



## **Antrag 6786-01-0127**

### **Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten**

#### **Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.)**

**(Linien VR/T18; VR/T21; VR/T23 und amf/T85; amf/T103; amf/T121)**

**im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der**

**deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 18. September 2002**

#### **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 modifizierte *pr17*-Gen des Kartoffelblattrollvirus (PLRV)

Im Entwicklungszyklus des Virus kodiert das Gen für ein 17 kDa-Protein (*pr17*), von dem vermutet wird, dass es sich um ein Transportprotein handelt, das das virale Genom als Ribonukleoproteinkomplex durch Plasmodesmenpassage im Phloem infizierter Pflanzen verbreitet. Für die Virusreplikation ist es wahrscheinlich entbehrlich. Das *pr17*-Gen ist ein Bestandteil des auf ORF3 des PLRV-Genoms liegenden Hüllproteingens (*cp*), wird aber durch einen zweiten Leseraster kodiert.

In die Kartoffelpflanzen wurde durch *Agrobacterium*-vermittelte Transformation ein modifiziertes *pr17*-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators des Cauliflower Mosaic Virus eingeführt. Die Modifikation des *pr17*-Gens besteht in einer 5'-terminalen Verlängerung durch Fusion mit der „multiple cloning site“ (Polylinker) des Vektors pBluescript. Durch gezielte Mutagenese wurden die ersten beiden AUG-Translationsstartkodons des *pr17*-Gens in ACG-Kodons verändert und ein AUG-Kodon in die Polylinkersequenz eingeführt.

Dieses Konstrukt bewirkt in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen die Bildung eines am N-Terminus verlängerten *pr17*-Proteins. Durch die Verlängerung wird der amphipathische Charakter der Oligomerisierungsdomäne des Proteins verändert. Das so modifizierte Protein könnte im Falle einer Virusinfektion in den gentechnisch veränderten Pflanzen durch Bildung von Hetero-Oligomeren mit dem vom viralen Genom kodierten Wildtyp-Transportprotein die Entstehung der viralen Transportstrukturen blockieren. Dadurch könnte der Langstreckentransport von Virus-RNA im Phloem und damit die Ausbreitung und weitere Vermehrung der Viren in der Pflanze verhindert werden. Untersuchungen im Gewächshaus zeigten eine Resistenz der gentechnisch veränderten Pflanzen gegenüber den Kartoffelviren PLRV, PVX und PVY. Dieses Ergebnis deutet auf einen ähnlichen Mechanismus des Phloemtransports nicht verwandter Pflanzenviren hin und kann Ausgangspunkt zur gentechnischen Erzeugung einer „Breitband-Virusresistenz“ in Pflanzen sein.

Grundsätzlich ist die Möglichkeit von Rekombinationen mit dem Wildtyp-*pr17*-Gen im Phloem nicht gentechnisch veränderter Kartoffelpflanzen gegeben, die gleichzeitig mit PLRV und anderen Viren infiziert sind. Sequenzhomologien des PLRV zu anderen verbreiteten Kartoffelviren, die eine Rekombination dieser Viren mit PLRV-Sequenzen begünstigen könnten, sind nicht festgestellt worden. Da diese Viren von der des PLRV deutlich verschiedene Genomstrukturen und Translationsstrategien aufweisen und außerdem bereits die Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung in der Pflanze besitzen, wäre selbst im Falle von Rekombinationsereignissen nicht mit dem Entstehen virulenterer Viren zu rechnen.

Neuere Untersuchungen mit gentechnisch veränderten Tabakpflanzen, die ein modifiziertes „movement protein“ MP17 des PRLV exprimieren, ergaben, dass das Protein die Plasmodesmen im Phloem verändert. Dieses hat Auswirkungen auf die Assimilatverteilung. Es kommt zum Anstau von Assimilaten, was zur Induktion von bestimmten Abwehrgenen führen kann. Dadurch wäre

dann auch eine Resistenz gegen verschiedene phytopathogene Organismen wie z. B. gegen *P. infestans* erklärbar.

Unter Gewächshausbedingungen sind keine Veränderungen im Phänotyp der gentechnisch veränderten Pflanzen erkennbar geworden, die auf Auswirkungen des exprimierten verlängerten pr17-Proteins auf den pflanzlichen Stoffwechsel schließen lassen.

Die Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen sind nicht zum Verzehr vorgesehen. Selbst bei einem unbeabsichtigten Verzehr durch Tiere oder Menschen wären jedoch keine schädlichen Einwirkungen auf deren Gesundheit zu erwarten.

Beim Kartoffelanbau kommt es regelmäßig zur Infektion von Pflanzen mit dem PLRV. Knollen, die von solchen Pflanzen geerntet werden, enthalten nicht nur das Virus, sondern auch das pr17-Protein. Solche Knollen gelangen in den menschlichen Verzehr, ohne dass gesundheitliche Beeinträchtigungen auftreten. Die Konzentration des Wildtyp-pr17-Proteins in PLRV-infizierten Pflanzen ist in vielen Fällen höher als die des gegenüber dem Wildtyp-Protein modifizierten pr17-Proteins in den gentechnisch veränderten Pflanzen.

(b) Die cDNA für die stärkekornggebundene Stärkesynthase (GBSS) aus Kartoffeln in Antisense-Orientierung

Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthalten cDNA der stärkekorngebundenen Stärkesynthase (GBSS) unter der Kontrolle des GBSS-Promotors *Wx* einschließlich einer „untranslated leader (ul)“-Sequenz aus der Kartoffel sowie den 35S-Terminator des Cauliflower mosaic virus (CaMV).

Die cDNA ist in umgekehrter Orientierung bezogen auf den Promotor angeordnet. In den gentechnisch veränderten Pflanzen wird dadurch die Bildung einer Antisense-RNA bewirkt, die das endogene Transkript des jeweiligen Gens inaktiviert und so die Bildung des entsprechenden kartoffeleigenen Enzyms verringert bzw. verhindert.

Die ul-Sequenz soll die Transkription des Transgens optimieren. Sie ist wie auch der Promotor normaler Bestandteil des GBSS-Gens nicht gentechnisch veränderter Kartoffeln und besitzt somit kein Gefährdungspotential.

Als Folge der gentechnischen Veränderungen wurde durch die gezielte Ausschaltung der Expression des am Stärkestoffwechsel beteiligten Enzyms in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen der Stärkestoffwechsel dahingehend verändert, dass eine in ihrer Struktur und/oder Zusammensetzung modifizierte Stärke synthetisiert wird. Die modifizierte Stärke unterscheiden sich nach Voruntersuchungen an Pflanzen, die im Gewächshaus kultiviert worden waren, von normaler Kartoffelstärke im Amylosegehalt.

Die geernteten Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen werden nach Versuchsende in eine gentechnische Anlage gebracht und sind nicht zum Verzehr oder zur Verfütterung vorgesehen. Selbst bei einem unbeabsichtigten Verzehr durch Tiere oder Menschen wären jedoch keine schädlichen Einwirkungen auf deren Gesundheit zu erwarten. Die Stärke in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen besteht aus den gleichen Grundbestandteilen (Amylopektin und Amylose) wie herkömmliche Kartoffelstärke. Die Modifikationen der Zusammensetzung bzw. der

Struktur der Stärke können einen Einfluß (positiv oder negativ) auf die Verdaulichkeit der Kartoffelstärke haben. Eine veränderte Verdaulichkeit ließe jedoch selbst im Falle eines Verzehrs keine Gesundheitsschäden befürchten.

(c) Das *nptII*-Gen

In alle gentechnisch veränderten Kartoffelklone wurde das *nptII*-Gen unter Kontrolle des Nopalinsynthese-Promotors und -Terminators eingeführt. Das *nptII*-Gen dient als Markergen zur Selektion transformierter Pflanzenzellen und kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase.

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. Das in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsame Gentamicin und sonstige Aminoglycoside und Aminocyclitole gehören nicht zum Substratspektrum der APH(3')II-Enzyme. In der Tiermedizin finden Kanamycin und Neomycin jedoch breite Anwendung. Aufgrund der Substratspezifität der Neomycin-Phosphotransferase ist zu erwarten, dass unter Freilandbedingungen in den gentechnisch veränderten Kartoffeln bei fehlendem Substrat keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen. Da die betreffenden Antibiotika im Boden nicht in höheren Konzentrationen vorliegen, vermittelt die Neomycin-Phosphotransferase den gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland keinen Selektionsvorteil. Eine Toxizität des Enzyms für Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen oder den Menschen liegt nicht vor.

(d) Die kodierende Sequenz des  $\alpha$ -Teils der  $\beta$ -Galaktosidase, *lacI*-Sequenzen

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen der Empfängersorte „Tomensa“ wurden Derivate des Vektors pBIN19 verwendet, bei dem sich die „multiple cloning site“ innerhalb der kodierenden Sequenz des  $\alpha$ -Fragments der  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* befindet.

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

Durch die Insertion des modifizierten *pr17*-Gens in die „multiple cloning site“ wurde die für das  $\alpha$ -Teil der  $\beta$ -Galaktosidase kodierende Sequenz unterbrochen, so dass sie in dieser Form u. a. in *E. coli*-Bakterien nicht mehr für ein komplementationsfähiges  $\alpha$ -Teil kodieren kann. Die unterbrochene Sequenz des  $\alpha$ -Teils der  $\beta$ -Galaktosidase steht unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Ein funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese Sequenz nicht kodiert. Veränderungen

in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen aufgrund des Vorhandenseins dieser Sequenz sind nicht zu erwarten.

In den gentechnisch veränderten Pflanzen befinden sich wahrscheinlich 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.

(e) M13-Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten wahrscheinlich 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.

(f) Das Fragment des *ocd*-Gens

Die Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten wahrscheinlich 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.

(g) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der TL-DNA der pBIN19-Derivate p17N (I.) und pWx/ul-asGBSS (II.) aus *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirkten, abhängig von dem Genprodukt der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamm vorhandenen Helferplasmids pAL4404, 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:

zu (I.)

- den 35S-Promotor des Cauliflower mosaic virus (CaMV),
- den 35S-Terminator des CaMV,
- Promotor und Terminator des Nopalinn-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens*.

Diese Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression des modifizierten *pr17*-Gens bzw. des *nptIII*-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 (c).

zu (II.)

- Promotorregion des GBSS-Gens (*Wx*) einschließlich der ul-Sequenz aus Kartoffeln,
- 35S-Terminator des Cauliflower mosaic virus (CaMV),
- Promotor und Terminator des Nopalinn-Synthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden cDNA für das GBSS-Enzym des Stärkestoffwechsels aus Kartoffeln in Antisense-Orientierung sowie für das *nptIII*-Gen in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(b) und (c).

(h) 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. Der verwendete Transformationsvektor wurde aus pBIN19 entwickelt. Bestandteil des Vektorrückgrats ist u. a. das *nptIII*-Gen. Mittels PCR wurde nachgewiesen, dass die 3 freizusetzenden, gentechnisch veränderten, virusresistenten Kartoffellinien (I.) das Antibiotika-Resistenzgen *nptIII* nicht enthalten, während die von der Antragstellerin vorgelegten Southern blot-Analysen der 3 amylosefreien Linien (II.) keinen zweifelsfreien Ausschluss des *nptIII*-Genes erlauben.

Es ist daher bei der Risikoabschätzung für die letzteren Linien zugrunde zu legen, dass der gesamte Vektor integriert worden ist:

- das *aphAIII* (= *nptIII*)-Gen aus *Streptococcus faecalis* (= *Enterococcus faecalis*), unterbrochen durch das Transposon *IS1*, unter Kontrolle seines eigenen Promotors, ist nur in Bakterien funktionsfähig;
- das *tetA*-Gen („repressor of tetracycline resistance“) 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 funktionsfähiger Genprodukte basierend auf diesen Sequenzen ist in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten, da sie nicht unter der Kontrolle pflanzenspezifischer Promotoren stehen. Dies gilt ebenfalls für das *nptIII*-Gen, dessen Expression durch einen bakteriellen Promotor kontrolliert wird.

Die Replikationsursprünge *oriV* bzw. *oriT* 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 oder die übrigen DNA-Abschnitte bakteriellen Ursprungs in höheren Pflanzen eine Funktion hätten. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig bzw. unterbrochen.

#### (j) 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 in Bezug auf das Resistenzverhalten gegenüber pilzlichen oder viralen Pathogenen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen, d.h. die Resistenz könnte im Freiland erhöht oder vermindert sein. 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. Während der bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus und im Freiland bei früheren Freisetzungsversuchen mit vergleichbaren Konstrukten durch andere Antragstellerin 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. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen oder aus Freisetzung-

gen anderer Pflanzen, die die gleichen Gene exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität dieser 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 angetroffen, jedoch nur auf nicht-natürlichen Standorten wie Wegrändern und anderen Ruderalflächen. 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 den Temperaturen im Winter im folgenden Jahr 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 mechanisch oder chemisch abzutöten, um die Bildung keimfähiger Samen zu verhindern. 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 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.9. minimiert. Um restliche im Boden verbliebene Knollen zu beseitigen, ist die Versuchsfläche im Anschluss an die Knollernte sowie im Frühjahr des folgenden Jahres jeweils ca. 15 cm tief aufzulockern. Dabei gefundene Knollen sind zu inaktivieren.

Kartoffelpflanzen der Sorte „Tomensa“ können blühen und Samen bilden. Dass unter den gegenwärtigen mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen oder -knollen überwintern, und dass daraus Pflanzen aufwachsen, ist nicht auszuschließen. Sollten Knollen oder Samen im Boden verbleiben, würden aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die vorgesehene Nachkontrolle erfasst. Die gentechnisch veränderten Pflanzen unterschieden sich nach Angaben der Antragstellerin bei Untersuchungen im Gewächshaus phänotypisch nicht von den Kontrollpflanzen. Die Expression der stärkekorngelundene Stärkesynthase (GBSS) in den gentechnisch veränderten Kartoffeln beeinflusst die Stärkezusammensetzung in den Knollen. Eine mögliche Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderungen ist nicht auszuschließen.

Dieses wird durch die vorgesehene Anbaupause von zwei Jahren und durch die vorgesehene Nachkontrolle ausreichend berücksichtigt.

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 leichtes Auffinden von Durchwuchskartoffeln wird dadurch gewährleistet.

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 artifizieller 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.

Die von der Antragstellerin vorgesehene Einhaltung eines Abstands von mindestens 10 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 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.

Mikroorganismen, die das verlängerte *pr17*-Protein des PLRV exprimieren würden, hätten keinen erkennbaren Selektionsvorteil, da es sich hier um ein Protein eines pflanzenspezifischen Virus handelt, dessen primäre Aufgabe es vermutlich ist, die Ausschlussgrenze von Plasmodesmen zu verändern. Im Falle eines horizontalen Gentransfers des in die gentechnisch veränderten Pflanzen eingeführten modifizierten *pr17*-Gens auf Mikroorganismen wären daher keine negativen Auswirkungen auf die Umwelt zu erwarten.

Das GBSS-Gen und der GBSS-Promotor (*Wx*) einschließlich der *ul*-Sequenz stammen aus Kartoffeln, kommen also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Sie könnten also auch - mit weit höherer Wahrscheinlichkeit - durch horizontalen Gentransfer aus nicht gentechnisch veränderten Organismen in Mikroorganismen in der Umwelt gelangen.

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(c) bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringerer Bedeutung, werden in der Tiermedizin jedoch vielfältig angewendet. Es wurde vorsorglich geprüft, 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 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.

Auch bei einer Übertragung der sonstigen in den Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Sequenzen nicht zu befürchten. Der GBSS-Promotor kommt natürlicherweise in der Kartoffel vor. Die übrigen Regulationssequenzen stammen aus *A. tumefaciens* und CaMV. *A. tumefaciens* ist in Böden weit verbreitet, und die genannten Sequenzen befinden sich in Wildtyp-Agrobakterien auf Ti-Plasmiden, die

durch Konjugation zwischen verschiedenen Rhizobiaceen ausgetauscht werden können. 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. Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen der Empfängersorte „Tomensa“ (zumindest die Konstrukte mit der antisense-GBSS; II.) enthalten daher möglicherweise auch Nukleinsäureabschnitte, die aus den Regionen der binären Plasmide außerhalb der T-DNA stammen (s. III.1.2.1.(h)). Für die Replikationsursprünge der Plasmide pBR322 und pVS1 ist anzumerken, dass diese in gramnegativen Bakterien vorkommen. 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.

Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthalten das  $\alpha$ -Fragment der  $\beta$ -Galaktosidase-Gens, das durch Insertion des modifizierten *pr17*-Gens unterbrochen wird, 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.(f) erläutert, wahrscheinlich nicht translatiert würde.

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln enthalten wahrscheinlich den Replikationsursprung von M13. M13 zählt zu den F-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*, *S. tuberosum* und CaMV. 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.

Durch Übertragung von außerhalb der Borderregionen gelegenen Sequenzen können ferner 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.

Mit Hilfe einer PCR-Untersuchung konnte die Antragstellerin in den Linien VR/T18, VR/T21 und VR/T23 das *nptIII*-Gen nicht nachweisen, während für die Linie amfT85, amf/T103 und amf/T121 dieser Nachweis nicht erbracht wurde. Das *nptIII*-Gen (i) unter Kontrolle seines eigenen Promotors 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 Freisetzungsfeldern 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 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 eventu-

elle 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. Die regenerierten Pflanzen wurden durch Inkubation pflanzlicher Homogenate in geeigneten Nährmedien auf Freiheit von Agrobakterien untersucht. Die zur Transformation eingesetzten Agrobakterien konnten nicht nachgewiesen werden. 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.