

Antrag gem. RL 2001/18/EG, Part B, zur Freisetzung von gentechnisch veränderten, Glyphosat-toleranten Zuckerrüben (H7-1) in Deutschland (2011 – 2013) nach dem vereinfachten Verfahren für die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Pflanzen gem. Entscheidung 94/730/EG (ABl. Nr. L292 vom 12.11.1994, S.31) der Kommission zum Einsatz in Feldversuchen in Deutschland in Verbindung mit § 11 der Gentechnik-Verfahrensordnung und § 16 des Gentechnikgesetzes (Antrag auf Anordnung der sofortigen Vollziehung gemäß § 80 a Abs. 1 Nr. 1 i.V. § 80 Abs. 2 Nr. 4 VWGO im Falle eines positiven Bescheides)

beim

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

"Abteilung 4 Gentechnik"

Mauerstr 39-42

10117 Berlin

eingereicht durch die
Monsanto Agrar Deutschland GmbH
Vogelsanger Weg 91
D-40470 Düsseldorf

Monsanto Agrar Deutschland GmbH
Antrag gem. RL 2001/18/EG, Part B, zur Freisetzung von gentechnisch veränderten, Glyphosat-toleranten
Zuckerrüben (H7-1) in Deutschland (2011 – 2013)

© 2010 Monsanto Company. All Rights Reserved.

This document is protected under copyright law. This document is for use only by the regulatory authority to which this has been submitted by Monsanto Company, and only in support of actions requested by Monsanto Company. Any other use of this material, without prior written consent of Monsanto Company, is strictly prohibited. By submitting this document, Monsanto Company does not grant any party or entity any right to license, or to use the information of intellectual property described in this document.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	8
Kurzbeschreibung des Projekts	9
1. Betreiber	9
2. Zweck der Freisetzung	9
3. Kurzbeschreibung der freizusetzenden Organismen	9
4. Ort und Zeitraum der Freisetzung	10
5. Anzahl der freizusetzenden Organismen	10
6. Kurze Beschreibung der Versuchsdurchführung	11
7. Zusammenfassung der Risikobewertung	12
A. Allgemeine Informationen	14
1. Name und Anschrift des Anmelders (Unternehmen oder Institut)	14
2. Name, Qualifikation und Erfahrung des verantwortlichen Wissenschaftlers	14
(a) Angaben zum Projektleiter	14
(b) Angaben zum Beauftragten für biologische Sicherheit	14
3. Titel des Projekts	14
B. Informationen zum Empfängerorganismus	15
1. Vollständiger Name	15
(a) Familienname: Chenopodiaceae	15
(b) Gattung: <i>Beta</i>	15
(c) Art: <i>vulgaris</i> (2n = 18)	15
(d) Unterart: <i>vulgaris</i>	15
(e) Cultivar/Zuchtlinie, Event: R01 / H7-1	15
(f) Trivialbezeichnung: Zuckerrübe	15
2. Fortpflanzung	16
(a) Informationen zur Fortpflanzung	16
(b) Geschlechtliche Kompatibilität mit anderen Kultur- und Wildpflanzen, einschließlich der Verbreitung kompatibler Arten in Europa	18
3. Überlebensfähigkeit	19
(a) Fähigkeit überlebensfähige Strukturen zu bilden	19
(b) Spezifische, die Überlebensfähigkeit ggf. beeinflussende Faktoren	19
4. Verbreitung	20
(a) Art und Umfang der Verbreitung	20
(b) Spezielle, die Verbreitung ggf. beeinflussende Faktoren	21
5. Geographische Verbreitung der Pflanze	21
6. Bei Pflanzenarten, die in den Mitgliedstaaten normalerweise nicht angebaut werden, Beschreibung des natürlichen Lebensraums der Pflanze und weitere Informationen	21
7. Weitere mögliche Wechselwirkungen der Pflanze mit anderen Organismen im Ökosystem, in dem sie normalerweise angebaut wird, oder andernorts,	

	einschließlich Informationen über toxische Effekte auf Menschen und Tiere oder andere Organismen	21
C.	Informationen über die gentechnische Veränderung	22
1.	Beschreibung der für die gentechnische Veränderung angewandten Verfahren ..	22
2.	Art und Herkunft des verwendeten Vektors.....	22
3.	Größe, Ursprung (Name) des Spenderorganismus und geplante Funktion jedes konstituierenden Fragments der für den Transfer vorgesehenen Region	23
D.	Informationen über die gentechnisch veränderte Pflanze	27
1.	Beschreibung der eingeführten oder veränderten Merkmale und Eigenschaften..	27
2.	Informationen über die tatsächlich eingeführten / deletierten Sequenzen.....	27
(a)	Größe und Struktur des eingeführten Genabschnitts (Insert) und Verfahren zu seiner Charakterisierung.....	27
(b)	Bei einer Deletion – Größe und Funktion der deletierten Region(en)	34
(c)	Kopienzahl des Inserts.....	34
(d)	Lage des Inserts in den Pflanzenzellen (integriert in das Chromosom, die Chloroplasten oder die Mitochondrien bzw. in einer nicht-integrierten Form) und Verfahren zu seiner Bestimmung.....	34
3.	Informationen über die Expression des Inserts	34
(a)	Informationen über die Expression des Inserts im Verlauf des Lebenszyklus der Pflanze und Verfahren für seine Charakterisierung.....	34
(b)	Pflanzenteile, in denen das eingeführte Insert exprimiert wird (z.B. Wurzeln, Stiel, Pollen, ...)	37
4.	Informationen über Unterschiede zwischen der gentechnisch veränderten Pflanze und der Empfängerpflanze im Hinblick auf: (a) Form(en) und/oder Rate der Fortpflanzung, (b) Verbreitung, (c) Überlebensfähigkeit	37
5.	Genetische Stabilität des Inserts und phänotypische Stabilität der gentechnisch veränderten Pflanze	38
(a)	Genetische Stabilität des Inserts der H7-1 Zuckerrübe.....	38
(b)	Phänotypische Stabilität der Glyphosat-Toleranz der H7-1 Zuckerrübe.....	40
(c)	Schlussfolgerung	40
6.	Jede Veränderung der Fähigkeit von gentechnisch veränderten Pflanzen, genetisches Material auf andere Organismen zu übertragen.....	40
(a)	Gentransfer von Pflanzen auf Bakterien	40
(b)	Gentransfer von Pflanze zu Pflanze.....	40
7.	Informationen über toxische, allergieauslösende und andere schädliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, die durch die gentechnische Veränderung hervorgerufen werden	41
8.	Informationen über die Sicherheit der gentechnisch veränderten Pflanze in Bezug auf die Tiergesundheit, insbesondere in Bezug auf toxische, allergieauslösende und andere schädliche Auswirkungen, die durch die gentechnische Veränderung hervorgerufen werden (falls eine Verwendung der gentechnisch veränderten Pflanze in Futtermitteln beabsichtigt ist)	42
9.	Mechanismen der Wechselwirkung zwischen der gentechnisch veränderten Pflanze und den Zielorganismen (falls zutreffend).....	42

10.	Mögliche Änderungen bei den Wechselwirkungen der gentechnisch veränderten Pflanzen mit Nicht-Zielorganismen, die durch die gentechnische Veränderung hervorgerufen werden	42
11.	Mögliche Wechselwirkungen mit der abiotischen Umwelt.....	43
12.	Beschreibung der Nachweis- und Identifizierungsverfahren für die gentechnisch veränderte Pflanze.....	44
13.	Informationen über frühere Freisetzungen der gentechnisch veränderten Pflanze.....	44
E.	Informationen über den Ort der Freisetzung	47
	Standort Gerbitz	47
(a)	Lage und Größe des Freisetzungsgeländes	47
(b)	Beschreibung des Ökosystems am Ort der Freisetzung, einschließlich Klima, Flora und Fauna.....	48
(c)	Vorhandensein geschlechtlich kompatibler verwandter Wild- und Kulturpflanzenarten.....	49
(d)	Nähe zu offiziell anerkannten geschützten Biotopen oder Schutzgebieten, die betroffen werden könnten	49
F.	Informationen über die Freisetzung	50
1.	Zweck der Freisetzung.....	50
2.	Voraussichtliche(r) Zeitpunkt(e) und Dauer der Freisetzung.....	50
3.	Verfahren für die Freisetzung der gentechnisch veränderten Pflanzen.....	50
4.	Verfahren zur Vorbereitung und Überwachung des Freisetzungsgeländes vor, während und nach der Freisetzung, einschließlich Anbaupraktiken und Ernteverfahren	51
5.	Ungefähre Anzahl der Pflanzen (oder Pflanzen pro m ²)	52
G.	Informationen über Pläne zur Kontrolle, Überwachung, Nachbehandlung und Abfall-entsorgung.....	53
1.	Getroffene Vorsichtsmaßnahmen:	53
(a)	Entfernung(en) zu geschlechtlich kompatiblen Arten von Wild- und Kulturpflanzen.....	53
(b)	Maßnahmen zu Minimierung / Vermeidung der Verbreitung von Vermehrungsträgern der gentechnisch veränderten Pflanze (z.B. Pollen, Samen, Knollen).....	53
2.	Beschreibung von Verfahren zur Behandlung des Geländes nach der Freisetzung	53
3.	Beschreibung der Verfahren zur Behandlung von GVP-Ernten und -Abfällen nach der Freisetzung	54
4.	Beschreibung der Überwachungstechniken und –pläne einschließlich des Plans zur Ermittlung der Auswirkung des freizusetzenden Organismus auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt (§15 Abs.1, Nr.4a GenTG)	54
5.	Beschreibung von Noteinsatzplänen.....	55
6.	Methoden und Verfahren, die zum Schutz des Geländes angewandt werden.....	55
	ANNEX II gemäss Richtlinie 2001/18/EWG: Umweltverträglichkeitsprüfung	56

1.	Wahrscheinlichkeit einer gegenüber den Empfänger- oder Elternpflanzen gesteigerten Persistenz der gentechnisch veränderten höheren Pflanzen in landwirtschaftlich genutzten Lebensräumen oder einer gesteigerten Invasivität in natürlichen Lebensräumen.....	56
2.	Selektionsvor- oder -nachteile, die auf die gentechnisch veränderten höheren Pflanzen übertragen wurden.....	57
3.	Möglichkeit eines Transfers von Genen auf die gleiche Pflanzenart oder auf andere geschlechtlich kompatible Pflanzenarten unter den Bedingungen der Anpflanzung der gentechnisch veränderten höheren Pflanzen und die dabei übertragenen Selektionsvor- oder -nachteile.....	58
4.	Mögliche sofortige und / oder spätere Auswirkungen der direkten oder indirekten Interaktionen zwischen den gentechnisch veränderten höheren Pflanzen und den Zielorganismen wie Räuber, Parasiten und Pathogenen (falls zutreffend) auf die Umwelt.....	59
5.	Mögliche sofortige und / oder spätere Auswirkungen der direkten oder indirekten Interaktionen zwischen den gentechnisch veränderten höheren Pflanzen und den Nicht-Zielorganismen auf die Umwelt einschließlich der Auswirkungen auf die Populationsniveaus der Konkurrenten, Pflanzenfresser, Symbionten (falls zutreffend), Parasiten und Pathogenen.....	60
6.	Mögliche sofortige und / oder spätere Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit infolge potentieller direkter und indirekter Wechselwirkungen zwischen den gentechnisch veränderten höheren Pflanzen und Personen, die an ihrer Freisetzung beteiligt sind, mit ihr in Kontakt oder in ihre Nähe kommen..	61
7.	Mögliche sofortige und / oder spätere Auswirkungen auf die Gesundheit von Tieren und Auswirkungen auf die Futter- und Nahrungsmittelkette infolge des Verzehrs von gentechnisch veränderten höheren Pflanzen und aus ihnen gewonnene Erzeugnisse, wenn die Nutzung der GVO als Futter beabsichtigt ist.	61
8.	Mögliche sofortige und / oder spätere Auswirkungen auf biogeochemische Prozesse infolge potentieller direkter und indirekter Wechselwirkungen zwischen GVO und Ziel- sowie Nicht-Zielorganismen in der Nähe von GVO-Freisetzungen.....	62
9.	Mögliche sofortige und / oder spätere sowie direkte und indirekte Auswirkungen der spezifischen Techniken, die beim Anbau, der Bewirtschaftung und der Ernte der gentechnisch veränderten höheren Pflanzen zum Einsatz kommen, auf die Umwelt, soweit sie sich von den Techniken unterscheiden, die bei gentechnisch nicht veränderten höheren Pflanzen zum Einsatz kommen.....	62
	Literatur.....	64
	Anhang 69	
	Übersichtskarte.....	69
	Detaillkarte.....	70
	Flurkarte.....	71
	Karten der geschützten Gebiete.....	72
	Übersichtskarte zum Freisetzungsort.....	72
	Detaillkarte.....	73
	vertrauliche Unterlagen.....	75

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1.	Taxonomische Kategorien der Gattung <i>Beta</i>	15
Tabelle 2.	Zusammenfassung der genetischen Elemente im Plasmid PV-BVGT08 .	26
Tabelle 3.	Zusammenfassung der Expressionswerte des CP4 EPSPS Proteins im Gewebe der H7-1 Zuckerrübe aus Freilandversuchen (Europa) der Jahre 1998 und 1999	36
Tabelle 4.	Liste von Ländern, in denen bereits in der Vergangenheit Freisetzungen entsprechend Teil B der Richtlinien 90/220/EWG und 2001/18/EG durchgeführt wurden	46

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1.	Plasmidkarte PV-BVGT08 mit Restriktionsstellen	25
Abbildung 2.	Schematische Charakterisierung des H7-1 Inserts	30
Abbildung 3.	Southern-Blot-Analyse der Transformante H7-1: Analyse der Anzahl der Inserts und Kopien	31
Abbildung 4.	Fragmente des „backbone“, die als Gensonden verwendet wurden	32
Abbildung 5.	Southern-Blot Analyse der Transformante H7-1: Analyse des PV-BVGT08 „backbone“	33
Abbildung 6.	Southern-Blot Analyse der H7-1 Transformante: genetische Stabilität.	39

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
CMS	Cytoplasmatische Männliche Sterilität
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European Food Safety Authority)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERA	Umweltverträglichkeitsprüfung (Environmental Risk Assessment)
EU	Europäische Union
FMV	Figwort Mosaic Virus
FM	Frischmasse / Frischgewicht
ggf.	gegebenenfalls
GM	gentechnisch verändert (Genetically Modified)
kb	Nucleotid Kilobase
kDa	kiloDalton
LB	Linke Borderregion
NA	nicht zutreffend / nicht anwendbar (Not applicable)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PEP	Phosphoenolpyruvat
RB	Rechte Borderregion
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
S3P	Shikimat-3-Phosphat
sp.	Spezies (Art)
ssp.	Subspezies (Unterart)
T-DNA	Transfer DNA
UK	Vereinigtes Königreich (United Kingdom)

KURZBESCHREIBUNG DES PROJEKTS

1. Betreiber

Monsanto Agrar Deutschland GmbH
Vogelsanger Weg 91
40470 Düsseldorf

2. Zweck der Freisetzung

Die Monsanto Agrar Deutschland GmbH beabsichtigt im Zeitraum von 2011 bis 2013 an verschiedenen Standorten in Deutschland Freisetzungsversuche mit gentechnisch veränderten, Glyphosat-toleranten Zuckerrüben (Event H7-1) durchzuführen. Ziele der Untersuchungen sind u.a.:

- Erfassung agronomischer Eigenschaften und phänotypischer Merkmale der gentechnisch veränderten Zuckerrüben während der Vegetationsperiode auch im Vergleich mit konventionellen, in der landwirtschaftlichen Praxis angebauten Zuckerrübensorten;
- Generierung von Daten zur Expression des integrierten Proteins in verschiedenen Geweben der gentechnisch veränderten Zuckerrüben sowie von verschiedenen Inhaltsstoffen der Pflanzen, der Ertragsleistung und Verarbeitungsqualität der Zuckerrüben während der Vegetationsperiode;
- Erarbeitung von zulassungsrelevanten Daten und Anwendungsempfehlungen zum Einsatz von Glyphosat-haltiger Pflanzenschutzmittel für die Anwendung in Glyphosat-toleranten Zuckerrüben;
- Erarbeitung von Daten möglicher Wirkungen der gentechnisch veränderten Zuckerrüben gegenüber Nicht-Zielorganismen.

Hierzu werden während der Vegetationsperiode zu unterschiedlichen Zeitpunkten Pflanzenproben der gentechnisch veränderten Zuckerrüben entnommen und analysiert sowie umfassende Bonituren im Feld auch im Vergleich mit konventionellen Zuckerrübensorten durchgeführt und abschließende Beerntungen vorgenommen.

3. Kurzbeschreibung der freizusetzenden Organismen

Bei dem freizusetzenden Organismus handelt es sich um aus der Zuckerrübentransformante H7-1 hervorgegangene Hybriden. Diese enthalten ein voll funktionsfähiges Gen, das für das CP4 EPSPS Protein kodiert und den Pflanzen Toleranz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat verleiht.

Zur Herstellung der Zuckerrübentransformante H7-1 wurde ein entschärfter („disarmed“), als PV-BVGT08 bezeichneter binärer *Agrobacterium tumefaciens*

Pflanzentransformationsvektor verwendet. Für die Transformation wurde eine multigerme Zuchtlinie genutzt. Aus den sterilen Sämlingen der Zuckerrübenlinie hervorgegangene Keimblätter wurden als Explantat-Quelle genutzt. Die Transformation wurde mit einer das PV-BVGT08 Plasmid enthaltenden Agrobakterien-Suspension durchgeführt. Zur abschließenden Selektion putativer Transformanten wurde Glyphosat verwendet.

Die aus der Transformation hervorgegangene Zuckerrübe H7-1 bzw. deren durch Kreuzung hervorgegangenen Nachkommen enthalten in ihrem Genom folgende Sequenzen: Eine aus dem *Agrobacterium* sp. Stamm CP4 (*cp4 epsps*) stammende Gensequenz, die für eine durch Glyphosat nicht inhibierte 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase (CP4 EPSPS) kodiert, die konstitutiv unter der Kontrolle des 35S Promotors des Figwort Mosaic Virus (FMV) sowie der E9 3' Polyadenylierungssequenz aus Erbse (*Pisum sativum*) exprimiert wird. Dem *cp4 epsps* Gen ist eine aus *Arabidopsis thaliana* stammende Chloroplasten-Transitpeptid Sequenz (*ctp2*) vorgeschaltet, die den post-translationalen Import des Proteins in die Chloroplasten bewirkt. Das CP4 EPSPS Enzym ist unempfindlich gegenüber Glyphosat.

Beim transformierten *cp4 epsps* Gen der H7-1 Zuckerrübe handelt es sich um eine Sequenz, die für die Expression in Pflanzen optimiert wurde.

4. Ort und Zeitraum der Freisetzung

Die Freisetzung ist für 3 Vegetationsperioden (2011-2013) geplant. Im Jahr 2011 sind zunächst Freisetzen an 1 Standort geplant (siehe folgende Übersicht). In den Folgejahren können im Rahmen des vereinfachten Verfahrens weitere Standorte nachgemeldet werden. Die Freisetzen sollen jeweils zwischen Mitte März und Ende Oktober stattfinden. Die Terminierung orientiert sich an den Versuchsfragestellungen sowie den jeweils ortsüblichen Aussaat- und Ernteterminen.

Bundesland	PLZ / Ort	Kreis / Gemarkung	Flur	Flurstück
Sachsen- Anhalt	06429 Nienburg (Saale) Ortsteil Gerbitz	Salzlandkreis/ Gerbitz	1	140

5. Anzahl der freizusetzenden Organismen

In Abhängigkeit von der verfolgten Zielstellung und der dafür benötigten Versuchsanlage ergibt sich ein unterschiedlicher Flächen- und Saatgutbedarf. Der Flächenbedarf für gentechnisch veränderte Zuckerrüben liegt bei maximal 5.000 m² pro Standort und Jahr.

Um einen gleichmäßigen Pflanzenbestand zu erhalten, werden mehr Samen ausgesät (70-80 nackte oder 25-35 pillierte Samen pro Quadratmeter) als endgültig an Pflanzen benötigt werden. Dementsprechend ergibt sich ein Bedarf an transgenem Saatgut von ca. 400.000 nackten oder 175.000 pillierten Samen pro Standort und Jahr.

Nach der Aussaat wird auf eine praxisübliche Bestandesdichte von 8-12 Pflanzen pro Quadratmeter vereinzelt, so dass die maximale Anzahl gentechnischer Pflanzen 60.000 pro Standort beträgt. Die Vereinzeln erfolgt im 2-8 Blattstadium.

6. Kurze Beschreibung der Versuchsdurchführung

Die Aussaat erfolgt mit in Versuchsarbeiten üblichen Drillmaschinen oder durch andere geeignete Verfahren (einschließlich Pflanzung). Die Drillmaschinen werden nach der Aussaat auf dem Freisetzungsgelände von eventuell noch vorhandenem transgenem Saatgut gereinigt. Dadurch wird eine Verschleppung transgenen Saatgutes verhindert.

Das Saatgut wird nicht im Endabstand abgelegt, sondern, wie in Zuckerrübenversuchen üblich, mit einer höheren Dichte ausgesät. Die Ablagetiefe beträgt etwa zwei bis drei Zentimeter. Nach Auflaufen der Keimlinge werden die überzähligen Pflanzen durch Hacken oder Jäten entfernt. Dies ist notwendig, um einen homogenen Pflanzenbestand in der Parzelle zu gewährleisten, der die Voraussetzung für die fachgerechte Durchführung und Auswertung der Versuche darstellt. Nach Vereinzeln wird ein Pflanzenbestand von 8-12 Pflanzen pro Quadratmeter angestrebt.

Alle Arbeiten zur Kulturführung (Saatbettbereitung, Aussaat, Düngung, Pflanzenschutz) entsprechen der üblichen Praxis im Zuckerrübenanbau. Die Herbizidmassnahmen erfolgen in Abh. der Versuchsfragestellungen.

Die Beerntung der Parzellen erfolgt entweder von Hand oder mit für Versuchszwecke geeigneten Parzellenrodern. Proben bzw. intakte Rüben, die vermehrungsfähig sind, werden in gentechnische Anlagen in geschlossenen sowie gekennzeichneten Behältern transportiert. Alternativ können nicht-vermehrungsfähige geköpfte Rübenkörper der Versuchspartellen zur weiteren Untersuchung unter üblichen Transportbedingungen in dafür geeignete Anlagen gebracht werden.

Nicht benötigtes Erntematerial und nicht verwertete vegetative Pflanzenreste verbleiben auf der Freisetzungsfäche. Durch geeignete Maßnahmen (z.B. Häckseln) werden die Pflanzen zerkleinert und flach in den Boden eingearbeitet. Geköpfte, nicht mehr vermehrungsfähige Zuckerrüben können auch alternativ zur weiteren Beseitigung in geeignete Kompostier- oder Biogasanlagen verfrachtet werden. Keinesfalls werden Erntematerial und Pflanzenreste der Zuckerrüben der menschlichen oder tierischen Verwertung zugeführt.

Im nächsten Jahr werden auf den Freisetzungsfächen keine Zuckerrüben angebaut, so dass eventuell austreibende Pflanzenreste sicher erkannt und abgetötet werden. Dies wird durch regelmäßige Kontrollen der Versuchsfächen gewährleistet.

Nach Abschluss der Versuche wird die Fläche für die Dauer einer Vegetationsperiode auf Aufwuchsrüben kontrolliert. Es werden entweder keine oder Pflanzen angebaut, die eine Nachkontrolle nicht behindern. Sofern ein Auflauf von Rübenschossern bzw. Durchwuchsrüben erfolgen sollte, werden diese sicher mit üblichen, gegen dikotyle Unkräuter wirksamen Herbiziden erfasst oder manuell entfernt.

Eine Verbreitung transgener Zuckerrüben durch Pollen ist nicht möglich, da die Zuckerrübe als eine zweijährige Pflanze im ersten Vegetationsjahr, also vor Erreichen der Blüte geerntet wird. Eventuell auftretende Rübenschösser werden im Versuch bereits vor der Blüte entfernt, so dass kein transgener Pollen gebildet wird. Eine Hybridisierung mit anderen Pflanzen bzw. Gentransfer durch Pollen wird damit ausgeschlossen und ein Isolationsabstand ist nicht erforderlich. Mit Durchwuchs im Folgejahr ist nicht zu rechnen, da im Verlauf der Vegetationsperiode keine Samenbildung erfolgt.

7. Zusammenfassung der Risikobewertung

In der Verträglichkeitsprüfung wurden keine schädlichen Wirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier oder die Umwelt durch die Freisetzung der Glyphosat-toleranten H7-1 Zuckerrüben nachgewiesen. Der Freisetzungsversuch stellt, wie die folgenden zusammenfassenden Ausführungen erkennen lassen, nach derzeitigem Stand der Wissenschaft kein Risiko für oben genannte Schutzgüter dar.

Die Wahrscheinlichkeit einer unabsichtlichen Verbreitung der H7-1 Zuckerrübe in der Umwelt ist sehr gering, da weder Pollen noch Samen gebildet werden.

Die Expression des die Glyphosat-Toleranz vermittelnden CP4 EPSPS Proteins verleiht H7-1 Zuckerrüben keinen selektiven Vorteil außerhalb landwirtschaftlicher Nutzflächen.

Die Möglichkeit des Transfers von Genen auf geschlechtlich kompatible *Beta* Arten ist als äußerst gering einzustufen und nur unter der Voraussetzung denkbar, dass die Zuckerrüben die generative Phase erreichen. Im Rahmen der beantragten Freisetzung werden die Pflanzen praxisüblich bereits im ersten Vegetationsjahr, also vor der Blüte geerntet. Eventuell bereits im ersten Jahr auftretende Rübenschosser werden vor der Blüte entfernt, so dass kein Pollen gebildet wird.

Das Risiko von negativen Wirkungen von H7-1 Zuckerrüben gegenüber Nicht-Zielorganismen ist basierend auf dem sehr umfassend charakterisierten Wirkungsmechanismus des EPSPS Enzyms und umfassenden Studien als außerordentlich gering zu bewerten. Im Rahmen der beantragten Freisetzung wird dieser Aspekt weitergehend untersucht.

Die Wahrscheinlichkeit von unerwünschten Wirkungen auf die menschliche Gesundheit infolge des Kontakts mit H7-1 Zuckerrüben entspricht der Wahrscheinlichkeit entsprechender Wirkungen von konventionellen Zuckerrüben. Für das in H7-1 gebildete CP4 EPSPS Protein konnte keine gesteigerte Allergenität beim Menschen ermittelt werden.

Abgesehen vom Vorhandensein des CP4 EPSPS Proteins in H7-1 Zuckerrüben sind die Pflanzen gegenüber konventionellen Zuckerrüben als substantiell äquivalent zu bewerten. Die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Wirkungen von als Futtermittel verwendeten Nebenprodukten bei hiermit gefütterten Tieren ist als nicht relevant einzustufen, da die im Rahmen der Freisetzung erzeugten Pflanzen nicht für eine weitere Verarbeitung und Nutzung in der Nahrungskette vorgesehen sind.

Die Wahrscheinlichkeit sofortiger und / oder auch späterer Auswirkungen der Freisetzung von H7-1 Zuckerrüben auf biogeochemische Prozesse ist äußerst gering. Es werden keine anderen Auswirkungen auf biogeochemische Prozesse erwartet, als solche, die auch bei konventionellen Zuckerrübensorten zutreffen.

Die für den Anbau der H7-1 Zuckerrüben angewendeten Techniken des Anbaus, des Kulturmanagements und der Ernte sind, abgesehen von der Herbizidanwendung, identisch mit entsprechenden Techniken bei konventionellen Zuckerrüben.

Nach dem vereinfachten Verfahren für die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Pflanzen gem. Entscheidung 94/730/EG (ABl. Nr. L292 vom 12.11.1994, S.31) der Kommission sollen weitere Standorte nachgemeldet werden. Die Voraussetzungen hierfür gelten als erfüllt:

Kriterium Entscheidung 94/730/EG	Kriterium erfüllt	Begründung mit Blick auf die beantragten gv-Zuckerrüben
Taxonomischer Status und Biologie der Empfänger-pflanzenart sind gut bekannt.	Ja	Die Zuckerrübe ist gut bekannt und wird im Antrag als Empfängerpflanzenart hinreichend beschrieben.
Informationen über die Wechselwirkungen zwischen Empfängerpflanzenart und den Ökosystemen, in denen die Freisetzungen (zu experimentellen und/oder landwirtschaftlichen Zwecken) erfolgen sollen, sind verfügbar.	Ja	Die geforderten Informationen sind verfügbar. Aufgrund der langjährigen landwirtschaftlichen Nutzung von Zuckerrüben liegen ausreichende Informationen über Wechselwirkungen von Zuckerrüben mit in Frage kommenden Ökosystemen vor. Der Anbau der hier beantragten gentechnisch veränderten Zuckerrüben im Rahmen der Freisetzung soll nach in der Praxis üblichen Verfahrensweisen bzw. Versuchstechnik erfolgen. Als Ergebnis der Umweltverträglichkeitsprüfung deutet nichts auf ein unvertretbares Risiko im Vergleich zu konventionellen Zuckerrüben hin.
Wissenschaftliche Daten über die Auswirkungen der experimentellen Freisetzung genetisch veränderter Pflanzen derselben Empfänger-pflanzenart auf die Sicherheit für die menschliche Gesundheit und die Umwelt sind verfügbar.	Ja	Die geforderten Daten sind verfügbar. In Deutschland und in weiteren Ländern der EU wurde bereits eine Vielzahl von Freisetzungsvorhaben mit gentechnisch veränderten Zuckerrüben, darunter auch die hier beantragte Linie, durchgeführt. Überdies wurden bereits positive Risikobewertungen durch Experten in- und außerhalb Europas publiziert.
Die eingeführten Sequenzen und ihre Expressionsprodukte sind unter den Bedingungen der experimentellen Freisetzung für die menschliche Gesundheit und die Umwelt sicher.	Ja	Aus den bisherigen Freisetzungen liegen keine Hinweise auf eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit und der Umwelt vor. Überdies wurden hinsichtlich der eingeführten Sequenzen und ihrer Expressionsprodukte bereits positive Risikobewertungen durch Experten in- und außerhalb Europas publiziert.
Die eingeführten Sequenzen sind gut beschrieben.	Ja	Die beantragte gentechnisch veränderte Zuckerrübe ist molekularbiologisch gut charakterisiert. Alle eingeführten Sequenzen sind bekannt und gut beschrieben. Es wurden bereits positive Risikobewertungen durch Experten in- und ausserhalb Europas publiziert.
Alle eingeführten Sequenzen sind im Zellkern- Genom integriert.	Ja	Generationsanalysen zeigen eine stabile Intregation der eingeführten Sequenzen
Alle Freisetzungen erfolgen im Rahmen eines im voraus festgesetzten Arbeitsprogramms.	Ja	Die Freisetzungen und das im Antrag geschilderte Arbeitsprogramm werden in der beantragten Laufzeit von 2011 bis 2013 durchgeführt.
Alle Freisetzungen erfolgen während einer im voraus festgesetzten Zeitspanne.	Ja	Die Zeitspanne ergibt sich durch die beantragte Laufzeit von 2011 bis 2013.

A. ALLGEMEINE INFORMATIONEN

1. Name und Anschrift des Anmelders (Unternehmen oder Institut)

Monsanto Agrar Deutschland GmbH
Vogelsanger Weg 91
40470 Düsseldorf

Ansprechpartner

Tel:

Fax:

Email:



2. Name, Qualifikation und Erfahrung des verantwortlichen Wissenschaftlers

(a) Angaben zum Projektleiter

Name, Vorname:



Der Befähigungsnachweis und die weiteren notwendigen Unterlagen liegen dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bereits vor.

(b) Angaben zum Beauftragten für biologische Sicherheit

Name, Vorname:



Der Befähigungsnachweis und die weiteren notwendigen Unterlagen liegen dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit bereits vor.

3. Titel des Projekts

Antrag gem. RL 2001/18/EG, Part B, zur Freisetzung von gentechnisch veränderten, Glyphosat-toleranten Zuckerrüben (H7-1) in Deutschland (2011 – 2013) nach dem vereinfachten Verfahren für die absichtliche Freisetzung genetisch veränderter Pflanzen gem. Entscheidung 94/730/EG (ABl. Nr. L292 vom 12.11.1994, S.31) der Kommission zum Einsatz in Feldversuchen in Deutschland in Verbindung mit § 11 der Gentechnik-Verfahrensordnung und § 16 des Gentechnikgesetzes (Antrag auf Anordnung der sofortigen Vollziehung gemäß § 80 a Abs. 1 Nr. 1 i.V. § 80 Abs. 2 Nr. 4 VWGO im Falle eines positiven Bescheides)

B. INFORMATIONEN ZUM EMPFÄNGERORGANISMUS

1. Vollständiger Name

- (a) **Familienname:** Chenopodiaceae
 (b) **Gattung:** *Beta*
 (c) **Art:** *vulgaris* (2n = 18)
 (d) **Unterart:** *vulgaris*
 (e) **Cultivar/Zuchtlinie, Event:** R01 / H7-1
 (f) **Trivialbezeichnung:** Zuckerrübe

Tabelle 1 enthält eine Zusammenstellung der taxonomischen Gliederung der Gattung *Beta* (De Bock, 1986).

Tabelle 1. Taxonomische Kategorien der Gattung *Beta*

	Arten	Plodie (2n)
Sektion 1	<i>Beta</i> (syn : <i>vulgares</i>)	
	<i>B. vulgaris</i> L.	18
	<i>B. maritima</i> L.	18
	<i>B. macrocarpa</i> Gus.	18, 36
	<i>B. atriplicifolia</i> Rouy	18
	<i>B. patula</i> Ait.	18
	<i>B. orientalis</i> Roth.	18
Sektion 2	<i>Corollinae</i>	
	<i>B. macrorhiza</i> Stev.	18
	<i>B. lomatogona</i> Fish et Mey.	18, 36
	<i>B. corolliflora</i> Zos.	36
	<i>B. trigyna</i> Wald et Kit	45, 54
	<i>B. intermedia</i> Bunge	36
Sektion 3	<i>Nanae</i>	
	<i>B. nana</i> Bois. et Held.	18
Sektion 4	<i>Patellares</i>	
	<i>B. procumbens</i> Chr. Sm.	18
	<i>B. webbiana</i> Moq.	18
	<i>B. patellaris</i> Moq.	36

¹In (Fehr et al., 1987).

2. Fortpflanzung

(a) Informationen zur Fortpflanzung

Die Biologie der Zuckerrübe ist gut charakterisiert und detailliert beschrieben (Cooke and Scott, 1993).

Die Zuckerrübe (*Beta vulgaris*, ssp. *vulgaris*) wird gewöhnlich über Samen verbreitet. Sie ist normalerweise diploid mit $2n=2x=18$ Chromosomen. Künstlich erzeugte autotetraploide Zuckerrüben ($2n=4x=36$) wurden Anfang der 40er-Jahre in der europäischen Zuckerrübenzüchtung eingeführt und ließen die sogenannten polyploiden oder anisoploiden Zuckerrübensorten entstehen, die eine Mischung aus tetraploiden, triploiden ($2n=3x=27$) und diploiden Pflanzen waren. Ab Mitte der 60er-Jahre wurden diese Sorten in größerem Ausmaß durch rein triploide Hybridsorten ersetzt. Derzeit sind sowohl diploide als auch triploide Hybridsorten auf dem Markt.

Die in der Landwirtschaft angebaute Zuckerrübe ist eine zweijährige Pflanze, im Gegensatz zur einjährigen oder nahezu einjährigen Wildrübe. Der einjährige Lebenszyklus wird durch ein dominantes „B“-Allel gesteuert, das wenn es auf die Zuckerrübe übertragen wird, das Schossen und anschließende Blühen auf den Feldern bewirkt. Normalerweise blüht die Zuckerrübe auf den Rübenanbau Feldern nicht, die Blüte kann jedoch durch niedrige Temperaturen induziert werden (Vernalisation). Entsprechend können blühende Pflanzen in Rübenanbau Feldern in sehr geringem Ausmaß auftreten. Züchter sind bestrebt, das Auftreten von Schossern durch die Entwicklung von nicht zum Schossen neigenden Sorten zu reduzieren.

Die Entwicklung von Hybridsorten der Zuckerrübe wurde durch die Entdeckung der zytoplasmatischen männlichen Sterilität (CMS) bei Zuckerrüben (Owen, 1945) und der daraus folgenden Entwicklung von Hybridzüchtungsmethoden (Owen, 1948) ermöglicht. Die zytoplasmatische männliche Sterilität (CMS) bei Zuckerrüben ist das Ergebnis einer Wechselwirkung zwischen Zellkerngenen und Veränderungen im Mitochondriengenom (Halldén *et al.*, 1990; Powling, 1982).

Die meisten Zuckerrüben-Genotypen sind stark selbstunverträglich (selbststeril) und bilden bei strikter Isolierung keinerlei Samen. Die Selbststerilität wird durch vier aufeinander einwirkende S-Loci hervorgerufen, von denen jedes zwei S-Allele besitzt (Larsen, 1977a; Larsen, 1977b). „Pseudo-Verträglichkeit“ oder „Pseudo-Selbstfertilität“ können durch einen Zusammenbruch der Unverträglichkeitsmechanismen entstehen. Dieses ist bei den verschiedenen Genotypen mehr oder weniger stark ausgeprägt und wird vor allem durch Umweltfaktoren beeinflusst, vor allem durch die Temperatur (Larsen, 1977a). Eine nahezu obligatorische Selbstfertilität wird durch die Präsenz eines speziellen dominanten Selbstfertilitätsgens (Savitsky, 1954) ausgelöst. Bei der Zuckerrübe dominiert die Windbestäubung, Insekten spielen eine unbedeutendere Rolle.

Art der Fortpflanzung

Zuckerrüben sind normalerweise zweijährig und entwickeln im ersten Jahr eine große, sukkulente Wurzel und einen Blütrieb im zweiten Jahr. Die Zuckerrübe wird für gewöhnlich im Frühjahr ausgesät und im Herbst desselben Jahres geerntet. In einigen Gebieten Südeuropas mit milden Wintern können auch im Herbst besonders schossfeste Sorten gesät und im Sommer des folgenden Jahres geerntet werden.

Für die Saatguterzeugung werden in der ersten Saison Stecklinge (vernalisierte Zuckerrübenpflanzen) gezogen. Diese werden in der nächsten Saison im Feld, auf dem die Produktion stattfindet, ausgepflanzt.

Wie bereits beschrieben, benötigen die Pflanzen um vom vegetativen in das reproduktive Stadium zu gelangen eine Phase der Vernalisation durch niedrige Temperaturen. Die Länge der erforderlichen thermischen Induktion ist genetisch bedingt. Da für die Blühinduktion auch die Tageslänge von Bedeutung ist, wird der Begriff „photo-thermale Blühinduktion“ verwendet, vor allem wenn durch Änderung von Temperatur und Tageslänge das Blühen und die Samenbildung von zweijährigen Genotypen im ersten Jahr induziert wird. Die Genetik der Schossfestigkeit bei zweijährigen Zuckerrüben ist noch unklar. Einige Studien legen nahe, dass diese von mehreren Genen mit unterschiedlichem Dominanzgrad bestimmt wird (Le Cohec and Soreau, 1989), andere wiederum gehen davon aus, dass dies ein weitgehend rezessives Merkmal ist (McFarlane *et al.*, 1949).

Die Mehrheit der wildwachsenden *Beta*-Arten des Mittelmeerraums ist einjährig, aber es finden sich auch zweijährige Arten. Die nordatlantischen Arten der *B. maritima* sind dagegen normalerweise mehrjährig.

Die Reproduktion kann vereinzelt auch aus vegetativen Pflanzenteilen wie Rübenköpfen oder anderen im Herbst auf dem Feld belassenen Teilen des Rübenkörpers („groundkeepers“) erfolgen. Es wäre möglich, dass deren Wiederaustrieb in der nächsten Saison fruchtbare Samen bilden kann. Die Ausbreitung auf diese Art ist selten, da solche Pflanzenreste meist vom Landwirt in den Boden eingearbeitet werden und aufgrund der Temperaturen im Winter absterben (siehe auch Abschnitt B.3.a.).

Spezielle, die Fortpflanzung ggf. beeinflussende Faktoren

Siehe Abschnitt B.2.a.

Generationsdauer

Siehe Abschnitt B.2.a.

(b) Geschlechtliche Kompatibilität mit anderen Kultur- und Wildpflanzen, einschließlich der Verbreitung kompatibler Arten in EuropaHybridisierung mit kultivierten Beta Variationen

Beta vulgaris beinhaltet zahlreiche kultivierte Formen von *Beta vulgaris ssp. vulgaris*, einschließlich Zucker- und Futterrübe, Spinat, Mangold, Gelbe Rübe und Rote Bete (OECD, 2001). Diese Unterarten sind untereinander kreuzbar, obwohl individuell selbstinkompatibel. Die Hybridisierung zwischen einigen der Unterarten ist bedingt durch die unterschiedlichen Blütezeiten und den unterschiedlichen Ploidiegrad zwischen diploiden und tetraploiden Pflanzen sehr begrenzt. Trotz der Tatsache, dass die genannten Arten im ersten Jahr vor der Blütenbildung geerntet werden und die Möglichkeit einer Hybridisierung somit minimal ist, ist eine Hybridisierung insbesondere in Regionen zur Saatguterzeugung zu berücksichtigen.

Bei der Zuckerrübe dominiert die Windbestäubung, wobei die Entfernung, die die Pollen überwinden können, von der Windstärke, der Feuchtigkeit und der Temperatur abhängt. Die Konzentration an Pollen wird sehr schnell durch die Verdünnung in der Luft und das Absetzen und Zersetzen am Boden reduziert. Studien haben belegt, dass die Konzentration an Pollen mit der Entfernung vom Pollenemittenten deutlich abnahm. So haben Experimente in England gezeigt, dass in einer Entfernung von 900 m windabwärts vom Freisetzungspunkt der Pollen, die Pollenkonzentration auf 0,3% zurückgegangen war (Dark, 1971). In Frankreich wurden von 1996 bis 1998 Langzeitexperimente mit Fruchtwechsel von mehreren transgenen Feldfrüchten durchgeführt, unter anderem mit herbizidtoleranten Zuckerrüben. Unter Verwendung von CMS-Pflanzen als „Pollenfänger“ wurde gezeigt, dass das Vorkommen von Pollen bei einer Distanz von über 30 Metern um 83% abnahm (CETIOM, 1999).

Es ist vorstellbar, dass Glyphosat-tolerante Schosser Pollen in Zuckerrüben-Anbaufeldern produzieren. Dieser Pollen könnte andere Schosser auf dem gleichen Feld oder angrenzenden Feldern befruchten und fertile Hybride hervorbringen. Diese Nachkommenschaft würde die Eigenschaft der Glyphosat-Toleranz tragen. Diese Pflanzen könnten jedoch durch bewährte Methoden mechanisch oder durch den Einsatz zugelassener Breitbandherbizide kontrolliert werden.

Hybridisierung mit wilden Beta Arten

Hybridisierungen zwischen *Beta vulgaris* und anderen Arten der Sektion *Beta* sind möglich. Die Hybriden sind grundsätzlich überlebensfähig und fertil. Sie zeigen keine Inkompatibilität auf chromosomaler Ebene (OECD, 2001). Hybriden zwischen *Beta vulgaris* und *Beta macrocarpa* sind bedingt durch die unterschiedlichen Blühzeiten sehr selten, wobei oft partielle Pollensterilität und Embryoabort festgestellt wurden (Abe *et al.*, 1986).

Wildarten der Gattung *Beta* wachsen im Mittelmeer- sowie im Ostseraum als Unkraut auf den Feldern oder auf Brachland. Der Genfluss zwischen konventionellen Zuckerrüben und Wildrüben wurde durch die Einkreuzung des Merkmals für Einjährigkeit in Kulturrüben (Boudry *et al.*, 1993) und die Einkreuzung von Genen in Wildrübenpopulationen nachgewiesen (Bartsch *et al.*, 1999).

Unter erheblichen Schwierigkeiten können künstliche Hybride mit den Arten der Sektion *Corollinae* (Van Geyt *et al.*, 1990) hergestellt werden. Solche Hybriden sind jedoch steril und bilden nur wenige Samen, wenn sie mit Zuckerrüben rückgekreuzt werden. Künstliche Hybride zwischen Zuckerrüben und Arten aus der Sektion *Procumbens* gehen normalerweise im Sämlingsstadium ein. Man kann sie durch Veredlung auf Zuckerrüben retten und sie können sich dann zu lebensfähigen Pflanzen entwickeln. Auch diese Hybride sind fast völlig steril und bilden bei Rückkreuzung nur wenige Samen. Keinerlei Berichte gibt es über Hybride zwischen konventionellen Zuckerrüben und *B. nana* der Sektion *Nanae*. Man geht davon aus, dass innerhalb der Familie der Gänsefußgewächse (*Chenopodiaceae*) alle Kreuzungen von konventionellen Zuckerrüben mit Arten anderer Sektionen außer der *Beta*-Sektion höchst unwahrscheinlich sind.

Auskreuzung in andere Arten, mit denen eine Kreuzung nicht möglich ist

Es gibt keine veröffentlichten Belege dafür, dass es neben der geschlechtlichen Kreuzung noch andere Mechanismen gibt, mit denen der Austausch von Genen von einer Zuckerrübenpflanze zu einem anderen Organismus möglich ist (siehe Abschnitt D.6).

3. Überlebensfähigkeit

(a) Fähigkeit überlebensfähige Strukturen zu bilden

Die Fortpflanzung der Zuckerrübe erfolgt im Wesentlichen durch Samen, die Reproduktion aus vegetativen Pflanzenteilen ist eher unbekannt. Jedoch kommt es bei der Gattung *Beta* auch zur Apomixis, allerdings nur bei den polyploiden Arten der Sektion *Corollinae*.

Die Zuckerrübe ist als „Unkrautpflanze“ normalerweise nicht überlebensfähig und ruderale Zuckerrüben werden nur sehr selten inmitten anderer Kulturpflanzen, in Gräben oder an Wegrändern beobachtet. Tauchen ruderale Zuckerrüben unter Folgekulturpflanzen auf, so werden sie normalerweise durch die zur Bekämpfung dicotyler Unkräuter eingesetzten Herbizide oder durch andere landwirtschaftliche Verfahren kontrolliert. Rübenköpfe und nach der Ernte im Boden verbliebene Rübensegmente („groundkeeper“) können bei milden Wintern gelegentlich überleben und im nächsten Frühjahr Blüentriebe ausbilden, sie stellen jedoch beim nächsten Fruchtwechsel kein Unkrautproblem dar.

Das Überleben der Zuckerrüben hängt auch von der Temperatur ab. Bei längeren Perioden mit einer Temperatur unter -5°C werden die Pflanzen absterben.

(b) Spezifische, die Überlebensfähigkeit ggf. beeinflussende Faktoren

Siehe Abschnitt B.3.a.

4. Verbreitung

(a) Art und Umfang der Verbreitung

Die Verbreitung kann auf drei Arten erfolgen: als Samen, Pollen und Rübenkopf.

Verbreitung über Samen

Auf Rübenanbauäckern ist die Verbreitung durch Samen eher selten, da die Zuckerrüben bereits zum Ende der ersten Wachstumssaison geerntet werden, d.h. vor der Blüte und der Samenbildung.

Es kann jedoch vorkommen, dass ausgesäte Samen aufgrund von schlechten Keimbedingungen nicht keimen und auflaufen. Dieser Samen wird bei der anschließenden Bodenbearbeitung zur Folgekultur in der Regel tiefer in den Boden eingearbeitet, so dass eine Keimung unmöglich ist. Auch können durch Samen von Schossern oder wieder ausgetriebenen Pflanzen Unkrautrüben-Populationen entstehen. Landwirte gehen aber gezielt gegen diese Unkrautrüben innerhalb des kommerziellen Zuckerrübenanbaus vor, da diese Rüben von nur geringem Ertrag und verminderter Qualität sind. Da die Zuckerrübe im Wechsel mit anderen Kulturpflanzen angebaut wird, eröffnet sich zudem die Möglichkeit der Bekämpfung von Unkrautrüben innerhalb der Fruchtfolge.

Die meisten aus Schossern zu Boden fallenden Samen keimen in derselben Saison aus. Aufgrund von schlechten Bedingungen oder vorhandenen Keimungshemmern kommt es jedoch vor, dass einige Samenkörner nicht keimen. Dieser Samen wird dann im Herbst zum Teil so tief in den Boden gepflügt, dass eine Keimung unmöglich ist und Dormanz eintritt. Gelangt dieser Samen dann später beim Pflügen wieder an die Oberfläche, so ist er prinzipiell in der Lage zu keimen. Durch Vögel, die sich vom Samen der Saatgutproduktionsfelder und den Kreuzungspartnern der Züchter ernähren, kann ein Teil des Samens außerhalb der Felder verbracht werden.

Auch Zuckerrübensamen, der zehn Jahre oder länger dormant im Boden ruht, behält einen Teil seiner Keimfähigkeit (Brouwer, 1976; Lysgaard, 1991; OECD, 2001). Keimen Samen von Unkrautrüben bei einem nachfolgenden Fruchtwechsel aus, so können sie mit den derzeit zugelassenen Herbiziden in der Folgekultur bekämpft werden, so dass eine weitere Verbreitung verhindert wird.

Verbreitung über Pollen

Die Zuckerrübe wird fremdbestäubt. Der Pollen wird vor allem über den Wind, aber auch durch Insekten verbreitet. Er ist jedoch sehr empfindlich gegenüber Feuchtigkeit und seine Lebensfähigkeit unter Freilandbedingungen beträgt nur bis zu 24 Stunden (Artschwager and Starrett, 1933). Bei trockenen Bedingungen und niedriger Temperatur kann er dagegen mehrere Tage lebensfähig bleiben (Brouwer, 1976; siehe auch Abschnitt B.2).

Verbreitung über vegetative Pflanzenteile

Üblicherweise werden bei der Rübenenernte auf dem Feld die Blätter von den Rüben abgetrennt und in den Boden eingearbeitet, wo sie abgebaut werden. Aus zurückbleibenden Rübenköpfen oder Teilen des Rübenkörpers können sich prinzipiell Pflanzen entwickeln. Diese Art der Ausbreitung ist jedoch sehr selten, da solche Pflanzenreste meist durch die übliche Bodenbearbeitung zerstört und in den Boden eingearbeitet werden (siehe auch Abschnitt B.3.a.).

(b) Spezielle, die Verbreitung ggf. beeinflussende Faktoren

Siehe Abschnitt B.4.a.

5. Geographische Verbreitung der Pflanze

Die verwandten Wildformen der Zuckerrübe haben ihren Ursprung in Kleinasien, aber einige Arten sind im ganzen Mittelmeerraum weit verbreitet. Alle Kulturformen der Rübe, d.h. vom Mangold mit der Nutzung der Blätter bis zu Arten mit Speicherwurzeln haben ihren Ursprung wahrscheinlich in der Wildrübe *Beta vulgaris* L. ssp. *maritima* (OECD, 2001).

Die Zuckerrübe ist die wichtigste Kulturpflanze für die Zuckerproduktion in den gemäßigten Klimazonen der nördlichen Hemisphäre. Seit Mitte der 40iger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die Zuckerrübe auch als Winterkulturpflanze in heißeren Klimaten wie z.B. der Türkei, Marokko, Algerien, Tunesien, Ägypten, Syrien, dem Irak und dem Iran angebaut.

6. Bei Pflanzenarten, die in den Mitgliedstaaten normalerweise nicht angebaut werden, Beschreibung des natürlichen Lebensraums der Pflanze und weitere Informationen

Nicht zutreffend.

7. Weitere mögliche Wechselwirkungen der Pflanze mit anderen Organismen im Ökosystem, in dem sie normalerweise angebaut wird, oder andernorts, einschließlich Informationen über toxische Effekte auf Menschen und Tiere oder andere Organismen

Es ist bekannt, dass sich in der Natur Zuckerrüben und andere Organismen gegenseitig beeinflussen. Insekten oder Säugetiere ernähren sich von Blättern oder Wurzeln der auf den Feldern wachsenden Pflanzen. Die Zuckerrübe ist darüber hinaus anfällig für bestimmte Pilz- und Viruserkrankungen und wird in ihrer Entwicklung durch die Konkurrenz anderer, in der Nachbarschaft wachsender Unkräuter beeinträchtigt.

Die Zuckerrübe ist weder pathogen noch gesundheitsschädlich. Die Zuckerrübe wird weit verbreitet angebaut und hat eine lange Geschichte der sicheren Nutzung.

C. INFORMATIONEN ÜBER DIE GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG

1. Beschreibung der für die gentechnische Veränderung angewandten Verfahren

Zur Herstellung der Zuckerrübentransformante H7-1 wurde ein entschärfter („disarmed“), als PV-BVGT08 bezeichneter binärer *Agrobacterium tumefaciens* Pflanzentransformationsvektor verwendet. Der Vektor PV-BVGT08 enthielt, abgegrenzt von der rechten und linken Borderregion, das die Glyphosat-Toleranz vermittelnde *cp4 epsps*-Gen.

Für die Transformation wurde eine multigerme KWS-Zuchtlinie verwendet. Aus den sterilen Sämlingen der Zuckerrübenlinie hervorgegangene Keimblätter wurden als Explantat-Quelle genutzt. Die Transformation wurde mit einer das PV-BVGT08 Plasmid enthaltenden Agrobakterien-Suspension durchgeführt. Die Pflanzen wurden in ein selektives Medium überführt, welches zur Elimination des Agrobakteriums 500 mg/L Carbenicillin enthielt. Zur abschließenden Selektion putativer Transformanten wurde Glyphosat verwendet.

2. Art und Herkunft des verwendeten Vektors

Der Plasmidvektor PV-BVGT08 ist ein entschärfter *Agrobacterium tumefaciens* „Double border“-Vektor, der aus 8590 bp besteht. Er enthält DNA-Sequenzen, die für den Transfer der T-DNA in die Zelle erforderlich sind. Diese werden begrenzt von der rechten (RB) und linken Borderregion (LB), wobei jede Region eine 21-25 bp Sequenz enthält, die den Start- bzw. Endpunkt der zu transferierenden DNA markiert. Die genetischen Elemente zwischen den T-DNA Rändern, von der rechten zur linken Borderregion sind:

- der 35S Promotor aus einem modifizierten Figwort Mosaic Virus (FMV);
- eine Chloroplasten-Transitpeptid Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* (*ctp2*);
- die für die *epsps* kodierende Sequenz aus *Agrobacterium* sp. Stamm CP4 (*cp4 epsps*) und
- das E9 3' Polyadenylierungssignal des *rbcS* E9 Gens (E9 3') der Erbse (*Pisum sativum*).

Der Promotor, die Sequenz für das Chloroplastenpeptid, die Kodierungsabschnitte und das E9 3' Polyadenylierungssignal bilden die *cp4 epsps*-Genkassette.

Zusätzlich enthält das Plasmid PV-BVGT08 einen bakteriellen Selektionsmarker, *aad*, der Resistenz gegen Spectinomycin und Streptomycin verleiht, sowie den Startpunkt der Replikation (*ori-V* und *ori-322*), der für die Replikation und die Selektion des Plasmids PV-BVGT08 in Bakterien notwendig ist. All diese genetischen Elemente befinden sich außerhalb der T-DNA. Wie erwartet, wurde keines dieser Elemente in die Zuckerrübentransformante H7-1 eingebracht (siehe Abschnitt D.2).

Abbildung 1 zeigt eine Karte des Vektors; eine Beschreibung der einzelnen genetischen Elemente findet sich in Tabelle 2. Zahlreiche Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen mit Lokalisation der Basenpaare sind in Abbildung 1 ebenfalls dargestellt.

3. Größe, Ursprung (Name) des Spenderorganismus und geplante Funktion jedes konstituierenden Fragments der für den Transfer vorgesehenen Region

Die genetischen Elemente zwischen den rechten und linken Borderregionen der T-DNA sind die Bestandteile der *cp4 epsps*-Genkassette, bestehend aus dem 35S Promotor aus einem modifizierten Figwort Mosaic Virus (P-FMV), einer Chloroplasten-Transitpeptid Sequenz aus *Arabidopsis thaliana*, der *cp4 epsps* Gen-Kodierregion basierend auf der Sequenz aus *Agrobacterium* sp., Stamm CP4 und dem E9 3' Polyadenylierungssignal des *rbcS E9* Gens aus *Pisum sativum*. Eine Beschreibung der genetischen Elemente und ihrer Funktionen wird in den folgenden Absätzen gegeben.

P-FMV

Die Transkription der *ctp2::cp4 epsps* kodierenden Sequenz wird durch den 35S Promotor reguliert. Dieser Promotor aus einem modifizierten Figwort Mosaic Virus (FMV) ist in der Pflanze konstitutiv aktiv (Gowda *et al.*, 1989; Richins *et al.*, 1987; Sanger *et al.*, 1990; Shepherd *et al.*, 1987).

ctp2 Chloroplasten-Transitpeptid Sequenz

Das Zielenzym von Glyphosat in der Pflanze, die 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS), ist in den Chloroplasten lokalisiert. Viele in den Chloroplasten lokalisierte Enzyme, einschließlich der EPSPS, werden über Vorstufen durch Gene des Zellkerns exprimiert und durch Chloroplasten-Transitpeptide (CTP) in die Chloroplasten verbracht. Es wurde *in vivo* (Timko *et al.*, 1988) und *in vitro* (Della-Cioppa *et al.*, 1986; Della-Cioppa *et al.*, 1987) gezeigt, dass Nicht-Chloroplasten Proteine durch Fusionsproteine, die ein CTP enthielten, in die Chloroplasten verbracht wurden. Um die Lokalisation des CP4 EPSPS Proteins, das als bakterielles Protein kein CTP enthält, im Chloroplasten zu erreichen, wurde die *ctp2* Chloroplasten-Transitpeptid Sequenz des *Arabidopsis thaliana epsps* Gens mit der *cp4 epsps* kodierenden Sequenz verbunden. Bei *Lactuca sativa* (Della-Cioppa *et al.*, 1986; Della-Cioppa *et al.*, 1987) wurde gezeigt, dass das CTP2-CP4 EPSPS Fusionsprotein in die Chloroplasten transferiert wurde. Der gezielte Transport des CP4-EPSPS Proteins zu den Chloroplasten ist von entscheidender Bedeutung, um einen hohen Toleranzgrad gegenüber Glyphosat zu erzielen (Della-Cioppa *et al.*, 1987).

cp4 epsps kodierende Sequenz

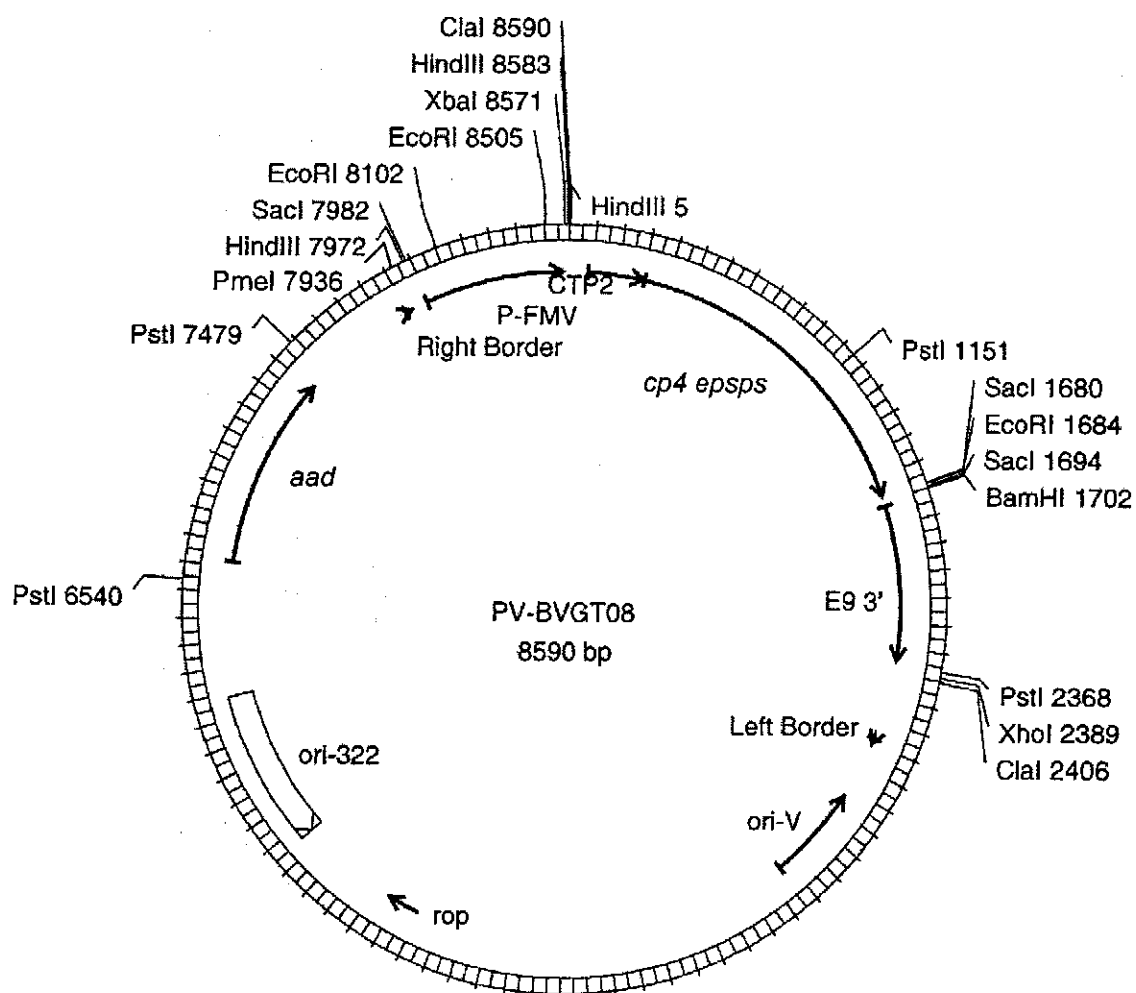
Das *cp4 epsps* Gen wurde ursprünglich aus dem *Agrobacterium* sp. Stamm CP4 isoliert und kodiert für die 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase (CP4 EPSPS), die im Gegensatz zu den meisten pflanzlichen und mikrobiellen EPSPS Enzymen gegenüber Glyphosat tolerant ist (Padgett *et al.*, 1996a). EPSPS katalysiert die Umsetzung von Shikimat-3-Phosphat und Phosphoenolpyruvat (PEP) in 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat (EPSP), ein Intermediärprodukt, das für die Synthese aromatischer Aminosäuren erforderlich ist (Haslam, 1974; Herrmann, 1983). Das *cp4 epsps* Gen kodiert für CP4 EPSPS, ein 47,6 kDa Protein, bestehend aus einem Polypeptid aus 455 Aminosäuren, das hochgradig tolerant gegenüber Glyphosat ist und der Pflanze Glyphosat-Toleranz verleiht (Padgett *et al.*, 1996a).

E9 3' Polyadenylierungssignal

Der *ctp2::cp4 epsps* kodierenden Sequenz folgt die E9 3' DNA Sequenz aus *Pisum sativum*, die die Polyadenylierungsstellen des *rbcS* E9 Gens (Coruzzi *et al.*, 1984) enthält und damit die mRNA-Transkription und Polyadenylierung steuert.

T-DNA Rand- oder Borderregionen

Das Plasmid PV-BVGT08 enthält die rechte und linke Borderregion, die den in das Genom der Zuckerrübe zu integrierenden DNA-Bereich eingrenzt. Diese Borderregionen entstammen aus *Agrobacterium tumefaciens* isolierten Plasmiden (Barker *et al.*, 1983; Depicker *et al.*, 1982).



Die genetischen Elemente und Enzymrestriktionsstellen der Southern-Blot-Analyse sind im inneren bzw. äußeren Bereich der Karte verzeichnet (relative Positionen zum Plasmidvektor).

Abbildung 1. Plasmidkarte PV-BVGT08 mit Restriktionsstellen

Tabelle 2. Zusammenfassung der genetischen Elemente im Plasmid PV-BVGT08

Genetisches Element	Größe (kb)	Funktion
Rechter Border	0,025	Eine Nukleotidsequenz aus 21-25 bp, die als Startpunkt des DNA-Transfers in die Pflanzenzellen fungiert und ursprünglich aus <i>A. tumefaciens</i> pTiT37 isoliert wurde (Depicker <i>et al.</i> , 1982)
P-FMV	0,672	Der 35S Promotor aus einem modifizierten Figwort Mosaic Virus (FMV) (Gowda <i>et al.</i> , 1989; Richins <i>et al.</i> , 1987; Sanger <i>et al.</i> , 1990; Shepherd <i>et al.</i> , 1987)
<i>ctp2</i>	0,31	Der N-Terminus der Chloroplasten-Transitpeptid Sequenz aus dem <i>Arabidopsis thaliana</i> EPSPS-Gen (Timko <i>et al.</i> , 1988)
<i>cp4 epsps</i>	1,363	Das 5-Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase Gen (CP4 EPSPS) aus dem <i>Agrobacterium</i> sp., Stamm CP4 (Padgett <i>et al.</i> , 1995)
E9 3'	0,63	Das 3'-Ende der <i>rbcS</i> E9 Gen-Sequenz aus <i>Pisum sativum</i> , das die Polyadenylierungsstellen enthält und die mRNA Bildung und Polyadenylierung steuert (Coruzzi <i>et al.</i> , 1984; Morrelli <i>et al.</i> , 1985)
Linker Border	0,025	Eine Nukleotidsequenz aus 21-25 bp, die als Endpunkt den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle abgrenzt. Sie wurde ursprünglich aus <i>A. tumefaciens</i> Plasmid pTi15955, einem Abkömmling des Octopin-Typ Plasmids pTiA6 isoliert (Barker <i>et al.</i> , 1983)
<i>ori-V</i>	0,393	Der vegetative Replikationsursprung, ursprünglich aus dem Plasmid RK2 isoliert (Rogers <i>et al.</i> , 1987)
<i>ori-322</i>	0,629	Ein Plasmid-Replikationsursprung, der die Vermehrung der DNA in bakteriellen Wirtsorganismen, z.B. <i>E. coli</i> , ermöglicht (Sutcliffe, 1979)
<i>rop</i>	0,191	Ein Segment aus dem Plasmid pBR322, das die Bildung von RNA Primern unterdrückt, ein wichtiges Kriterium zur Erhaltung des Plasmids in anderen Bakterien wie z.B. <i>E.coli</i> (Bolivar <i>et al.</i> , 1977; Cesareni <i>et al.</i> , 1982)
<i>aad</i>	0,789	Das bakterielle Gen, das die Tn7 AAD 3' Adenyltransferase kodiert, die Resistenz gegen Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Fling <i>et al.</i> , 1985)

D. INFORMATIONEN ÜBER DIE GENTECHNISCH VERÄNDERTE PFLANZE

1. Beschreibung der eingeführten oder veränderten Merkmale und Eigenschaften

Die H7-1 Zuckerrübentransformante enthält ein voll funktionsfähiges Gen, das für das CP4 EPSPS Protein kodiert und den Pflanzen Toleranz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat verleiht. Glyphosat hat ein sehr breites herbizides Wirkungsspektrum und positive Umwelteigenschaften. Da konventionelle Kulturpflanzen üblicherweise sehr empfindlich auf Glyphosat reagieren, war eine Anwendung des Herbizids während des Wachstums der Kulturen bisher nicht möglich. Durch die Erweiterung der Anwendbarkeit von Glyphosat auf entsprechend gentechnisch tolerante Kulturpflanzen ergibt sich für den Landwirt eine neue Möglichkeit der Unkrautkontrolle in der Zuckerrübe. Durch Glyphosat lässt sich die Unkrautkontrolle sehr wirksam und kostengünstig, bei gleichzeitig gegenüber bisher üblichen Herbiziden günstigem Umweltprofil des Herbizids gestalten.

2. Informationen über die tatsächlich eingeführten / deletierten Sequenzen

(a) Größe und Struktur des eingeführten Genabschnitts (Insert) und Verfahren zu seiner Charakterisierung

Die molekulare Analyse wurde durchgeführt, um die in das Genom der H7-1 Zuckerrübe inserierte DNA genauer zu charakterisieren. Die genomische DNA wurde mit Southern Blot (Southern, 1975) analysiert, um die Anzahl der Insertionen (Inserts) der integrierten DNA in das Zuckerrübengenom und die Anzahl der in das Genom eingefügten Kopien (Anzahl der Kopien an einem Integrationsort) sowie das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von weiteren Plasmidsequenzen („backbone“) zu ermitteln.

Die durchgeführten Analysen lassen folgende Schlüsse zu:

- (1) Das Genom der H7-1 Zuckerrübe enthält nur ein DNA Insert, das aus einer Kopie der *cp4 epsps* Expressionskassette besteht, die mit der DNA der Zuckerrübe verknüpft ist.
- (2) Das H7-1 Zuckerrübengenom enthält keine messbaren „backbone“ Sequenzen des Plasmids. Die Replikationsursprünge (*ori V* und *ori 322*) und das *aad* Gen sind in der H7-1 Zuckerrübe nicht vorhanden.

Die Resultate der molekularen Analyse bestätigen die Schlussfolgerung, dass die in das Genom der Zuckerrübe inserierte DNA nur für das gewünschte CP4 EPSPS Protein kodiert.

Der folgende Abschnitt beschreibt die für die Charakterisierung der inserierten DNA vorgenommenen Untersuchungen und Ergebnisse.

Anzahl an Inserts

Die Anzahl der Inserts der eingefügten DNA in das Genom der Zuckerrübe wurde für die Transformante H7-1 ermittelt. Um die Zahl der Inserts zu bestimmen, wurde die genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *Hind*III, *Xba*I und *Bam*HI (Abbildung 2) geschnitten („verdaut“). Als Negativkontrolle wurde DNA von einer nicht transformierten Kontrollpflanze, mit gleichem genetischen Hintergrund, mit *Hind*III geschnitten. Als Positivkontrolle wird die DNA des Transformationsvektors (PV-BVGT08) verwendet.

Diese Enzyme schneiden einmal in PV-BVGT08, schneiden aber nicht innerhalb der verwendeten markierten *cp4 epsps*-Sonde (Abbildung 2). Die Enzyme setzen so Fragmente frei, die Teile der eingebrachten DNA und der angrenzenden genomischen DNA der Pflanze enthalten. Die Anzahl der entdeckten Fragmente kennzeichnen die Zahl der in der H7-1 Zuckerrübe vorhandenen Inserts.

Die Ergebnisse werden in Abbildung 3 gezeigt. Nach dem Schneiden mit den Enzymen *Hind*III, *Xba*I oder *Bam*HI wurde jeweils nur ein einziges Hybridisierungsfragment entdeckt. Die Fragmente von 5,2 kb Länge aus dem Verdau mit *Hind*III (Spur 4), von 4 kb Länge aus dem Verdau mit *Xba*I (Spur 5) und ca. 11 kb Länge aus dem Verdau mit *Bam*HI (Spur 7) zeigen, dass die Transformante H7-1 ein einziges Integrationsereignis aufweist. Das starke Signal in Spur 1 stellt das linearisierte PV-BVGT08 Plasmid dar. Das zweite, sehr schmale und schwache Bandenmuster ist wahrscheinlich auf einen unvollständigen Verdau von PV-BVGT08 zurückzuführen. Diese Einschätzung basiert auf der Kenntnis, dass Plasmide in unterschiedlichen Formen (Isoformen), d.h. ringförmig, linear oder als multimerische Concatamere auftreten können. Ein unvollständiger Verdau einer hoch konzentrierten Probe von Plasmid DNA kann zu einer oder mehreren Banden im Agarose-Gel führen. Die negative, d.h. die genomische DNA einer nicht transformierten Kontrolle (Spur 8) zeigte erwartungsgemäß kein Signal.

Anzahl Kopien

Theoretisch könnte eine Integrationsstelle aus mehr als einer Kopie der eingeschleusten DNA bestehen. Aber aufgrund der Fragmentgröße beim oben gezeigten Restriktionsverdau war dies eher unwahrscheinlich. Wäre mehr als eine Kopie der eingeschleusten DNA in H7-1 vorhanden, so würden zusätzliche Fragmente entdeckt werden.

Diese These wurde auch durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Pst*I unterstützt. *Pst*I schneidet in der T-DNA zweimal, zwischen den linken und rechten „Border“-Sequenzen (Abbildung 2). Eine der Restriktionsstellen liegt innerhalb des *cp4 epsps*-Gens, daher würde man nach dem Verdau mit der *cp4 epsps*-Gensonde zwei Hybridisierungsfragmente erwarten. Eines der erwarteten Fragmente entspricht dem internen Fragment von 1,2 kb. Das zweite Fragment dürfte eine Fusionsstelle mit dem Zuckerrüben-Genom enthalten. Auch hier gilt, gäbe es mehr als eine Kopie, so würden zusätzliche Fragmente nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass *Pst*I die DNA wie erwartet schnitt. Es wurde das interne Fragment von 1,2 kb Länge und nur ein zusätzliches Fragment von 4,9 kb Länge entdeckt (Abbildung 3, Spur 3).

Als zusätzliche interne Kontrolle wurde die DNA mit *Cla*I geschnitten (Abbildung 3, Spur 6). Wie erwartet, hybridisierte ein einziges 2,4 kb langes Fragment mit der *cp4 epsps* Gensonde, da *Cla*I zweimal außerhalb des *cp4 epsps*-Gens aber innerhalb der eingefügten T-DNA Kasette schneidet. Dieses Ergebnis zeigt zudem die Unversehrtheit des integrierten DNA-Fragments.

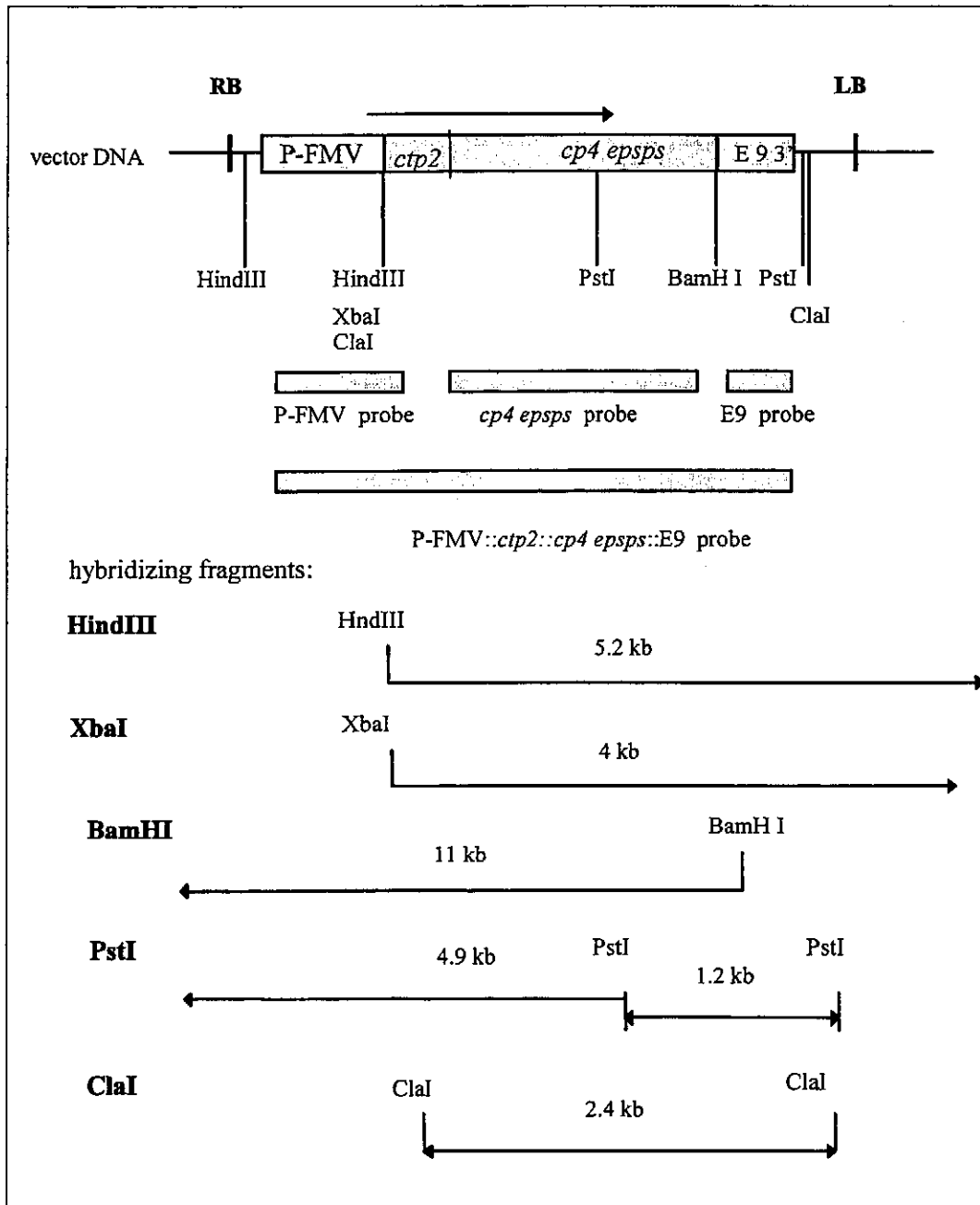


Abbildung 2. Schematische Charakterisierung des H7-1 Inserts

Die Karte zeigt das Insert und die flankierenden Regionen bei der H7-1 Zuckerrübe. Der obere Teil der Abbildung zeigt die genetischen Elemente innerhalb des Inserts und die Schnittstellen der für die Southern-Blot-Analyse verwendeten Restriktionsenzyme. Die Balken unter den genannten Inserts bezeichnen die für die Analyse verwendeten Sonden. Im unteren Teil der Karte sind die Größen der DNA Fragmente nach dem Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen dargestellt.

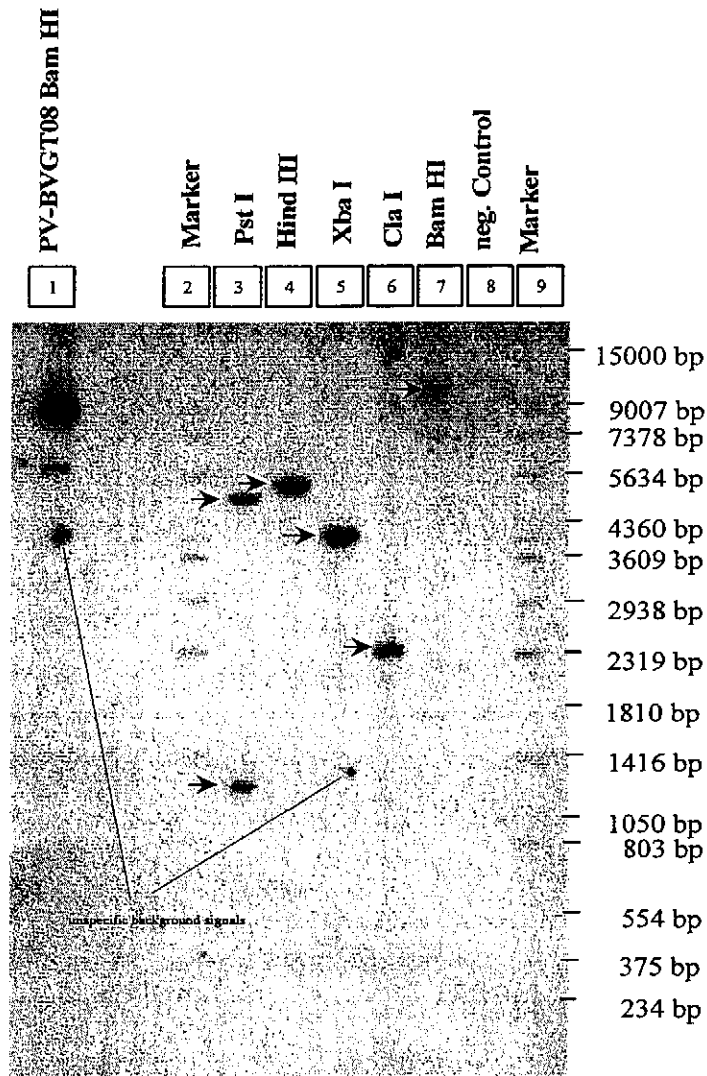


Abbildung 3. Southern-Blot-Analyse der Transformante H7-1: Analyse der Anzahl der Inserts und Kopien

Verschiedene Proben mit 10 µg der genomischen DNA der H7-1 Zuckerrübe wurden mit *Pst*I, *Hind*III, *Xba*I, *Cla*I und *Bam*HI (Spur 3 bis 7) geschnitten. Genomische DNA der nicht-transformierten Negativkontrolle wurde mit *Bam*HI (Spur 8) geschnitten. Als Positivkontrolle wurde Plasmid PV-BVGT08 ebenfalls mit *Bam*HI (Spur 1) geschnitten. Spur 2 und 9 stellen Größenmarkierungen dar.

Der Blot wurde mit einer ³²P-markierten *cp4 epsps* Kodierregion hybridisiert. Die Sonde ist eine interne Sequenz des *cp4 epsps* Gens, das die Basenpaare 447 bis 1555 umfasst.

Ermittlung des Vorhandenseins anderer PV-BVGT08 Plasmidsequenzen („backbone“)

Es wurde nicht erwartet, dass genetische Elemente von außerhalb der Bordersequenzen von Plasmid PV-BVGT08 (*ori-V*, *ori-322* und *aad*) in das Genom der Zuckerrübe transferiert wurden.

Um zu ermitteln, ob Sequenzen des „backbone“ außerhalb der T-DNA-Region in das Rüben-genom der Transformante H7-1 transferiert wurden, wurde die gesamte T-DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Genomische DNA von H7-1, nicht transformierte Kontroll-DNA und PV-BVGT08 DNA versetzt mit genomischer DNA von H7-1 wurden mit dem Restriktionsenzym *Xba*I geschnitten und dann mit drei überlappenden mittels PCR erzeugter Gensonden, die die gesamte „backbone“ Sequenz umfassen, hybridisiert (Sonde 1, 2 and 3, Abbildung 4). Eine vierte Sonde bestehend aus dem gesamten „backbone“ in einem Fragment wurde ebenfalls verwendet (Sonde 4, Abbildung 4).

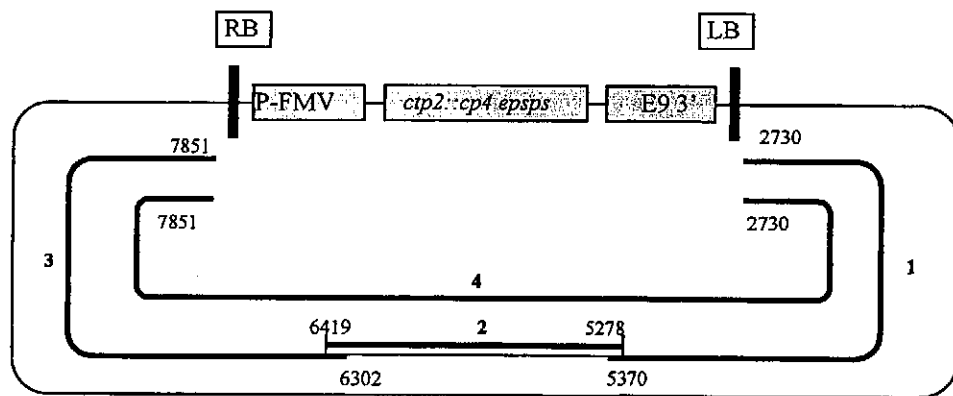
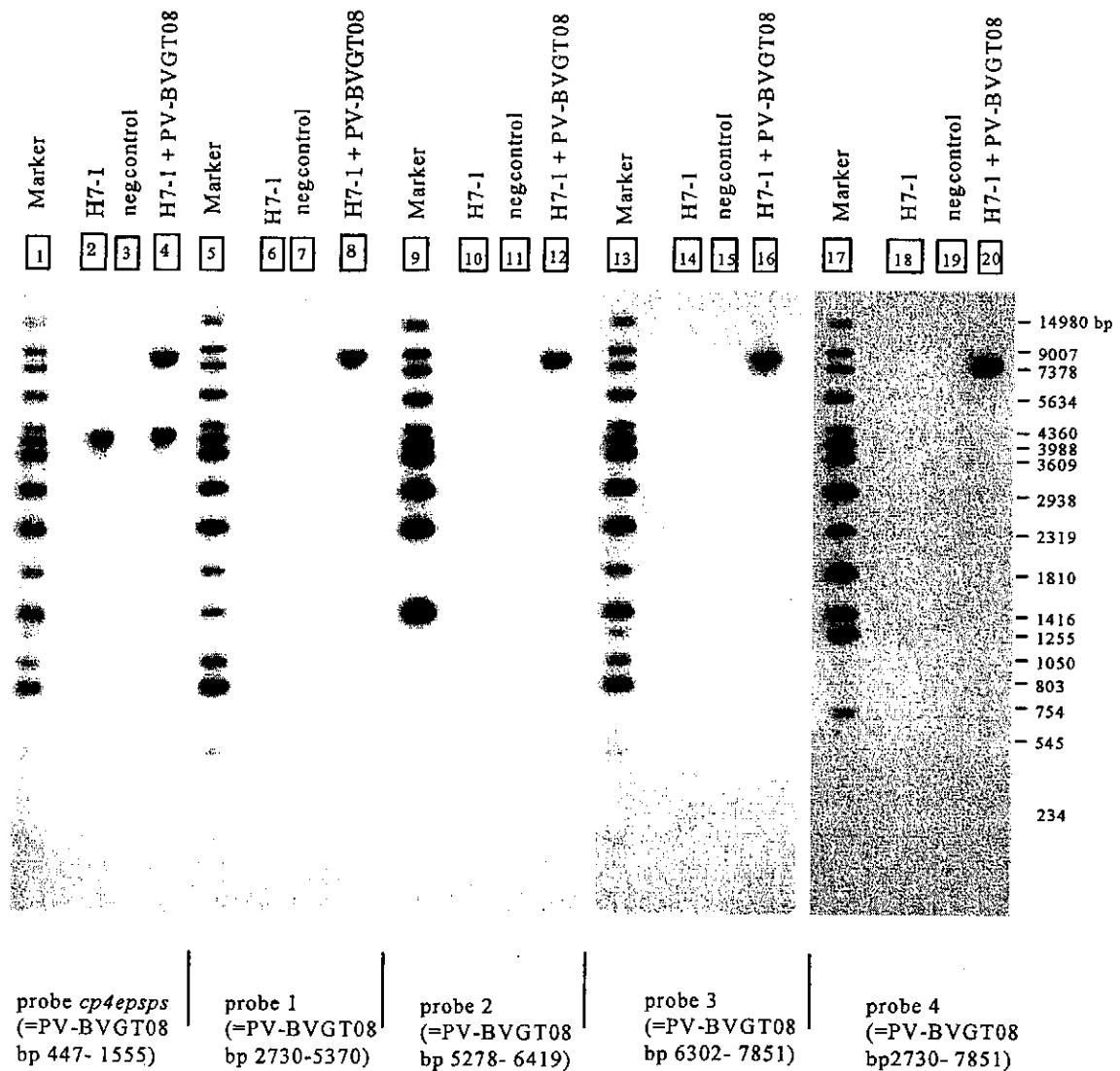


Abbildung 4. Fragmente des „backbone“, die als Gensonden verwendet wurden

Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Southern-Blot-Analysen, bei denen alle vier Gensonden eingesetzt wurden, um das Fehlen von Plasmid „backbone“ Sequenzen zu prüfen. In den Spuren 6, 10, 14, und 18, zeigt der Verdau der genomischen DNA von H7-1, die mit den überlappenden „backbone“-Gensonden hybridisiert wurde, keine Hybridisierungsbanden. Gleiches gilt für die Negativkontrollen (Spur 3, 7, 11, 15 und 19). Nur die Positivkontrollen, d.h. genomische DNA von H7-1 versetzt mit PV-BVGT08 DNA, zeigten erwartungsgemäß Banden eines 8,6 kb langen Fragments (Spuren 4, 8, 12, 16 und 20). Diese Banden stellen die linearisierte PV-BVGT08-DNA dar.

Als DNA-Konzentrationskontrolle wurden die genomische DNA von H7-1 (Spur 2) sowie die mit PV-BVGT08-DNA versetzte genomische DNA von H7-1 (Spur 4), mit *Xba*I geschnitten und mit einer Sonde, die das *cp4 epsps*-Gen enthielt, hybridisiert. Die Bande eines 4,0 kb langen Fragments in Spur 2 zeigt ein DNA-Fragment, das den mit einem Teil der genomischen Zuckerrüben-DNA verschmolzenen P-FMV Promotor enthält. Die beiden Banden der Spur 4 zeigen das gleiche 4,0 kb Fragment mit der 8,6 kb linearisierten PV-BVGT08 Plasmid-DNA. Beide Banden sind von gleicher Intensität, was eindeutig beweist, dass die Konzentration der zugefügten PV-BVGT08-DNA mit der Konzentration des *cp4 epsps*-Elements in der DNA von H7-1 vergleichbar ist. Die Konzentration der verwendeten Plasmid-DNA ist äquivalent zu einer halben Kopie. Wenn signifikante Sequenzen des „backbone“ in das H7-1 Genom integriert wären, so hätten eindeutige Signale nachweisbar sein müssen.



negcontrol = nicht-transgene Negativkontrolle
probe = Sonde

Abbildung 5. Southern-Blot Analyse der Transformante H7-1: Analyse des PV-BVGT08 „backbone“

10 µg genomische DNA von H7-1, nicht transgene Negativ-Kontroll-DNA und H7-1 transgene DNA versetzt mit PV-BVGT08 wurden mit *Xba*I geschnitten. Die Blots wurden mit ³²P-markierten Sonden hybridisiert, die den gesamten „backbone“ von PV-BVGT08 umfassen (Sonde 1-4). Ein Blot wurde mit einem ³²P markierten *cp4 epsps*-Fragment hybridisiert.

Zusammenfassung der molekularen Analyse der H7-1 Zuckerrübe

Die Untersuchungen zur molekularen Charakterisierung haben gezeigt, dass das H7-1 Pflanzengenom nur ein DNA Insert, bestehend aus einer Kopie der *cp4 epsps* Expressionskassette enthält. Die Elemente der *cp4 epsps* Kassette sind intakt. Die H7-1 Zuckerrübe enthält keine nachweisbaren „backbone“ Sequenzen aus dem für die Transformation verwendeten Plasmid. Die Replikationsursprünge (*ori-V* und *ori-322*) und das *aad* Gen sind in H7-1 nicht vorhanden.

(b) Bei einer Deletion – Größe und Funktion der deletierten Region(en)

Nicht zutreffend.

(c) Kopienzahl des Inserts

Die Analysen zur Charakterisierung der inserierten DNA lassen erkennen, dass das Genom der H7-1 Zuckerrübe lediglich eine Kopie der *cp4 epsps* Expressionskassette enthält (siehe Abschnitt D.2.a).

(d) Lage des Inserts in den Pflanzenzellen (Integriert in das Chromosom, die Chloroplasten oder die Mitochondrien bzw. in einer nicht-integrierten Form) und Verfahren zu seiner Bestimmung

Das Genom der H7-1 Zuckerrübe enthält ein DNA Insert, das entsprechend der Mendelschen Vererbungslehre aufspaltet und vererbt wird. Analysen zur Aufspaltung bei der H7-1 Zuckerrübe lassen erkennen, dass die *cp4 epsps* Expressionskassette als Einzelkopie stabil in das Kerngenom integriert wurde und entsprechend stabil vererbt wird (siehe Abschnitt D.5).

3. Informationen über die Expression des Inserts

(a) Informationen über die Expression des Inserts im Verlauf des Lebenszyklus der Pflanze und Verfahren für seine Charakterisierung

Die H7-1 Zuckerrübe enthält ein eingeführtes, funktionelles CP4 EPSPS Protein, dieses Protein verleiht der Pflanze Toleranz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat. Das Expressionsniveau des CP4 EPSPS Protein wurde 1998 und 1999 in glyphosat behandelten Zuckerrüben von 16 Standorten in Europa bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass das Expressionsniveau des eingeführten Proteins unter unterschiedlichen klimatischen Bedingungen vergleichbar ist.

In den Jahren 1998 und 1999 wurden an 10 bzw. 6 Standorten in wichtigen Zuckerrübenanbaugebieten Europas Freilandversuche durchgeführt. An allen Standorten wurden Pflanzenproben, d.h. Brei-Proben des Wurzelkörpers und Rübenköpfe (Blätter), entnommen und mittels eines validierten ELISA-Verfahrens hinsichtlich der Expression des CP4 EPSPS Proteins analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Das durchschnittliche

Expressionsniveau des CP4 EPSPS Proteins im Rübenkopf lag 1998 bei 0,172 und 1999 bei 0,161 µg/mg Frischmasse (FM). Im Rübenbrei lag das durchschnittliche Expressionsniveau 1998 bei 0,053 und 1999 bei 0,181 µg/mg Frischmasse.

Es ist erkennbar, dass der Gehalt an CP4 EPSPS Protein in den Wurzelproben von 1999 3-fach höher lag als in den Proben des Jahres 1998. Diese 3-fache Erhöhung des CP4 EPSPS Expressionsniveaus ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Methoden von Monsanto-Louvain-la-Neuve (1998er Proben) und Monsanto-St. Louis (1999er Proben) zurückzuführen. Die von Monsanto-St. Louis angewandte Methode war im Vergleich zur von Monsanto-Louvain-la-Neuve Methode hinsichtlich der Extraktionseffizienz (98,7 %) aus der Wurzelmatrix optimiert.

Tabelle 3. Zusammenfassung der Expressionswerte des CP4 EPSPS Proteins im Gewebe der H7-1 Zuckerrübe aus Freilandversuchen (Europa) der Jahre 1998 und 1999

Gewebetyp	1998		1999	
	CP4 EPSPS µg/mg FM (Mittelwert) ³	CP4 EPSPS µg/mg FM (Bereich) ⁴	CP4 EPSPS µg/mg FM (Mittelwert) ³	CP4 EPSPS µg/mg FM (Bereich) ⁴
Rübenkopf ¹	0,172	0,106 – 0,216	0,161	0,102 – 0,307
Brel ²	0,053	0,033 – 0,077	0,181	0,116 – 0,233

FM = Frischmasse

- ¹ 1998: An allen 10 Standorten wurden vor der Ernte der glyphosat-behandelten H7-1 Zuckerrüben Blattproben von 30 Pflanzen genommen. Die 30 Pflanzen wurden zu einer Probe zusammengefasst. Die Proben wurden sofort auf Trockeneis gelegt und eingefroren, um die Stabilität der Proben bis zur Analyse sicherzustellen.
 1999: An jedem der 6 Standorte wurde eine Versuchsparzelle angelegt. Jede Parzelle wurde in 3 Sub-Parzellen unterteilt. Zur Ernte wurden aus jeder Sub-Parzelle (oder Wiederholung) Blattproben von 25-30 zufällig ausgewählten Pflanzen für die Analyse vorbereitet. Pro Standort wurden 3 Einzelproben erzeugt. Die Proben wurden in Plastikröhrchen überführt, auf Trockeneis gelegt und zum Prüflabor versandt.
- ² 1998: Zur Ernte der glyphosat-behandelten H7-1 Zuckerrüben wurden Rübenkörper von 30 H7-1 Zuckerrübenpflanzen je Standort nach Frankreich zum ARGEN Labor geschickt und dort mit einer Breisäge aufbereitet. Die 30 Einzelpflanzen wurden zu einer Analysenprobe zusammengefasst. Um die Stabilität der Proben bis zur Analyse zu gewährleisten wurden die Proben sofort auf Trockeneis gelegt und eingefroren.
 1999: An jedem der 6 Standorte wurde eine Versuchsparzelle angelegt. Jede Parzelle wurde in 3 Sub-Parzellen unterteilt. Zur Ernte wurden aus jeder Sub-Parzelle (oder Wiederholung) die Rübenkörper der 25-30 für die Blattproben zufällig ausgewählten Pflanzen für die Analyse geerntet. Die Rübenkörper wurden nach Frankreich zum ARGEN Labor geschickt und dort mit einer Breisäge aufbereitet. Pro Standort wurden 3 Proben vorbereitet. Die Proben wurden nach der Aufbereitung sofort auf Trockeneis gelegt und bei -80°C bis zur Analyse eingefroren.
- ³ 1998: Der Mittelwert wurde unter Verwendung von n=10 berechnet, wobei von jedem der 10 Standorte eine Einzelprobe zur Analyse zur Verfügung stand. Jede Probe wurde zweifach untersucht.
 1999: Der Mittelwert wurde auf Grundlage von jeweils 3 Einzelproben (Wiederholungen) von jedem Standort berechnet.
- ⁴ 1998: Minimale und maximale Werte der Analysen über alle Standorte
 1999: Minimale und maximale Werte der Analysen über alle Standorte

(b) Pflanzentelle, in denen das eingeführte Insert exprimiert wird (z.B. Wurzeln, Stiel, Pollen, ...)

Die Expression der für das *cp4 epsps* Gen kodierenden Sequenz wird von einem 35S Promotor aus einem modifizierten Figwort Mosais Virus (FMV) reguliert, der in der Pflanze konstitutiv aktiv ist (Kay *et al.*, 1987; Odell *et al.*, 1985; Zhong *et al.*, 1996). Es ist deshalb zu erwarten, dass das CP4 EPSPS Protein in allen Pflanzengewebe gebildet wird. Diese Annahme wird durch die Untersuchungen zur Proteinexpression im Rübenkopf (Blätter) und im Wurzelkörper (Brei) bestätigt.

4. Informationen über Unterschiede zwischen der gentechnisch veränderten Pflanze und der Empfängerpflanze im Hinblick auf: (a) Form(en) und/oder Rate der Fortpflanzung, (b) Verbreitung, (c) Überlebensfähigkeit

Die Zuckerrübe wird seit fast 200 Jahren in Europa angebaut. Die angebauten Rüben sind weder persistent noch invasiv und werden in anderen Kulturpflanzen und Habitaten selten vorgefunden. Die Rübe stellt kein Unkrautproblem in landwirtschaftlich genutzten Lebensräumen dar und kann in natürlichen Habitaten nur bei schwacher Konkurrenz durch andere Pflanzenarten überleben. Das bei der H7-1 Zuckerrübe eingeführte *cp4 epsps* Gen kodiert für das CP4 EPSPS Protein, dass der Pflanze Toleranz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat verleiht. Während der in der Vergangenheit durchgeführten Freisetzungen mit H7-1 Zuckerrüben (siehe Abschnitt D.13., Tabelle 4) wurden keine Hinweise auf durch die gentechnische Veränderung hervorgerufene Änderungen phänotypischer Charakteristika der H7-1 Zuckerrübe gegenüber konventionellen Zuckerrüben gefunden.

Die Tatsache, dass keine Unterschiede hinsichtlich Morphologie, Vitalität, Pflanzengesundheit und Anfälligkeit gegenüber Schädlingen gefunden wurden, weist darauf hin, dass die biologische Fitness und die Überlebensfähigkeit der H7-1 Zuckerrübe durch die gentechnische Veränderung nicht verändert wurden. Es ist deshalb sehr unwahrscheinlich, dass die H7-1 Zuckerrübe auf oder auch außerhalb der Anbaufläche persistenter sein sollte als konventionelle Zuckerrüben oder eine gesteigerte Überlebensfähigkeit, ein höheres Unkrautpotential oder Invasivität in natürliche Lebensräume aufweisen sollte.

Es wird gefolgert, dass die H7-1 Zuckerrübe, abgesehen von der Toleranz gegenüber Glyphosat, aus phänotypischer und agronomischer Sicht gegenüber konventionellen Zuckerrübensorten gleichwertig ist. Entsprechendes ist bezüglich der Fortpflanzung, Verbreitung und Überlebensfähigkeit zu erwarten. Im Rahmen der beantragten Freisetzung sind zudem weitergehende Untersuchungen zu phänotypischen und agronomischen Charakteristika der H7-1 Zuckerrübe geplant.

5. Genetische Stabilität des Inserts und phänotypische Stabilität der gentechnisch veränderten Pflanze

(a) Genetische Stabilität des Inserts der H7-1 Zuckerrübe

Die Eigenschaft der Glyphosat-Toleranz wird entsprechend der Mendelschen Vererbungsregeln aufgespalten und vererbt. Die vorgenommenen Analysen legen den Schluss nahe, dass das Insert in das Kerngenom integriert wurde und nicht in den Mitochondrien oder Chloroplasten lokalisiert ist.

Um zu bestätigen, dass das DNA-Insert bei der RR-Transformante H7-1 stabil in das Pflanzengenom integriert wurde, wurden Southern-Hybridisierungen der genomischen DNA der H7-1 Zuckerrübe und ihrer Nachkommenschaft über 3 Generationen vorgenommen. Die ursprüngliche H7-1 Linie (6401VH = H7-1-1995) wurde mit 3 Generationen (64801H = H7-1-1996, 74922H = H7-1-1997 und 83002S = H7-1-1998) verglichen, die aus Selbstungen und Kreuzungen der ursprünglichen H7-1 Linie mit konventionellen Linien hervorgegangen waren (siehe Abbildung 6).

Als Kontrollen wurden vier verschiedene nicht-transgene Zuckerrübenlinien analysiert (5R7150 = neg.control 1, 8K1180 = neg.control 2, 6S0085 = neg.control 3, 3S0057 = neg.control 4; siehe Abbildung 6). Die DNA der Proben wurde mit den Restriktionsenzymen *Xba*I, *Hind*III und *Bam*HI geschnitten und mit einem ³²P-markierten *cp4 epsps*-Fragment hybridisiert. Sollte das DNA-Insert stabil in das Pflanzengenom integriert worden sein, so wäre zu erwarten, dass alle H7-1 Nachkommen, die mit dem gleichen Restriktionsenzym aufgeschlossen wurden, ein Band von exakt gleicher Länge aufweisen.

Die DNA's der Nachkommen der H7-1 Transformante (Abbildung 6, Spuren 3 - 6) bildeten die erwarteten Fragmente: Mit *Bam*HI geschnittene DNA ergab eine Bande eines ungefähr 11,0 kb langen Fragments, der Verdau mit *Xba*I ergab ein Fragment von 4,0 kb und die *Hind*III-Restriktion ergab eine Bande eines 5,2 kb langen Fragments. Alle Hybridisierungsbanden der gleichen Restriktion aber von unterschiedlichen Nachkommen waren hinsichtlich des molekularen Gewichts und der Mobilität identisch. Dies zeigt, dass das DNA Insert stabil in das Pflanzengenom integriert wurde. Die nicht-transgenen Linien (negative Kontrollen) zeigten kein Signal (Spuren 1, 2, 7 und 8).

Es wurden keine signifikanten Unterschiede der Bandenmuster der H7-1 Zuckerrüben mehrerer Generationen gefunden. Die Resultate belegen die genetische Stabilität der inserierten DNA über 3 Generationen.

Monsanto Agrar Deutschland GmbH

Antrag gem. RL 2001/18/EG, Part B, zur Freisetzung von gentechnisch veränderten, Glyphosat-toleranten Zuckerrüben (H7-1) in Deutschland (2011 – 2013)

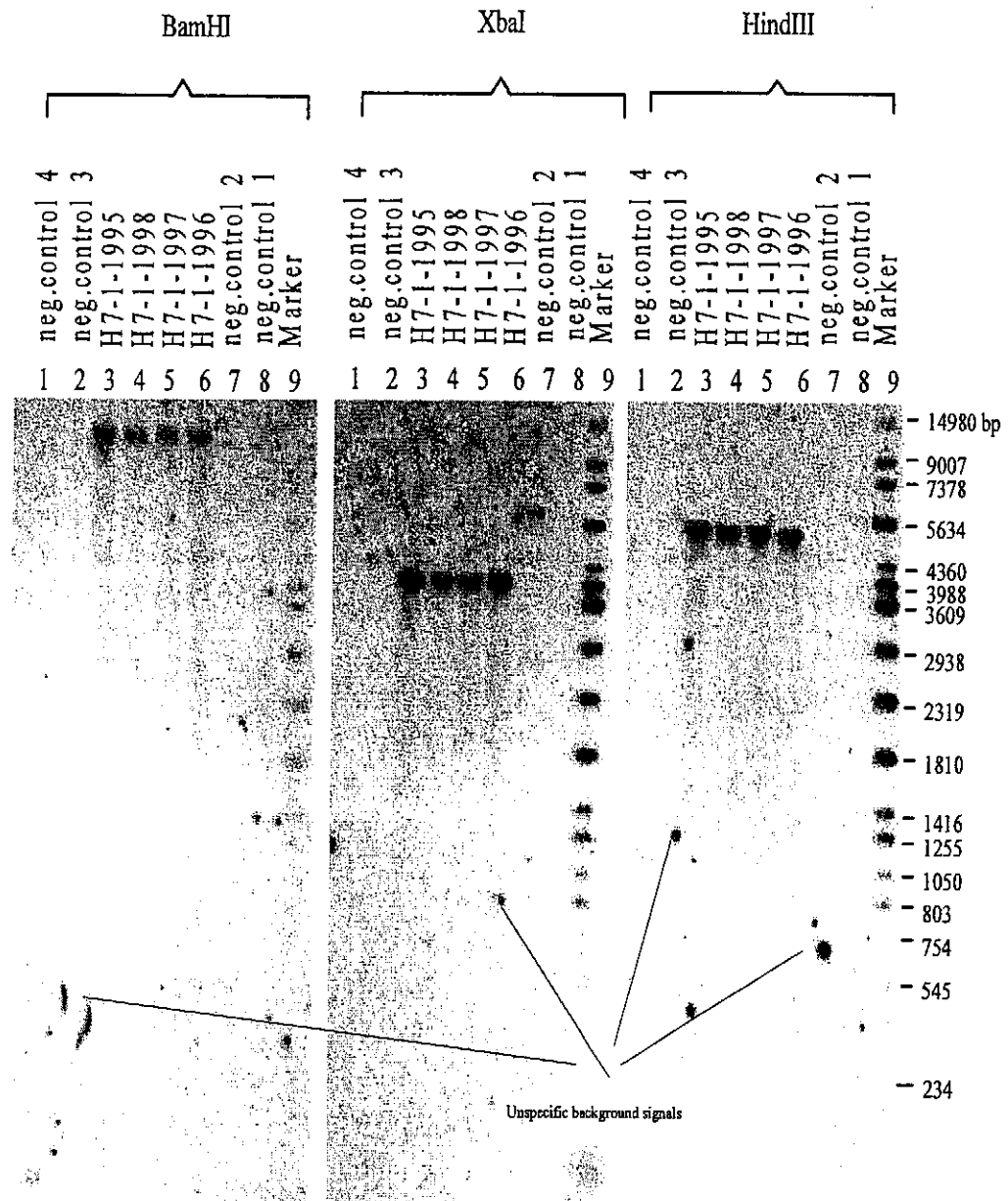


Abbildung 6. Southern-Blot Analyse der H7-1 Transformante: genetische Stabilität

10 µg genomische DNA der ursprünglichen H7-1 Linie [6401VH (H7-1-1995)] und dreier Folgegenerationen [64801H (H7-1-1996), 74922H (H7-1-1997), 83002S (H7-1-1998)] sowie DNA von nicht-transgenen Kontrollen (neg.control) wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI, *Xba*I and *Hind*III geschnitten. Der Blot wurde mit einer ³²P-markierten *cp4 epsps* Sonde von Plasmid PV-BVGT08 (= bp 447 – 1555) markiert.

(b) Phänotypische Stabilität der Glyphosat-Toleranz der H7-1 Zuckerrübe

Bei anderen kommerziell genutzten Glyphosat-toleranten Nutzpflanzen (z.B. Roundup Ready-Sojabohne, Roundup Ready-Raps, Roundup Ready-Baumwolle), die mit dem *cp4 epsps*-Gen transformiert wurden, wird die Glyphosat-Toleranz als ein dominantes Merkmal entsprechend den Mendelschen Regeln vererbt.

Die Prüfung mehrerer Generationen der H7-1 Zuckerrüben hinsichtlich ihrer Toleranz gegenüber Glyphosat in Feldversuchen über einen Zeitraum von 4 Jahren (seit 1996) in 7 europäischen Ländern, haben bestätigt, dass die *cp4 epsps* Expressionskassette stabil vererbt wird, da der Grad an Toleranz über alle Orte und Generationen gleich blieb. Die Toleranz der Pflanzen gegenüber Glyphosat war immer sehr gut und die für die landwirtschaftliche Praxis empfohlenen Dosierungen beeinflussten die Pflanzen nicht.

(c) Schlussfolgerung

Alle Untersuchungen, d.h. Southern-Blot Analyse, Feldstudien und Untersuchungen zur Proteinexpression sind konsistent mit der Vorstellung, dass die Glyphosat-Toleranz entsprechend der Mendelschen Erbgänge vererbt wird. Sie zeigen, dass das DNA Insert stabil vererbt wird und beständig über viele Generationen exprimiert wird.

6. Jede Veränderung der Fähigkeit von gentechnisch veränderten Pflanzen, genetisches Material auf andere Organismen zu übertragen

(a) Gentransfer von Pflanzen auf Bakterien

Es wurden keine Elemente in die H7-1 Zuckerrübe übertragen, von denen bekannt ist, dass diese einen Einfluss auf die Mobilität der DNA hätten. Es wird nicht erwartet, dass sich die H7-1 Zuckerrübe von konventionellen Zuckerrüben hinsichtlich ihrer Fähigkeit zum Austausch genetischen Materials mit Bakterien unterscheidet.

(b) Gentransfer von Pflanze zu Pflanze

Es ist bekannt, dass natürliche Hybridisierungen zwischen kultivierten Formen von *Beta vulgaris* und zwischen *Beta vulgaris* und Wildformen der Section *Beta* möglich sind. Die H7-1 Zuckerrübe hat, abgesehen von der Toleranz gegenüber Glyphosat, die gleichen Eigenschaften wie konventionelle Zuckerrüben, inklusive des Potentials zur Auskreuzung. Die Möglichkeit zur Auskreuzung ist jedoch sehr eingeschränkt, da Zuckerrüben in der Regel zur Erzeugung der vegetativen Wurzel angebaut werden und der Lebenszyklus der Pflanzen in der landwirtschaftlichen Produktion deshalb auf die vegetative Phase beschränkt bleibt. Wenn Zuckerrüben zur Saatgutproduktion angebaut werden, so werden in der Regel technische Abtrennungsmaßnahmen im Feld vorgenommen, um die Möglichkeit eines Gentransfers von Pflanze zu Pflanze zu minimieren.