



Antrag 6786-01-0200 / 42010.0200

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderter Gerste
(*Hordeum vulgare* L.; Golden Promise) pYW210-9-(4001-4360) und pJH271-Beta-Glu-
307 im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde**

Berlin, den 04. Mai 2009

Hinweis zu diesem Dokument:

Der folgende Text fasst die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen zusammen, die für ein Freisetzungsvorhaben in Deutschland genutzt werden sollen. Der Text ist Bestandteil des Genehmigungsbescheids, der zu einem Antrag auf Genehmigung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen nach der Richtlinie 2001/18/EG und dem deutschen Gentechnikgesetz (GenTG) erteilt worden ist. Der Bescheid wurde vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als der in Deutschland nach dem Gentechnikrecht zuständigen Behörde ausgestellt und enthält die Abschnitte:

- I. Genehmigung
- II. Nebenbestimmungen
- III. Begründung
 - III.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 GenTG
 - III.1.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 1 GenTG
 - III.1.2. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG
 - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 2 GenTG
 - III.1.4. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 4 und 5 GenTG
 - III.2 Würdigung und Bescheid der Einwendungen
- IV. Kosten
- V. Rechtsbehelfsbelehrung

Nur der Bescheid ist rechtlich verbindlich. Der folgende Auszug umfasst das Kapitel III.1.2. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing House zusammengestellt.

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

(a) Das *cThEn42(GC)*-Gen

Die von phytopathogenen Pilzen der Gattung *Rhizoctonia* im Pflanzenbau verursachten Keimlingskrankheiten sind durch Absterben der Wurzeln (Wurzelfäule) gekennzeichnet. Gerste wird von *Rhizoctonia solani* AG8 befallen, einer Gruppe mit einem breiten Wirtsspektrum. Hohe Bodenfeuchte und kühlere Temperaturen begünstigen den Pilz in seiner Ausbreitung. Befallene Keimlinge zeigen Welken und Absterben vor oder kurz nach dem Auflaufen. *Rhizoctonia oryzae* befällt ebenfalls Gerste mit ähnlicher Symptomatik, zeigt aber ein etwas anderes Temperaturoptimum und einen weniger schädlichen Infektionsverlauf. *Rhizoctonia oryzae* befällt jedoch auch wichtige Fruchtfolgekulturen wie die Felderbse, so dass der Infektion von Gerste eine wichtige Funktion in der Pathogenese der Pilze besonders auch in Folgekulturen zukommt.

In das Genom der vorliegenden gentechnisch veränderten Gerstentransformanten wurde ein synthetisches Gen übertragen, dessen Produkt, eine Endochitinase, in der Lage ist, Chitin (Poly-N-acetyl-D-glucosamin) als wesentlichen gerüstbildenden Bestandteil der pilzlichen Zellwand innerhalb des Polymers zufallsverteilt zu spalten. Hierdurch soll eine verbesserte Resistenz der Gerste gegen die durch *Rhizoctonia*-Arten verursachte Wurzelfäule erreicht werden.

Das Gen wurde nach Vorgabe einer cDNA (*ech42*) aus dem Bodenpilz *Trichoderma harzianum* synthetisiert, welcher eine Reihe von wirtschaftlich bedeutenden phytopathogenen Pilzen parasitiert. Dabei ermöglicht die Bildung von Endo- und Exochitinasen *T. harzianum* das Eindringen in seine Wirte. *T. harzianum* ist weit verbreitet und wird kommerziell als Pflanzenstärkungsmittel zur Abwehr von Pilzkrankheiten an Pflanzen angewendet.

In das Genom der Gerste wurde ein synthetisches Endochitinase-Gen zusammen mit einer DNA kodierend für die Signalpeptid-Sequenz der 33 kDa Endochitinase der Gerste übertragen. Die Gensequenz des fungalen Endochitinase-Gens wurde auf einen G+C-Gehalt von 65% codon-optimiert, um die Expression in der Gerste zu gewährleisten. In den gentechnisch veränderten Pflanzen wird die Expression des Enzyms vom *Ubi-1*-Promotor des Ubiquitin-Gens aus *Zea mays* kontrolliert, der zusammen mit einem Exon und einem Intron des *Ubi-1*-Gens dem Pilzresistenzgen vorgeschaltet wurde. Das Exon ist etwa 82 bp, das Intron ca. 1010 bp groß. Das Terminationssignal stammt vom *nos*-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*. Vorliegende Informationen über den *Ubi-1*-Promotor zeigen, dass er zwar in allen Pflanzengewebe aktiv sein kann, jedoch in jüngerem Pflanzengewebe stärker exprimiert als in älteren. Es liegen keine Angaben über die Kopienzahl des eingebrachten Genes im Genom der für die Freisetzung vorgesehenen Gerstenlinie vor.

Erfahrungen liegen aus der Expression der *ech42*-cDNA aus *T. harzianum* in gentechnisch verändertem Tabak und gentechnisch veränderten Kartoffeln sowie Äpfeln vor. Hier führte

die Expression zu einem gegenüber der nicht gentechnisch veränderten Kontrolle reduzierten Erregerbesatz und zu weniger Krankheitssymptomen. Die Expressionshöhe war mit der Entwicklung der Pilzerkrankungen negativ korreliert. Während in gentechnisch veränderten Tabak- und Kartoffelpflanzen auch ein hohes Expressionsniveau keinen erkennbaren Einfluss auf die Pflanzenmorphologie und -entwicklung nahm, zeigten die gentechnisch veränderten Äpfel mit hoher ECH42-Expression deutlichen Minderwuchs. Einige Pflanzen konnten nicht bewurzelt werden. In Untersuchungen in den USA an den zur Freisetzung beantragten gentechnisch veränderten Gersten wurden keine Veränderungen der Morphologie festgestellt.

Ob als Folge der Chitinaseexpression in den Pflanzen ggf. auftretende Metabolite Effekte im pflanzlichen oder tierischen Stoffwechsel verursachen, ist bislang nicht untersucht worden. Die hier freizusetzende gentechnisch veränderte Gerste ist jedoch nicht für den Verzehr vorgesehen, das Vorhaben ist sehr klein. Die meisten Pflanzen besitzen natürlicherweise eigene Chitinasen zur Abwehr von Phytopathogenen. In Gerste wurden verschiedene Endochitinasen z.B. in Blatt und Aleuron beschrieben. Über allergene Wirkungen oder toxische Eigenschaften dieser Enzymgruppe wurde bisher nicht berichtet. Ein Datenbankabgleich der Aminosäuresequenz der in die Gerste eingebrachten pilzlichen Endochitinase mit einer Allergen-Datenbank erbrachte keine Ähnlichkeiten zu anderen Allergenen, es wurden keine Homologien zu Toxinen gefunden. Insgesamt liefern die vorliegenden Informationen über das Enzym keine Hinweise darauf, dass es toxisch ist oder ein allergenes Potenzial besitzt.

Nach den Angaben der Antragstellerin konnte die Expression des übertragenen Gens in *in-vitro*-Untersuchungen durch die in Körnern der gentechnisch veränderten Gerste ermittelte Aktivität des rekombinanten Enzyms belegt werden. Gewächshausstudien und Freilanduntersuchungen in den USA ergaben für die gentechnisch veränderte Gerste einen verringerten *Rhizoctonia*-Befall und ein gehemmtes Wachstum von *Gaeumannomyces graminis* (Erreger der Schwarzbeinigkeit). Von einer generellen, antifungalen Wirkung der Endochitinase kann jedoch nicht ausgegangen werden, da der Befall der gentechnisch veränderten Gersten mit Fusarium-Pilzen nicht verringert war. Ergebnisse aus den Freisetzungsexperimenten der Jahre 2006 und 2007 (Az 6786-01-0168) ergaben keine Hinweise auf eine gestörte Wechselwirkung von Wirtspflanzen mit Mykorrhiza-Pilzen.

Insgesamt lassen sich unter den Bedingungen des vorliegenden Freisetzungsvorhabens aus der Bildung einer chimären Endochitinase in der gentechnisch veränderten Gerste keine Hinweise auf schädliche Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt ableiten.

(b) Das (1,3-1,4)- β -Glucanase-Gen

Das Enzym (1,3-1,4)- β -Glukanase depolymerisiert β -Glukane der Endosperm-Zellwände von Gersten-Karyopsen. Dieser Abbau stellt die Voraussetzung dafür dar, dass α -Amylasen und Proteasen die im Endosperm gespeicherte Stärke und Speicherproteine erreichen und abbauen können, um den wachsenden Keimling mit Zuckern und Aminosäuren zu versorgen. Die Optimierung dieser enzymatischen Umsetzung ist vor allem beim technischen Verfahren der Mälzung für Brauvorgänge sowie für die Herstellung von Futtermitteln angestrebt. Da die keimenden Karyopsen in solchen Verfahren durch mechanische Bearbeitung und Pasteurisierung höheren Temperaturen ausgesetzt sind, ist neben hoher Glukanase-Aktivität auch eine thermische Stabilität des Enzyms gewünscht.

In das Genom der vorliegenden Gerstentransformante wurde ein chimäres, synthetisches Gen übertragen, dessen Produkt, eine thermostabile (1,3-1,4)- β -Glukanase, in der Lage ist, während der Karyopsenkeimung im Aleuron und Endosperm Glukane zu depolymerisieren. Hierzu wurde durch intragenische Rekombination zweier (1,3-1,4)- β -Glukanase Gene aus den bodenbürtigen Bakterien *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* ein chimäres Gen generiert, welches codon-optimiert wurde, um die Expression in der Gerste zu gewährleisten. In den gentechnisch veränderten Pflanzen wird die Expression des Enzyms vom *Hor3*-Promotor des Hordein3-Speicherproteins aus Gerste kontrolliert. Das Terminationssignal stammt vom *nos*-Gen aus *Agrobacterium tumefaciens*. Vorliegende Informationen über den *Hor3*-Promotor zeigen, dass er im Aleuron und im Endosperm von Karyopsen während der Keimung aktiv ist. Die Kopienzahl des eingebrachten Genes im Genom wird mit 1-4 Kopien angegeben. Nach den Angaben der Antragstellerin konnte durch *in-vitro*-Untersuchungen in Körnern der gentechnisch veränderten Gerste nach Erhitzung die Aktivität des rekombinanten, hitzestabilen Enzyms und damit die Expression des übertragenen Gens belegt werden. Die Aktivität des eingebrachten Gens hat zur Folge, dass keimende Karyopsen gentechnisch veränderter Pflanzen eine verbesserte Mobilisierung von Kohlenhydraten und stickstoffhaltigen Verbindungen aus Stärke und Proteinen aufweisen.

Glukane sind auch Bestandteile von pilzlichen Zellwänden. Da die Expression der (1,3-1,4)- β -Glukanase jedoch zeitlich und räumlich auf das keimende Korn beschränkt ist, wären nur in diesem Entwicklungsstadium schädigende Pilze betroffen. Ob die hohe Substratspezifität der chimären Glukanase auch die vorwiegend aus 1,3- β -Glukanen bestehenden Komponenten der pilzlichen Zellwand depolymerisieren kann, ist unklar und Forschungsgegenstand der beantragten Freisetzung. Eine Gefährdung der in §1 Nr.1 des GenTG genannten Schutzgüter ist daraus nicht abzuleiten.

Es ist bislang nicht untersucht worden, ob als Folge der Glukanaseexpression in den Pflanzen ggf. auftretende Metabolite Effekte im pflanzlichen oder tierischen Stoffwechsel verursa-

chen. Chemisch unterscheiden sich diese Metabolite jedoch nicht von denen, die von den Gerste-endogenen Glukanasen produziert werden. Über allergene Wirkungen oder toxische Eigenschaften der Enzymgruppe der Glukanasen wurde bisher nicht berichtet. Ein Datenbankabgleich der Aminosäuresequenz des in die Gerste eingebrachten chimären Glukansesens bakteriellen Ursprungs mit einer Allergen-Datenbank erbrachte keine Ähnlichkeiten zu anderen Allergenen, es wurden keine Homologien zu Toxinen gefunden. Die hier freizusetzende gentechnisch veränderte Gerste ist nicht für den Verzehr vorgesehen.

Ergebnisse aus den Freisetzungsexperimenten der Jahre 2006 und 2007 (Az 6786-01-0168) ergaben keine Hinweise auf eine gestörte Wechselwirkung von Wirtspflanzen mit Mykorrhiza-Pilzen.

Insgesamt sind schädliche Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen und die Umwelt nicht zu erwarten.

(c) Das *bar*-Gen

Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* kodiert für eine Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (PAT) und steht unter Kontrolle des *Ubi-1*-Promotors aus Mais und der Terminationssequenz des Nopalin-Synthase-Gens (*nos*) aus *A. tumefaciens*. Das Markergen bewirkt eine Toleranz gegen Phosphinothricin (Glufosinat), den Wirkstoff des Herbizids Basta®, und wurde für Selektionszwecke bei der Herstellung der gentechnisch veränderten Pflanzen übertragen.

L-Phosphinothricin ist ein Glutaminsäure-Analogon und inhibiert die pflanzliche Glutaminsynthetase. Die Hemmung der Glutaminsynthetase hat durch die Akkumulation von Ammonium den Zelltod zur Folge. Aus diesem Grund findet Phosphinothricin als Wirkstoff in dem nicht-selektiven Herbizid Basta Verwendung. Basta enthält die Enantiomeren D- und L-Phosphinothricin im Verhältnis 1 : 1. D-Phosphinothricin wirkt nicht als Glutaminsynthetase-Hemmstoff.

Im Unterschied zu nicht gentechnisch veränderten Pflanzen, die mit Basta® behandelt werden, würde in den gentechnisch veränderten Pflanzen im Falle einer Behandlung mit Basta das L-Phosphinothricin durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase acetyliert, wodurch N-Acetyl-L-Phosphinothricin entsteht, das keine herbizide Wirkung hat. Die gentechnisch veränderten Pflanzen sind dadurch tolerant gegenüber dem Herbizid Basta®. Die Substratspezifität der Phosphinothricin-Acetyltransferase ist hoch. Selbst das Phosphinothricin-Analogon Glutamat wird kaum umgesetzt. D-Phosphinothricin wird durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase nicht metabolisiert.

Aus den auf dem Feld verbleibenden Teilen der gentechnisch veränderten Pflanzen würde das in diesen noch befindliche N-Acetyl-Phosphinothricin bei der Verrottung in den Boden gelangen und dort durch Mikroorganismen wieder in L-Phosphinothricin umgesetzt werden. D/L-Phosphinothricin wird im Boden, ebenfalls durch Mikroorganismen, abgebaut.

Nach den vorliegenden Daten weist N-Acetyl-L-Phosphinothricin eine deutlich geringere Toxizität als Phosphinothricin (= Wirkstoff des Herbizids Basta®) auf. Basta® ist vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit nach dem Pflanzenschutzgesetz zugelassen. Im Rahmen dieser Zulassung wurde auch eine toxikologische und ökotoxikologische Bewertung des Mittels vorgenommen.

Schädliche Einwirkungen der in den gentechnisch veränderten Pflanzen enthaltenen Phosphinothricin-Acetyltransferase wären bei einem Verzehr von Pflanzenteilen durch Tiere oder Menschen ebenfalls nicht zu erwarten. Bei einer oralen Aufnahme wäre davon auszugehen, dass das Enzym ebenso wie Proteine im Allgemeinen im Verdauungstrakt abgebaut würde. Die Phosphinothricin-Acetyltransferase besitzt keine der für allergene Proteine aus Nahrungsmitteln typischen Eigenschaften (Hitzestabilität, Stabilität im Verdauungstrakt) sowie keine Sequenzhomologie zu bekannten Allergenen.

(d) Das *sGFP*-Gen

Fluoreszierende Proteine sind stabile Proteine, die speziesunabhängig eingesetzt werden können. Sie eignen sich als Reporter zum Nachweis von Genexpression und Proteinlokalisierung in lebenden Zellen nach Anregung mit UV-Licht. Gene kodierend für fluoreszierende Reporterproteine werden vielfältig in Organismen und Zellkulturen eingesetzt. Das vorliegende *sGFP* wurde durch Codon-Optimierung an die Codon-Usage in Pflanzen angepasst. Die Transkription wird durch den Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor initiiert und durch den Terminator aus dem *nos*-Gen von *Agrobacterium tumefaciens* terminiert. Das *sGFP*-Gen wurde als zusätzliches Reportergen eingesetzt. Das Green Fluorescent Protein (GFP) aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* wurde bisher u.a. in gentechnisch veränderten Pflanzen, Mäusen und Zebrafischen exprimiert. Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Vitalität dieser Organismen liegen nicht vor. Fütterungsstudien mit Nagern, der Vergleich der Aminosäuresequenz mit der bekannter Allergene und *in-vitro* Verdaulichkeitsstudien ergaben, dass von GFP keine Gesundheitsrisiken ausgehen.

(e) Weitere Bestandteile des Transformationsvektors

Die Transformation der Pflanzen erfolgte *Agrobacterium*-vermittelt. Die verwendeten Transformationsplasmide wurden aus pBIN19 entwickelt. Bestandteil des Rückgrats dieses Plas-

mids ist u. a. das *nptIII*-Gen. Alle Transformanten der gentechnisch veränderten Gerste wurden mittels Southern Blot Analyse auf Anwesenheit des *nptIII*-Gens untersucht. In keiner der untersuchten Gerstenlinien wurde das *nptIII*-Gen in seiner Gesamtheit oder in Fragmenten in das Zielgenom integriert.

Da keine weitere Analyse der in die Gerstenpflanzen integrierten Sequenzen durchgeführt wurde, wird der Risikoabschätzung zugrunde gelegt, dass das gesamte übrige Plasmid integriert worden sein kann. Das Plasmid pBIN19 enthält außerhalb der Borderregionen:

- das *tetA*-Gen des Plasmids pRK2, unterbrochen durch die T-DNA;
- das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2 für die Replikation in *E.coli* und in *A. tumefaciens*;
- ein Fragment des *klaC*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- ein *traF*-Fragment, enthaltend den *oriT* des Plasmids RP4, aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung des Plasmids pUC (ColE1 *ori*) aus *E. coli*.

Eine Bildung signifikanter Mengen funktionsfähiger Genprodukte durch diese Sequenzen ist in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten. Bei den übertragenen DNA-Abschnitten handelt es sich um Genfragmente bzw. Gene, die nicht unter der Kontrolle von pflanzenspezifischen Promotoren stehen und nicht der pflanzlichen Codonnutzung angepasst sind.

(d) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Insertionsort im Chromosom bzw. von der Umgebung des Insertionsorts („Positionseffekt“). Unter Freilandbedingungen kann die Expressionsstärke zudem durch Umwelteinflüsse, z. B. durch die Temperatur, beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall könnte dies dazu führen, dass die Eigenschaften der gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeneigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der bishe-

rigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen im Gewächshaus und im Rahmen von Freisetzungen in Nordamerika wurden jedoch keine Beobachtungen gemacht, die auf ein solches Ereignis hindeuten.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor und wurden zuerst beim Mais nachgewiesen. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen, wenn dieses keine Homologie zu bereits bekannten Allergenen aufweist. Die in der gentechnisch veränderten Gerste gebildeten Enzyme gehört zu Gruppen, die zur enzymatischen Grundausstattung aller höheren Pflanzen gehören (Endochitinasen und Glukanasen). Über allergene Wirkungen oder toxische Eigenschaften dieser Enzymgruppe wurde bisher nicht berichtet. Recherchen in medizinischen Literaturdatenbanken und in Aminosäuresequenz-Datenbanken ergaben keine Hinweise auf toxische oder allergene Eigenschaften des Enzyms. Insgesamt liefern die vorliegenden Informationen über die Enzyme keine Hinweise darauf, dass sie toxisch sind oder ein allergenes Potenzial besitzen. Auf Basis zahlreicher Untersuchungen ist auch für das Genprodukt des eingesetzten Selektionsmarkers (*bar*) und des Reportergens (*sGFP*) kein erhöhtes allergenes Potenzial zu erwarten. Eine Verwendung von Produkten des Versuchs für die menschliche Ernährung oder zur Verfütterung ist nicht vorgesehen.

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

Gerste ist eine alte Kulturpflanze, die nur in der Nachbarschaft zu landwirtschaftlichen Anbauflächen, vereinzelt an Wegrändern und auf Ruderalflächen als Unkraut vorkommt. In natürlichen, intakten Pflanzengesellschaften Mitteleuropas ist eine Etablierung von Gerste nicht bekannt. Die Erfahrungen aus Freisetzungen in den USA erbrachten keine Hinweise darauf,

dass sich die gentechnisch veränderte Gerste aufgrund der gentechnischen Veränderungen in dieser Hinsicht von nicht gentechnisch veränderter Gerste unterscheidet.

Nach Beendigung der generativen Phase sterben Gerstenpflanzen ab. Neue Pflanzen können aus den gebildeten Samen entstehen. Die Samen (Karyopsen) werden während der Ernte aus den Ähren gedroschen. Sie sind nach Eintritt in eine sekundäre Keimruhe unter günstigen Bedingungen einige Jahre im Boden überdauerungsfähig, ohne ihre Keimfähigkeit einzubüßen. Allerdings ist die Überdauerungsfähigkeit der hier ausgebrachten Sommergerste gegenüber Wintergerste reduziert. Unter günstigen Bedingungen können sie in folgenden Kulturpflanzenbeständen keimen. Aus der gentechnischen Veränderung ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine gegenüber konventioneller Gerste veränderte Überdauerungsfähigkeit.

Die Antragstellerin hat vorgesehen, die Ähren der gentechnisch veränderten Gerste und der nicht veränderten Kontrollpflanzen (mit Ausnahme der Mantelsaat) von Hand zu ernten, bevor sie die volle Reife erreicht haben. So soll Ausfallverlusten bei mechanischer Ernte vorgebeugt werden. Die geernteten und nicht für Analysen benötigten Ähren sollen thermisch inaktiviert werden. Nach einer Herbizidbehandlung der Fläche ist vorgesehen, die noch verbliebenen Pflanzenreste zu zerkleinern und in den Boden einzuarbeiten.

Im Anschluss an das Freisetzungsvorhaben soll die Versuchsfläche mit einer Kulturpflanze bestellt werden, die das Erkennen von ggf. auflaufender Gerste zu ermöglicht. Auflaufende Gerstenpflanzen sollen während der Nachkontrolle nach Ende der Freisetzung und im Folgejahr entfernt werden. Es ist vorgesehen, die Nachkontrolle zu verlängern, falls im Jahr nach der Freisetzung noch Gerstendurchwuchs beobachtet wurde.

Die Antragstellerin berichtet, bei den bisher mit der gentechnisch veränderten Gerste durchgeführten Untersuchungen und Beobachtungen der morphologischen Eigenschaften der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen und im Rahmen von Freisetzungen in Nordamerika keine Unterschiede zwischen den gentechnisch veränderten und nicht gentechnisch veränderten Pflanzen gefunden zu haben. Hinweise auf eine erhöhte Vitalität und Fertilität der gentechnisch veränderten Gerste, die eine Überdauerung oder Ausbreitung der gentechnisch veränderten Pflanzen begünstigen würden, liegen nicht vor. Demzufolge ist die Möglichkeit, dass die gentechnisch veränderte Gerste im Freiland überdauert oder sich auf diesem Wege Pflanzen etablieren, äußerst gering.

Mit der Entwicklung einer Linie von gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen wird die Erwartung verbunden, unter Bedingungen hohen Infektionsdruckes durch bestimmte pilzliche Schaderreger mehr und qualitativ hochwertigere Samen ernten zu können als von pilzsensi-

tiven Pflanzen. Aus dieser Eigenschaft könnte grundsätzlich ein Selektionsvorteil abgeleitet werden. Es gibt jedoch keine Hinweise darauf, dass die generelle Konkurrenzschwäche der landwirtschaftlichen Kulturpflanzen gegenüber Wildpflanzenarten durch diese Eigenschaft verändert würde. Tatsächlich ist die Infektionsanfälligkeit gegenüber anderen pilzlichen Organismen als den Zielorganismen, wie etwa *Fusarium*, unverändert.

Aus den genannten Gründen ist daher weder eine unkontrollierte Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen noch eine Ausbreitung zu erwarten.

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

Gerste (*Hordeum vulgare*) eine bedeutende Kulturpflanze der gemäßigten Breiten. Die in unseren Breiten überwiegend angebaute Sommer- und Wintergerste (*Hordeum vulgare*, Braugerste) ist diploid. Wintergerste wird in unseren Breiten hauptsächlich als Futtergetreide angebaut, spezielle Sorten der Sommergerste zu Brauzwecken. Als weitere Form wird mit regionalen Schwerpunkten noch die Nacktgerste zur Gewinnung von Gerstenkaffee als Kaffeeersatz angebaut. Pollensterile Gerste wird nicht für Anbauzwecke genutzt.

Gerste ist ein einjähriges, begranntes Ährengras mit Sommer- und Winterformen. Die aufrechte Ährenspindel der Gerste ist zweizeilig alternierend mit Ährchen besetzt, an jedem Spindelabsatz finden sich 3 einblütige Ährchen. Bei der hier beantragten zweizeiligen Gerste ist nur die Mittelblüte fertil. Die Blühphase der Einzelblüte ist mit ca. 1 Stunde sehr kurz. Durch die zeitlich versetzte Abfolge des Blühbeginns der einzelnen Blüten eines Ährchens, der gesamten Ähre und der verschiedenen Ähren einer Pflanze am Haupt- und den diversen Nebentrieben kann die Blühzeit aller Blüten der Gerstenpflanze über eine Woche betragen. Gerste ist ein Selbstbestäuber und kleistogam, d.h. in der Regel tritt Selbstbestäubung noch vor der Blütenöffnung ein. In gewissem Umfang, beeinflusst vom Genotyp und den klimatischen Bedingungen zur Blütezeit, ist Fremdbefruchtung möglich. Diese wird mit meist < 2 % angegeben, bei trockener und warmer Witterung kann die Fremdbefruchtung bei manchen Genotypen auch höher sein. Sommergerste ist im Allgemeinen strenger autogam als Wintergerste.

Gerstenpollen wird vom Wind verbracht. Jedoch wird die Möglichkeit der Fremdbefruchtung über eine Windverbringung durch die hohe Empfindlichkeit des Gerstenpollens gegenüber Hitze, Trockenheit, aber auch gegen zu große Feuchtigkeit, Kälte oder Sonneneinstrahlung stark eingeschränkt. Er kann daher in der Luft keine längeren Strecken ohne Schaden überwinden. Untersuchungen zur Pollenausbreitung von Gerste zeigten einen Samenansatz von ca. 3 % an pollensterilen Gerstenpflanzen, die ca. 50 m von der Pollenquelle entfernt ange-

baut worden waren. In Feldstudien wurde dagegen ermittelt, dass bereits nach 1 m die Auskreuzungsrate von gentechnisch veränderten Pollen an männlich fertilen Pflanzen auf 0-7 % zurückgegangen war.

Die Saatgutverordnung sieht als Maßnahme zur Abschirmung von unerwünschten Einkreuzungen in Gerstenvermehrungsflächen mit Sommergerste die Anlage eines Trennstreifens (ohne Angabe einer Breite) zu benachbarten Getreidebeständen vor. Weitere Mindestabstände sind nicht einzuhalten.

Als wichtige Kulturpflanze ist Gerste seit langer Zeit Gegenstand von Kreuzungsversuchen mit Kreuzungspartnern innerhalb und außerhalb der Gattung *Hordeum*. Kreuzungen zwischen Gerste und Weizen bzw. Gerste und Roggen sind nur durch künstliche Befruchtung unter Zuhilfenahme von speziellen Zellkulturtechniken möglich, eine Hybridisierung kommt natürlicherweise nicht vor. Nachkommen sind männlich steril. Gerste kann mit der Haargerste (*Elymus* sp.) hybridisieren, auch hier sind die Nachkommen männlich steril. Mit anderen *Hordeum*-Wildgersten hybridisiert *Hordeum vulgare* nicht, oder die Nachkommen sind steril.

Die Möglichkeit des Auftretens von Spontanhybriden unter Freilandbedingungen wird als sehr gering angesehen. Dazu tragen neben der genetisch bedingten Inkompatibilität der Kreuzungspartner weitere Anforderungen bei, die für eine erfolgreiche Hybridisierung unter Freilandbedingungen erfüllt sein müssen, wie die zeitlich synchrone Blühphase beider Partner.

Die laut Antragsunterlagen vorgesehenen Maßnahmen in Verbindung mit den Nebenbestimmungen dieses Genehmigungsbescheids sind ausreichend, um Auskreuzungen in Kulturpflanzenbestände entgegenzuwirken.

Ferner ist durch die Nebenbestimmung II.9. vorgesehen, dafür zu sorgen, dass im Umkreis von 35 m um die Freisetzungsfläche herum keine wilden, mit Gerste kreuzbaren Pflanzen vorhanden sind. Auf der Freisetzungsfläche selbst soll das Auftreten von *Elymus repens* (Quecke) kontrolliert werden. Unter diesen Bedingungen ist nicht zu erwarten, dass es zu einer Ausbreitung der gentechnischen Veränderung auf andere Pflanzen außerhalb der Freisetzungsfläche kommt.

Ggf. dennoch stattgefundenene einzelne Bastardierungsereignisse zwischen den gentechnisch veränderten Pflanzen und Wildpflanzen würden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu einer Ausbreitung der übertragenen Fremdgene in Wildpflanzenpopulationen führen, da dafür anschließende Rückkreuzungen des Bastards mit der Wildpflanzenart erforderlich wären.

III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von den gentechnisch veränderten Pflanzen über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in den Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Beweise für eine unter natürlichen Bedingungen im Freiland stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und ihrer Expression in Mikroorganismen liegen nicht vor. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen jedoch folgern, dass auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, dass ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellen würde.

Soweit anzunehmen ist, dass ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Pflanzen und Mikroorganismen tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmaterial, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

a) Das *cThEn42(GC)*-Gen

Das *cThEn42(GC)*-Gen wurde nach Maßgabe des homologen Genes aus dem bodenbürtigen Pilz *Trichoderma harzianum* synthetisiert. Selbst im Falle eines Transfers dieses Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz der damit verbundenen Expression einer Endochitinase in der Umwelt nicht erkennbar erhöht. Die Codon-Anpassung an die pflanzliche Codonusage macht zudem eine effiziente Translatierung in Mikroorganismen unwahrscheinlich.

b) Das (1,3-1,4)- β -Glucanase-Gen

Das (1,3-1,4)- β -Glucanase-Gen stammt aus einer intragenischen Rekombination zweier Glucanasen aus den bodenbürtigen Bakterien *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans*. Auch dieses Gen wurde codon-optimiert, um eine gute Expression in höheren Pflanzen zu gewährleisten. Selbst im Falle eines Transfers dieses Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde das Auftreten des damit verbundenen Phänotyps einer thermostabilen Variante der (1,3-1,4)- β -Glucanase keinen erkennbaren Selektionsvorteil mit sich bringen.

c) Das *bar*-Gen

Die Inaktivierung von Phosphinothricin durch Acetylierung ist ein bei Bodenmikroorganismen natürlicherweise vorkommender Prozess. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet. Auch für das *bar*-Gen ist also die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht-gentechnisch veränderten Mikroorganismen gegeben. Selbst im Falle eines Transfers des *bar*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz dieser Resistenz in der Umwelt nicht erkennbar erhöht.

d) Das *sGFP*-Gen

Das *sGFP*-Gen entstand durch Austauschmutationen in verschiedenen Triplets des Gens des „Green Fluorescent Proteins“ aus der Qualle *Aequorea victoria*. GFP wird seit langem als Reporter bei Expressionsuntersuchungen an Pro- und Eukaryoten eingesetzt. Für den unwahrscheinlichen Fall eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen ist ein Selektionsvorteil durch das dann übertragene *sGFP* nicht zu erkennen.

e) Innerhalb der T-DNA gelegene sonstige DNA-Abschnitte

e1) Die kodierende Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase sowie *lacI*-Sequenzen aus *E. coli*

Die gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen wurden durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt. Bei diesem Vektor befindet sich die „multiple cloning site“ innerhalb der für das α -Fragment der β -Galaktosidase aus *E. coli* kodierenden Sequenz. Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das α -Fragment alleine ist enzymatisch nicht aktiv. Zudem ist das α -Fragment in den gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen durch Insertion der in die „multiple cloning site“ klonierten Gene unterbrochen, so dass kein funktionsfähiges Genprodukt gebildet werden kann. Dies wäre auch in Bakterien, die das Gen durch einen horizontalen Gentransfer erhalten würden, der Fall.

e2) Promotorfragment des *nos*-Gens aus *A. tumefaciens*

Die gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen enthalten innerhalb der T-DNA ein Fragment des Promotors des *nos*-Genes. Auch bei einer Übertragung dieses Fragmentes ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten, da *A. tumefaciens* ein ubiquitär im Boden vorkommendes Bakterium ist. Zudem ist der Promotor durch zahlreiche Klonierungsschritte nur fragmentarisch erhalten.

e3) M13-Sequenzen

pBin19 und Derivate enthalten innerhalb der T-DNA zwei Abschnitte aus M13mp19, nämlich einen 440 bp großen Abschnitt, der einen Teil eines offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfasst sowie einen 433 bp großen Abschnitt, der den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält. Der Phage M13 zählt zu den F-spezifischen *E. coli*-Phagen. Für diese Nukleinsäureabschnitte ist somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen. Sollte es zu einer Expression des Genabschnittes für das Strukturprotein kommen, so würde dies nicht zu einem funktionsfähigen Protein führen, da der Abschnitt nur für 167 von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Mit einer Funktionsfähigkeit dieses Teils des Strukturproteins in Bakterien ist nicht zu rechnen.

f) Außerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Mittels Southern Blot-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der bakterielle Selektionsmarker *nptIII* zusammen mit dem inserierten Transposon IS1 aus *Bacillus subtilis* nicht in die Genome der für die Freisetzung vorgesehenen Transformanten übertragen worden ist. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob Teile des übrigen Plasmid-Rückgrates in die gentechnisch veränderte Gerste übertragen worden sind:

- das *tetA*-Gen des Plasmids pRK2, unterbrochen durch die T-DNA;
- das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- ein Fragment des *kilA*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- ein *traF*-Fragment, enthaltend den *oriT* des Plasmids RP4, aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung des Plasmids pUC (ColE1 *ori*) aus *E. coli*.

RK2 gehört zu einer Gruppe von *broad host range*-Plasmiden (u. a. RP1, RP4, R18, R68), die in einer Vielzahl gram-negativer Bakterien replizierbar sind. Für die aus RK2 stammenden DNA-Abschnitte ist somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (*kilA*, *tetA*).

Das pUC-Replikon gehört zum Typ der ColE1-Plasmide, die einen auf einige gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich haben. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und nahe verwandten Bakterienspezies, wie z.B. *Serratia* oder *Salmonella*, replizieren. In den meisten gram-negativen Bodenbakterien erfolgt keine Replikation. In Enterobakterien treten ColE1-Plasmide recht häufig auf. Ein Gentransfer ausgehend von Enterobakterien auf andere Bakterien ist als weitaus wahrscheinlicher anzusehen als ein horizontaler Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien. Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass die eventuelle Präsenz des Replikationsursprungs von pUC im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

g) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *Zea mays*, Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), *Agrobacterium tumefaciens* und aus *Hordeum vulgare*. Das bodenbürtige Bakterium *A. tumefaciens* ist in der Umwelt verbreitet. In Wildtyp-Agrobakterien befinden sich die genannten Sequenzen auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation zwischen verschiedenen Rhizobiacen ausgetauscht werden können. CaMV ist ein pflanzeninfizierendes, doppelsträngiges DNA-Virus, das in Pflanzen verbreitet ist. Mais und Gerste werden als landwirtschaftliche Nutzpflanzen weltweit angebaut.