



Antrag 6786-01-0145

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Pappeln

(*Populus x canescens* (Aiton) Sm. = *Populus tremula* L. x *Populus alba* L. -

Graupappel) ggs11

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 28. April 2003

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 *gshI*-Gen

Das *gshI*-Gen aus *Escherichia coli* kodiert für eine γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS). γ -ECS ist an der Synthese von Glutathion (Glutamyl-Cysteinyl-Glycin, GSH) insofern wesentlich beteiligt, als es die Verknüpfung von Glutaminsäure und Cystein zu Glutamyl-Cystein unter Energieverbrauch spezifisch katalysiert. Weitere Substrate für γ -ECS sind nicht bekannt. In einem zweiten Schritt entsteht Glutathion, in dem Glycin mittels Glutathion-Synthetase an das Dipeptid gebunden wird.

In Pflanzenzellen erfüllt Glutathion mehrere Funktionen: Es schützt als Antioxidans Pflanzenzellen gegen Oxidationen, wirkt als Reserve für organischen Schwefel und trägt als Ausgangsstoff für Phytochelatine [(γ -Glutaminsäure-Cystein)_n-Glycin; n=2-11] zur Entgiftung von Xenobiotika und Schwermetallen bei. Hierzu werden über die Thiolgruppe der Cysteinreste der Phytochelatine feste Komplexe mit Metall-Ionen gebildet, die unter Verbrauch von ATP in die Vakuolen der Pflanzenzellen gepumpt und dort gelagert werden.

Für die Transformation der Graupappel wurde das Startcodon des nativen *gshI*-Gens aus *E. coli* im Konstrukt p70*gshI* von TTG zu ATG verändert. Dies führt zu einem Aminosäure-Austausch von Leucin zu Methionin. Die Expression des *gshI*-Gens erfolgt unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) mit verdoppelter *enhancer*-Region und vom 35S-Terminationssignal des CaMV. Mittels *Southern blot* wurde nachgewiesen, dass das *gshI*-Gen mit zwei Kopien in das Genom der Transformante ggs11 übertragen worden ist.

Untersuchungsergebnisse an der Transformante ggs11 zeigen, dass die Übertragung des *gshI*-Gens zu einer erhöhten Expression von aktiver γ -ECS im Cytosol führt und dass mehr Glutathion in dieser Pflanze als in Kontrollpflanzen gebildet wird. Der Gesamt-Proteingehalt in den untersuchten Blättern der transgenen Pflanze ist dagegen im Vergleich zum Wildtyp ebenso wenig erhöht wie die gemessene Aktivität der Glutathion-Reduktase. Phänotypische Unterschiede zwischen der gentechnisch veränderten Graupappel und dem Wildtyp wurden nicht beobachtet.

γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) wird in allen Pflanzen gefunden. Toxische Eigenschaften sind deshalb für dieses Enzym nicht zu erwarten.

Die vermehrte Bildung von Glutathion wird als Voraussetzung dafür angesehen, dass die Pflanze in Erfüllung der vorgesehenen Funktion Schwermetalle verstärkt aufnehmen kann. Die dazu notwendige Bildung von Phytochelatinen kann zu einer Veränderung der *source-sink*-Verteilung der einzelnen Bausteine (bes. Cystein und Glutaminsäure) führen. Dies zu überprüfen wird Aufgabe der Untersuchungen sein, die im Rahmen der Freisetzung durchgeführt werden sollen. Schädliche Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt sind daraus nicht abzuleiten.

Die ggs11-Pflanzen bilden im Stamm sowie in alten und jungen Blättern mehr Glutathion als der nicht transformierte Wildtyp. Für die Glutathion-Synthese in den Wurzeln der beiden Pflanzengruppen wurden keine Unterschiede gefunden. Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Aufnahme von Cadmium aus der Bodenlösung ergaben nur für junge Blätter von ggs11-Pflanzen einen gegenüber nicht transgenen Kontrollpflanzen signifikant höheren Cd-Gehalt. In Wurzeln, Stamm und alten Blättern sowie in den Gesamtpflanzen unterschieden sich die Cd-Konzentrationen zwischen den gentechnisch veränderten und den nicht gentechnisch veränderten Kontrollpflanzen nicht. Es ist bisher nicht bekannt, in welchem Umfang sich die transgenen Pflanzen hinsichtlich ihrer Eigenschaft, weitere Schadstoffe aus der

Bodenlösung aufzunehmen und in verschiedenen Pflanzenorganen zu lagern, von nicht transgenen Graupappeln und anderen Pflanzen unterscheiden, die in der Region der Freisetzungsf lächen wachsen. Diese Frage soll im Rahmen des Freisetzungsvorhabens untersucht werden.

(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 Pflanzen 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) 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 Sequenzen jenseits der Border wurde jedoch berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden.

Der verwendete Transformationsvektor p70gsh1 wurde aus pBIN19 entwickelt. Bestandteil des Rückgrats dieses Vektors ist u. a. das *nptIII*-Gen. Die gentechnisch veränderten Graupappel ggs11 wurde mittels PCR auf Anwesenheit eines Teils des *nptIII*-Gens untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass ggs11 kein vollständiges *nptIII*-Gen enthält.

Da keine weitere Analyse der in die Graupappeln integrierten Sequenzen durchgeführt wurde, wird der Risikoabschätzung zugrunde gelegt, dass der gesamte übrige Vektor integriert worden ist. Der Vektor pBIN19 enthält außerhalb der Borderregionen außer dem *nptIII*-Gen:

- (1) den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- (2) ein Fragment des *klaC*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- (3) das Transposon *IS1*, aus *Bacillus subtilis*;
- (4) das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- (5) das *tetA*-Gen des Plasmids pRK2 aus *E. coli*, unterbrochen durch die T-DNA;
- (6) den Replikationsursprung des Plasmids pUC (ColE1 *ori*) aus *E. coli*;
- (7) ein *traF*-Fragment, enthaltend den *oriT* des Plasmids RP4, aus *E. coli*.

(1) und (7): Der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 (1) bzw. der *oriT* (7) des Plasmids RP4 ermöglichen die Replikation des Plasmids in einem weiten Wirtsbereich gramnegativer Bakterien bzw. seinen konjugativen Transfer, sofern die Mobilisierungsfunktionen durch ein Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden.

(2), (3), (4), (5) und (6): Es gibt keine Hinweise dafür, dass *oriV* von RK2 bzw. *oriT* von RP4, der Replikationsursprung von ColE1 (6) oder die übrigen DNA-Abschnitte bakteriellen Ur-

sprungs (2, 3, 4, 5) in höheren Pflanzen eine Funktion hätten. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (2) bzw. unterbrochen (5).

(d) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

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

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation 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 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. Es ist nicht zu erwarten, dass Teile der gentechnisch veränderten Graupappeln zum menschlichen Verzehr verwendet werden. Des weiteren liegen aus den bisherigen Versuchen mit 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. Auf Grund seiner zentralen Funktion im Stoffwechsel ist auch für die γ -Glutamylcystein-Synthetase kein erhöhtes allergenes Potential zu erwarten. Die gentechnisch veränderten Bäume sollen im Verlauf des Freisetzungsvorhabens nicht zu Blüte gelangen.

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

Es ist vorgesehen, die gentechnisch veränderten Graupappeln zum Versuchsende aus dem Boden zu entfernen und zusammen mit dem während des Vorhabens angefallenen und gesammelten Laub in einer Verbrennungsanlage mit geeigneten Filtern zu verbrennen, sofern nicht Teile der Bäume für weitere Untersuchungen verwendet werden. Die Genehmigungsbehörde geht davon aus, dass dies umweltgerecht erfolgen wird.

Graupappeln sind zur Ausbildung von adventiven Sprossen an Wurzeln (Wurzelbrut, Wurzelschösslinge) fähig. Eventuell übrig bleibendes Material, das zum Wiederaustreiben befähigt ist, soll durch Herbizideinsatz inaktiviert werden. Die Freisetzungsf lächen sollen während

des Vorhabens auf das Auftreten von Wurzelbrut kontrolliert werden. Während zweier Jahre nach Versuchsende sollen die Felder kontrolliert und mit Herbizid behandelt werden, gegebenenfalls auftretende Wurzelschösslinge sollen mit Herbiziden abgetötet werden. In die Kontrolle während und im Anschluss an die Freisetzung ist eine 15 m breite Fläche um die Freisetzungsfelder herum einzubeziehen. Dadurch wird der Möglichkeit Rechnung getragen, dass sich das Wurzelsystem der Graupappeln im Verlauf der Freisetzung auch über die Freisetzungsfelder hinaus entwickeln kann und sich an diesen Wurzeln Wurzelschösslinge entwickeln könnten.

Die Antragstellerin berichtet, bei den bisher mit den vorliegenden gentechnisch veränderten Graupappeln durchgeführten Untersuchungen und Beobachtungen der morphologischen Eigenschaften der Pflanzen unter Gewächshausbedingungen sowie im Rahmen einer bereits laufenden Freisetzung im Freiland keine Unterschiede zwischen den transgenen und nicht transgenen Pflanzen gefunden zu haben. Hinweise auf eine erhöhte Vitalität und Fertilität der transgenen Graupappeln, die eine Überdauerung oder Verwilderung der gentechnisch veränderten Pflanzen begünstigen würden, liegen nicht vor. Eine Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen durch nach der Beendigung des Versuchs und den Nachkontrollmaßnahmen möglicherweise im Boden verbliebene Wurzelteile ist nicht zu erwarten. Demzufolge ist die Möglichkeit, dass gentechnisch veränderte Graupappeln im Freiland überdauern oder sich auf diesem Wege Pflanzen etablieren, äußerst gering.

Die übertragene gentechnische Veränderung verleiht den Pflanzen unter den zu erwartenden Schwermetallbelastungen der Freisetzungsorte grundsätzlich einen Selektionsvorteil. Unter Berücksichtigung der vorgesehenen Maßnahmen während (Dauer, Verhinderung der Blüte) und nach Beendigung des Vorhabens (Nachkontrolle) ist jedoch nicht zu erwarten, dass sich die gentechnisch veränderten Graupappeln an diesen Standorten etablieren können.

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

Graupappeln sind diözisch. Die für diese Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Pflanzen gehen auf den weiblichen Graupappelklon INRA 717 1-B4 zurück. Eine Pollenbildung und -abgabe kann deshalb ausgeschlossen werden. Pollen von *Populus*-Arten werden durch den Wind verbreitet. Einkreuzungen und Fruchtbildung an den gentechnisch veränderten Graupappeln könnten jedoch nicht ausgeschlossen werden, wenn die Pflanzen aus dem Versuch zum Blühen kämen.

Die gentechnisch veränderten Graupappeln für das Freisetzungsvorhaben werden nach Angaben der Antragstellerin seit Sommer 2002 vegetativ vermehrt. Zum Zeitpunkt der vorgesehenen Auspflanzung (Frühjahr 2003) werden sie einen Entwicklungsstand erreicht haben, der in etwa einjährigen Bäumen entspricht. Im allgemeinen erreichen die Graupappeln die generative Phase nach etwa sieben bis 15 Jahren, unter Stressbedingungen scheint auch eine frühere Blütenbildung möglich zu sein. Die übertragenen Eigenschaften geben keinen Anlass, eine wesentliche Verkürzung der Zeit bis zur Geschlechtsreife der transgenen Pflanzen zu erwarten.

Die Antragstellerin sieht vor, die Freisetzung nach drei Jahren, und somit rechtzeitig vor Erreichen der generativen Phase der Pflanzen, zu beenden. Darüber hinaus sieht die Antragstellerin vor, vor dem Laubausbruch im Frühjahr die Bäume auf die Ausbildung von Blüten-

knospen zu beobachten und eventuell auftretende Blütenknospen vor der Anthese zu entfernen, um jeglichen sexuellen Austausch mit Pflanzen der Umgebung zu verhindern. Entsprechende Maßnahmen sind auch Gegenstand der Regelungen der Nebenbestimmung II.6. dieses Bescheides.

Erfahrungen zeigen, dass die Ausbildung von Blütenknospen an Bäumen, die vor dem Laubausschlag blühen, vor der Blütenöffnung sicher erkannt werden kann. Die Übertragung genetischer Information von anderen Pflanzen auf die gentechnisch veränderten Graupapeln über Pollen ist deshalb nicht zu erwarten.

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 des Empfängerorganismus integriert. Beweise für eine unter natürlichen Bedingungen im Freiland stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und ihrer Expression in Mikroorganismen liegen nicht vor. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen jedoch folgern, dass auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, dass ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellen würde. Es ist das Ziel dieses Freisetzungsvorhabens, wissenschaftlich fundierte Daten zur Möglichkeit und ggf. zur Frequenz eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Graupappeln auf Bakterien und Mykorrhizapilze zu gewinnen.

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

(a) Das *gshI*-Gen

γ -Glutamylcystein-Synthetase (γ -ECS) wird in allen Pflanzen gefunden. Das in die transgene Pflanze ggs11 übertragene Gen stammt aus *E. coli*. Auch für dieses Gen ist also die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Organismen gegeben.

Die Freisetzungsflächen liegen auf Standorten, an denen über Jahrhunderte hinweg Metallgewinnung und -verarbeitung betrieben wurden. Die auf diesen Standorten lebenden Organismen haben sich unter dem bestehenden Selektionsdruck der Schadstoffbelastung etabliert. Selbst in dem äußerst unwahrscheinlichen Fall eines Transfers des *gshI*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen ist deshalb nicht zu erwarten, dass dies zu einem Selektionsvorteil führen würde.

(b) Das *nptII*-Gen

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 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 Graupappeln auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

(c) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in den Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Sequenzen nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus dem Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), einem pflanzeninfizierenden, doppelsträngigen DNA-Virus und aus dem ubiquitär verbreiteten Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*.

(d) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Durch Übertragung von außerhalb der Borderregionen gelegenen Sequenzen könnten folgende DNA-Abschnitte in die gentechnisch veränderten Pflanzen integriert worden sein:

- (1.) Teile des *nptIII*-Gens aus *Streptococcus faecalis* (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;
- (2.) der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- (3.) die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RP4;
- (4.) der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- (5.) ein nicht-funktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- (6.) das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- (7.) das Transposon IS1 aus *Bacillus subtilis*;
- (8.) der Replikationsursprung des Plasmids pUC (pMB1; ColE1 *ori*) aus *E. coli*.

Nach einer PCR-Untersuchung der Antragstellerin enthält die zur Freisetzung vorgesehene Linie ggs11 kein vollständiges *nptIII*-Gen. Das *nptIII*-Gen, das unter der Kontrolle seines eigenen Promotors steht, 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 auch die Anwesenheit eines vollständigen *nptIII*-Gens in den gentechnisch veränderten Graupappeln zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen würde.

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 (2 bis 6) 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 (5) bzw. unterbrochen (6).

Das Insertionselement IS1 (7) 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 wäre. Im Vergleich hierzu wäre eine theoretisch denkbare Ausbreitung über einen horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen vernachlässigbar gering.

Das pMB1-Replikon (8) 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 kleine sterile Stammstückchen der Graupappel mit Agrobakterien inkubiert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen des binären Plasmids enthielten. Nach erfolgter Transformation wurden die Pflanzenteile zur Eliminierung der Agrobakterien intensiv gewaschen, und es wurde eine Antibiotikabehandlung durchgeführt.

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

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

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

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

III.1.2.6. Schadstoffbelastetes Laub der transgenen Bäume

Auf Grundlage der vorhandenen Daten kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Blätter der transgenen Graupappeln einen gegenüber Kontrollpflanzen erhöhten Schadstoffgehalt aufweisen. Im Rahmen des Genehmigungsverfahrens waren deshalb die möglichen Folgen zu bewerten, die sich aus der Schadstoffakkumulation in den Blättern der transgenen Bäume ergeben könnten.

Das während der Freisetzung anfallende Laub soll zunächst auf den Freisetzungsfeldern gesammelt und am Ende des Vorhabens zusammen mit den gerodeten Bäumen entsorgt werden. Zwar sind in der Nebenbestimmung II.7. Maßnahmen festgelegt, die die Möglichkeit des Austrags von Pflanzenteilen, insbesondere Laub, der gentechnisch veränderten Graupappeln auf andere Flächen einschränken sollen. Dennoch ist es nicht völlig auszuschließen, dass während der Freisetzung Laub oder weitere Teile der transgenen Pflanzen von den Freisetzungsfeldern auf andere Flächen verbracht werden. Dieses Verbringen ist vor dem Hintergrund zu betrachten, dass die Region als Ergebnis der bereits seit langer Zeit während der Buntmetallverhüttung stark mit Schadstoffen belastet ist. Auch über Erosionsbewegungen (z. B. Wind, Wasser) können schadstoffbelastete Materialien (z. B. Erdboden) auf andere Flächen verbracht werden. Es kann deshalb auch aus der im Einzelfall möglichen Verbringung von Pflanzenteilen aus dem Freisetzungsvorhaben auf andere Flächen keine erhöhte Gefährdung der Schutzgüter des GenTG abgeleitet werden.

Es ist vorgesehen, den Boden unter der Stelle, an der das im Verlauf der Freisetzung gesammelte Laub gelagert werden soll, z. B. mit einer Folie abzudecken. Dadurch soll die Möglichkeit des Wiedereintrags von ggf. im Laub akkumulierten Schadstoffen in den Boden verringert werden. Dennoch ist davon auszugehen, dass Teile des gesammelten Pflanzenmaterials während der Lagerung verrotten. Als Folge der Verrottung können Stoffe, die zuvor von den Pflanzen aus der Bodenlösung aufgenommen worden waren, wieder in die Bodenlösung zurück gelangen, wo sie den chemischen und biologischen Prozessen des Standorts unterliegen. Schädliche Einwirkungen sind aus diesem Stoffkreislauf aus gentechnikrechtlicher Sicht nicht abzuleiten.