Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Antrag 6786-01-0147

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch verändertem Raps (*Brassica napus* ssp. *oleifera* (Metzg.) Sinsk.) mit verändertem Fettsäuremuster im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 16. Mai 2003

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.

Dienstsitz Braunschweig
Bundesallee 50, Geb. 247
38116 Braunschweig
Tel: +49 (0)531 21497-0
Fax: +49 (0)531 21497-299

Abt. Pflanzenschutzmittel
Messeweg 11/12
38104 Braunschweig
Tel: +49 (0)531 299-5
Fax: +49 (0)531 299-3002

Dienstsitz Berlin
Mauerstraße 39-42
10117 Berlin
Tel: +49 (0)30 18444-000
Fax: +49 (0)30 18444-89999

Referatsgr. Untersuchungen
Diedersdorfer Weg 1
12277 Berlin
Tel: +49 (0)30 18412-0
Fax: +49 (0)30 18412-2955

III.1.2.1. Bewertung der durch die übertragenen Nukleinsäuresequenzen bewirkten Veränderungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen

(a) Das Acyl-[ACP] Thioesterase-Gen (*ClFatB4*)

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 (*ClFatB4*) kodierten Enzyms aus *Cuphea lanceolata* sind Myristyl- und Palmityl-[ACP]. Als Folge der Bildung dieses Enzyms enthält das in den Samen der gentechnisch veränderten Rapspflanzen gebildete Öl bis zu ca. 20% der normalerweise im Rapsöl nicht vorkommenden Myristinsäure ($C_{14:0}$) und vermehrt Palmitinsäure ($C_{16:0}$).

Die Expression des in den gentechnisch veränderten Rapspflanzen enthaltenen *ClFatB4*-Gens wird durch seinen samenspezifischen Promotor und sein Terminationssignal gesteuert. In einem der beiden verwendeten Konstrukte soll die Expression duch die Vorschaltung des vierfachen Enhancers des 35S-Promotors des CaMV 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. Die neu bzw. in erhöhter Konzentration im Rapsöl auftretenden Fettsäuren Myristinsäure und Palmitinsäure kommen natürlicherweise in anderen pflanzlichen Ölen vor, die der menschlichen Ernährung dienen (z. B. Kokosöl). Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine toxische Wirkung des Enzyms oder des neuen Stoffwechselproduktes erwarten lassen.

(b) Das *nptII*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase. Es 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 Pflanzen 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.

(c) 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 liegenden 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.

Die gentechnisch veränderten Rapspflanzen enthalten ins Genom integriert den geneigenen Promotor und Terminator des *ClFatB4*-Gens sowie den 35S-Promotor und -Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV). Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden kodierenden Sequenzen des *ClFatB4*-Gens und des *nptII*-Gens in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Bildung dieser Proteine in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) und (b).

(d) 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 der zur Transformation des Rapses verwendeten Vektoren pNBM99-ClFatB4 bzw. pNBM99-EnClFatB4.

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 der Plasmide pNBM99-ClFatB4 und pNBM99-EnClFatB4

Die für die Erzeugung der gentechnisch veränderten Rapspflanzen verwendeten Plasmide 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 ermöglicht die Replikation z.B. in *Pseudomonas*-Arten, in *Aeromonas formicans*, *Rhizobium leguminosarum* und in *A. tumefaciens*. 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.

(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 Expressi-

onsstärke 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 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.

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 des *ClFatB4*-Gens durch die Verwendung des geneigenen samenspezifischen Promotors auf die späteren Stadien der Samenreife beschränkt. In Untersuchungen u.a. an nicht zur Freisetzung bestimmten gentechnisch veränderten Pflanzen konnte gezeigt werden, dass der Promotor des *ClFatB4*-Gens in anderen Pflanzenteilen (z.B. Pollen) nicht aktiv ist.

Die Expression des *nptII*-Gens wird von dem konstitutiven 35S-Promotor des CaMV reguliert. Aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus und in den Jahren 1996 bis 2002 im Freiland sowie aus Freisetzungen anderer gentechnisch veränderter Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimieren, liegen keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

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 Pflanzen, 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. und II.7. bis II.9. 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. Rapssamen können, wenn sie in tiefere Bodenschichten gelangen und eine sekundäre Keimruhe eintritt, im Boden mehr als 20 Jahre überdauern.

Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Veränderung der Fettsäurezusammensetzung der Speicherlipide der Samen Einfluss auf die Überdauerungsfähigkeit von Rapssamen nehmen

kann. Derzeit liegen keine experimentellen Daten dazu vor, ob die in den Samen der zur Freisetzung beantragten gentechnisch veränderten Rapspflanzen gebildete Myristinsäure Einfluss auf deren Überdauerungsfähigkeit nimmt. Die Antragstellerin geht jedoch davon aus, dass sie unter den Bedingungen des Freisetzungsortes gegenüber normalen Rapssamen benachteiligt sind, da die Samen der transgenen Linien 30 – 40% gesättigte Fettsäuren im Samenöl enthalten, während Öl aus konventionellen Rapspflanzen zu etwa 90% ungesättigte Fettsäuren enthält. Gesättigte Fettsäuren haben einen deutlich höheren Schmelzpunkt als ungesättigte Fettsäuren und werden wegen der relativ niedrigen Keimtemperaturen unter unseren klimatischen Bedingungen langsamer mobilisiert.

Die Überdauerung von Samen des gentechnisch veränderten Rapses und von ggf. gebildeten Rapsbastarden kann dadurch minimiert werden, dass jeweils im Anschluss an die Ernte durch geeignete Maßnahmen ausgefallene Samen noch während der gleichen Vegetationsperiode zur Keimung gebracht werden und die daraus auflaufenden Pflanzen durch eine mehrmalige flache Bodenbearbeitung vernichtet werden. Diese Maßnahmen sind in dem beantragten Versuch vorgesehen.

Nach Durchführung dieser Maßnahmen dennoch im Boden verbliebene Rapssamen und ggf. Samen von Rapsbastarden gelangen im Verlauf der vorgesehenen 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 bzw. durch die in der Nebenbestimmung II.10. zur Auflage gemachte, mehrjährige Anbaupause und Nachkontrolle nach Versuchsende erfasst und zerstört. Sollten im letzten Jahr der Nachkontrolle noch gentechnisch veränderter Raps oder Rapsbastarde auftreten, so ist die Nachkontrolle jeweils um ein Jahr zu verlängern. Durch die zur Auflage gemachte Anbaupause wird gewährleistet, dass die ggf. nachwachsenden Rapspflanzen und Rapsbastarde erfasst werden können.

Einzelne gentechnisch veränderte Rapssämlinge oder Rapsbastarde, die nach Ende der Nachkontrolle auf der Versuchsfläche oder außerhalb 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 das eingebrachte *ClFatB4*-Gen veränderte pflanzensoziologische Eigenschaften entwickeln und andere Biotope besiedeln können.

Deshalb ist auch im Falle des noch vereinzelten Auflaufens gentechnisch veränderter Rapssämlinge 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 Pflanzen durch Pollen auf andere Pflanzen

Innerhalb von Rapsbeständen findet zu etwa zwei Dritteln Selbstbestäubung und zu etwa einem Drittel Fremdbestäubung statt. Dieser Rapspollen wird durch Insekten, insbesondere Bienen, und durch den Wind verbreitet. Bei der landwirtschaftlichen Saatguterzeugung werden, um unerwünschte Fremdeinstäubung zu minimieren, gemäß Saatgutverordnung Isolati-

onsabstände von 100 m bei zertifiziertem Saatgut bzw. 200 m bei Basissaatgut verlangt. In der Nebenbestimmung II.7. dieses Bescheides wird ein Mindestabstand zu benachbarten Rapsfeldern festgelegt. Es ist aber davon auszugehen, dass Rapspollen in geringem Umfang auch über den Isolationsabstand hinausgetragen werden kann.

Die Folge einer Befruchtung einzelner Blüten von nicht gentechnisch verändertem Raps wäre das vorübergehende Vorkommen einzelner Rapspflanzen, die ein verändertes Fettsäuremuster in ihren Samen aufweisen. Risiken für die Umwelt oder die Landwirtschaft sind daraus nicht abzuleiten. Bei der Gewinnung von Rapsöl aus Samen, die durch Bestäubung einzelner Rapsblüten mit Pollen der gentechnisch veränderten Rapspflanzen hervorgegangen sein könnten, würde das Enzym Acyl-[ACP] Thioesterase zusammen mit den übrigen Proteinen vom Öl getrennt. Die Proteine würden in dem Pressrückstand, dem sog. "Ölkuchen", verbleiben, der als Viehfutter verwendet wird. Die im Samen der Rapspflanzen neu exprimierte Fettsäure Myristinsäure sowie die verstärkt auftretende Palmitinsäure treten bereits in anderen, auch zur menschlichen Ernährung verwendeten Produkten auf. Eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit kann deshalb auch aus einem eventuellen Verzehr von Rapsöl mit erhöhtem Myristin- und Palmitinsäuregehalt bzw. daraus hergestellten Produkten nicht abgeleitet werden.

Zur gleichen Art wie der Raps gehört die Kohlrübe (*Brassica 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 herangezogen 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 (*Brassica napus*) ist ein Bastard aus Rübsen (*Brassica rapa*) und Kohl (*Brassica oleracea*) und deshalb - mit den nachfolgend genannten Einschränkungen - mit diesen Arten prinzipiell kreuzbar.

Hybride aus *Brassica 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 (*Brassica 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 Rapssaatguts 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 (*Brassica juncea*), Schwarzer Senf (*Brassica nigra*), Weißer Senf (*Sinapis alba*), Ackersenf (*Sinapis arvensis*), Retticharten (*Raphanus sativus*), Hederich (*Raphanus raphanistrum*) und Grauer Bastardsenf (*Hirschfeldia incana*). Aufgrund der geringen Chromosomenhomologie dieser Pflanzenarten mit Raps treffen für Bastarde dieser Pflanzen mit Raps die oben für *Brassica rapa* und *Brassica 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 Pflanzen und diesen Brassicaceen kommen sollte, lässt dies wegen der geringen Wahrscheinlichkeit keine Ausbreitung des gentechnisch übertragenen Erbmaterials in Wildpflanzenpopulationen befürchten.

Für alle theoretisch möglichen Hybriden aus den gentechnisch veränderten Pflanzen und nicht gentechnisch veränderten Kultur- oder Wildpflanzen gilt, dass diese Hybriden durch das *ClFatB4*-Gen keine veränderten pflanzensoziologischen Eigenschaften entwickeln würden.

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 des Empfängerorganismus 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 Erbmaterial 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.

Das Acyl-[ACP] Thioesterase-Gen wird unter der Kontrolle seiner eigenen, samenspezifischen Regulationssequenzen exprimiert. Das Gen enthält 6 Introns. Selbst im Falle einer Übertragung des Gens auf Mikroorganismen wäre daher nicht mit der Bildung des entsprechenden Enzyms in den Mikroorganismen zu rechnen. Gene, die Enzyme mit der gleichen Funktion kodieren, kommen zudem natürlicherweise in einer Reihe von Pflanzenarten vor.

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(b) 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 *aad*-Gen, dessen Übertragung in das Pflanzengenom nach den Angaben in den Antragsunterlagen nicht ausgeschlossen werden kann. Das *aad*-Gen kodiert für das Enzym Streptomycin-Adenyltransferase.

Die zur Regulation des übertragenen *nptII*-Gens in die Rapspflanzen eingeführten Sequenzen stammen aus CaMV. Die theoretische Möglichkeit eines Transfers der CaMV-Sequenzen aus diesen Pflanzen würde keine neue im Vergleich zur natürlicherweise vorliegenden Situation darstellen, weil CaMV als doppelsträngiges pflanzeninfizierendes DNA-Virus ohnehin in Pflanzen anzutreffen ist.

Die Plasmide pNBM99-ClFatB4 und pNBM99-EnClFatB4, die für die Erzeugung der gentechnisch veränderten Rapspflanzen verwendet wurde, 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 Rapspflanzen chromosomal integriert worden sein (siehe III.1.2.1. (d)). 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 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 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 Pflanzen eingesetzte Agrobakterien

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Rapspflanzen wurden sterile 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. Die für den Freisetzungsversuch verwendeten Pflanzen wurden über mehrere Generationen über Saatgut vermehrt. Durch diese generativen Phasen sind ggf. nach der Antibiotikabehandlung noch verbliebene Agrobakterien aus den gentechnisch veränderten Rapslinien entfernt worden.