



Antrag 6786-01-0130

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten

Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) (3 unabhängige Linien)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der

deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 13. Juni 2001

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 *alcR*-Transaktivator-Gen und das β -Glucuronidase-Gen

In das Genom der Kartoffelpflanzen wurde eine mit dem CaMV-35S-Promotor fusionierte cDNA des *alcR*-Gens aus *Aspergillus nidulans*, gekoppelt mit dem β -Glucuronidase (*uidA*, GUS)-Gen aus *E. coli*, das unter der transkriptionellen Kontrolle eines chimären *Aspergillus nidulans alcA*/CaMV-35S-Promotors steht, eingeführt.

Das *alcR*-Gen kodiert für ein Protein mit Zinkfingermotiv, das in Anwesenheit von Äthanol spezifisch an bestimmte DNA-Sequenzen bindet. Das *alcA*-Gen (Alkoholdehydrogenase) ist neben dem *aldA*-Gen (Aldehyddehydrogenase) und 5 weiteren Strukturprotein-Genen ein Bestandteil des Äthanol-Regulons von *Aspergillus nidulans*. Es wird durch das transkriptionelle *alcR*-Aktivatorprotein aktiviert, indem der induzierte Aktivator im Bereich des Transkriptionsstarts spezifisch bindet und die Transkription des Gens anregt. Dazu besitzt der *alcA*-Promotor nahe des Transkriptionsstarts drei *alcR*-Bindeorte, die für die Expression der Alkoholdehydrogenase in *Aspergillus nidulans* erforderlich sind. In den gentechnisch veränderten Kartoffeln erfolgt die Expression des *alcR*-Gens konstitutiv unter Kontrolle des 35S CaMV-Promotors und des Terminators des Nopalin-Synthase (*nos*)-Gens aus *A. tumefaciens*.

Das GUS-Gen wurde als Reporter gen in das Kartoffelgenom eingeführt. Das Enzym β -Glucuronidase spaltet Glucuronide und wird in Geweben von Vertebraten und Invertebraten und auch in Bakterien gefunden. Auch Pflanzen besitzen eine geringe endogene β -Glucuronidase-Aktivität, die jedoch durch geeignete Verfahren unterdrückt werden kann. Die Expression des GUS-Gens wird durch einen chimären *alcA*::35S-Promotor gesteuert. Der chimäre Promotor besteht aus einem deletierten 35S-Promotor des CaMV und einem Fragment des *alcA*-Promotors, das die *alcR*-Bindestellen enthält und für die Äthanolregulierbarkeit des Promotors verantwortlich ist. Zur Steuerung der Transkriptionsterminierung wurde der 35S-Terminator des CaMV eingeführt.

Die Expression des GUS-Gens erfolgt nach Äthanolbehandlung der gentechnisch veränderten Pflanzen. In Proteinextrakten mit Alkohol begaster, gentechnisch veränderter Kartoffelpflanzen konnte deutliche Enzymaktivität nachgewiesen werden. Es ist nicht zu erwarten, dass Pflanzen durch die Expression des GUS-Gens einen Selektionsvorteil erhalten.

Unter normalen Wachstumsbedingungen wird von der Kartoffel kein Äthanol gebildet. Erst unter Stress-Bedingungen (z. B. Sauerstoffmangel) kann es unter natürlichen Bedingungen

zu einer geringfügigen Bildung von Äthanol kommen. Das aus *alcR*-Gen und *alcA*-Promotor bestehende System wird nicht durch endogene Pflanzentranskriptionsfaktoren aktiviert. Zur Entwicklung der gentechnisch veränderten Kartoffeln unter Induktionsbedingungen im Gewächshaus liegen keine Angaben vor. Es gibt jedoch keine Hinweise, dass von gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen exprimierte β -Glucuronidase die Entwicklung dieser Pflanzen beeinträchtigt. Unter nicht induzierenden Bedingungen unterscheiden sich die gentechnischen Kartoffeln weder hinsichtlich des Wachstums, der Größe, der Blattmorphologie und -farbe, der Wurzel- und Knollenbildung noch hinsichtlich der Ausbildung von Strukturen zur Vermehrung und Ausbreitung sowie deren Überlebensfähigkeit von der Ausgangssorte.

Das AlcR-Aktivatorprotein wirkt sequenzspezifisch. Um die Expression pflanzeneigener Gene beeinflussen zu können, bedarf es entsprechender spezifischer Genabschnitte in den Kartoffelgenen. Dafür gibt es keine Hinweise.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind durch diese gentechnischen Veränderungen in den Kartoffelpflanzen nicht zu erwarten.

Die geernteten Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen sollen nach Versuchsende teilweise zur Wiederauspflanzung aufbewahrt oder zu analytischen Untersuchungen eingesetzt werden. Überzählige Kartoffeln werden inaktiviert.

(b) Das *nptII*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase. Es wurde als Markergen zur Selektion transformierter Pflanzenzellen eingeführt.

Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), welche die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-OH-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika katalysiert, wodurch diese inaktiviert werden. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus. Zu den Substraten der APH(3')II-Enzyme zählen die Antibiotika Kanamycin, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamicin A und B sowie Paromomycin. Die in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsamen Gentamicine und sonstigen Aminoglycoside und Aminocyclitole gehören nicht zum Substratspektrum der APH(3')-II-Enzyme. In der Tiermedizin finden auch Kanamycin und Neomycin breite Anwendung. Das Enzym ist nichttoxisch für Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen und den Menschen.

(c) Die kodierende Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase, *lacI*-Sequenzen

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden Vektoren verwendet, die von dem Plasmid pBIN19 abstammen. Bei diesen befindet sich die „multiple cloning site“ innerhalb der kodierenden Sequenz des α -Fragments der β -Galaktosidase aus *E. coli*.

Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das physiologisch wichtigste Substrat ist Lactose, die zu Galaktose und Glucose hydrolysiert wird. Als α -Teil werden die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren der β -Galaktosidase bezeichnet. Das α -Teil alleine ist enzymatisch nicht aktiv, eine Komplementation in geeigneten Wirten ist jedoch möglich.

Durch die Insertion der chimären *alcR*::GUS-DNA-Sequenz in die „multiple cloning site“ wurde die für das α -Teil der β -Galaktosidase kodierende Sequenz unterbrochen, so dass sie in dieser Form u. a. in *E. coli*-Bakterien nicht mehr für ein komplementationsfähiges α -Teil kodieren kann. Die unterbrochene Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase steht unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Ein funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese Sequenz nicht kodiert. Veränderungen in den gentechnisch veränderten Kartoffeln aufgrund des Vorhandenseins dieser Sequenz sind nicht zu erwarten.

In den gentechnisch veränderten Pflanzen befinden sich außerdem auch 5'- und 3'-Sequenzen des Repressor-Gens *lacI*. Diese 5'- und 3'-Sequenzen sind jedoch durch die *lacZ*- und M13 *ori*-Sequenzen voneinander getrennt. Eine Funktionsfähigkeit der *lacI*-Sequenzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen ist nicht zu erwarten.

(d) M13-Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen, die durch Transformation mit einem Derivat des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten zwei Fragmente aus M13mp19, nämlich ein 440 bp großes Fragment, das einen Teil eines offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfaßt, sowie ein 433 bp großes Fragment, das den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält.

Sollte es in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer Transkription des Fragments des offenen Leserahmens des Strukturproteins kommen, würde dies nicht in einem funktionalen Protein resultieren, da das Fragment nur für 167 Aminosäuren von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Pflanzen aufgrund der Anwesenheit dieses Fragments sind daher nicht zu erwarten.

Der Replikationsursprung von M13 bewirkt die Replikation des Phagen in *E. coli*, wenn *E. coli* mit M13-, f1- oder fd-Phagen infiziert ist. Eine Funktionsfähigkeit des Replikationsursprungs in Pflanzen ist nicht zu erwarten.

(e) Das Fragment des *ocd*-Gens

Die Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten ein Fragment des *ocd*-Gens (Ornithin-Cyclodeaminase), welches sich zwischen dem 3'-Ende der translatierten Sequenz des *nptII*-Gens und der *nos*-Terminatorsequenz befindet. Da diese Sequenz als Teil der mRNA des *nptII*-Gens transkribiert wird, jedoch hinter dem Terminationskodon des *nptII*-Gens liegt, ist nicht zu erwarten, dass die Sequenz translatiert wird.

(f) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der TL-DNA des Plasmids pTiB6S3 aus *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirkten, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stammes GV2260 vorhandenen Helferplasmids pGV2260, das nicht in die Pflanzen übertragen wurde, die Integration der zwischen den Borderregionen liegenden Gene in Chromosomen der Kartoffelpflanzen. Diese Borderregionen des Ti-Plasmids sind in den gentechnisch veränderten Pflanzen funktionslos und lassen keine Veränderungen in den Pflanzen erwarten.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten ins Genom integriert folgende Regulationssequenzen:

- 35S-Promotor des Cauliflower mosaic virus (CaMV);
- Promotor und Terminator des Nopalin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*;
- *alcR*-Bindestelle des *alcA*-Gens aus *Aspergillus nidulans*

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der chimären *alcR*::GUS-DNA-Sequenz sowie des *nptII*-Gens in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1. (a) und (b).

(g) 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. Eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Border wurde jedoch berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden.

Nach den dem Antrag zu entnehmenden Informationen können im vorliegenden Fall durch Integration von außerhalb der Borderregionen gelegenen DNA-Abschnitten folgende funktionale Einheiten in die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen übertragen worden sein:

Nach den dem Antrag zu entnehmenden Informationen können im vorliegenden Fall durch Integration von außerhalb der Borderregionen gelegenen DNA-Abschnitten folgende funktionale Einheiten in die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen übertragen worden sein:

- (i) das *nptIII*-Gen (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;
- (ii) der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- (iii) die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RK2;
- (iv) der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- (v) ein nicht-funktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- (vi) das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- (vii) das Transposon *IS1* innerhalb des *nptIII*-Gens;
- (viii) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Da das *nptIII*-Gen (i) unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht, ist davon auszugehen, dass es in Pflanzen in der Regel nicht exprimiert wird. Eine Auswirkung des Gens auf den pflanzlichen Stoffwechsel wäre auch im Falle einer Expression des Gens nicht zu erwarten.

Die Replikationsursprünge *oriV* (ii) bzw. *oriT* (iii) des Plasmids RK2 ermöglichen die Replikation des Plasmids in einem weiten Wirtsbereich Gram-negativer Bakterien bzw. seinen konjugativen Transfer, sofern die Mobilisierungsfunktionen durch ein Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden. Es gibt keine Hinweise dafür, dass die Replikationsursprünge von RK2, der Replikationsursprung von pMB1 (viii) oder die übrigen DNA-Abschnitte bakteriellen Ursprungs (iv, v, vi, vii) in höheren Pflanzen eine Funktion hätten. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (v) bzw. unterbrochen (vi).

(h) 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 Kartoffelpflanzen 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 bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen 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 sichere Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen sowie aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor. Pollen von Kartoffelpflanzen wird ohnehin nur in geringem Umfang durch den Wind verbreitet und spielt als Auslöser von Pollenallergien generell keine nennenswerte Rolle.

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

Kartoffeln befindet sich in Mitteleuropa seit mehreren hundert Jahren im landwirtschaftlichen Anbau. Eine Etablierung von Kartoffeln in natürlichen Ökosystemen wurde dabei in Europa nicht beobachtet. Kartoffeln werden zwar gelegentlich außerhalb kultivierter Flächen ange-

troffen, jedoch nur auf nicht-natürlichen Standorten wie Wegrändern und anderen Ruderflächen. Da Kartoffeln nicht frostresistent sind, kommt es auch an solchen Standorten nicht zu einer dauerhaften Ansiedlung. Infolge des Kartoffelanbaus können auf landwirtschaftlich genutzten Flächen in Abhängigkeit von der Höhe der Wintertemperaturen in der folgenden Kultur "Durchwuchskartoffeln" auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen oder Samen hervorgegangen sind.

Es ist vorgesehen, die oberirdischen Teile der Kartoffelpflanzen vor dem Abreifen physikalisch oder chemisch abzutöten, um ein Reifen der Samen zu unterbinden. Die Knollen werden nach der Ernte analysiert oder zur Wiederauspflanzung im Folgejahr aufbewahrt. Überzählige Knollen sollen inaktiviert werden. Die auf dem Feld verbleibenden transgenen Pflanzenreste sollen zur Verrottung liegen bleiben. Kartoffeln sollen während der zweijährigen Nachkontrolle nicht angebaut werden. Durchwuchskartoffeln werden während dieser Zeit erkannt und vernichtet. Die Wahrscheinlichkeit einer Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen durch nach der Ernte möglicherweise im Boden verbliebene Knollen wird durch die Maßnahmen gemäß der Nebenbestimmung II.8. minimiert. Um restliche im Boden verbliebene Knollen zu beseitigen, ist die Versuchsfläche im Anschluß an die Knollenernte sowie im Frühjahr des folgenden Jahres jeweils ca. 15 cm tief aufzulockern. Dabei gefundene Knollen sind zu inaktivieren.

Kartoffelpflanzen der Sorte „Solara“ können blühen und Samen bilden. Es ist denkbar, dass die gentechnisch veränderten Kartoffeln durch Eintrag von fremden Kartoffelpollen befruchtet werden können, so dass eine Entstehung von Samen nicht vollständig auszuschließen, jedoch wenig wahrscheinlich ist. Dass unter den mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen überwintern, und dass daraus Pflanzen aufwachsen, ist nicht wahrscheinlich.

Sollten Knollen oder Samen im Boden verbleiben, würden aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die von dem Antragsteller vorgesehene Nachkontrolle erfaßt. Eine mögliche Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderungen ist nicht zu erwarten. Während der Nachkontrolle nach Beendigung des Vorhabens sind auf den zu kontrollierenden Flächen keine Pflanzen oder nur solche Pflanzen anzubauen, welche die Nachkontrolle nicht behindern. Ein Auffinden von Durchwuchskartoffeln wird dadurch ohne Probleme möglich.

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

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

Versuche zur Kreuzung von Kartoffeln mit in Mitteleuropa vorkommenden Solanaceen waren erfolglos. Unter Freilandbedingungen fand keine Einkreuzung von gentechnisch veränderten Kartoffeln in *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) statt. Auch nach künstlicher Pollenübertragung auf *S. nigrum* wurden keine lebensfähigen Samen erhalten. Eine Regeneration einiger Hybriden, die sich allerdings als steril erwiesen, war nur mit Hilfe artifizierlicher Methoden ("embryo rescue") unter Bedingungen möglich, die in der Natur nicht auftreten. Kartoffeln und *Solanum dulcamara* (Bittersüßer Nachtschatten) erwiesen sich als streng bilateral inkompatible Arten; bei Kreuzungsversuchen kam es nicht zu einer Befruchtung der Samenanlagen. Auch mit der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) ist die Kartoffel nicht kreuzbar. Die Vermehrung von Kartoffeln erfolgt in der landwirtschaftlichen Praxis vegetativ über Knollen.

Im Folgenden wird daher nur auf eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen auf andere Kartoffelpflanzen eingegangen. Pollen von Kartoffelpflanzen können durch Insekten oder durch den Wind übertragen werden. Eine Übertragung durch den Wind geschieht jedoch nur über kurze Entfernungen. Bei Kartoffeln findet in erster Linie Selbstbefruchtung statt, eine Fremdbefruchtung bereits innerhalb eines blühenden Kartoffelfeldes ist selten. Sie geschieht am ehesten zwischen benachbarten Pflanzen.

Auf dem Versuchsgelände am Standort Gatersleben werden im Rahmen verschiedener Freisetzungsvorhaben vom Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben, bis 2002 gentechnisch veränderte Erbsen und Kartoffeln freigesetzt. Werden die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen aus verschiedenen Freisetzungsvorhaben auf demselben Schlag in unmittelbarer Nähe angebaut werden, so kann die gemeinsame Fläche als Freisetzungsfeld betrachtet und der Isolationsabstand zum nächsten Feld mit nicht-gentechnisch veränderten Kartoffeln auf die Gesamtfläche angewendet werden.

Die von dem Antragsteller vorgesehene Einhaltung eines Abstands von mindestens 20 m zu anderen mit Kartoffeln bebauten landwirtschaftlichen Nutzflächen wird als ausreichend angesehen. Sollte es dennoch zu einer Pollenübertragung auf Kartoffelpflanzen kommen, die zur Erzeugung von Speisekartoffeln angebaut werden, so wäre dadurch nicht mit schädlichen Einwirkungen zu rechnen. Pflanzgut für den landwirtschaftlichen Anbau von Kartoffeln wird vegetativ vermehrt, d. h. nicht über Samen. Die Wahrscheinlichkeit, dass aus möglicherweise gebildeten Samen Pflanzen auflaufen würden, ist, wie weiter oben bereits ausgeführt wurde, unter den gegebenen klimatischen Bedingungen sehr gering. Im Rahmen einer

Fruchtfolge würden solche Pflanzen durch die üblichen feldbaulichen Maßnahmen eliminiert werden. Selbst wenn Knollen solcher Pflanzen verzehrt würden, wäre dadurch mit keiner Gefährdung der Gesundheit zu rechnen, wie aus der unter III.1.2.1. vorgenommenen Bewertung hervorgeht.

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 Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmateriale, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

Die Gene für den *alcR*-Transaktivator und die β -Glucuronidase stammen aus den ubiquitär verbreiteten *Aspergillus nidulans* bzw. *E. coli*, kommen also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher unter natürlichen Bedingungen mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen wie *Aspergillus nidulans* bzw. *E. coli* erfolgen.

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(b) bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringerer Bedeutung, werden in der Tiermedizin jedoch vielfältig angewendet. Es war somit zu prüfen, ob durch einen möglichen horizontalen Gentransfer des *nptII*-Gens der therapeutische Einsatz der betreffenden Antibiotika beeinträchtigt würde.

Der Resistenzmechanismus der Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung kommt natürlicherweise bei Bodenmikroorganismen vor. APH(3')II-Enzyme wurden zudem in klinischen Isolaten von Mikroorganismen aus Menschen gefunden. Die weite Verbreitung von Genen, die eine Resistenz gegen Aminoglycosid-Antibiotika vermitteln, ist durch die häufige Anwendung dieser Antibiotika sowie dadurch zu erklären, dass diese Gene oft auf Plasmiden lokalisiert sind, wodurch eine effektive Übertragung durch Konjugation möglich ist. Selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Kartoffeln auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Das Gen für das α -Fragment der β -Galaktosidase ist 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. Das gleiche gilt für die 3'- und 5'-Sequenzen des *lacI*-Gens.

Eine ähnliche Situation liegt bei dem Fragment des Gens für ein Strukturprotein des Phagen M13 und bei dem Fragment des *ocd*-Gens vor. Mit einer Funktionsfähigkeit dieser Fragmente in Bakterien ist nicht zu rechnen. Bei dem Fragment des *ocd*-Gens kommt noch hinzu, dass dieses Fragment wie unter III.1.2.1.(e) erläutert, nicht translatiert würde.

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln enthalten den Replikationsursprung von M13. M13 zählt zu den F-Faktor spezifischen *E. coli*-Phagen. Für diesen Replikationsursprung 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.

Die zur Regulation der übertragenen Gene in die Kartoffeln eingeführten Sequenzen stammen aus *A. tumefaciens*, *Aspergillus nidulans* und CaMV. Bezüglich eines horizontalen Gentransfers dieser Sequenzen auf Mikroorganismen ist anzumerken, dass *A. tumefaciens* und *Aspergillus nidulans* in der Umwelt weit verbreitet sind und eine Übertragung der entsprechenden Sequenzen aus *Agrobacterium* bzw. *Aspergillus* weitaus wahrscheinlicher ist, als eine Übertragung aus den gentechnisch veränderten Pflanzen. Die theoretische Möglichkeit eines Transfers der CaMV-Sequenzen aus den gentechnisch veränderten Pflanzen würde keine neue im Vergleich zur natürlicherweise vorliegenden Situation darstellen, weil CaMV als doppelsträngiges pflanzeninfizierendes DNA-Virus ohnehin in Pflanzen anzutreffen ist.

In der Regel werden bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Border liegenden Sequenzen ins Pflanzengenom integriert. Eine Übertragung von Sequenzen jenseits der Border kann jedoch aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden. Im vorliegenden Fall könnten durch Übertragung von außerhalb der Borderregionen gelegenen Sequenzen folgende DNA-Abschnitte in die gentechnisch veränderten Pflanzen integriert worden sein:

- (i) das *nptIII*-Gen aus *Streptococcus faecalis* (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;
- (ii) der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- (iii) die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RK2;
- (iv) der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- (v) ein nicht-funktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- (vi) das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- (vii) das Transposon *IS1* innerhalb des *nptIII*-Gens;
- (viii) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Das *nptIII*-Gen (i), das mit seinem eigenen Promotor in den gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten sein könnte, verleiht nach Literaturangaben nicht nur eine Resistenz gegen Kanamycin und Neomycin, sondern auch gegenüber dem Antibiotikum Amikacin. Amikacin ist in Deutschland nicht als Tierarzneimittel zugelassen, kann jedoch in der Humantherapie verwendet werden. Für die Humantherapie stellt es ein sogenanntes Reserveantibiotikum dar. Wegen des Einsatzes als Reserveantibiotikum und der damit einhergehenden nicht häufigen Anwendung sind Resistenzen gegenüber Amikacin bisher nicht weit verbreitet. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen-DNA auf Mikroorganismen und der Abwesenheit eines Selektionsdrucks auf den Freisetzungsf lächen ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die Präsenz dieses Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen wird.

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 (ii bis vi) 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 (v) bzw. unterbrochen (vi).

Das Insertionselement *IS1* (vii) tritt natürlicherweise bei verschiedenen Arten der Enterobacteriaceae auf. Es wurde beispielsweise bei Arten der Gattungen *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia* und *Salmonella* gefunden. Die Kopienzahl pro Bakteriengenom kann bei *IS1* bis zu > 40 Kopien betragen. Kopien von *IS1* können sowohl chromosomal als auch plasmidal lokalisiert sein und wurden auch in Prophagen nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass eine Ausbreitung dieses Insertionselements über horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien leicht möglich ist. Im Vergleich hierzu ist eine theoretisch denkbare Ausbreitung über einen horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen vernachlässigbar gering.

Das pMB1-Replikon (viii) 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 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 eventuelle Präsenz des Replikationsursprungs von pMB1 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden sterile Kartoffelblätter mit Agrobakterien inokuliert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen des binären Vektorplasmids enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Nur Kartoffelpflanzen, die frei von Agrobakterien waren, wurden verwendet.

Die verwendeten *Agrobacterium*-Stämme sind, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. sie sind 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 Vektorplasmide 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.