



Antrag 6786-01-0188

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch verändertem Schwarzen
Nachtschatten (*Solanum nigrum* L.) (Transformationsevents S06-336, S06-353,
S06-354 und S06-356) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde,
Berlin, den 20. Juli 2007**

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 Konstrukt zum Silencing des *nigpro*-Gens

Das Prosystemin-Gen (*nigpro*) kodiert das Peptid Prosystemin (200 Aminosäuren), aus dem durch Proteolyse das aktive, 18 Aminosäuren kurze Peptid Systemin abgespalten wird. Systemin ist ein Signalmolekül, das bei der Vermittlung der systemischen Reaktion auf Verwundung von Pflanzengewebe eine entscheidende Rolle spielt, indem es an der Informationsweitergabe vom Ort der Verwundung zu entfernter gelegenen Pflanzengeweben beteiligt ist. In diesen Pflanzenteilen werden dann weitere Abwehrreaktionen induziert.

Mit Untersuchungen an gentechnisch veränderten Tomaten, die eine Prosystemin-cDNA in Antisense-Orientierung exprimierten, konnte gezeigt werden, dass Pflanzen, die das Prosystemin-Peptid nur in geringem Maße bilden konnten, erheblich in der Fähigkeit eingeschränkt wurden, als systemische Reaktion auf eine Verwundung Protease-Inhibitoren des Typs I und II zu bilden. Die Pflanzen konnten außerdem deutlich schlechter auf den Fraß durch *Manduca sexta*-Larven reagieren.

In den gentechnisch veränderten Pflanzen des Freisetzungsvorhabens soll die Synthese des pflanzeigenen Prosystemins bzw. des aktiven Systemins reduziert werden, um die Funktion des Peptids bei weiteren Interaktionsprozessen zwischen der Pflanze und der Umwelt untersuchen zu können. Dazu wurde ein Konstrukt entwickelt, bei dem zwei durch einen Abstandhalter getrennte, komplementäre interne Fragmente des Prosystemin-Gens aus *S. nigrum* in Sense- und in Antisense-Orientierung angeordnet wurden. Es wird erwartet, dass der Sense- und der Antisense-Bereich des Transkripts des *nigpro*-Gens hybridisieren und durch das in der Folge ausgelöste so genannte posttranskriptionale Genesilencing die Bildung des Prosystemins eingeschränkt wird. Als Abstandhalter wurde auch hier das dritte Intron des Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase-Gen aus *Flaveria trinervia* verwendet, das eine Splicing-Aktivität auslöst. Die Expression wird ebenfalls vom Promotor und dem Terminationsignal des 35S-Gens des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) kontrolliert.

Als Folge der gentechnischen Veränderung wird durch gezielte Reduktion der Bildung des Prosystemin-Peptids die Abwehr der gentechnisch veränderten Pflanze gegen herbivoren Fraß bzw. Pathogenbefall verringert. Ob und in welcher Form sich dies auf die weitere Entwicklung der Pflanze auswirken wird, soll u. a. Gegenstand der Untersuchungen im Verlauf des Vorhabens sein. Mit vorangegangenen Versuchen im Gewächshaus und im Freiland (Az. 6786-01-0156) konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion des endogenen Systemin-gehalts in *S. nigrum* Pflanzen keinen Einfluss auf die Gewichtszunahme von Larven des Tabakswärmers (*Manduca sexta*), die Anzahl von Blattläusen (*Myzus persicae nicotianae*) oder den Umfang von Fraßstellen des Flohkäfers (*Epitrix pubescens*) hatte. Daraus schließt

der Antragsteller, dass das Prosystemin-Peptid in *S. nigrum* keine direkten Abwehrmechanismen vermittelt.

S. nigrum ist im mitteleuropäischen Kulturraum nicht als Nutz- oder Nahrungspflanze bekannt, ein Verzehr durch Menschen ist nicht vorgesehen und nicht zu erwarten. Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind nach Ansicht der ZKBS durch diese Modifikationen in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten.

(b) Das Hygromycin-Phosphotransferasegen *hptII*

Als Selektionsmarker zur Anreicherung von gentechnisch verändertem Pflanzengewebe nach der Transformation enthält die T-DNA des verwendeten Transformationsplasmids das Hygromycin-Phosphotransferasegen (*hptII*) aus *E. coli*. Die von dem *hptII*-Gen kodierte Hygromycin-Phosphotransferase inaktiviert durch Phosphorylierung spezifisch das Antibiotikum Hygromycin. Diese Substratspezifität begründet die Erwartung, dass bei fehlendem Substrat in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter Freilandbedingungen keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen können. Überdies bietet dieses Gen den gentechnisch veränderten Pflanzen unter Freilandbedingungen keinen Selektionsvorteil, da Hygromycin im Boden nicht in höheren Konzentrationen vorliegt.

Hygromycin wird wegen seiner hohen Toxizität für eukaryote Organismen in der Humanmedizin nicht und in der Tiermedizin nur für spezielle Anwendungsgebiete eingesetzt. Hygromycin-resistente Enterobacteriaceen, die ein Gen für eine Hygromycin-Phosphotransferase enthalten, wurden in Probenmaterial (Faeces, Urin, Blut) tierischen und menschlichen Ursprungs gefunden und werden von diesen Tieren bzw. Menschen in die Umwelt abgegeben.

Das *wissenschaftliche Gremium für gentechnisch veränderte Organismen* der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat die Möglichkeit der Verwendung von Antibiotikumresistenzgenen als Selektionsmarker in gentechnisch veränderten Pflanzen für Freisetzungen und das Inverkehrbringen bewertet. Als Ergebnis wurden häufig bei Transformationen von Pflanzen verwendete Antibiotikumresistenzgene drei Gruppen zugeordnet. Das *hph*-Gen wurde in die Gruppe I eingestuft, da das Antibiotikum Hygromycin in der Humantherapie keine Anwendung findet und die Anwendung in der Veterinärmedizin sehr eingeschränkt indiziert ist. Für die Antibiotikaresistenzgene, die der Gruppe I zugeordnet wurden, ist es nach Überzeugung des wissenschaftlichen Gremiums in hohem Maße unwahrscheinlich, dass ihre Anwesenheit im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen zu spürbaren Veränderungen der Verbreitung dieser Gene in der Umwelt führt oder in nennenswertem Maße Einfluss auf die Gesundheit des Menschen oder von Tieren nimmt. Diese Bewertung entspricht auch der Haltung der ZKBS. Aus der Verwendung des Hygromycin-Resistenzgens in den gentech-

nisch veränderten Pflanzen lässt sich keine Gefährdung für die menschliche Gesundheit oder die Umwelt ableiten.

Das *hptII*-Gen wurde durch zielgerichtete Mutagenese aus dem *hph*-Gen entwickelt. Beide Gene bzw. Genprodukte sind weitestgehend identisch (Nukleinsäureebene: 99 %, Aminosäureebene 99,4 %). Es gibt keinen Anhaltspunkt dafür, das in den gentechnisch veränderten Pflanzen verwendete *hptII*-Gen anders zu bewerten, als das *hph*-Gen.

(c) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Border wurde jedoch berichtet. Das für die Transformation verwendete Plasmid pSOL3SYS geht zurück auf das binäre Plasmid pSOL1, das aus funktionalen Elementen der Plasmide pCAMBIA-1301, pBI121 und pUC entwickelt wurde. Die Sequenzen der genannten Plasmide sind bekannt und in Datenbanken abrufbar. Der Transformationsvektor enthält außerhalb der Borderregionen:

- das *aphAIII* (= *nptIII*)-Gen aus *Streptococcus faecalis* (= *Enterococcus faecalis*), unter der Kontrolle seines eigenen Promotors, ist nur in Bakterien funktionsfähig;
- den ColE1-Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli*;
- die Replikationsregion des Plasmids pVS1 aus *Pseudomonas aeruginosa* mit der genetischen Information für Replikation und Stabilität in *A. tumefaciens*.

Aus den mit den Antragsunterlagen vorgelegten PCR-Untersuchungsergebnissen geht hervor, dass in den zur Freisetzung vorgesehenen Linien kein vollständiges *nptIII*-Gen vorliegt. Da keine weiteren Ergebnisse von Analysen der in die gentechnisch veränderten Pflanzen integrierten Sequenzen bekannt sind, wird der Risikoabschätzung zugrunde gelegt, dass die übrigen, außerhalb der T-DNA gelegenen Vektorabschnitte integriert worden sein könnten. Es gibt keinerlei Hinweise dafür, dass die Replikationsregionen von ColE1 und pVS1 in höheren Pflanzen eine Funktion haben.

(d) Positioneffekte 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 verän-

dernten Pflanzen des Schwarzen Nachtschattens 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 pflanzeigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Aus den Arbeiten im Gewächshaus mit der gentechnisch veränderten Pflanze wurden jedoch keine Beobachtungen berichtet, die auf ein solches Ereignis hindeuten.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine 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.

Von den gentechnischen Veränderungen in den vorliegenden gentechnisch veränderten Pflanzen führt nur das Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase zur Bildung eines Proteins. Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit gentechnisch veränderten Pflanzen sowie aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *hph*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

S. nigrum ist im mitteleuropäischen Kulturraum nicht als Nutz- oder Nahrungspflanze bekannt, ein Verzehr durch Menschen ist nicht vorgesehen und nicht zu erwarten. Pollen von Schwarzem Nachtschatten spielt als Auslöser von Pollenallergien generell keine nennenswerte Rolle. Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind durch diese gentechnischen Veränderungen nicht zu erwarten.

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

S. nigrum ist eine einjährige krautige Pflanze. Nach Beendigung der generativen Phase sterben *S. nigrum*-Pflanzen ab. Neue Pflanzen können nur aus Samen entstehen, die in Beeren

reifen, eine vegetative Vermehrung erfolgt nicht. Die Samen sind nach Eintritt in eine sekundäre Keimruhe unter günstigen Bedingungen viele Jahre im Boden überdauerungsfähig, ohne ihre Keimfähigkeit einzubüßen. Die Pflanzen sind kälteempfindlich; in unseren Breiten überdauern sie nicht die tiefen Wintertemperaturen.

Es ist im vorliegenden Freisetzungsvorhaben vorgesehen, im Gewächshaus vorgetriebene Pflanzen freizusetzen, Samen werden nicht ausgebracht. Im Antrag ist vorgesehen, sich möglicherweise im Feld entwickelnde Blütenknospen während maximal drei-täglichen Kontrollgängen zu entfernen, um die Abgabe von Pollen und den Ansatz von Samen zu verhindern. In Nebenbestimmung II.10. wurde wegen der nur mindestens fünf Tage dauernden Knospenphase festgelegt, dass die gentechnisch veränderten Pflanzen spätestens alle zwei Tage auf das Auftreten von Blütenknospen zu kontrollieren sind. Nachdem die Pflanzen des Vorhabens mit samt Wurzelwerk von der Fläche entfernt wurden, soll die Freisetzungsfäche bis Ende November des jeweiligen Versuchsjahres in regelmäßigen Abständen auf das Auftreten von gentechnisch veränderten *S. nigrum*-Pflanzen kontrolliert werden. Ggf. auftretende Pflanzen sollen entfernt und entsorgt werden. Nach Beendigung des Vorhabens ist außerdem eine Nachkontrolle der Versuchsfläche vorgesehen, die im Falle des Auftretens von gentechnisch veränderten Pflanzen des Schwarzen Nachtschattens um jeweils ein Jahr zu verlängern ist. Diese Maßnahmen sind ausreichend, um sicher zu stellen, dass keine gentechnisch veränderten Pflanzen im Feld verbleiben, die Bildung von Samen kann ebenso ausgeschlossen werden. Eine Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen ist deshalb nicht zu erwarten.

S. nigrum besiedelt bevorzugt offene und gestörte Habitate wie Gärten, Ackerflächen, Wegränder, Hecken, Schienenwege, Mülldeponien etc. Sein Vorkommen in der Gegend der Freisetzungsfäche ist für die Region der Freisetzungsfäche dokumentiert. Auf Grund der Frostempfindlichkeit sterben Pflanzen mit Beginn von Frostperioden ab, eine Überwinterung in unseren Klimaten wurde bisher nicht berichtet. In Anbetracht der zuvor genannten vorgesehenen Maßnahmen ist eine Verwilderung von gentechnisch veränderten Pflanzen aus diesem Vorhaben nicht zu erwarten.

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

Die Pflanzen sollen im Feld spätestens alle zwei Tage auf das Auftreten von Blütenknospen kontrolliert werden. Gefundene Blütenknospen werden vor der Anthese, d. h. vor der Abgabe von Pollen, entfernt. Die Bildung oder Abgabe von Pollen der gentechnisch veränderten Pflanzen ist deshalb nicht zu erwarten.

In räumlicher Nähe zu den gentechnisch veränderten Pflanzen sollen nicht gentechnisch veränderte Kontrollpflanzen des Schwarzen Nachtschattens kultiviert werden, die auch zur Blüte gelangen können. Durch die in der Nebenbestimmung II.8. des vorliegenden Bescheides geregelte Maßnahme der dauerhaften Kennzeichnung der gentechnisch veränderten Pflanzen wird gewährleistet, dass die gentechnisch veränderten von den Kontrollpflanzen sicher unterschieden werden können.

Solanum-Arten gelten zwar als weitgehende Selbstbefruchter, Auskreuzen und Fremdbefruchtung sind jedoch möglich, und das Auftreten von Art- und Gattungsbastarden mit *S. nigrum* wurde beobachtet. So wurden spontane Hybriden aus dem hexaploiden *S. nigrum* und *S. physalifolium* var. *nitidibaccatum* (diploid) und *S. villosum* (tetraploid) berichtet, die auch in Deutschland vorkommen. Für einige *Solanum*-Arten ist bekannt, dass blütenbesuchende Bienen und Schwebfliegenarten in geringem Umfang für Fremdbefruchtungen sorgen. Es liegen keine Erkenntnisse darüber vor, über welche Strecken mit Auskreuzungen gerechnet werden kann.

Am inneren Rand der ca. 1,5 ha großen Pachtfläche soll durch die Einsaat eines 3 m breiten Streifens einer Kleeegrasmischung das Auftreten von *S. nigrum*-Pflanzen unterbunden werden. Dazu beitragen sollen auch die vom Antragsteller vorgesehenen Kontrollgänge, mit denen in einem Umkreis von 35 m um die Pachtfläche herum sexuell kompatible Pflanzenarten vorzeitig entfernt werden sollen.

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 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 Bakterien tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmaterial allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer

die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmaterial, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

Ökologisch relevante Auswirkungen eines Gentransfers wären nur bei Vorliegen eines Selektionsdrucks zugunsten des übertragenen Gens zu erwarten. Weiterhin müsste bei der Bewertung berücksichtigt werden, ob es sich hierbei um ein in entsprechenden Populationen bereits vorhandenes oder um ein neues Gen handelt. Ökologische Konsequenzen eines solchen Gentransfers ohne Vorliegen eines Selektionsdrucks für die mit den Konstrukten übertragenen Eigenschaften sind jedoch nicht zu erwarten.

(a) Das Konstrukt zum Silencing des *nigpro*-Gens

Die beiden *nigpro*-spezifischen internen Fragmente des Konstrukts wurde aus *S. nigrum* isoliert, der „Abstandshalter“ zwischen den beiden komplementären Fragmenten stammt aus dem Intron 3 des Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase-Gens aus *Flaveria trinervia*. *S. nigrum* ist in Mitteleuropa weit verbreitet, Pyruvat-Orthophosphat-Dikinasen gehören zur enzymatischen Grundausstattung von Pflanzen mit C4-Physiologie wie z. B. Mais.

Die in den Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen stammen aus CaMV und *Agrobacterium tumefaciens*. *A. tumefaciens* ist in der Umwelt verbreitet. In Wildtyp-Agrobakterien befinden sich die genannten Sequenzen auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation zwischen verschiedenen Rhizobiaceen ausgetauscht werden können. CaMV ist ein pflanzeninfizierendes doppelsträngiges DNA-Virus, das in Pflanzen weit verbreitet ist.

Für alle diese genetischen Elemente ist also auch die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Organismen gegeben.

(b) Das Antibiotikumresistenzgen *hptII*

Das *hptII*-Gen, das das Enzym Hygromycin-Phosphotransferase kodiert, stammt aus *E. coli*. Hygromycin wird wegen seiner hohen Toxizität für eukaryote Organismen in der Humanmedizin nicht und in der Tiermedizin nur für spezielle Anwendungsgebiete eingesetzt. Hygromycin-resistente Enterobacteriaceen, die ein Gen für eine Hygromycin-Phosphotransferase enthalten, wurden in Probenmaterial (Faeces, Urin, Blut) tierischen und menschlichen Ursprungs gefunden und werden von diesen Tieren bzw. Menschen in die Umwelt abgegeben. Die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung dieses Gens durch Übertragung zwischen Bakterien ist daher weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen.

(c) Außerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Mittels PCR-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der bakterielle Selektionsmarker des verwendeten Transformationsplasmids pSOL3SYS (*nptIII*-Gen für eine Kanamycinresistenz) nicht in die Genome der für die Freisetzung vorgesehenen Transformanten übertragen worden ist. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob die übrigen Teile der Plasmide (*ori* ColE1, *ori* pVS1, *repA*, *staA*) in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragen worden sind.

Der *origin of replication* (*ori*) ColE1 hat einen auf einige gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und nahe verwandten Bakterienarten, 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 nicht auszuschließende Präsenz des Replikationsursprungs im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

Die Replikationsregion des Plasmids pVS1 aus *Pseudomonas aeruginosa* mit der genetischen Information für Replikation und Stabilität ermöglicht die Replikation des Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. Auch für diese Nukleinsäureabschnitte ist 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

III.1.2.5. Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzte Agrobakterien

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden Hypocotylblätter von *in vitro*-kultivierten, eine Woche alten Sämlingen der *S. nigrum*-Inzuchtlinie Sn30 mit Agrobakterien inokuliert, welche die zu übertragenden Konstrukte zwischen den Borderregionen der binären Plasmide enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt.

Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm LBA 4404 ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. er ist nicht mehr zur Tumorinduktion befähigt. In dem unwahrscheinlichen, aber theoretisch denkbaren Fall der Übertragung der eingeführten Fremdgene durch solche Agrobakterien in eine Zelle einer anderen Pflanze müsste diese Zelle spontan zu einer ganzen, fertilen Pflanze regenerieren, damit die Fremdgene in Keimzellen gelangen würden. Nur auf diese Weise könnten diese Gene an die

Nachkommen der Pflanze weitergegeben werden. Damit ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu rechnen.

Unter der Annahme, dass ein Vorhandensein geringer Mengen rekombinanter Agrobakterien in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht auszuschließen ist, ist ferner eine mögliche Übertragung der in den Agrobakterien enthaltenen binären Plasmide durch Konjugation auf in der Umwelt vorkommende Wildtyp-Agrobakterien (*A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes*) in Betracht zu ziehen, die dann wiederum möglicherweise die Fremdgene auf einzelne Zellen anderer Pflanzen übertragen könnten.

Im Fall einer Infektion und nachfolgenden Transformation durch Wildtyp-*A. tumefaciens* bzw. *A. rhizogenes* entsteht aus der transformierten Pflanzenzelle ein Tumor ("Wurzelhalsgalle" bzw. "hairy roots"). Die Bildung einer Pflanze aus einem solchen Tumor ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu erwarten.

Zu berücksichtigen ist weiterhin eine Übertragung der eingeführten Gene aus Agrobakterien in andere Bodenbakterien. Auf die möglichen Auswirkungen wurde bereits unter III.1.2.4. eingegangen.