



Antrag 6786-01-0106

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) (Linien DARA5 und DARA12)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der
deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 23. Juli 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

Die gentechnisch veränderten Kartoffellinien DARA5 und DARA12 sind unter Verwendung des Vektors pMAB316::pTiB6S3-SE, einem sogenannten Cointegratvektor, transformiert worden. Cointegratvektoren wurden Anfang der 80er Jahre für die Transformation von Pflanzen entwickelt: Die Region der T-DNA des Ti-Plasmids, die die tumorinduzierenden Eigenschaften von *A. tumefaciens* vermittelt, wird durch eine bekannte Region ersetzt, die zur homologen Rekombination mit einem Intermediärvektor genutzt wird. Dadurch wird das Ti-Plasmid „entwaffnet“. Die im Intermediärvektor vorliegenden Zielsequenzen werden mittels homologer Rekombination in den Transformationsvektor und anschließend über *A. tumefaciens* in das Pflanzengenom übertragen. Die Struktur des Ti-Plasmids außerhalb der T-DNA blieb weitgehend unverändert.

Im vorliegenden Fall wurden beim Wildtyp Ti-Plasmid pTiB6S3 derjenige Teil der T_L-DNA, der für die Phytohormon-Synthese sowie die Octopinsynthese kodiert, sowie die rechte Borderregion und die gesamte T_R-DNA mittels doppelter homologer Rekombination durch ein Kanamycin-Resistenzgen aus dem Transposon Tn903 ersetzt. Es entstand der entwaffnete Vektor pTiB6S3-SE (*split end vector*).

Die für die Transformation notwendige rechte T-DNA-Borderregion wird nach Cointegration von einem Intermediärvektor, im vorliegenden Fall von pMAB316, zur Verfügung gestellt. Das Vektorrückgrat von pMAB316 besteht aus dem Replikationsursprung (*ori*) aus pBR322, aus der *left inside homology* (LIH) für die homologe Rekombination mit *Agrobacterium*-residenten Ti-Plasmiden, der rechten T-DNA-Bordersequenz sowie dem Nopalinsynthase-Gen des Ti-Plasmids pTiT37, dem Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzgen aus dem Transposon Tn7 und dem *nptII*-Gen des Transposons Tn5 unter der Kontrolle der *nos*-Regulationselemente. Als Zielgen wurde in pMAB316 die Sequenz des Phytochrom B-Gens aus *A. thaliana* zwischen den 35S-Promotor und das *nos*-Terminationssignal des pMON316 kloniert. Bedingt durch die Cointegratbildung befindet sich der gesamte Klonierungsvektor mit Ausnahme des Replikationsursprungs innerhalb der T-DNA.

(a) Das *phyB*-Gen für Phytochrom B

Das *phyB*-Gen aus *Arabidopsis thaliana* kodiert für einen Photorezeptor, der durch Absorption von Licht der Wellenlänge 660 nm in seine physiologisch aktive Form übergeht, in der er eine Reihe phänotypischer Veränderungen auslöst. Als Folge der gentechnischen Veränderung kommt es in den transgenen Pflanzen zu einer Steigerung der Anthocyan- und Chlorophyllsynthese und zu einer Erhöhung der Rate der Photosynthese. Des Weiteren sind eine Reihe von morphologischen und physiologischen Änderungen an Pflanzen der Linien DA-

RA5 und DAR12 beobachtet worden wie: reduzierte Apikaldominanz, kürzere Internodien, Zwergwachstum, verzögerte Seneszenz, dickere Stengel, Stärkeeinlagerungen und erhöhtes spezifisches Gewicht in Stengel und Blättern, kleinere Blätter, Streckung der Zellen des Palisadenparenchyms, vermehrte Wurzelbildung, erhöhte Anzahl Knollen, erhöhter Knollenertrag. In den gentechnisch veränderten Kartoffeln wird das übertragene Phytochrom B-Gen aus *A. thaliana* unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors konstitutiv exprimiert. Aufgrund der komplexen Wirkungsweise des Phytochrom-Systems ist bei der erhöhten Expression von Phytochrom B mit Auswirkungen auf den Sekundärmetabolismus zu rechnen, wie durch die erhöhten Anthocyan- (Phenolstoffwechsel) und Chlorophyllgehalte (Isoprenoidstoffwechsel) belegt wurde.

(b) Das *nptII*-Gen

Das *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase und wurde unter der Kontrolle eukaryotischer Regulationssequenzen als Markergen zur Selektion transformierter Kartoffelzellen eingeführt. Bei der Entwicklung des Transformationsvektors wurde ein *nptII*-Gen unter der Kontrolle prokaryotischer Regulationssequenzen verwendet.

Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), die die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-OH-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika katalysiert, wodurch diese inaktiviert werden. Das Enzym zeichnet sich durch 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 dieser 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) Weitere innerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

- Das Nopalinsynthase-Gen (*nos*-Gen)

Die T-DNA des Cointegratvektors pMAB316::pTiB6S3-SE enthält nahe der rechten Border das *nos*-Gen aus *A. tumefaciens* für die Nopalinsynthase. Nopalin ist ein nicht toxisches Aminosäurekonjugat (aus α -Ketoglutarat und Arginin oder Ornithin), das in pflanzlichen Tu-

morzellen Agrobakterien als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle dient. Es wird auch in Wurzelhalsgallen an Pflanzen gebildet, die von phytopathogenen Wildtyp-Agrobakterien des Nopalintyps befallen wurden. Der Nachweis der Nopalinsynthase-Aktivität kann dazu verwendet werden, die Insertion der T-DNA in transformierten Zellen zu verifizieren.

- Das Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzgen

Innerhalb der T-DNA-Borderregionen enthält pMAB316::pTiB6S3-SE das bakterielle Gen *aadA* (Enzym: Aminoglycosid-3-Adenyltransferase (AAD(3′)(9)) für eine Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz.

Die Aminoglycosid-3-Adenyltransferase (AAD(3′)(9)) katalysiert die Adenylierung der 3′-OH-Gruppe des N-Methyl-L-Glucosamin-Ringes von Streptomycin bzw. der 9-Hydroxygruppe von Spectinomycin, wodurch diese inaktiviert werden. Das Enzym zeichnet sich durch hohe Substratspezifität aus. Zu den Substraten des AAD(3′)(9)-Enzyms zählen Streptomycin und Spectinomycin. In der Humanmedizin findet Streptomycin nur noch in Spezialindikationen Anwendung (z.B. Tuberkulose). Da das *aadA*-Gen unter der Kontrolle seines eigenen, prokaryotischen Promotors steht, ist nicht davon auszugehen, daß es in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen exprimiert wird.

- Die Transkripte 5 und 7 der LIH

Die LIH (*left inside homology*) der T-DNA des Plasmides pTiA6 aus *A. tumefaciens* umfaßt 1,8 kb und ist sequenziert. Sie bietet die für die Bildung des Cointegrats aus pTiB6S3-SE und dem Intermediärvektor pMAB316 mittels homologer Rekombination notwendige homologe Region. Des weiteren werden von diesem Fragment die Transkripte 5 und 7 kodiert, deren Funktion unbekannt ist. Als Bestandteil der T-DNA von Wildtyp-Ti-Plasmiden sind die Transkripte der beiden übertragenen Gene an der Bildung von Wurzelhalsgallen an Agrobakterien-befallenen Pflanzen beteiligt. An den gentechnisch veränderten Kartoffeln wurden weder im Gewächshaus noch im Rahmen bereits mit diesen Pflanzen durchgeführten Untersuchungen im Freiland Wurzelhalsgallen beobachtet.

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

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Borderregionen wurde jedoch im Einzelfall berichtet. Da keine genaue Analyse der in die Kartoffelpflanzen integrierten Sequenzen durchgeführt worden ist, wird der Bewertung zugrunde gelegt, daß der gesamte Vektor integriert worden ist.

Im wesentlichen liegen auf einem Ti-Plasmid folgende Abschnitte außerhalb der T-DNA-Borderregionen: der Replikationsursprung für die Replikation in *Agrobacterium*, die Virulenz-

Region mit den *vir*-Genen – sie kodieren die für den Transfer der T-DNA aus dem Plasmid in das Pflanzengenom notwendigen Proteine -, eine Region für die Konjugationsfunktionen sowie die genetischen Informationen, die für den Opine-Katabolismus notwendig sind. Im vorliegenden Fall befinden sich aus der LIH-Region noch zusätzlich der bakterielle Replikationsursprung ColE1 (*ori*) aus pBR322 sowie ein *nptII*-Gen unter der Kontrolle prokaryotischer Regulationssequenzen (vergl. III.1.2.1. (b)) in diesem Bereich. Der bakterielle Replikationsursprung hat in Pflanzen keine Funktion.

Aus der Verwendung dieses Plasmids sind Auswirkungen auf gentechnisch veränderte Pflanzen unter Freilandbedingungen, welche auf mögliche Gefahren gemäß § 1 Ziffer 1 GenTG hinweisen würden, nicht bekannt.

(e) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die linke Borderregion stammt aus dem Plasmid pTiB6S3, die rechte Borderregion aus der T_L-DNA des Plasmids pTiT37, beide aus *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirkten, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des Helferplasmids, das in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamms vorhanden ist und 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:

- den 35S-Promotor und das 35S-Terminatorssignal des Cauliflower mosaic virus (CaMV),
- den Promotor und das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens aus *A. tumefaciens*,
- prokaryotische Regulationselemente des *aadA*- und des *nptII*-Gens,
- die Regulationselemente der Transkripte 5 und 7 aus *A. tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssignale regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden genetischen Elemente in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) bis (c).

(f) Positioneffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Insertionsort im Chromosom bzw. von der Umgebung des Insertionsorts („Positionseffekt“). Unter Freilandbedingungen kann die Expressi-

onsstärke zudem durch Umwelteinflüsse, z. B. durch die Temperatur, beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall könnte dies dazu führen, daß die Eigenschaften in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeneigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen wurden jedoch keine Beobachtungen gemacht, die Anlaß geben, schädliche Einwirkungen auf die Rechtsgüter des GenTG zu erwarten.

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 sowie aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht-gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

Pollen von Kartoffelpflanzen wird ohnehin nur in geringem Umfang durch den Wind verbreitet und spielt als Auslöser von Pollenallergien generell keine nennenswerte Rolle.

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

Die Kartoffel befindet sich in Mitteleuropa seit über 200 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 Ru-

derallflächen. Da Kartoffeln nicht frostresistent sind, kommt es auch an solchen Standorten nicht zu einer dauerhaften Ansiedlung. Infolge des Kartoffelanbaus können auf landwirtschaftlich genutzten Flächen in Abhängigkeit von der Höhe der Wintertemperaturen in der folgenden Kultur "Durchwuchskartoffeln" auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen hervorgegangen sind.

Es ist vorgesehen, die Knollen zu ernten und zu analysieren oder zur Wiederauspflanzung im Folgejahr aufzubewahren. Übrig gebliebene Knollen sollen, z. B. durch Schreddern, inaktiviert und anschließend kompostiert werden. Die auf dem Feld verbleibenden transgenen Pflanzenreste sollen zur Verrottung liegen bleiben. In den zwei Vegetationsperioden nach Abschluß der Experimente soll eine Pflanzenspezies angebaut werden, die Nachkontrolle der Fläche und die Bekämpfung eventuell auflaufender Kartoffelpflanzen erlaubt, Kartoffeln sollen während der zweijährigen Nachkontrolle nicht angebaut werden. Durchwuchskartoffeln sollen während dieser Zeit 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 ca. 15 cm tief aufzulockern. Dabei gefundene Knollen sind zu inaktivieren.

Kartoffelpflanzen können blühen und Samen bilden. Es ist denkbar, daß die gentechnisch veränderten Kartoffeln durch Eintrag von fremden Kartoffelpollen befruchtet werden können, so daß eine Entstehung von Samen nicht vollständig auszuschließen, jedoch wenig wahrscheinlich ist. Daß unter den mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen überwintern, und daß daraus Pflanzen aufwachsen, ist nicht wahrscheinlich. Die Antragstellerin sieht vor, die Kartoffelpflanzen vor dem Abreifen mit dem Krautschläger oder chemisch abzutöten. Diese Maßnahme vermindert die Möglichkeit der Ausbildung reifer Samen.

Sollten 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. Zu einer Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderung liegen zwar keine Hinweise vor. Außerdem wird dieser Möglichkeit durch die vorgesehene Anbaupause von zwei Jahren und durch die durchzuführende Nachkontrolle ausreichend vorgebeugt. Ein Auffinden von Durchwuchskartoffeln wird dadurch ohne Probleme möglich.

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

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

Versuche zur Kreuzung von Kartoffeln mit in Mitteleuropa vorkommenden Solanaceen waren erfolglos. Unter Freilandbedingungen fand keine Einkreuzung von gentechnisch veränderten Kartoffeln in *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) statt. Auch nach künstlicher Pollenübertragung auf *S. nigrum* wurden keine lebensfähigen Samen erhalten. Eine Regeneration einiger Hybriden, die sich allerdings als steril erwiesen, war nur mit Hilfe artifizierlicher Methoden ("embryo rescue") unter Bedingungen möglich, die in der Natur nicht auftreten. Kartoffeln und *S. 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 20 m zwischen dem Freisetzungsvorhaben und nächsten Kartoffelanbauten 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 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 Bedin-

gungen lassen jedoch folgern, daß auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, daß ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellen würde.

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

Die eingeführten Gene einschließlich der Regulationssequenzen stammen aus *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, dem cauliflower mosaic virus bzw. *Agrobacterium tumefaciens*, 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.

(a) Das Phytochrom B-Gen

Das Gen für Phytochrom B stammt aus *A. thaliana*. Das Phytochrom B-Gen kommt in den nicht modifizierten Pflanzen und in der Umwelt ohnehin vor und dient hier nur der Überexpression. Es könnte also auch durch horizontalen Gentransfer aus nicht gentechnisch veränderten Organismen in Mikroorganismen der Umwelt gelangen.

(b) Das Kanamycin-Resistenzgen

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 *npII*-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.

(c) Das Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzgen

Die Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung kommt bei Bodenmikroorganismen natürlicherweise vor. Auch Bakterien mit einer Resistenz gegenüber Streptomycin sind in der Umwelt verbreitet. Eine Resistenz gegenüber diesen Antibiotika kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten. Selbst im Falle eines Transfers der genannten Resistenzgene von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde sich die Gesamtfrequenz dieser Resistenzen in der Umwelt wahrscheinlich nicht erkennbar erhöhen.

(d) Regulationssequenzen

Die zur Regulation der übertragenen Gene in die Kartoffeln eingeführten Sequenzen stammen aus Mikroorganismen wie *A. tumefaciens*, *E. coli* 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. Gleiches gilt für *E. coli*, das als natürlicher Bestandteil der Darmflora des Menschen ebenfalls weit verbreitet ist. 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.

(e) Außerhalb der Borderregionen liegende Sequenzen

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

- (i) das *nptII*-Gen (siehe oben)
- (ii) der Replikationsursprung des Plasmids pBR322 aus pMB1
- (iii) das "entwaffnete" Ti-Plasmid pTiB6S3-SE

pBR322 ist Prototyp für in der Gentechnik häufig verwendete Sicherheitsvektoren. Sein aus pMB1 stammendes Replikon (ii) gehört zum Typ der ColE1-Plasmide, die einen auf einige Gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich haben. Im Wesentlichen kann das Replikon in *Escherichia coli* und nahe verwandten Bakterienspezies, wie z.B. *Serratia* oder *Salmonella*, replizieren. In den meisten Gram-negativen Bodenbakterien erfolgt keine Replikati-

on. 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.

Das Ti-Plasmid pTiB6S3-SE ist - im wesentlichen durch Deletionen - konstruiert worden aus dem Wildtyp-Octopin-Plasmid pTiB6S3, welches in Agrobakterien weit verbreitet ist.

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

Nach erfolgter Transformation wurden alle Sterilkulturpflanzen vor dem Ausbringen zur Knollengewinnung 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 *Agrobacterium 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 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 (*Agrobacterium 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.