



## **Stellungnahme der ZKBS zum Antrag EFSA-GMO-NL-2005-24 der Firma Monsanto auf Genehmigung des Inverkehrbringens der gentechnisch veränderten Sojabohne 40-3-2 als gentechnisch verändertes Lebensmittel und Futtermittel zu Anbauzwecken nach der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003**

### **1. Gegenstand des Antrags und Zweck des Inverkehrbringens**

Der Antrag EFSA-GMO-NL-2005-24 (BVL-Az. 6787-01-0024) wurde von der Firma Monsanto bei der zuständigen Behörde der Niederlande eingereicht und von dieser am 04. November 2005 an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) weitergeleitet.

Gegenstand des Antrages ist das Inverkehrbringen der gentechnisch veränderten Sojabohne (*Glycine max* L.) der Linie GTS 40-3-2, die eine Toleranz gegenüber Glyphosat-haltigen Herbiziden aufweist.

Als Zweck benennt der Antrag den Anbau in der EU. Dabei soll der Anbau der Glyphosat-toleranten Sojabohne GTS 40-3-2 in Verbindung mit der Anwendung des entsprechenden Herbizids eine neue Form des Unkrautmanagements ermöglichen. Bereits im Jahr 1994 hat die Firma Monsanto einen Antrag auf Inverkehrbringen der Sojabohne 40-3-2 (C/UK/94/M3/1) bei der zuständigen Behörde Großbritanniens gestellt, zu dem die ZKBS im Jahr 1995 eine befürwortende Stellungnahme verabschiedet hat. Der Antrag erhielt im Jahr 1996 eine Zulassung nach der damals gültigen Richtlinie 90/220/EG. Diese frühere Zulassung wurde in eine gültige Zulassung nach neuem Recht überführt (notifiziert als „existierendes Produkt“), die für die Verwendung von Lebens- und Futtermitteln sowie Lebens- und Futtermittelzusatzstoffen gilt. Der Genehmigungszeitraum ist am 18. April 2007 ausgelaufen. Da die Firma Monsanto einen Antrag auf weitere Zulassung eines „existierenden Produktes“ nach der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 für gentechnisch veränderte Lebens- und Futtermittel gestellt hat (EFSA-GMO-RX-40-3-2), sind die Produkte derzeit weiterhin verkehrsfähig. Folglich bezieht sich der vorliegende Antrag ausschließlich auf die Genehmigung des Anbaus in der EU.

### **2. Beschreibung des gentechnisch veränderten Organismus**

In Pflanzengewebe von Sojabohnen der Linie A5403 wurde durch Mikroprojektil-Bombardement-vermittelte Transformation das Plasmid PV-GMGT04 übertragen. Dieses leitet sich vom Plasmid pUC119 (Vieira und Messing, 1987) ab und enthält infolgedessen einen Replikationsursprung (*ori*-pUC) zur Replikation in *Escherichia coli*. Zudem ist das bakterielle Kanamycin-Resistenzgen *npt* II, welches für die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase II aus dem *E. coli* Transposon Tn5 kodiert, unter der Kontrolle seines eigenen Promotors vorhanden (Beck *et al.*, 1982). Darüber hinaus enthält der Plasmidvektor PV-GMGT04 sowohl eine *uidA*-Expressionskassette als auch zwei *cp4 epsps*-Expressionskassetten. Die Expression der durch das *uidA*-Gen aus *E. coli* kodierten  $\beta$ -D-Glucuronidase (Jefferson *et al.*, 1986) diente als Erstnachweis eines erfolgreichen Trans-



formationsereignisses ( $R_0$ -Sprosse). Aufgrund natürlicher genetischer Segregation enthielt die auf die regenerierten  $R_0$ -Pflanzen (Linie 40-3) zurückgehende  $R_2$ -Nachkommenschaft (Linie 40-3-2) aber kein *uidA*-Gen mehr, was durch die molekulare Charakterisierung der Linie GTS 40-3-2 bestätigt wurde.

Durch Southern Blot und PCR Analysen wurde die Sojabohnenlinie GTS 40-3-2 näher charakterisiert. Aus den Ergebnissen dieser Analysen ist zu schließen, dass lediglich eine der beiden *cp4 epsps*-Expressionskassetten, nicht aber funktionale Sequenzen des Vektorrückgrades oder einer anderen im Plasmid PV-GMGT04 enthaltenen Expressionskassette stabil im Genom der Linie GTS 40-3-2 enthalten ist. Die integrierte Expressionskassette umfasst neben dem *epsps*-Gen für eine 5-Enylpyrovylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS) aus dem *Agrobacterium* Stamm CP4 den 35S-Promotor mit verdoppelter Enhancer-Region aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), den kodierenden Bereich für das N-terminale Chloroplasten-Transit-Peptid (CTP4) des *epsps*-Gens aus *Petunia hybrida* und das Terminationsignal des Nopalin Synthase-Gens (*nos*-Gen) aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Eine detaillierte molekulare Charakterisierung des Inserts, die neben Southern Blot und PCR Analysen auch eine Sequenz-Analyse umfasst, ergab zudem folgende Ergebnisse:

- Vom 35S-Promotor des CaMV wurde ein 354 Basenpaare (bp) umfassender Teil des verdoppelten Enhancers nicht in das Sojabohnengenom übertragen. Der Promotor ist jedoch ausreichend aktiv, um den gentechnisch veränderten Sojabohnenpflanzen eine agronomisch nutzbare Toleranz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat zu verleihen, die durch die Expression des *cp4 epsps*-Gens vermittelt wird.
- Zusätzlich zu dem vollständigen *epsps*-Gen aus dem *Agrobacterium* Stamm CP4, das Bestandteil der oben beschriebenen ins Pflanzengenom integrierten *cp4 epsps*-Expressionskassette ist (= Primärinsert), enthalten die Sojabohnen der Linie GTS 40-3-2 und ihre Nachkommen zwei weitere Fragmente des *epsps*-Gens, nämlich:
  - a) ein 72 bp großes Sekundärfragment, das getrennt vom Primärinsert in das Sojabohnengenom integriert wurde, jedoch bei der Vererbung zusammen mit diesem segregiert,
  - b) ein 250 bp großes Fragment, das sich an das 3'-Ende des im Primärinsert enthaltenen Terminatorsignals des *nos*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* anschließt.

An das 3'-Ende des unter b) beschriebenen 250 bp großen *epsps*-Fragments schließt sich ein 534 bp langer DNA-Abschnitt an, bei dem es sich um genomische Sojabohnen-DNA handelt, die infolge des Transformationsprozesses neu angeordnet wurde.

Um mögliche offene Leserahmen (ORF = *open reading frame*), die infolge der Integration der in Sojabohne 40-3-2 enthaltenen Inserts entstanden sein könnten, zu untersuchen, wurde eine Bioinformatik-basierte Analyse durchgeführt. Diese umfasst die Identifizierung und Bewertung aller putativen Peptide, die ausgehend von den 5'- und 3'-Übergängen zwischen genomischer DNA und den beschriebenen Inserts gebildet werden könnten, im Hinblick auf ihr allergenes, toxisches oder anderes bioaktives Potential. Die Sequenzanalyse des Primärinserts ergab für den 5'-Übergang sechs und für den 3'-Übergang fünf mögliche Polypeptide, die in die Bioinformatik-basierte Analyse einbezogen wurden. Die Analyse des 72 bp-Sekundärfragments erbrachte acht mögliche Polypeptide, wobei sich aufgrund der geringen Größe des Inserts einige der Peptide über den Bereich des kompletten Inserts und der beiden flankierenden Sequenzen erstreckten. Die Bioinformatik-Analyse der ermittelten putati-



ven Proteinsequenzen ergab, dass keines dieser Polypeptide signifikante Ähnlichkeiten zu bekannten Allergenen, Toxinen oder anderen bioaktiven Peptiden aufweist.

Northern Blot Analysen zeigten nicht nur die Anwesenheit einer mRNA der erwarteten Länge (ca. 1,5 kb) sondern auch die Präsenz sekundärer Transkripte, die daher resultieren, dass das innerhalb der *cp4 epsps*-Expressionskassette befindliche *nos*-Terminationssignal nicht erkannt wird. Auf diese Weise entsteht ein *over-length*-Transkript, das neben der kompletten *cp4 epsps*-Sequenz zusätzlich einen Teil des 3'-flankierenden Sequenzbereichs inklusive des angrenzenden 250 bp *epsps*-Fragments enthält. Ein posttranskriptionales Spleißen dieses Fusionsproduktes resultiert in vier verschiedenen mRNA-Varianten, die alle denselben Leserahmen aufweisen (Rang *et al.*, 2005). Die Ergebnisse durchgeführter Western Blot Analysen weisen allerdings darauf hin, dass die sekundären Transkripte nicht translatiert werden, da lediglich das erwartete Volllängen-CP4 EPSPS-Protein mit einer Größe von ca. 46 kDa und keine weiteren CP4 EPSPS-Fusionsproteine detektiert werden konnten. Selbst für den Fall, dass eine Translation der beobachteten Sekundärtranskripte stattfinden sollte, so wäre aufgrund der Ergebnisse der durchgeführten Bioinformatikbasierten Analyse aufgrund der fehlenden Ähnlichkeit der Sequenzen zu bekannten Allergenen und Toxinen nicht mit schädlichen Auswirkungen zu rechnen.

Um die Expression des eingeführten Inserts zu untersuchen, wurden die durchschnittlichen CP4 EPSPS-Konzentrationen mittels ELISA in Blättern und Samen von Sojabohne 40-3-2 bestimmt. Die gemessenen Konzentrationen, die auf der Basis von Pflanzenmaterial aus Feldversuchen, die im Jahre 1998 in der EU durchgeführt wurden, ermittelt wurden, lagen zwischen 0,321 µg/mg und 0,618 µg/mg FG (Frischgewicht) in den Blättern und zwischen 0,086 µg/mg und 0,270 µg/mg FG in den Samen. Ähnliche Expressionsgehalte wurden auch auf der Grundlage von Material aus US-amerikanischen Feldversuchen ermittelt.

Die Expression des eingebrachten *cp4 epsps*-Gens verleiht den gentechnisch veränderten Pflanzen eine Toleranz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat, der zum Beispiel im Handelsprodukt Roundup® enthalten ist. Die Vererbung der Herbizidtoleranz folgt einem monogenen Erbgang.

### 3. Erfahrungen aus vorausgegangenen Freilanduntersuchungen

Freisetzen der gentechnisch veränderten Sojabohne 40-3-2 fanden seit 1991 vor allem in den USA, aber auch in Puerto Rico (1991-1994), Argentinien (1993-1994) und Kanada (1993-1994) statt. Im Rahmen der Freisetzen in Nord- und Südamerika wurden umfangreiche Untersuchungen zur Ausprägung der Herbizidtoleranz, zur Ermittlung von Ertragsparametern sowie zum Verhalten der gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland durchgeführt (Keimfähigkeit, Überdauerung, Vermehrung, Ausbreitungskapazität, Anfälligkeit gegenüber Krankheitserregern und Schädlingen etc.). Aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchungen ist festzustellen, dass sich die gentechnisch veränderte Sojabohnenpflanze mit Ausnahme der Herbizidtoleranz in ihren Eigenschaften und ihrem Verhalten nicht signifikant von nicht gentechnisch veränderten Sojabohnenpflanzen unterscheidet. Zudem wurden im Jahr 1994 Freilandversuche in Italien und Frankreich sowie in den Jahren 1996 und 1997 in Italien durchgeführt, um die Anbauwürdigkeit der gentechnisch veränderten Sojabohne in den jeweiligen Gebieten zu untersuchen. Diesbezüglich wurde eine vergleichende Untersuchung der phänotypischen und agronomischen Merkmale von Sojabohne 40-3-2 und konventionellen Sojasorten durchgeführt. Diese bestätigen die Ergebnisse der amerikanischen Studien, sodass insgesamt keine Hinweise für eine Veränderung hinsichtlich der Überlebens-, Vermehrungs- und Ausbreitungsfähigkeit vorliegen.



Darüber hinaus erfolgten in Europa in der Vegetationsperiode 1998 europäische Anbauexperimente an sieben Standorten in Frankreich und Italien sowie im Jahr 2005 an fünf Standorten in Rumänien (Harrigan *et al.*, 2007), auf deren Basis vergleichende Inhaltsstoffanalysen durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Inhaltsstoffanalysen, die auf den in Europa angebaute Sojabohnen beruhen, bestätigen die Ergebnisse der vorausgegangenen Studien in den USA (Padgett *et al.*, 1996), die besagen, dass Sojabohne 40-3-2 substantiell äquivalent zu traditionellen Sojabohnen ist. Auch eine unbeabsichtigte Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels durch die gentechnische Veränderung im Sinne eines sogenannten Positionseffektes oder durch pleiotrope Effekte konnte anhand der untersuchten Parameter in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Alles in allem ist die Gesamtheit der dargestellten vergleichenden Inhaltsstoffanalysen - auch im Hinblick auf den Antragsgegenstand - ausreichend, um die substantielle Äquivalenz von Sojabohne 40-3-2 mit hinreichender Sicherheit zu belegen. Insgesamt spiegeln Umfang und Anzahl der zugrunde liegenden Anbauexperimente die Erfahrungen unter Feldbedingungen in einer repräsentativen Auswahl geographischer Standorte über mehr als eine Vegetationsperiode wider.

#### **4. Erteilte Genehmigungen zum Inverkehrbringen außerhalb der EU**

Die RoundupReady<sup>®</sup>-Sojabohne (Event GTS 40-3-2) wurde erstmalig 1996 in den USA und Argentinien für den kommerziellen Anbau zugelassen und hat seitdem in einer Reihe weiterer Staaten (z. B. Kanada, Brasilien, Uruguay, Paraguay, Südafrika) entsprechende Anbauzulassungen erhalten. Im Jahr 2007 wurden gentechnisch veränderte Sojabohnen, von denen die RoundupReady<sup>®</sup>-Sojabohne (Event GTS 40-3-2) den mit Abstand größten Anteil ausmacht, weltweit auf ca. 58,6 Mio. Hektar angebaut, was 64% der gesamten Soja-Anbaufläche entspricht (James, 2007). Des Weiteren ist der Import von Sojabohnen mit dem Event GTS 40-3-2 und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln nicht nur in der EU sondern auch in 13 weiteren Staaten (China, Mexiko, Japan, Taiwan, Korea, Thailand, Australien, Neuseeland, Philippinen, Kolumbien, Bolivien, Russland und Schweiz) zugelassen.

#### **5. Risikoabschätzung**

Gegenstand des Antrages ist die Genehmigung des Anbaus von Sojabohnen der Linie GTS 40-3-2 in der EU.

Die ZKBS hat in ihrer Stellungnahme die für die RoundupReady<sup>®</sup>-Sojabohne (Event GTS 40-3-2) relevanten Prüfpunkte aus Annex II der Richtlinie 2001/18/EG berücksichtigt.

##### **5.1. Bewertung der Fähigkeit der gentechnisch veränderten Sojabohne zu überdauern oder sich zu etablieren und der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Gene durch Pollen auf andere Pflanzen**

Die Sojabohne ist eine einjährige krautige Kulturpflanze subtropischen Ursprungs. Der Anbau ist aufgrund ihres Temperaturanspruches und der mangelnden Kältetoleranz an warme Klimate gebunden. In der europäischen Union werden nur in den südlichen Ländern, insbesondere in Italien, Frankreich und Rumänien, in nennenswertem Umfang Sojabohnen angebaut. Als domestizierte Pflanze ist die Sojabohne auf die Kultivierung durch den Menschen angewiesen, wohingegen sie sich in natürlichen Floren nicht etablieren kann. Sojabohnen



sind nicht winterhart, die Samen weisen keine sekundäre Keimruhe auf. Während des Anbaus oder bei der Ernte ausgefallene Samen keimen bei ausreichender Feuchtigkeit unmittelbar nach der Ernte wieder aus. Es ist deshalb zu erwarten, dass die aufgelaufenen Pflanzen im Verlauf des Winters absterben oder im Zuge der üblichen Bodenbearbeitungsmaßnahmen zerstört werden.

Sojabohnen sind selbstbestäubend, Fremdbestäubung kommt nur in geringem Umfang (< 1%) im Feldbestand vor. Gemäß der Richtlinie 69/208/EWG des Rates über den Verkehr mit Saatgut von Öl- und Faserpflanzen ist für Sojabohnen-Vermehrungsbestände keine Mindestentfernung zu benachbarten Sojabohnenfeldern vorgeschrieben. Die wenigen mit der Sojabohne kreuzbaren Arten (*Glycine gracilis*, *Glycine soja*) sind in Europa nicht heimisch, so dass Hybridisierungen nicht zu erwarten sind.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die oben genannten Eigenschaften von Sojabohnen durch die im Antrag beschriebene gentechnische Veränderung bzw. die infolgedessen übertragene Eigenschaft (Herbizidtoleranz) beeinflusst werden. Die Antragstellerin hat bei Freisetzungsversuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen Untersuchungen zu zahlreichen Inhaltsstoffen sowie zu verschiedenen agronomischen und phänotypischen Merkmalen (z. B. Keimfähigkeit, Überdauerung, Vermehrung, Ausbreitungskapazität, Anfälligkeit gegenüber Krankheitserregern und Schädlingen) durchgeführt. Bei diesen Versuchen hat sich bestätigt, dass sich die gentechnisch veränderten Pflanzen bezüglich der genannten Eigenschaften nicht signifikant von nicht gentechnisch veränderten Sojasorten unterscheiden. Die Möglichkeit einer Überdauerung, Ausbreitung, Verwilderung und Pollenübertragung der gentechnisch veränderten Pflanzen ist nicht anders zu bewerten als die von traditionell gezüchteten Sojabohnen.

## **5.2. Bewertung der durch das übertragene Gen (cp4 epsps) bewirkten Veränderungen in der gentechnisch veränderten Sojabohne auf die Umwelt**

Das *epsps*-Gen kodiert für eine 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS). Dieses Enzym katalysiert in Pflanzen und Mikroorganismen die Reaktion des Shikimat-3-Phosphats mit Phosphoenolpyruvat zum 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat, einer Zwischenstufe für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren und anderer aromatischer Substanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Die natürlicherweise in Sojabohnen vorkommende EPSPS wird durch den herbiziden Wirkstoff Glyphosat gehemmt, weshalb die Pflanzen nach Anwendung entsprechender Herbizide absterben. Hingegen wird das entsprechende Enzym aus dem *Agrobacterium* Stamm CP4 nicht gehemmt, so dass die Biosynthese aromatischer Metabolite auch bei Behandlung der Pflanzen mit Glyphosat-haltigen Herbiziden in ausreichendem Maße aufrecht erhalten bleibt (Malik *et al.*, 1989; Steinrücken und Amrhein, 1980). Das *epsps*-Gen aus *Agrobacterium* Stamm CP4 wurde bei der Konstruktion der eingebrachten Expressionskassette mit der DNA-Sequenz für das Chloroplasten-Transitpeptid (CTP4) der EPSPS aus *Petunia hybrida* fusioniert. Hierdurch wird in den Pflanzenzellen der Transport der EPSPS in die Chloroplasten gewährleistet. Das Transitpeptid wird in der Regel beim Import in die Chloroplasten abgespalten. Als Regulationssequenzen dienen der 35S-Promotor des CaMV sowie das Terminationssignal des *nos*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die in den gentechnisch veränderten Sojabohnen neu gebildete CP4 EPSPS katalysiert die gleiche Reaktion wie entsprechende Enzyme, die natürlicherweise in Sojabohnen und anderen Kulturpflanzen vorkommen. Da dem Transitpeptid der EPSPS aus *Petunia hybrida* wie auch anderen derzeit bekannten Signalpeptiden, ob prozessiert oder unprozessiert, kein





gesundheitsschädigendes Potential zuerkannt wird, ist davon auszugehen, dass dies auch für das Fusionsprotein aus Transitpeptid und Enzym, hier CTP4 und CP4 EPSPS, zutrifft. Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine schädliche Wirkung des neu gebildeten EPSPS-Proteins erwarten lassen.

### **5.3. Bewertung potentieller Auswirkungen der gentechnisch veränderten Sojabohne auf Nichtziel-Vertebraten**

Als Indikator für die Abwesenheit möglicher Risiken für Nichtziel-Vertebraten können vor allem die Ergebnisse der dargestellten Rattenfütterungsstudien, die sowohl in Form von Studien, die die Antragstellerin selbst durchgeführt und dokumentiert hat, als auch in Form von *peer-reviewed* Artikeln (Teshima *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2004) vorliegen, gewertet werden. Die Studien, die sowohl mit verarbeiteten als auch mit rohen Sojabohnenmaterial durchgeführt wurden, erfassen auch toxikologische Endpunkte und bestätigen insgesamt, dass die gv-Sojabohne hinsichtlich ihrer Sicherheit und Verträglichkeit als Futtermittel herkömmlichen Sojabohnen entspricht. Darüber hinaus hat die Antragstellerin Fütterungsstudien mit Sojabohne 40-3-2 und entsprechenden Kontroll-Diäten in Masthühnern, Welsen, Milchkühen und Schweinen sowie Wachteln durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studien belegen die ernährungsphysiologische Gleichwertigkeit der gentechnisch veränderten Sojabohne 40-3-2 gegenüber herkömmlichen Sojabohnen und bestätigen somit auch die in den Inhaltsstoffanalysen nachgewiesene substantielle Äquivalenz von Sojabohne 40-3-2. Auch unerwartete, einschließlich pleiotroper Effekte konnten nicht festgestellt werden.

Der Antrag betrifft den Anwendungszweck des Anbaus. Die enthaltenen Daten zu Fütterungsstudien sind insgesamt ausreichend, um nachteilige Effekte der gentechnisch veränderten Sojabohne auf Nichtziel-Vertebraten mit hinreichender Sicherheit ausschließen zu können.

### **5.4. Bewertung potentieller Auswirkungen der gentechnisch veränderten Sojabohne auf weitere Nichtziel-Organismen**

Aufgrund der gentechnischen Veränderung, der molekularen Charakterisierung, der nachgewiesenen substantiellen Äquivalenz und fehlenden Wirkpfaden für Umweltrisiken werden keine schädlichen Effekte auf weitere Nichtziel-Organismen, insbesondere Arthropoden, durch den Anbau der Sojabohne 40-3-2 erwartet. Dies wird durch die Erfahrungen des langjährigen großflächigen Anbaus dieser Sojabohne außerhalb der EU bestätigt, da bisher keine Berichte über direkte schädliche Effekte auf weitere Nichtziel-Organismen vorliegen.

Die von der Antragstellerin vorgelegten Studien zu Pathogenen und Symbionten bestätigen mit hinreichender Sicherheit die Annahme, dass schädliche Einflüsse der Sojabohne 40-3-2 nicht zu erwarten sind.

Die ZKBS merkt kritisch an, dass viele der beigelegten Studien im Antrag nur eingeschränkt geeignet sind, fehlende Wirkungen auf Nichtziel-Arthropoden zu bestätigen. Ein großer Teil der Studien entspricht nicht den heutigen wissenschaftlichen Standards. Einige der Studien weisen Mängel im experimentellen Design auf, die u. a. mangelnde Exposition des Nichtziel-Arthropoden, zu geringe Wiederholungszahlen oder unzureichende statistische Auswertungen betreffen. Viele der getesteten Organismen sind nicht in der Lebensgemeinschaft der an Soja vorkommenden Organismen vertreten bzw. kommen in Europa nicht vor. Weiterhin sind nicht alle relevanten trophischen Ebenen mit aussagekräftigen Studien geprüft.



In Anbetracht der Gesamtheit der vorliegenden Informationen hält die ZKBS potentiell schädliche Auswirkungen auf weitere Nichtziel-Organismen für unwahrscheinlich. Es konnten keine schädlichen Ursache-Wirkungspfade identifiziert werden, die ein fallspezifisches Monitoring auslösen würden.

### **5.5. Bewertung eines horizontalen Gentransfers von der gentechnisch veränderten Sojabohne auf Mikroorganismen**

Ein horizontaler Gentransfer von Pflanzen auf Mikroorganismen ist unter natürlichen Bedingungen nicht beobachtet worden, kann aber nicht ausgeschlossen werden (Gebhard & Smalla, 1998; Nielsen *et al.*, 2000; De Vries *et al.*, 2004). Bei der Sicherheitsbewertung eines eventuellen horizontalen Gentransfers des *cp4 epsps*-Gens auf Mikroorganismen ist zu berücksichtigen, ob dieses Gen im Genpool der aufnehmenden Population bereits vorkommt. Das *cp4 epsps*-Gen kommt natürlicherweise in Bodenmikroorganismen vor. Ökologisch nachteilige Folgen sind daher aus dem sehr selten zu erwartenden Ereignis der horizontalen Übertragung des *cp4 epsps*-Gens aus der gentechnisch veränderten Sojabohne auf Bodenmikroorganismen nicht zu erwarten.

Die Inaktivierung von Glyphosat bzw. die Expression Glyphosat-toleranter EPSP-Synthasen ist bei Bodenmikroorganismen ein natürlich vorkommender Prozess. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet. Auch DNA-Sequenzen, die für Chloroplasten-Transitpeptide kodieren, sind - insbesondere auch für das *epsps*-Gen - für eine Reihe von verschiedenen Pflanzenarten beschrieben worden. Selbst im Falle eines Transfers des *cp4 epsps*-Gens oder des *ctp4*-Genabschnitts von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde weder die Gesamtfrequenz des Vorkommens dieses Gens noch die Gesamtfrequenz des damit verbundenen Phänotyps einer Glyphosat-toleranten Variante der EPSPS in der Umwelt erkennbar erhöht.

Auch bei einer Übertragung der sonstigen in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus CaMV und *Agrobacterium tumefaciens*. CaMV ist ein pflanzeninfizierendes doppelsträngiges DNA-Virus, das in Pflanzen ohnehin anzutreffen ist. *Agrobacterium tumefaciens* ist ein im Boden vorkommendes Bakterium.

### **5.6. Auswirkungen durch die Anwendung komplementärer Glyphosat-haltiger Herbizide auf Anbau und Management der Sojabohne**

Auswirkungen der Anwendung Glyphosat-haltiger Herbizide werden nicht im Rahmen dieses Antrags bewertet, sondern sind Gegenstand der Pflanzenschutzmittelzulassung. Die ZKBS merkt kritisch an, dass potentielle Unterschiede zwischen dem Anbau der Sojabohne 40-3-2 und konventionellem Sojaanbau unter europäischen Bedingungen im Antrag nur in sehr geringem Umfang dargestellt sind, da die Antragstellerin die Nutzung von Glyphosat-haltigen Herbiziden als vergleichbar zu herkömmlichen Kultivierungsmaßnahmen ansieht. Es ist nach Auffassung der ZKBS nicht auszuschließen, dass sich durch die Verwendung der gv-Sojabohne Veränderungen bei der Kultivierung und im Anbaumanagement ergeben. Glyphosat-haltige Herbizide können nach Auflaufen der Sojapflanzen ausgebracht werden, was Auswirkungen auf die Ackerbegleitflora haben könnte. Aus der Erfahrung der Anwendung konventioneller Pflanzenschutzmittel ist zu erwarten, dass früher oder später eine Toleranzentwicklung in der Ackerbegleitflora gegenüber dem Wirkprinzip von Glyphosat-



haltigen Herbiziden einsetzen wird. Es zeigt sich bereits bei der Kultivierung von herbizidtoleranten (HT) Sojabohnen in den USA, dass die kontinuierliche und wiederholte Ausbringung von Glyphosat auf HT-Kulturen Veränderungen in der Ackerbegleitflora und eine Entwicklung von resistenten oder toleranten Kräutern und –gräsern bedingt (Fernandez-Cornejo J. & Caswell M. 2006). Nach Ansicht der ZKBS besteht möglicherweise auch eine indirekte Wechselwirkung bei der Anwendung von Glyphosat-haltigen Herbiziden auf Stickstoff-fixierende Symbiosepartner der Sojabohne (z. B. *Bradyrhizobium japonicum*, Moorman *et al.*, 1992, King *et al.*, 2001), was zu einer Reduktion des Ertrages führen könnte (King *et al.*, 2001). Zum Ausgleich wäre potentiell ein erhöhter Aufwand von Stickstoff-Dünger bei der Kultivierung von HT-Soja nötig. Die ZKBS empfiehlt das Herbizid- und Anbaumanagement der Sojabohne 40-3-2 so anzupassen dass möglichst geringe nachteilige Wirkungen auftreten.

Die ZKBS geht davon aus, dass indirekte Auswirkungen des komplementären Herbizideinsatzes im Rahmen des Monitorings (general surveillance) erfasst, dokumentiert und bewertet werden. Das von der Antragstellerin vorgelegte *Stewardship Programm* sollte mit der Pflanzenschutzmittelzulassung abgestimmt und die Wirksamkeit der Maßnahmen im Monitoringplan berücksichtigt werden. Die vorgesehene Vorgehensweise erlaubt, dass die Anwendungsbedingungen des Herbizids (wie Aufwandmengen, Intensität der Unkrautkontrolle oder Management zur Vermeidung der Resistenzentwicklung gegen Glyphosat-haltige Herbizide) besser den regionalen Erfordernissen der Europäischen Mitgliedsstaaten angeglichen werden können.

### 5.7. Monitoringplan

Die Antragstellerin hat einen vollständigen Plan zur Beobachtung der Umweltauswirkungen des Anbaus der Sojabohne 40-3-2 vorgelegt und sich verpflichtet, bei der nationalen Umsetzung des Beobachtungsplans auch Daten, die durch bestehende Beobachtungsprogramme erhoben und veröffentlicht werden, bei der Auswertung der Beobachtung zu berücksichtigen. Darüber hinaus ergaben sich bei der Sicherheitsbewertung der Sojabohne 40-3-2 keine unmittelbaren Anlässe für eine fallspezifische Beobachtung durch die Antragstellerin.

### 6. Empfehlung der ZKBS

Die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit ist zu dem Ergebnis gekommen, dass durch den Anbau der Sojabohne 40-3-2 keine schädlichen Einwirkungen auf die in §1 Nr. 1 des Gentechnikgesetzes benannten Schutzgüter zu erwarten sind.

Die ZKBS geht davon aus, dass etwaige indirekte Auswirkungen des komplementären Herbizideinsatzes im Rahmen eines mit der Pflanzenschutzmittelprüfung abgestimmten *Stewardship Programms* durch die Antragstellerin berücksichtigt werden, damit entsprechende unvorhergesehene Effekte (im *General Surveillance*) entdeckt werden können.

### Zitierte Literatur:

Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H. (1982) Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19: 327-36.





- De Vries, J., Herzfeld, T., and Wackernagel, W. (2004) Transfer of plastid DNA from tobacco to the soil bacterium *Acinetobacter* sp. by natural transformation. *Molecular Microbiology* 53: 323-334.
- Fernandez-Cornejo, J., Caswell, M. (2006) The first decade of genetically engineered crops in the United States. In: USDA Economic Research Service (Eds); *Economic Information Bulletin* 1. <http://www.ers.usda.gov/publications/eib11/eib11.pdf>
- Gebhard, F. and Smalla, C. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1550-1154.
- Harrigan, G.G., Ridley, W.P., Riordan, S.G., Nemeth, M.A., Sorbet, R., Trujillo, W.A., Breeze, M.L., and Schneider, R.W. (2007) Chemical composition of glyphosate-tolerant soybean 40-3-2 grown in europe remains equivalent with that of conventional soybean (*Glycine max* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55: 6160-6168.
- James, C. (2007) Global status of commercialized biotech/GM crops: 2007. *ISAAA*, 37.
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M. and Hirsh, D. (1986) Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 8447-8451.
- King, C.A., Purcell, L.C., Vories, E.D. (2001) Plant growth and nitrogenase activity of glyphosate-tolerant soybean in response to foliar glyphosate applications. *Agronomy Journal* 93: 179-186.
- Malik, J., Barry, G., and Kishore, G. (1989) The herbicide glyphosate. *BioFactors* 2: 17-25.
- Moorman, T.B., Becerill, J.M., Lydon, J., Duke, S.O. (1992) Production of hydrobenzoic acids by *Bradryrhizobium japonicum* strains treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural Food chemistry* 40: 289-293.
- Nielsen, K. M., Elsas, J. D. van, and Smalla, K. (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4DnptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1237-1242.
- Padgett, S.R., Taylor, N.B., Nida, D.L., Bailey, M.R., MacDonald, J., Holden, L.R., and Fuchs, R.L. (1996) The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J. Nutr.* 126: 702-16.
- Rang, A., Linke, B., and Jansen, B. (2005) Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 438-443.
- Steinrücken, H.C. and Amrhein, N. (1980) The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 94: 1207-1212.
- Teshima, R., Akiyama, H., Okunuki, H., Sakushima, J., Goda, Y., Onodera, H., Sawada, J., and Toyoda, M. (2000) Effect of gm and non-gm soybeans on the immune system of BN rats and B10A mice. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 41: 188-193.
- Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* 153: 3-11.
- Zhu, Y., Li, D., Wang, F., Yin, J., and Jin, H. (2004) Nutritional assessment and fate of DNA of soybean meal from Roundup Ready or conventional soybeans using rats. *Archives of Animal Nutrition* 58: 295-310.