



**Bescheid 6786-01-0114 / 42010.0114**

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Erbsen  
(*Pisum sativum* L.) pGPTV-BAR::USPPAMYL  
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,  
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde  
Berlin, den 27. Januar 2000**

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 Erbsen**

**(a)  $\alpha$ -Amylase-Gen**

Die gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen enthalten 1800 bp der 1948 bp großen AmyLi-Sequenz ( $\alpha$ -Amylase-Gen) aus *B. licheniformis* unter der Kontrolle des samenspezifischen USP-Promotors der Ackerbohne (*Vicia faba*) und der Terminatorsequenz des ocs-Gens aus *A. tumefaciens*.

$\alpha$ -Amylasen wirken am Abbau von Stärken mit, indem sie die  $\alpha$ -1,4-glykosidischen Bindungen von Oligo- und Polysacchariden hydrolysieren. Sie kommen außer in Bakterien auch bei Pilzen, höheren Pflanzen und Tieren vor. Amylasen werden vielfältig in der Gärungs- und Backwarenindustrie eingesetzt. Die übertragene  $\alpha$ -Amylase aus *B. licheniformis* zeichnet sich nach Angaben der Antragstellerin durch eine hohe Hitzestabilität und ein breites pH-Optimum (stabil bei 25 °C bei pH 6 – 11 sowie bei der Optimaltemperatur 76 °C bei pH 9) aus.

Der USP-Promotor ist Bestandteil des USP-Gens, das aus den reifen Kotyledonen von *V. faba* durch die Antragstellerin isoliert wurde. Proteine, vergleichbar dem USP-Protein, werden auch bei anderen Pflanzenarten gefunden. Obwohl die Funktion des Proteins bisher noch unbekannt ist, liegen Kenntnisse zur Funktion des Promotors vor. Es handelt sich um einen starken Promotor, der nach Angaben der Antragstellerin früh in der Samenentwicklung aktiv wird.

Gentechnisch veränderte Erbsenpflanzen, in denen das bakterielle  $\alpha$ -Amylase-Gen homozygot vorliegt, zeigen nach den Angaben der Antragstellerin auch in der fünften Generation im Gewächshaus keine signifikanten Gestalts- und sonstigen Habitus-Veränderungen. Das Gen wird stabil vererbt und exprimiert.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich unter Freilandbedingungen Auswirkungen der rekombinanten  $\alpha$ -Amylase auf die Pflanzen bemerkbar machen. Die rekombinante  $\alpha$ -Amylase wird in Proteinkörpern lokalisiert. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, daß es auch bei suboptimalen Temperaturen zu einem Abbau der endogenen Samenstärke, dem Hauptbestandteil von Erbsensamen (ca. 70 %), kommt. Dabei entsteht vorwiegend Maltose, Maltotriose und  $\alpha$ -Dextrin. Die Folge einer partiellen Veränderung der Kohlenhydratzusammensetzung könnte möglicherweise den osmotischen Wert der Samen verändern und die Frosttoleranz u. U. erhöhen. Eine unerwünschte Aussaat der Erbsensamen wird jedoch durch die vorgesehenen Sicherheitsmaßnahmen verhindert.

Schädliche Auswirkungen für die Rechtsgüter des § 1 Nr. 1 GenTG lassen sich nicht ableiten,

#### (b) Das *bar*-Gen

Das *bar*-Gen steht in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter der Kontrolle des Promotors des *nos*-Gens sowie der Terminatorsequenz des *g7*-Gens aus *A. tumefaciens*. Es wurde zur Selektion transformierter Pflanzenzellen verwendet.

Das *bar*-Gen kodiert für eine Acetyltransferase (PAT), die sehr spezifisch die Acetylierung von L-Phosphinothricin katalysiert. L-Phosphinothricin, ein Analogon der Glutaminsäure, ist der aktive Bestandteil des Herbizidwirkstoffs Glufosinat-Ammonium (= Ammonium-D,L-Phosphinothricin) und inhibiert durch kompetitive Hemmung die Glutaminsynthetase. 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.

Nach Anwendung von Glufosinat-Ammonium kommt es in nicht-gentechnisch veränderten Geweben zu einer Ammonium-Akkumulation und infolgedessen zum Absterben der Zellen.

In den gentechnisch veränderten Geweben wird L-Phosphinothricin durch die Acetylierung in das Derivat *N*-Acetyl-Phosphinothricin überführt, das keine herbizide Wirkung besitzt. 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. Mit dem Auftreten neuer Stoffwechselprodukte aufgrund der Expression des *bar*-Gens in den Pflanzen ist daher in Abwesenheit des Substrates nicht zu rechnen. D-Phosphinothricin wird durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase nicht metabolisiert.

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.

Eine Phosphinothricin-Behandlung der Freisetzungsfläche ist nicht vorgesehen.

(c) Das *uidA*-Gen (GUS-Gen)

Das *uidA*-Gen, das für das Enzym  $\beta$ -Glucuronidase kodiert, ist promotorlos und enthält die Nopalinsynthase-Terminationsregion von *A. tumefaciens*. Es ist Bestandteil der Ti-Region des zur Transformation eingesetzten Vektors pGPTV-BAR und wird als Reportergen für Promotoruntersuchungen eingesetzt. Eine Expression des *uidA*-Gens in den gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen ist nicht zu erwarten.

(d) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der T-DNA des Plasmids pTiT37 aus *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirken, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region der in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamm EHA105 vorhandenen Deletionsvariante des Helferplasmids pTiBo542, das nicht in die Pflanzen übertragen wurde, die Integration der zwischen den Borderregionen liegenden Gene in das Genom der Erbsenpflanzen. Diese Borderregionen des Ti-Plasmids sind in den gentechnisch veränderten Pflanzen funktionslos und lassen keine Veränderungen in den Pflanzen erwarten.

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

- die Promotorregion USP-Gens aus *Vicia faba*,
- den Promotor des Nopalin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*,
- die Terminatoren des Octopin-Synthase-Gens und des Gens 7 der T-DNA aus *A. tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden kodierenden DNA-Sequenzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Erbsenpflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) und (b).

(e) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel werden bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegenden Sequenzen des verwendeten Vektors in das Pflanzengenom integriert. Eine Übertragung von Sequenzen jenseits der Borderregionen wurde berichtet. Im Fall der Erbsentransformante „pGPTV-BAR::USPPAMYLI“ ist aufgrund der vorliegenden Southern-blot-Ergebnisse sowie Daten zur Expression der übertragenen Gene davon auszugehen, daß keine Sequenzen des Vektors außerhalb der Border übertragen wurden.

(f) 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 es in den Samen der gentechnisch veränderten Pflanzen zu einer Verschiebung des Anteiles verschiedener Kohlenhydrate kommt. 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. Während der Vermehrung der gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus 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, 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.

Erbsen enthalten natürlicherweise allergen wirkende Proteine. Die vorliegenden Informationen lassen jedoch keine Erhöhung des allergenen Potentials der gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen erwarten. Es ist nicht davon auszugehen, daß das promotorlose *uidA*-Gen in den Pflanzen exprimiert wird. Da das neu eingeführte  $\alpha$ -Amylase-Gen in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter der Kontrolle eines samenspezifischen Promotors steht, ist nicht zu erwarten, dass es zu einer Bildung der  $\alpha$ -Amylase in den Erbsenpollen kommt. Aus zahlreichen Freisetzen von Pflanzen, die das *bar*-Gen unter der Kontrolle nicht-gewebespezifischer Promotoren exprimieren, liegen keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

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

Erbsen befinden sich in Mitteleuropa seit mehreren tausend Jahren im landwirtschaftlichen Anbau. Eine Etablierung von Erbsen in natürlichen Ökosystemen wurde dabei in Europa nicht beobachtet. Erbsen sind eine hoch entwickelte Kulturpflanzenart, die außerhalb von Kulturflächen keine Überlebenschance besitzt, da keimende Erbsen konkurrenzschwach gegenüber auf der Keimfläche befindlichen Pflanzenbewuchs (Verunkrautung) sind. Sie können sich daher an solchen Standorten nicht dauerhaft ansiedeln.

Die verwendete Erbsensorte „Erbi“ ist eine sommerannuelle Kulturpflanzensorte, die sich sexuell über Samen vermehrt. Eine vegetative Vermehrung beispielsweise durch Knollen oder Speicherwurzeln findet nicht statt. Eine Verbreitung der Samen im Bestand kann bei Öffnung der Hülsen vor der Ernte erfolgen. Die in Deutschland verwendeten Sommererbsensorten sind frostempfindlich. Erbsensamen können jedoch unter bestimmten klimatischen Bedingungen (milde Winter) überdauern. Sollten Samen im Boden verbleiben, würden bei günstigen Witterungsbedingungen aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die von der Antragstellerin vorgesehene Nachkontrolle erfaßt und von ihr unschädlich entsorgt.

Eine mögliche Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge einer durch die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase induzierte Veränderungen in der Kohlenhydratzusammensetzung ist nicht auszuschließen. Dieses wird durch die vorgesehene Anbaupause von einem Jahr und durch die durchzuführende Nachkontrolle ausreichend berücksichtigt. Ein Auffinden von Durchwuchserbsen wird dadurch ohne Probleme möglich.

Die in der Versuchsplanung des vorliegenden Antrags vorgesehene Verpackung der Samenhülsen vor der Reife sowie die manuelle Ernte schließen eine unbeabsichtigte Ausbreitung der gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen aus. Gegen ein geplantes Verrotten der abgeernteten, mechanisch abgetöteten Erbsenpflanzen auf der Freisetzungsfäche bestehen keine Einwände, da diese Pflanzen sich nicht mehr regenerieren können.

Somit ist weder mit einer Überdauerung noch mit einer Verwilderung der gentechnisch veränderten Pflanzen zu rechnen.

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

*P. sativum* ist fast ausschließlich selbstbefruchtend. Der Anteil der Fremdbefruchtung kann 1-3 % betragen und erfolgt vornehmlich durch Insekten (hauptsächlich Wildbienen). Die Möglichkeit der Pollenübertragung auf die sexuell kompatible Gartenerbse (*P. sativum* ssp. *hortense*) oder die Futtererbse (*P. sativum* ssp. *arvense*) kann daher nicht ausgeschlossen werden, wird aber durch die vorwiegend erfolgende Selbstbefruchtung weitgehend eingeschränkt. Der von der Antragstellerin vorgesehene Abstand von 20 m in allen Richtungen zu landwirtschaftlich genutzten Flächen, bzw. 800 m zu Anbauflächen für Erbsenlinien der Genbank der Antragstellerin ist als hinreichend anzusehen. In Mitteleuropa kommen keine Wildarten der Gattung *Pisum* vor, die mit *P. sativum* bastardisieren können. Für eine Bastardisierung mit anderen Pflanzenarten liegen keine Hinweise vor.

Die Folge einer Befruchtung einzelner Blüten von nicht gentechnisch veränderten Erbsen und eines einmaligen Nachbaus dieser Erbsen wäre das vorübergehende Vorkommen einzelner  $\alpha$ -Amylase-produzierender, Phosphinothricin-toleranter Erbsenpflanzen in der Umgebung der Freisetzungsfläche. Da die eingebrachten Gene den Pflanzen ohne Anwendung von Phosphinothricin keinen Selektionsvorteil verleihen, sind Risiken für die Umwelt oder die Landwirtschaft daraus nicht abzuleiten.

### III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von dem gentechnisch veränderten Erbsen über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten kodierenden DNA-Sequenzen wurden im Zuge der Transformation in Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. 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.

$\alpha$ -Amylasen kommen außer in Bakterien auch bei Pilzen, höheren Pflanzen und Tieren vor. Eine Übertragung des rekombinanten  $\alpha$ -Amylase-Gens auf diese Organismen würde ihnen keine neuartigen Eigenschaften vermitteln. Ein Selektionsvorteil ist nicht zu erwarten. Des weiteren ist ein Austausch von  $\alpha$ -Amylasen zwischen Mikroorganismen (z.B. *Rhizobium*) weitaus wahrscheinlicher als ein horizontaler Gentransfer von den gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen.

Die Inaktivierung von Phosphinothricin durch Acetylierung mit Hilfe der vom *bar*-Gen kodierten Phosphinothricin Acetyltransferase 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.

Das *uidA*-Gen ist in Bakterien natürlicherweise verbreitet. Eine Übertragung des promotorlosen *uidA*-Gens aus der Pflanze auf Bakterien, die natürlicherweise das *uidA*-Gen besitzen, durch Rekombination würde diesen keinen grundsätzlich neuen Phänotyp verleihen. Diese trifft auch für Mikroorganismen zu, denen das *uidA*-Gen fehlt, da das übertragene, promotorlose Gen nicht exprimiert wird.

Außerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte des Vektors konnten mit Hilfe der Southern-blot-Analyse nicht nachgewiesen werden.

#### III.1.2.5. Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen eingesetzte Agrobakterien

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen wurden Agrobakterien verwandt, die die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen eines binären Vektorplasmids enthielten. Die verwendeten Agrobakterien sind, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. nicht mehr zur Tumorinduktion befähigt. Nach erfolgter Transformation wird in der Regel zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Es wurden keine Agrobakterien nachgewiesen.

Selbst wenn noch wenige Agrobakterien im gentechnisch veränderten Pflanzenmaterial verblieben sein sollten, besteht kein Risiko. In Betracht zu ziehen wäre in diesem Fall die Möglichkeit einer Übertragung der Transgene durch die Agrobakterien auf andere Pflanzen. Eine solche Übertragung, wenn sie stattfände, wäre ohne weitere Auswirkungen, denn nach der Transformation einer Pflanzenzelle durch die modifizierten Agrobakterien müßte diese spontan zu einer fertilen Pflanze regenerieren, damit die Transgene an die Nachkommen weitergegeben werden können. Damit ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu rechnen.

Weiterhin wäre eine mögliche Übertragung der Transgene aus Agrobakterien durch horizontalen Gentransfer in andere Bakterien in der Umwelt in Betracht zu ziehen (siehe III.1.2.4).