im Einklang mit den Stellungnahmen der ZKBS und des GMO-Panels der EFSA wird daher nicht von schädlichen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt und auf die sonstigen Schutzgüter des § 1 Nr. 1 GenTG ausgegangen. Danach ist die Verwendung des *aadA*-Gens bei Freisetzungen auch nach dem 1. Januar 2009 noch zulässig. Weitere Sicherheitsvorkehrungen sind nach dem Stand von Wissenschaft und Technik somit nicht erforderlich.

(c) Weitere DNA-Abschnitte der eingesetzten Transformationsplasmide

Die Transformation der Tabakpflanzen *N. tabacum* der Varietät „Petit Havana“ erfolgte mit Hilfe von Partikelbeschuss mit DNA-beladenen Goldpartikeln. Hierbei wurde das vom Plasmid pUC119 abgeleitete Plasmid pDK53 in der Transformation eingesetzt. Im Plasmid pDK53 sind folgende genetische Elemente des Ursprungsplasmids pUC119 enthalten:

- Ampicillinresistenzgen *bla*_{TEM-1}
- bakterieller Replikationsursprung *ori*

Zur Erleichterung der Integration des gewünschten Fragments in die Plastiden-DNA durch homologe Rekombination wurden plastidäre Sequenzen vor und hinter die Klonierungsstelle des Transgens in pUC119 eingefügt. Diese flankierenden Sequenzen entsprechen einerseits einer Teilsequenz der 16S RNA Untereinheit (*rrn16*) inklusive benachbarter Sequenzen für die plastidäre tRNA-Valin (*trnV*), andererseits der 3' untranslatierten Region des ribosomalen Proteins S12 (*rps12*) aus Tabak. Die *rrn16*- und *rps12/7*-Sequenzen dienen der Integration der Fremdgene in die Plastiden-DNA des Tabaks durch zwei *crossing over* in den entsprechenden homologen plastidären Regionen.

Die mögliche Übertragung von Teilen des Vektorrückgrats, insbesondere des bakteriellen Ampicillinresistenzgens *bla*_{TEM-1}, in das plastidäre oder das nukleäre Genom der Tabakpflanze wurde vom Antragsteller mittels PCR-Analyse untersucht, bei der je ein *bla*-Gen spezifischer und ein backbone-spezifischer Primer verwendet wurde. Aus der DNA von *N. tabacum* konnte mit diesen beiden Primern kein spezifisches PCR-Fragment amplifiziert werden. Auch wenn damit die Übertragung des funktionellen Ampicillinresistenzgens *bla*_{TEM-1} aus dem Vektorrückgrat unwahrscheinlich ist, kann über das Vorhandensein des Ampicillinresistenzgens *bla*_{TEM-1} und weiterer Sequenzen des Vektorrückgrats mit dieser Untersuchung keine sichere Aussage getroffen werden. Der Risikoabschätzung wird daher zugrunde gelegt, dass sie in den Pflanzen enthalten sind.

Die genannten Abschnitte außerhalb der für eine homologe Rekombination geeigneten Region sind für die Expression in Bakterien bestimmt und haben in Pflanzen keine Funktion. Eine Bildung signifikanter Mengen funktionsfähiger Genprodukte basierend auf diesen Sequenzen ist in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten, da sie nicht unter der Kontrolle pflanzenspezifischer Promotoren stehen und nicht der pflanzlichen Codonnutzung angepasst sind.

Deshalb sind auch aufgrund der weiteren DNA-Abschnitte der eingesetzten Transformationsplasmide schädliche Einwirkungen auf die in § 1 Nr. 1 GenTG geschützten Rechtsgüter nicht zu erwarten. Weitere Sicherheitsvorkehrungen sind nach dem Stand von Wissenschaft und Technik daher nicht angezeigt.

(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 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 pflanzeneigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Bisher existieren jedoch keine Hinweise für solche Beeinflussungen. Die gentechnisch veränderten Tabakpflanzen wiesen den Angaben der Antragstellerin zufolge bei Versuchen im Gewächshaus keine phänotypischen Unterschiede zu den isogenen Ausgangspflanzen auf.

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 sichere Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Da die Pflanzen nicht als Lebens- oder Futtermittel genutzt werden und nur auf einer begrenzten Fläche angebaut werden, ist nicht mit Risiken für die menschliche Gesundheit und das Leben i.S.d § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG durch eine potentiell allergene Wirkung zu rechnen. Diesbezügliche weitere Sicherheitsvorkehrungen sind nach dem Stand von Wissenschaft und Technik daher nicht erforderlich.

III.1.3.2. Bewertung der Fähigkeit der gentechnisch veränderten Pflanzen, im Freiland zu überdauern oder sich zu etablieren

N. tabacum gehört zur Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) und ist eine einjährig kultivierte Pflanze, welche bis zu 3 m hoch wächst. Eine einzelne Pflanze kann bis zu 150 Blüten tragen und bis zu mehrere 100.000 sehr kleine Samen produzieren (Tausendkorngewicht 0,06 bis 0,08 g).

Die minimale Keimtemperatur von Tabaksamen liegt bei 10°C. Die Samen gehören zu den Lichtkeimern. Zu große Feuchtigkeit und zeitweise Trockenheit beeinflussen das Auflaufen negativ. Selbst Kälte adaptierte Keimlinge können Temperaturen unter -3°C nur für wenige Stunden tolerieren. Ausgewachsene Tabakpflanzen sind definitiv frostempfindlich. Aus diesen Gründen werden beim Anbau meist nicht Samen, sondern die unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus vorgezogenen Pflanzen ausgebracht.

Tabaksamen bleiben über viele Jahre hinweg keimfähig. Im Boden können Tabaksamen unter Umständen mehrere Jahre überdauern.

Über Durchwuchs von *N. tabacum* in Folgekulturen wird in der Literatur nicht berichtet. Außerhalb von landwirtschaftlichen Nutzflächen werden verwilderte Tabakpflanzen nur sehr selten beobachtet, z.B. auf frisch aufgeworfener Erde an Baustellen. Eine dauerhafte Etablierung wurde bisher nicht beobachtet.

Da bei den beantragten Versuchen im Gewächshaus vorgezogene Tabakpflanzen ausgepflanzt werden sollen, besteht eine gegenüber der Direktaussaat stark verringerte Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins ungekeimter Samen. Die transplastomen Donorpflanzen sollen unmittelbar nach Entnahme der Pollen (noch vor der Samenreife) abgeschnitten werden, so dass Samenverluste von den gentechnisch veränderten Tabakpflanzen selbst verhindert werden. Von den Samen der nicht gentechnisch veränderten Rezeptorpflanzen, welche bei der Ernte der Samenkapseln möglicherweise verloren gehen, wird erwartungsgemäß

nur ein sehr geringer Anteil gentechnisch veränderte Plastiden enthalten (siehe Kap. III.1.3.3.). Sollten diese Samen im Anschluss an die Freisetzungen auflaufen, so würden diese Pflanzen im Rahmen der Nachkontrolle erfasst und vernichtet werden.

Auch unter diesem Gesichtspunkt ist somit keine schädliche Einwirkung i.S.d. § 16 Abs. 1 Nr. 3 auf die geschützten Rechtsgüter zu erwarten. Über die vorgesehenen Sicherheitsvorkehrungen hinaus sind somit nach dem Stand von Wissenschaft und Technik keine weiteren erforderlich.

III.1.3.3. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Gene von den gentechnisch veränderten Pflanzen durch Pollen auf andere Pflanzen

Der Zweck des hier beantragten Vorhabens zur Freisetzung ist nach Angaben der Antragstellerin, die pollenvermittelte Übertragung der gentechnischen Veränderung von transplastomen Tabakpflanzen auf benachbarte nicht gentechnisch veränderte Tabakpflanzen im Freiland nachzuweisen bzw. zu quantifizieren. Dieser Zweck setzt voraus, dass die gentechnisch veränderten Pflanzen zur Blüte gelangen. Dadurch kann es zu einer Übertragung von Pollen der gentechnisch veränderten Pflanzen auf andere Pflanzen kommen.

N. tabacum gehört zu den fakultativ selbstbefruchtenden Pflanzen. In der Blüte setzen die Antheren die Pollen häufig vor oder während der Öffnung der Blütenkrone frei, so dass ein Großteil der Samenanlagen bereits bei Öffnung der Blüten befruchtet sein kann. Der Pollentransfer erfolgt vornehmlich durch Insekten wie z.B. Honigbienen (*Apis mellifera* L.), Hummeln (*Bombus* species) sowie Schwebfliegenarten (*Syrphidae*) und verschiedene Schwärmer (*Sphingidae*).

Bei den in der Literatur angegebenen Fremdbefruchtungsraten bis zu 4% handelt es sich um Mittelwerte. Einzelne Blüten können Fremdbefruchtungsraten bis zu 50 % aufweisen. Es ist davon auszugehen, dass die Fremdbefruchtungsrate grundsätzlich mit zunehmender Dichte der auftretenden Bestäuber steigt, während sie mit zunehmender Entfernung zwischen Donor- und Empfängerpflanze stark abnimmt. Während zwischen direkt nebeneinander stehenden Tabakpflanzen mittlere Auskreuzungsraten bis zu 10 % beobachtet werden, beträgt die Auskreuzungsrate in 10 m entfernt stehende Empfängerpflanzen bereits weniger als 1 %.

Im Bezug auf das beantragte Vorhaben ist weiterhin zu berücksichtigen, dass eine pollenvermittelte Übertragung von plastidär lokalisierten genetischen Informationen grundsätzlich wenig wahrscheinlich ist. Nachdem für *N. tabacum* ursprünglich eine ausschließlich maternale Vererbung von Plastiden angenommen worden war, wurde 1986 erstmalig überhaupt die paternale Übertragung von Plastiden nachgewiesen. Unter Gewächshausbedingungen wurde mit den hier beantragten Elternlinien die pollenvermittelte Übertragung der gentechnisch

veränderten Plastiden mit einer Frequenz von etwa 2×10^{-5} in Kotyledonen (für die Weitergabe an folgende Generationen nicht relevant) und von etwa 3×10^{-6} in Sproßmeristeme (relevant für die Weitergabe an folgende Generationen über die Keimbahn) der F1-Generation nachgewiesen. In anderen Versuchen wurden für *N. tabacum* höhere Übertragungsraten plastidär kodierter Marker von bis zu 2×10^{-2} in Kotyledonen und von 5×10^{-3} in Sproßmeristeme der F1-Generation ermittelt.

Um die Übertragungsraten zu erhöhen, wird in diesen Experimenten mit männlich sterilen Empfängerpflanzen gearbeitet. Auf Grund der vorhandenen Pollenkonkurrenz wäre zu erwarten, dass die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung der plastidär lokalisierten gentechnischen Veränderungen auf männlich fertile Tabakpflanzen noch unter den zuvor berichteten Werten liegt. Bei entsprechenden Experimenten mit *N. tabacum* wurde allerdings festgestellt, dass für die paternale Vererbung von Plastiden in die F1-Generation bei Übertragung der Pollen auf männlich sterile Empfängerpflanzen ähnliche Raten (1×10^{-4} bis 8×10^{-4}) wie bei Übertragung der Pollen auf männlich fertile Empfängerpflanzen (3×10^{-5} bis 6×10^{-4}) aufweist. Den vorliegenden Informationsstand zusammenfassend ist für *N. tabacum* eine pollenvermittelte Übertragung plastidär lokalisierter genetischer Informationen in die Sproßmeristeme von Pflanzen der F1-Generation mit einer (geringen) Häufigkeit im Bereich von 5×10^{-3} bis 3×10^{-6} zu erwarten.

Bei der Bewertung der pollenvermittelten Übertragung von plastidär lokalisierten genetischen Informationen ist weiterhin zu berücksichtigen, dass bei Pflanzen in durchaus relevantem Umfang plastidäre DNA in das Kerngenom transferiert werden kann. Für die Risikoabschätzung ist weiterhin relevant, dass nach einem solchen Transfer möglicherweise übertragene Gene nur unter bestimmten Bedingungen funktional werden können. Nach bisherigen Erkenntnissen ist das Eintreten eines solchen Ereignisses (plastidäre DNA wird in Kerngenom transferiert und funktional) mit einer insgesamt sehr geringen Häufigkeit von 10^{-14} bis 10^{-15} zu erwarten.

Grundsätzlich ist nicht auszuschließen, dass außerhalb der Versuchsflächen Kreuzungspartner von *N. tabacum* vorhanden sind. Kultivierter Tabak in Gärten oder Balkonkästen kann in den angrenzenden Ortschaften vorkommen, der minimale Abstand beträgt an beiden beantragten Standorten 100 m. In der Nebenbestimmung II.11. wird angeordnet, dass kreuzungskompatible Tabakpflanzen, welche innerhalb eines Abstandes von 100 m um die Freisetzungsf lächen zur Blüte kommen, wie gentechnisch veränderte Tabakpflanzen behandelt werden sollen. Diese Maßnahme dient der räumlichen Begrenzung der Freisetzung.

Die Hauptanbauggebiete für Tabak in Deutschland liegen in Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz. In Sachsen-Anhalt wurden in 2008 auf 49,74 ha Tabak von 16 verschiedenen Anbauern kultiviert. Für Mecklenburg-Vorpommern finden sich in der Literatur keine Angaben

zu größeren Anbaugebieten. Da kommerziell angebauter Tabak zur Verbesserung der Tabakqualität häufig geköpft wird, kann unter diesen Bedingungen eine etwaige Bestäubung dieser Pflanzen mit dem Pollen der gentechnisch veränderten Pflanzen nicht erfolgen.

Außer dem virginischen Tabak (*N. tabacum*) kommen in Deutschland weitere Nicotiana-Arten, wie z.B. der Bauerntabak (*N. rustica*), der Berg- oder Duft-Tabak (*N. sylvestris*), der Flügel-Tabak (*N. alata*) und der Sanders Tabak (*N. x sanderae*) als Kultur- und Zierpflanzen vor. Natürliche Kreuzungsprodukte zwischen *N. tabacum* und *N. rustica* führen allerdings, wenn sie überhaupt entstehen, nur in stark reduziertem Umfang zu lebensfähigen Nachkommen. Für die anderen genannten Arten kann eine Hybridisierung mit *N. tabacum* nicht ausgeschlossen werden.

Die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung der gentechnischen Veränderung auf diese Pflanzen ist insgesamt sehr gering, da wie oben dargelegt zum einen die Auskreuzungsrate der paternal vererbten transplastomen Merkmale sehr gering ist und diese zum anderen mit zunehmender Entfernung zu den Spenderpflanzen stark abnimmt.

Eine schädliche Einwirkung auf die Schutzgüter des § 1 Nr. 1 GenTG – etwa in Form einer Beeinträchtigung der Vermarktungsfähigkeit von Tabaksaatgut – ist aufgrund der genannten Faktoren nicht zu erwarten. Diesbezügliche Sicherheitsvorkehrungen, die über die in der Nebenbestimmung II.11. angeordneten hinausgehen, sind daher nach dem Stand von Wissenschaft und Technik nicht erforderlich.

III.1.3.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von den gentechnisch veränderten Pflanzen durch horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in den Plastiden 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 Aus-

tauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologen Erbmaterial, also jedweder pflanzlichen DNA, möglich wäre.

Somit ist die bloße Anwesenheit von fremder DNA keine schädliche Einwirkung auf Pflanzen oder Mikroorganismen. Eine schädliche Einwirkung wäre es z.B., wenn eine Auskreuzung zu einer toxikologisch relevanten Veränderung von Pflanzen führen würde, die für den menschlichen Verzehr bestimmt sind (vgl. *Dederer* in Eberbach/Lange/Ronellenfitsch, GenTR/BioMedR, Band 1, § 16 Rn. 100). Hiervon ist allerdings – wie folgt dargelegt wird – nicht auszugehen.

(a) Das *gfp*-Gen

Das *gfp*-Gen stammt aus dem Genom der Qualle *Aequorea victoria* und wird seit langem als Reporter gen bei Expressionsuntersuchungen an Pro- und Eukaryoten eingesetzt. Für den unwahrscheinlichen Fall eines horizontalen Gentransfers von den transplastomen Pflanzen auf Mikroorganismen ist kein Selektionsvorteil durch das übertragene *gfp*-Gen zu erkennen.

(b) Das *aadA*-Gen

Das *aadA*-Gen ist in Boden- und Enterobakterien bereits weit verbreitet und wird in klinischen Isolaten wie auch in probiotischen als Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie verwendeten Bakterien häufig nachgewiesen. Aufgrund der weiten Verbreitung des *aadA*-Gens bei Mikroorganismen wäre selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers keine erkennbare Erhöhung der Gesamtfrequenz des Gens zu erwarten.

Entsprechend kommt die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) in ihrer Stellungnahme von 2009 kommt zu dem Schluss, dass der derzeitige Kenntnisstand nahelegt, dass durch den Transfer des *aadA*-Gens von Pflanzen auf Bakterien keine negativen Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt zu erwarten sind.

(c) Weitere auf den Transformationsplasmiden gelegene DNA-Abschnitte

Die gentechnisch veränderten Tabakpflanzen können Teilsequenzen folgender genetischer Elemente enthalten, die auf den verwendeten Plasmiden liegen:

- das Ampicillinresistenzgen *bla*_{TEM-1} und
- ein bakterieller Replikationsursprung *ori*.

Das *bla*_{TEM-1}-Gen vermittelt Resistenz gegen Ampicillin, einen halbsynthetischen, antibiotisch wirksamen Arzneistoff aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika. Das *bla*_{TEM-1}-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. Jüngste Studien zu Antibiotikaresistenzen von Mikroorganismen in der Umwelt zeigen, dass ein hoher Anteil von Bodenbakterien natürlicherweise gegen ein breites Spektrum von β -Lactam-Antibiotika resistent ist, welches unter anderem durch Polymorphismus des *bla*-Gens in diesen Mikroorganismen begründet ist. Weiterhin zeigen jüngste Ergebnisse von Feldstudien, dass z.B. eine 10-jährige Monokultur von gentechnisch verändertem Mais, welcher das *bla*-Gen enthält, an der Verbreitung der natürlich vorkommenden, bodenbakteriellen Antibiotika-Resistenzen im Vergleich zum konventionellen Anbau nichts ändert.

Die ZKBS hat Antibiotikaresistenzmarkergene in gentechnisch veränderten Pflanzen in ihrer Stellungnahme vom Dezember 2008 in einheitlicher Weise (ohne die Berücksichtigung der 1999 aufgestellten Gruppen) in die Sicherheitsbewertung von gentechnisch veränderten Pflanzen einbezogen. Gleichzeitig ist in die jetzt vorgenommene Sicherheitsbewertung des horizontalen Gentransfers (HGT) von solchen Markergenen aus gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien der neue wissenschaftliche Erkenntnisgewinn eingeflossen. Dies hat zu der Schlussfolgerung geführt, dass solche HGT-Ereignisse, falls sie stattfinden, in ihrem Gewicht vernachlässigbar gegenüber den natürlichen Prozessen ihrer Übertragung und Neuentstehung und der natürlichen Präsenz der betrachteten Resistenzgene in der globalen Mikroorganismen-Gesellschaft sind.

Für den Replikationsursprung *ori* zur Plasmidreplikation 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.

(d) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Die Regulationssequenzen stammen aus Plastiden von *N. tabacum*, der als landwirtschaftliche Nutzpflanze weltweit in vielen Anbauregionen angebaut wird.

Aufgrund der oben aufgezeigten Sachlage sind nach dem Stand von Wissenschaft und Technik keine weiteren Sicherheitsvorkehrungen erforderlich.

III.1.3.5. Bewertung der Möglichkeit eines Eintrags der auf gentechnischen Arbeiten beruhenden Eigenschaften der Tabakpflanzen mit dem Pollen in Imkereiprodukte

Wie bereits in Kapitel III.1.3.3. ausgeführt, setzt der Zweck der beantragten Freisetzung voraus, dass die genetisch veränderten Pflanzen zur Blüte gelangen. Für das vorliegende Vorhaben kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass auf Grund der systematischen Sammeltätigkeit von Bienen Pollen, in dem die gentechnische Veränderung nachweisbar ist, in Imkereiprodukte eingetragen wird. Dadurch würde in Folge der Entscheidung des Europäischen Gerichtshofs vom 06.09.2011 (Rechtssache C-442/09) die Vermarktungsfähigkeit dieser Produkte ausgeschlossen, da der im gegenständlichen Freisetzungsversuch verwendete GVO in der Europäischen Union keine allgemeine Zulassung als Lebensmittel hat. Legt man einen Radius von 5000 Metern (Abschätzung der maximalen Distanz für regelmäßige Sammelaktivitäten von Bienen) um die Freisetzungsstandorte zugrunde, so wären etwa 12 Imker am Standort Thulendorf und etwa 4 Imker am Standort Ausleben betroffen, wobei sich diese Angaben für Thulendorf aus den Wohnorten der gemeldeten Imker und für Ausleben aus den gemeldeten Standorten von Bienenstöcken ergeben.

Im Bezug auf das beantragte Vorhaben ist zu berücksichtigen, dass plastidär lokalisierte genetische Informationen in Pollenkörnern wahrscheinlich nur in geringerem Umfang enthalten sind als in vegetativen Zellen. Es liegen allerdings keine Informationen darüber vor, ob und in welchem Umfang die Nachweisbarkeit der gentechnischen Veränderung im Pollen mit den experimentell bestimmten Frequenzen einer paternalen Vererbung plastidär lokalisierter genetischer Informationen (siehe III.1.3.3.) übereinstimmt. Entstehung und Aufbau von Pollenkörnern lassen vermuten, dass plastidär lokalisierte genetische Informationen häufiger in Pollenkörnern nachweisbar sind, als sie tatsächlich in die nächste Generation übertragen werden.

Pollen kann in der Blüte in den Nektar fallen und von der Biene zusammen mit dem Nektar aufgenommen werden. Diese primäre Einstäubung ist mengenmäßig der wichtigste Eintrag von Pollen in Honig. Die sekundäre Einstäubung erfolgt im Bienenstock. Der in den Bienenstock gezielt eingetragene Pollen oder an Bienen anhaftender Pollen gelangt zufällig in den eingelagerten Honig.

Es besteht die Möglichkeit, dass Bienen gezielt Tabakpflanzen anfliegen, um Pollen zu sammeln und getrennt von Honig in spezifischen Waben einzulagern. Deshalb könnte Tabakpollen auch in Pollenprodukten auftreten.

In Abhängigkeit von der Landschaftsstruktur und dem Nahrungsangebot werden durchschnittliche Sammeldistanzen zwischen 0,5 und 5,5 km beschrieben. Darüber hinaus werden auch deutlich entfernte Trachtpflanzen angefliegen. Beschrieben sind Sammeldistanzen bis über 10 km. Große Sammeldistanzen wurden nur in sehr intensiv genutzten Agrarräumen ohne für Bienen attraktive Trachtpflanzen beobachtet. Wenn Honigbienen von ihrem Stock weit entfernte Trachtpflanzen anfliegen, dann werden diese intensiv befliegen und besammelt. In der Literatur ist beschrieben, dass Bienen Tabakblüten aufsuchen, es gibt jedoch keine Hinweise dafür, dass Tabakpflanzen besonders wertvolle und attraktive Trachtpflanzen darstellen.

Eine genaue Abschätzung von Abständen, mit denen ein Eintrag von gentechnisch verändertem Pollen aus bestimmten Standorten in den Honig einzelner Bienenstöcke vermieden werden kann, ist aufgrund der komplexen Zusammenhänge nicht möglich. Der Stand der Wissenschaft belegt, dass verschiedene Faktoren wie z.B. Landschaftsstruktur, Nahrungsangebot, Wetterverhältnisse das Sammelverhalten von Bienen beeinflusst. Daraus lässt sich ableiten, dass zwischen Sammelradien und dem Anteil des Pollens im Honig kein monokausaler Zusammenhang existiert. Eine genaue Abschätzung der Wirksamkeit von Abständen ist daher nicht möglich. Bei Abständen von mehr als 10 km ist der Eintrag von gentechnisch verändertem Pollen zwar nahe Null, kann aber auch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Auf Grund des komplexen Wirkungszusammenhanges ist auch die Anlage einer Mantelsaat mit noch attraktiveren Trachtpflanzen keine geeignete Maßnahme, um den Eintrag von Pollen in Honig zu minimieren oder auszuschließen. Insbesondere kommt auch das Anbringen von bienendichten Netzen nicht in Betracht, da der Versuchszweck gerade erfordert, dass normale Freilandbedingungen (z.B. Lichtverhältnisse, Mikroklima) vorliegen.

Es ist nach dem Stand der Wissenschaft somit davon auszugehen, dass durch die hier gegenständliche Freisetzung Imkereiprodukte als Sachgüter i.S.d. § 1 Nr. 1 GenTG potentiell schädlichen Einwirkungen ausgesetzt sein könnten. Diese potentielle schädliche Einwirkung liegt jedoch nicht in einer möglichen Gesundheitsgefahr für Menschen, sondern lediglich in der eingeschränkten Vermarktungsfähigkeit von Produkten, die gentechnisch veränderten Pollen enthalten. Nach dem Stand von Wissenschaft und Technik existieren – wie dargelegt – für das vorliegende Freisetzungsvorhaben jedoch keine adäquaten Sicherheitsvorkehrungen, die einerseits den Eintrag von Pollen in Imkereiprodukte minimieren und andererseits den Versuchszweck nicht gefährden würden.