



Antrag 6786-01-0095

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) (Nachkommen der Transformanten DL10, DL11, DL12, DL13, DC1) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 27. April 1999

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 Lysozym-Gen

Das in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthaltene Konstrukt aus dem Lysozym-Gen des Bakteriophagen T4 und dem DNA-Abschnitt für das Signalpeptid der α - Amylase aus *Hordeum vulgare* (Gerste) wird unter der Kontrolle des 35S-Promotors und der 35S-Terminatorregion des CaMV, flankiert von 2 zwei „scaffold attachment regions“ aus der Sojabohne, konstitutiv exprimiert.

Das T4-Lysozym ist ein bakterizides Enzym. Es spaltet als (N-Acetyl-)Muramidase die glykosidische Bindung des Mureins zwischen dem C-Atom 1 der N-Acetylmuraminsäure (MuNAc) und dem C-Atom 4 des N-Acetylglucosamins (GlcNAc) und baut die Muropolysaccharidkette zu dem Disaccharid GlcNAc-MurNAc ab. Die Vorschaltung des Signalpeptids der α - Amylase bewirkt grundsätzlich den co-translationalen Import des

chimären Proteins in das Endoplasmatische Reticulum und damit im Ergebnis den Export in die Interzellularräume. Es ist davon auszugehen, daß das chimäre Protein oder das prozessierte Lysozym im Endoplasmatischen Reticulum bzw. bei der Passage durch den Golgi-Apparat glykosyliert wird; ein Export auch des chimären Proteins in die Interzellularräume ist nicht auszuschließen. Die Genkassette wird von 2 Kopien einer „scaffold attachment region“ aus der Sojabohne flankiert. Diese sollen dazu dienen, Positionseffekte durch die Bildung chromosomaler „Loops“ zu reduzieren.

Die Befähigung zur Synthese von Lysozym ist unter Bodenmikroorganismen und Pflanzen weit verbreitet; in der Humanmedizin findet Lysozym Anwendung zur Behandlung von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege. In Anbetracht des ubiquitären Vorkommens von Lysozym wird einem möglichen zusätzlichen Eintrag von Lysozym in die Umwelt durch den Anbau der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen quantitativ keine Bedeutung beigemessen. Da dem Signalpeptid der α - Amylase wie auch allen anderen derzeit bekannten Signalpeptiden, ob prozessiert oder unprozessiert, und der „scaffold attachment region“ kein gesundheitsschädliches Potential zuerkannt wird, ist davon auszugehen, daß dies auch für den Komplex aus Signalpeptid und Enzym (hier T4-Lysozym) zutrifft.

(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 Kanamycin und Neomycin jedoch breite Anwendung.

Aufgrund der Substratspezifität der Neomycin-Phosphotransferase ist zu erwarten, daß unter Freilandbedingungen in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen 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.

(c) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der T-DNA des Plasmids pSR8-30 bzw. pSR8-40. Diese Sequenzen bewirkten, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamm vorhandenen Helferplasmids, 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 Kartoffelpflanzen enthalten ins Genom integriert folgende, in Pflanzen funktionale Regulationssequenzen:

- den 35S-Promotor des CaMV,
- den Promotor des Nopalinsynthase-Gens aus *A. tumefaciens*,
- die 35S-Terminatorregion des CaMV,
- die Gen-4-Terminatorregion aus *A. tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden DNA-Abschnitte, die für das T4-Lysozym bzw. für die Neomycin-Phosphotransferase in den gentechnisch veränderten Pflanzen kodieren. Ausführungen zu den Auswirkungen der Bildung dieser Proteine in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) und (b).

(d) 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 Borderregionen wurde jedoch berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden. In der Risikobewertung werden deshalb auch jene Bereiche der zur Transformation der Kartoffeln verwendeten Vektoren berücksichtigt, die jenseits der T-DNA-Borderregionen lokalisiert sind. Hierbei handelt es sich insbesondere um folgende Sequenzen:

- [a] der Replikationsursprung des Plasmids pBR 322.
- [b] das Replikon des Plasmids RK2, bestehend aus *oriV* und *oriT*,
- [c] das β -Lactamase-Gen des Plasmids pBR 322.

Der Replikationsursprung von pBR 322 [a] stammt aus dem Plasmid pMB1, das zur Gruppe der ColE1-ähnlichen Plasmide gehört. Das ColE1-Replikon besitzt einen engen Wirtsbereich,

der auf *Escherichia coli* und einige verwandte Bakterienarten beschränkt ist. Der Replikationsursprung von pBR 322 funktioniert nicht in den Zellen der Kartoffelpflanzen.

Die Replikationsursprünge *oriV* bzw. *oriT* [b] 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 in höheren Pflanzen eine Funktion hätten.

Da das β -Lactamase-Gen [c] unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht, ist nicht davon auszugehen, daß es in Pflanzen exprimiert würde. Das Genprodukt des β -Lactamase-Gens ist eine TEM-1- β -Lactamase, die ein weites Spektrum von β -Lactam-Antibiotika durch Hydrolyse der zyklischen Amidbindung im β -Lactam-Ring inaktivieren kann. Aufgrund der Spezifität dieser Reaktion für solche β -Lactam-Antibiotika wäre selbst bei einem Vorhandensein geringer Mengen von β -Lactamase in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu erwarten, daß in den Pflanzen bei fehlendem Substrat keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen.

TEM-1- β -Lactamasen sind in verschiedenen Enterobakterien, unter anderem in *E. coli*, weit verbreitet. Enterobacteriaceen sind Bestandteil der Darmflora von Tieren und Menschen. Hinweise auf eine toxische Wirkung des Enzyms liegen nicht vor. Es ist davon auszugehen, daß eine mit der Nahrung aufgenommene β -Lactamase wie Proteine im allgemeinen im Verdauungstrakt degradiert und verdaut würde.

(e) 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 gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maß resistent gegenüber dem Befall durch *Erwinia carotovora* und anderen Mikroorganismen sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten. Auch im Hinblick auf das *nptII*-Gen kann aus einer veränderten Expressionsstärke kein Risiko für die Umwelt, die Gesundheit von Menschen oder für Tiere abgeleitet werden.

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 Kartoffelpflanzen im Gewächshaus 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

nisch 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 im Gewächshaus sowie aus Freisetzungen anderer gentechnisch veränderter Pflanzen, die die entsprechenden Gene 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 befinden 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 Kartoffelanbaus können auf landwirtschaftlich genutzten Flächen "Durchwuchskartoffeln" auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen hervorgegangen sind. Kartoffelknollen sind frostempfindlich. Ihre Überdauerung wird daher in erster Linie durch die Wintertemperaturen beeinflusst.

Es ist vorgesehen, die geernteten Knollen, die z. T. über den üblichen Erntezeitraum bis zum Ende des jeweiligen Jahres im Boden verbleiben, zur weiteren Aufarbeitung in eine gentechnische Anlage zu bringen. Das Kartoffelkraut soll auf den Freisetzungsf lächen untergegrubbert werden. Ein Pflügen der Freisetzungsf lächen nach der Knollenernte soll unterbleiben. In den folgenden Vegetationsperioden sollen die Freisetzungsf lächen in Fruchtfolge mit gentechnisch verändertem Raps und *Lolium multi-florum* (Welsches Weidelgras) geführt werden, so daß die Nachkontrolle auf eventuell auflaufende Kartoffelpflanzen erfolgen kann. Eventueller Wiederaufwuchs von Kartoffeln soll im Folgejahr erfaßt und vernichtet werden.

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 bis zu ca. 15 cm tief aufzulockern. Dabei gefundene Knollen sind in ihrer Keimfähigkeit zu zerstören.

Pflanzen der Kartoffelsorte "Désirée" blühen und bilden Samen. Es ist nicht wahrscheinlich, daß unter den mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen überwintern, und daß daraus Pflanzen aufwachsen.

Sollten dennoch Knollen oder Samen im Boden verbleiben, würden aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die von der Antragstellerin vorgesehene bzw. durch die gemäß der Nebenbestimmung II.9. durchzuführende Nachkontrolle erfaßt. Eine mögliche Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderung ist nicht gänzlich auszuschließen. Dieses wird jedoch durch die 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 Auffinden von Durchwuchskartoffeln wird dadurch ohne Probleme möglich.

Aus den genannten Gründen ist daher weder eine Etablierung noch eine unkontrollierte 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 *Solanum 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. 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 Isolationsabstands von 20 m zu nicht zu dem Freisetzungsvorhaben gehörenden Kartoffelanpflanzungen wird als ausreichend erachtet. 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 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 Kartoffelpflanzen über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind in Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen 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.

Eine Übertragung des T4-Lysozym-Gens in Mikroorganismen würde keine besondere Situation schaffen, da Bodenmikroorganismen und insbesondere Bakteriophagen mit der Befähigung zur Synthese von Lysozym weit verbreitet sind. Selbst im Falle eines Transfers des T4-Lysozym-Gens aus den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in Mikroorganismen ist mit keinem bedeutsamen Anstieg der Menge an Lysozym in der Umwelt zu rechnen, noch hätten die Bakterien, falls sie überleben sollten, einen Wachstumsvorteil.

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(b) bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringer 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 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 Kartoffelpflanzen auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Die zur Regulation der übertragenen Gene in die Kartoffelpflanzen eingeführten Sequenzen stammen aus *A. tumefaciens* und CaMV. Bezüglich eines horizontalen Gentransfers dieser Sequenzen auf Mikroorganismen ist anzumerken, daß *A. tumefaciens* in Böden weit verbreitet ist und eine Übertragung der entsprechenden Sequenzen aus *Agrobacterium* weitaus wahrscheinlicher ist als eine Übertragung aus den gentechnisch veränderten Pflanzen. Entsprechendes gilt für das Signalpeptid der α -Amylase aus der Gerste und die „scaffold attachment regions“ aus der Sojabohne, die keine kodierende Funktion haben. 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 anzu-treffen 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:

- (a) der Replikationsursprung des Plasmids pBR322,
- (b) das Replikon des Plasmids RK2, bestehend aus *oriV* und *oriT*,
- (c) das β -Lactamase-Gen des Plasmids pBR 322.

Der Replikationsursprung von pBR322 (a) stammt aus dem Plasmid pMB1, das zum Typ der ColE1-Plasmide gehört, 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.

RK2 gehört zu einer Gruppe von broad host range-Plasmiden (u. a. RP1, RP4, R18, R68), die in einer Vielzahl gram-negativer Bakterien replizieren können. Für die aus RK2 stammenden DNA-Abschnitte (b) 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.

TEM-1- β -Lactamasen sind in verschiedenen Enterobakterien, unter anderem in *E. coli*, weit verbreitet. Enterobacteriaceen sind Bestandteil der Darmflora von Tieren und Menschen. Hinweise auf eine toxische Wirkung des Enzyms liegen nicht vor. 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 β -Lactamase-Gens im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden die Explantate der verwendeten Kartoffelsorte Désirée mit Agrobakterien inokuliert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen binärer Vektorplasmide enthielten. Nach erfolgter Transformation wurden die regenerierten Kartoffelpflanzen auf Freiheit von Agrobakterien getestet. Nur Kartoffelpflanzen, die frei von Agrobakterien waren, wurden weiter verwendet.

Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. er ist nicht mehr zur Tumorentstehung

befähigt. In dem unwahrscheinlichen, aber theoretisch denkbaren Fall der Übertragung der eingeführten Fremdgene durch Agrobakterien, die aus den freigesetzten gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen stammen, in eine Zelle einer anderen Pflanze müßte diese Zelle spontan zu einer ganzen, fertilen Pflanze regenerieren, damit die Fremdgene in Keimzellen gelangen und so an die Nachkommen der Pflanze weitergegeben werden können. 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.