



Antrag 6786-01-0049

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) (Dst9-3, Dst9-6, Dst22-6, Dst23-1, Dst23-15, Dst23-17, Dst65-24; Dst4-2, Dst4-5, Dst4-8, Dst4-9, Dst4-12, Dst4-14, Dst4-15, Dst4-17) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 30. Mai 1996

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 *barnase*-Gen und das *barstar*-Gen aus *Bacillus amyloliquefaciens*

Die in den unter I.1.1 Nr. I) genannten gentechnisch veränderten Kartoffelklone enthalten das *barnase*-Gen, das unter der Kontrolle des *prp1-1*-Promotors aus der Kartoffel und der Terminatorregion des Nopalin-Synthase-Gens aus *A.tumefaciens* steht. Das *barnase*-Gen enthält N-terminal eine Signalsequenz des alkalischen Phosphatase-Gens aus *Escherichia coli*. Weiterhin liegt in den gentechnisch veränderten Kartoffeln das *barstar*-Gen unter Kontrolle des 35S Promotors des Cauliflower mosaic virus (CaMV) und der nicht kodierenden 3'-Region des Gens für das Transkript 7 der T-DNA aus *A. tumefaciens* vor.

Das *barnase*-Gen kodiert für die Ribonuklease Barnase; das Genprodukt des *barstar*-Gens ist ein spezifisches Inhibitorprotein für die Barnase, das mit diesem Protein einen 1:1 Komplex bildet.

Die Kartoffelklone entstanden durch Transformation mit den binären Vektoren (pTCV15, pTCV17), bei denen die Länge des *prp1-1*-Promotors vor dem *barnase*-Gen unterschiedlich groß ist (432 bp bei pTCV15 bzw. 273 bp bei pTCV17). Bei dem *prp1-1*-Promotor handelt es sich um einen selektiv durch verschiedene Pathogene, wie z.B. Pilze, einige Viren (PVY, PLRV) oder Nematoden, induzierbaren Promotor, der aber nicht auf abiotische Stimuli wie Verwundung, Hitzeschock oder Licht-Dunkelheit-Veränderungen reagiert.

Bei Infektion einer gentechnisch veränderten Kartoffel mit einem pilzlichen Pathogen, z.B. *Phytophthora infestans*, kommt es zur lokalen Induktion des *barnase*-Gens in den infizierten Zellen. Das *barnase*-Gen kodiert für die Ribonuklease Barnase, die zum Tod der befallenen Zellen führt. Durch den Zelltod soll die Ausbreitung des pilzlichen Pathogens inhibiert werden. Da der *prp1-1*-Promotor auch ohne Infektion in einigen Geweben eine schwache konstitutive Expression des *barnase*-Gens zeigt, wurde zusätzlich das *barstar*-Gen unter Kontrolle des konstitutiven CaMV-Promotors in die gentechnisch veränderten Pflanzen eingeführt. Das *barstar*-Gen kodiert für den Barnase-spezifischen Inhibitor Barstar, der bei schwacher Expression des *barnase*-Gens den Zelltod verhindert.

Von der Expression beider Gene in den Kartoffelpflanzen ist keine schädigende Wirkung zu erwarten, da Ribonukleasen mit einer vergleichbaren Aktivität wie die Barnase natürlicherweise in Pflanzen enthalten sind. Aufgrund der hohen Spezifität des Inhibitors Barstar für die Barnase ist nicht zu erwarten, daß er auch pflanzliche oder tierische Ribonukleasen hemmen kann.

b) Das GUS-Gen (*uidA*-Gen) aus *E.coli*

Das GUS-Gen, das in den unter I.1.1. Nr. II) genannten gentechnisch veränderten Kartoffelklonen enthalten ist, steht unter der Kontrolle des *prp1-1*-Promotors der Kartoffel und der Nopalinsynthase-Terminationsregion von *Agrobacterium*.

Das GUS-Gen ist ein Reporter-gen und ermöglicht mittels eines enzymatischen Tests, die Expression des *prp1-1*-Promotors in verschiedenen Geweben der gentechnisch veränderten Kartoffeln zu untersuchen. Das Enzym β -Glucuronidase spaltet Glucuronide und wird in Geweben von Vertebraten und Invertebraten und auch in Bakterien gefunden, nicht jedoch in pflanzlichen Geweben. Nach der Zugabe eines entsprechenden Substrates kann die En-

zymaktivität im Gewebe photometrisch nachgewiesen werden. Es ist nicht zu erwarten, daß Pflanzen durch die Expression des GUS-Gens einen Selektionsvorteil erhalten.

c) Das *nptII*-Gen

In alle gentechnisch veränderten Kartoffelklone wurde das *nptII*-Gen unter Kontrolle des Noplin synthase-Promotors und des Terminators des Octopinsynthase-Gens eingeführt. Das *nptII*-Gen diente 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) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

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

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten ins Genom integriert folgende Regulationssequenzen:

- den 35S-Promotor des Cauliflower mosaic virus (CaMV),
- die Promotorregion des *prp1-1*-Gens aus *Solanum tuberosum*,
- den Promotor des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- die Terminatorregion des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- die Terminatorregion des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- die Terminatorregion des Gens für das Transkript 7 der T-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden Gene; dies sind das *barnase*-Gen, das *barstar*-Gen, das GUS-Gen und das *nptII*-Gen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.a) bis c).

e) 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 im Einzelfall berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden.

Nach den dem Antrag zu entnehmenden Informationen könnten im vorliegenden Fall durch Integration von außerhalb der Borderregionen gelegenen DNA-Abschnitten folgende funktionale Einheiten in die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen übertragen worden sein: (i) ein Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzgen zur Selektion in Bakterien, (ii) der Replikationsursprung des Vektors pBR322, (iii) der Replikationsursprung des Pseudomonas-Plasmid pVS1, sowie (iv) bei den Vektoren pTCV15 und pTCV17 eine zweite Kopie des *barstar*-Gens mit regulatorischen Elementen zur Expression in *E.coli*.

(i) Da das Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzgen von einem Plasmid aus gramnegativen Bakterien stammt und unter Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht, ist nicht davon auszugehen, daß es in den Pflanzen exprimiert wird. Eine Auswirkung des Gens auf den pflanzlichen Stoffwechsel ist daher nicht zu erwarten.

(ii) und (iii) Die Replikationsursprünge von pBR322 und pVS1 ermöglichen die Replikation der Ausgangsvektoren pTCV1, pTCV15 und pTCV17 in einem weiten Wirtsbereich gramnegativer Bakterien. Die Vektoren sind nur bei Vorliegen geeigneter Helferplasmide zwischen Bakterien mobilisierbar; es gibt keine Hinweise dafür, daß die Replikationsursprünge in Pflanzen eine Funktion haben.

(iv) Eine zweite Kopie des *barstar*-Gens wurde bei den Vektoren pTCV15 und pTCV17 in die kodierende Region des Ampicillin-Resistenzgen von pBR322 inseriert. Es steht unter Kontrolle von Expressionssignalen für *E. coli*, um eine Inhibierung der Ribonuklease Barnase bei der Replikation in Bakterien sicherzustellen. Das Ampicillin-Resistenzgen ist durch die Insertion inaktiviert. Eine Expression des *barstar*-Gens in Pflanzen ist von diesem Konstrukt nicht zu erwarten

f) 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 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 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 keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität dieser Pflanzen vor.

Die Kartoffelsorte „Bintje“ ist unter normalen Kulturbedingungen im Gewächshaus und im Freiland männlich steril, so daß Pollen als potentieller Auslöser von Pollenallergien keine Rolle spielt. Generell spielt Kartoffelpollen keine nennenswerte Rolle als Allergen.

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 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, 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 in der folgenden Kultur "Durchwuchskartoffeln" auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen hervorgegangen sind. Da Kartoffelknollen frostempfindlich sind, wird ihre Überdauerung daher in erster Linie durch die Wintertemperaturen beeinflusst.

Es ist vorgesehen, die Knollen der gentechnisch veränderten Kartoffeln manuell zu ernten und nach Bonitur durch Autoklavieren zu inaktivieren, sofern sie nicht für weitere wissenschaftliche Untersuchungszwecke benötigt werden.

Das Kartoffelkraut soll zur Verrottung auf den Freisetzungsf lächen liegen bleiben. Nach der Ernte soll lediglich flach geeggt werden, um die Flächen einzuebnen. In den Vegetationsperioden der beiden folgenden Jahre ist entweder eine Brache vorgesehen, oder es sollen Pflanzen angebaut werden, die eine Nachkontrolle auf eventuell auflaufende Kartoffelpflan-

zen erlauben. Während der zweijährigen Anbaupause ist ein eventueller Aufwuchs von Kartoffeln zu beseitigen.

Die Wahrscheinlichkeit einer Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen durch nach der Ernte möglicherweise im Boden verbliebene Knollen wird durch die Maßnahmen gemäß der Nebenbestimmung II.8. minimiert. Um restliche im Boden verbliebene Knollen zu beseitigen, ist die Versuchsfläche im Anschluß an die Knollenernte sowie im Frühjahr des folgenden Jahres jeweils ca. 15 bis 20 cm tief aufzulockern. Dabei gefundene Knollen sind zu entsorgen.

Pflanzen der Kartoffelsorte „Bintje“ sind männlich steril. Da bei Kartoffeln in erster Linie Selbstbefruchtung stattfindet, bildet die Sorte „Bintje“ unter normalen Kulturbedingungen im Freiland und im Gewächshaus keine Beeren und damit auch keine Samen. Es wäre jedoch denkbar, daß die gentechnisch veränderten Kartoffeln durch Eintrag von fremden Kartoffelpollen befruchtet werden könnten, so daß eine Entstehung von Samen nicht vollständig auszuschließen, jedoch wenig wahrscheinlich ist.

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. Eine mögliche Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderung ist nicht wahrscheinlich. Während der Nachkontrolle 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 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

Grundsätzlich ist die Möglichkeit einer Übertragung genetischen Materials durch Pollen auf andere Pflanzen bei Kartoffeln sehr eingeschränkt. Kreuzungsversuche von Kartoffeln mit in Mitteleuropa vorkommenden verwandten Wildpflanzen (*Solanum nigrum*, *Solanum dulcamara*) waren erfolglos. Eine erfolgreiche Pollenübertragung könnte nur auf andere Kartoffelpflanzen stattfinden, wobei die Wahrscheinlichkeit, daß aus Samen Kartoffelpflanzen aufwachsen würden, gering ist. Im Rahmen einer Fruchtfolge würden solche Pflanzen durch die üblichen anbautechnischen Maßnahmen eliminiert. Pflanzgut für den landwirtschaftlichen Anbau von Kartoffeln wird vegetativ vermehrt, d.h. nicht über Samen.

Bei der Kartoffelsorte „Bintje“ ist nicht von einer Möglichkeit einer Übertragung eingeführter Gene durch Pollen auf andere Kartoffeln auszugehen, da die Sorte unter normalen Kulturbedingungen im Gewächshaus und im Freiland männlich steril ist, d.h. es tritt keine Pollenbildung auf. Histologische Untersuchungen an Pollensäcken zeigen, daß bei „Bintje“ keine intakten, lebensfähigen Pollen gebildet werden. Aus diesem Grund ist ein Isolationsabstand zu benachbarten Kartoffelfeldern nicht notwendig. Der von der Antragstellerin vorgesehene Überwachungstreifen von 3 Metern um die Versuchsfläche wird als ausreichend erachtet, um auch einem eventuellen Auflaufen gentechnisch veränderter Kartoffeln auf angrenzenden

Flächen durch eventuelle Ungenauigkeiten beim Legen, bei der Pflege oder Ernte Rechnung zu tragen.

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.

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.

Das *barnase*-Gen und das *barstar*-Gen stammen aus dem ubiquitär verbreiteten Mikroorganismus *Bacillus amyloliquefaciens*. Diese Gene könnten also auch - mit weit höherer Wahrscheinlichkeit - durch horizontalen Gentransfer aus diesem nicht gentechnisch veränderten Organismus in andere Mikroorganismen der Umwelt gelangen. Das GUS-Gen kodiert für eine Glucuronidase, die bei Pflanzen nicht vorkommt. Glucuronidasen sind jedoch bei Mikroorganismen verbreitet, so daß auch hier - selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers - keine erkennbare Erhöhung der Gesamtfrequenz resultieren würde.

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 *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.

Auch bei einer Übertragung der sonstigen in den Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Sequenzen nicht zu befürchten. Der Promotor *prp1-1* 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.

Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthalten möglicherweise auch Nucleinsäureabschnitte, die aus den Regionen der binären Plasmide außerhalb der T-DNA stammen (s.III.1.2.1.e). Für die Replikationsursprünge der Plasmide pBR322 und pVS1 ist anzumerken, daß diese in gramnegativen Bakterien vorkommen. Für diese Nucleinsäureabschnitte ist somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weit aus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen.

Dieselbe Bewertung gilt für das Spectinomycin/Streptomycin-Resistenzgen, das ursprünglich aus einem gramnegativen Plasmid der P-Inkompatibilitätsgruppe stammt. Das β -Lactamase-Gen, das durch die Insertion einer zweiten Kopie des *barstar*-Gens inaktiviert ist, kommt in einer Reihe von Enterobacteriaceen sowie in einigen weiteren gramnegativen Bakterien vor. Eine nennenswerte Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus in der Umwelt wäre auch dann nicht anzuehmen, wenn es in intakter Form vorliegen würde.

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 binärer Vektorplasmide enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Um nachzuweisen, daß das Vermehrungsmaterial der freizusetzenden Pflanzen frei von Agrobakterien ist, wurden Gewebekomponenten auf geeigneten Kulturmedien ausgestrichen. Dabei wurden keine Agrobakterien festgestellt.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß die freizusetzenden Pflanzen sehr geringe Mengen der zur Transformation eingesetzten Agrobakterien enthalten könnten. Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *Agrobacterium 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 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 (*Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium 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-*Agrobacterium tumefaciens* bzw. *Agrobacterium 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.