



Bescheid 6786-01-0100 / 42010.0100

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Weinreben
(*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) pGJ40 und pGJ42
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde
Berlin, den 15. Juni 1999**

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 Weinreben

(a) Das Chitinase-Gen *chi26* aus *Hordeum vulgare*

Chitinasen katalysieren die Hydrolyse von Chitin, einem linearen Homopolymer von β -1.4 glycosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin-Resten. Zusammen mit Glucanasen sind sie vor allem als PR-Protein (von *pathogenesis related*) Bestandteil eines komplexen Abwehrsystems, mit dem sich Pflanzen bei Schaderregerbefall schützen. Chitinasen sind in vielen

Pflanzenarten, darunter Wein, und in allen Pflanzenteilen, auch in Weinbeeren, nachgewiesen worden.

Chitinasen werden auf Grund ihrer Primärstruktur in fünf Klassen gruppiert, *chi26* wird der Klasse II zugeordnet. Als Substrat setzen sie vor allem Chitin um, das von Pflanzen jedoch nicht gebildet wird. Außerdem wird die Hydrolyse bakterieller Lipo-Oligosaccharide diskutiert. Auch diese Funktion scheint im Zusammenhang mit Abwehrreaktionen der Pflanze zu stehen.

Chitin ist Bestandteil pilzlicher Zellwände und des Exoskeletts z. B. von Insekten. Ein allgemein akzeptiertes Modell zur Bildung pilzlicher Zellwände besagt, daß Pilzhyphen in einem turgor-deformierbaren, plastischen Apex Chitin (Poly-N-actyl-D-glucosamin) und β -1,3-Glucan synthetisieren und diese in einem kontinuierlichen Prozeß in die Apexspitze eingelagert werden. Diese primären Homopolymeren bilden sich in einem Zeitraum von wenigen Minuten unter Kristallisation des Chitins und Ausbildung von Mikrofibrillen, Beta 1,6-Verzweigungen und Tripelhelix-Bildung des Glucans, kovalenter Vernetzung beider Polymere, Modifikationen (z.B. Deacylierungen) und Protein-Einlagerung zu einem turgor-resistenten, rigiden Tubus um. Der ganze Vorgang ist so gesteuert, daß ein Fließgleichgewicht zwischen Apex und Tubus besteht, das die für Substratmoleküle und Enzyme offene Wachstumsspitze aufrechterhält.

Nur das unverzweigte und homopolymere Chitin in der Apexspitze ist offenbar für Chitinasen zugänglich und hydrolysierbar. Im Zusammenspiel mit der unten beschriebenen β -1,3-Glucanase wird damit der Aufbau der Zellwand gestört, was unter Turgor zum Zerplatzen des Apex führen kann. Es ist deshalb zu erwarten, daß die Spezifität der pflanzlichen Chitinase für die unmodifizierte wachsende Primärkette des Chitins so groß ist, daß fertige Elemente von Exo- oder Endocuticula von Insekten nicht zugänglich sind. Versuche, Insektenresistenz mithilfe von gentechnisch inserierten Chitinasen zu erzeugen, schlugen fehl, wenn die Chitinase pflanzlichen Ursprungs war, und gelangen nur mit Chitinasen aus Insekten.

(b) Das Glucanase-Gen *glu32* aus *H. vulgare*

Das Gen *glu32* kodiert für eine β -1,3-Glucanase. β -1,3-Glucanasen katalysieren die Hydrolyse von β -1,3-Glucan, einem linearen Homopolymer von β -1,3 glycosidisch verknüpften Glucoseresten. Zusammen mit Chitinasen ist die β -1,3-Glucanase Bestandteil des o. g. komplexen Abwehrsystems, mit dem sich Pflanzen bei Schaderregerbefall schützen. Auch Glucanasen sind in vielen Pflanzenarten, darunter Wein, und in allen Pflanzenteilen, darunter Weinbeeren, nachgewiesen worden.

β -1,3-Glucan ist Bestandteil pilzlicher Zellwände; unter der Bezeichnung Kallose dient es in Pflanzen als Abdichtungsmaterial nach Gewebsverletzungen. Bei Pilzen ist offenbar nur das unverzweigte und homopolymere β -1,3-Glucan in der Apexspitze für β -1,3-Glucanasen zugänglich und hydrolysierbar. Im Zusammenspiel mit der oben beschriebenen Chitinase wird der Aufbau der Zellwand gestört, was unter Turgor zum Zerplatzen des Apex führen kann. Das ebenfalls in Pflanzen gebildete β -1,3-1,4-Glucan ist Bestandteil pflanzlicher Zellwände und wird von β -1,3-Glucanasen nicht umgesetzt.

(c) Das Gen für ein Ribosomen-inaktivierendes Protein (RIP) aus *H. vulgare*

Das Ribosomen-inaktivierende Protein RIP aus *H. vulgare* gehört unter dem Namen „barley toxin“ zu einer Reihe von Substanzen, die in Pflanzen weit verbreitet sind und zur Pathogen-

abwehr fremde Ribosomen durch Modifikation einer hoch konservierten Region der großen rRNA der großen Untereinheit inaktivieren. Eigene Ribosomen bleiben intakt, die Sensitivität steigt mit dem evolutionären Abstand und ist bei Pilzen am höchsten. Die Unterschiede werden auf die ribosomalen Proteine zurückgeführt. Es werden zwei Typen unterschieden: Barley toxin gehört wie alle RIP aus Getreide zum Typ I. Es ist eine RNA N-Glycosidase und besteht aus einer Kette mit einem Molekulargewicht von etwa 30 KD. Es depurinisiert *in vitro* die 28S rRNA der 60S-Untereinheit von Rattenleber-Ribosomen in der Sequenz 5'-AGUACGAGAGGA-3' an der Position A4324. Diese Modifikation hemmt die Bindung des Elongationsfaktors EF-2 und damit die Translokation der entstehenden Kette. Pilz-Ribosomen sind in diesem System 10 mal sensitiver als Säuger-Ribosomen.

In Gerste werden CHI26 und RIP30 in der späten Samenentwicklung in der Aleuronschicht in großer Menge gespeichert. Das Glucanase-Gen, *glu32*, wird während der Samenentwicklung in geringer und während der Keimung in etwas größerer Menge in der Aleuronschicht und im Keimling der Gerste exprimiert. Es ist nicht bekannt, daß z. B. vorratschädigende Insekten beim Verzehr Schaden nehmen. Auch aus der langen Erfahrung, die im Umgang mit Getreidesamen in jeder Darreichungsform als Bestandteil menschlicher und tierischer Ernährung gewonnen wurden, liegen keine Hinweise auf schädliche Einwirkungen vor. Sollten Produkte der Transgene in Beeren, Most oder Wein vorkommen, ist nach allen vorliegenden Kenntnissen zu erwarten, daß sie im Verdauungsprozeß von Mensch und Tier degradiert werden.

In den gentechnisch veränderten Weinreben werden die übertragenen Zielgene *chi26*, *bgl32* und *rip30* jeweils unter der Kontrolle des 35S-Promotors und –Terminationssignals aus CaMV konstitutiv in der Pflanze exprimiert. Über die Konzentrationen der beiden Hydrolasen und des RIP in Weinbeeren, Most, Wein oder Samen liegen keine Angaben des Antragstellers vor. Jedoch ist die oben beschriebene hohe Akkumulation von Chitinase und RIP in den Samen des Spenderorganismus Gerste nach den Erfahrungen, die mit transgenem Mais und Raps vorliegen, unter konstitutivem Promotor nicht zu erwarten.

In Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, daß die Expression der unter (a) bis (c) genannten Gene in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen zu einer erhöhten Pilzresistenz führte. In keiner der durchgeführten Untersuchungen gibt es einen Hinweis darauf, daß die eingeführten Gene in den transgenen Pflanzen andere als die geplanten Veränderungen bewirkten.

Die gentechnisch veränderten Weinreben sollen wurzelecht oder als Pfropfreben ausgepflanzt werden. Untersuchungen zu Auswirkungen von verschiedenen Chitinase- und Glucanase-Genen, die in gentechnisch veränderten Tabakpflanzen unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert worden sind, zeigen, daß die Entwicklung des Mykorrhiza-Organismus *Glomus mossae* nicht negativ beeinflusst wird. Es ist deshalb nicht zu erwarten, daß Organismen der natürlichen Mykorrhiza der Weinrebe durch das Vorkommen dieser Proteine Schaden nehmen.

(d) Das *gus*-Gen (*uidA*-Gen) aus *E.coli*

Das *gus*-Gen kodiert eine β -Glucuronidase und wurde mit dem Plasmid p35Sgus-int in das Genom einiger der gentechnisch veränderten Weinreben eingeführt, um mit Hilfe des histochemischen Nachweises der GUS-Aktivität die Auskreuzungsrate bei Reben untersuchen zu können. Das *gus*-Gen wird unter der Kontrolle des 35S-Promotors und 35S-Terminationssignals des CaMV exprimiert. Um eine Genexpression in Bakterien zu verhin-

dern, wurde das Gen mit einem Intron versehen.

Das Enzym β -Glucuronidase spaltet Glucuronide und wird in Geweben von Vertebraten und Invertebraten und in Bakterien gefunden. Auch Pflanzen besitzen eine geringe endogene β -Glucuronidase-Aktivität, die jedoch durch geeignete Verfahren unterdrückt werden kann. Nach der Zugabe eines entsprechenden Substrates kann die Enzymaktivität im transgenen Gewebe nachgewiesen werden. Es ist nicht zu erwarten, daß Pflanzen durch die Expression des *gus*-Gens aus *E. coli* einen Selektionsvorteil erhalten.

Sollten Teile der Pflanzen von Tieren oder Menschen verzehrt werden, so wären keine schädlichen Auswirkungen zu erwarten, da davon auszugehen wäre, daß das GUS-Enzym im Verdauungstrakt abgebaut würde.

(e) Das *nptII*-Gen

Das *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase und wurde als Markergen zur Selektion transformierter Weinrebenzellen eingeführt.

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.

(f) Die kodierende Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase, *lacI*-Sequenzen

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

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

Durch die Insertion der verschiedenen Expressionskassetten in die „multiple cloning site“ wurde die für das α -Teil der β -Galaktosidase kodierende Sequenz unterbrochen, so daß sie in dieser Form u. a. in *E. coli*-Bakterien nicht mehr für ein komplementationsfähiges α -Teil kodieren kann. Die unterbrochene Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase steht unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Ein funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese

Sequenz nicht kodiert. Veränderungen in den gentechnisch veränderten Weinreben aufgrund des Vorhandenseins dieser Sequenz sind nicht zu erwarten.

In den gentechnisch veränderten Pflanzen befinden sich außerdem auch 5'- und 3'-Sequenzen des Repressor-Gens *lacI*. Diese 5'- und 3'-Sequenzen sind jedoch durch die *lacZ*- und M13 ori-Sequenzen voneinander getrennt. Eine Funktionsfähigkeit der *lacI*-Sequenzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen ist nicht zu erwarten.

(g) M13-Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten zwei Fragmente aus M13mp19, nämlich ein 440 bp großes Fragment, das einen Teil eines offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfaßt sowie ein 433 bp großes Fragment, das den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält.

Sollte es in den gentechnisch veränderten Weinreben zu einer Transkription des Fragments des offenen Leserahmens des Strukturproteins kommen, würde dies nicht in einem funktionalen Protein resultieren, da das Fragment nur für 167 Aminosäuren von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Pflanzen aufgrund der Anwesenheit dieses Fragments sind daher nicht zu erwarten.

Der Replikationsursprung von M13 bewirkt die Replikation des Phagen in *E. coli*, wenn *E. coli* mit M13-, f1- oder fd-Phagen infiziert ist. Eine Funktionsfähigkeit des Replikationsursprungs in Pflanzen ist nicht zu erwarten.

(h) Das Fragment des *ocd*-Gens

Die Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten ein Fragment des *ocd*-Gens (Ornithin-Cyclodeaminase), welches sich zwischen dem 3'-Ende der translatierten Sequenz des *nptII*-Gens und der NOS-Terminatorsequenz befindet. Da diese Sequenz als Teil der mRNA des *nptII*-Gens transkribiert wird, jedoch hinter dem Terminationskodon des *nptII*-Gens liegt, ist nicht zu erwarten, daß die Sequenz translatiert wird.

(i) Bordersequenzen des Ti-Plasmids pTiT37; Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der TL-DNA des Plasmids pTiT37 aus *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirken, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamms LBA4404 vorhandenen Helferplasmids pAL4404, das nicht in die Pflanzen übertragen wurde, die Integration der zwischen den Borderregionen liegenden Gene in Chromosomen der Weinreben. 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-Terminationssignal des cauliflower mosaic virus (CaMV),

- den Promotor und Terminator des Nopalin-Synthase-Gens (*nos*-Gen) aus *A. tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden Gene in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) – (e).

(j) 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. Eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Borderregionen wurde jedoch berichtet. Nach den dem Antrag zu entnehmenden Informationen können im vorliegenden Fall durch Integration von außerhalb der Borderregionen gelegenen DNA-Abschnitten folgende funktionale Einheiten in die gentechnisch veränderten Weinreben übertragen worden sein:

- (1) der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- (2) die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RK2;
- (3) der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- (4) ein nicht-funktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- (5) das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- (6) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

(1) und (2): Der Replikationsursprung *oriV* (1) bzw. der *oriT* (2) 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.

(3) - (6): Es gibt keine Hinweise dafür, daß *oriV* bzw. *oriT* von RK2, der Replikationsursprung von pMB1 (6) oder die übrigen DNA-Abschnitte bakteriellen Ursprungs (3 - 5) in höheren Pflanzen eine Funktion hätten. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (4) bzw. unterbrochen (5).

Bestandteil des Vektorrückgrats des Vektors pBIN19 ist außerhalb der T-DNA-Bordersequenzen auch das *nptIII*-Gen, das Resistenz unter anderem gegen das Reserveantibiotikum Amikacin vermittelt. Die gentechnisch veränderten Weinreben wurden mittels PCR auf Anwesenheit des *nptIII*-Gens untersucht. Keine der zur Freisetzung vorgesehenen Linien enthält das vollständige Gen. Die Expression eines funktionsfähigen Genprodukts wäre in den gentechnisch veränderten Pflanzen auch im Falle der Anwesenheit des vollständigen *nptIII*-Gens nicht zu erwarten, da dieses unter der Kontrolle prokaryotischer Regulationssequenzen steht.

(k) 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 Um-

gebung 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 Weinreben im Freiland nicht in gleichem Maße pilzresistent sind oder nicht in gleichem Maße GUS exprimieren 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. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen sowie aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nichtgewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

Pollen von Weinreben wird durch den Wind verbreitet. Er spielt als Auslöser von Pollenallergien generell keine nennenswerte Rolle. Die vorliegenden Informationen über die übertragenen Eigenschaften lassen keine Veränderung des allergenen Potentials der Pollen erwarten.

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

Eine Verbreitung gentechnisch veränderter Weinreben außerhalb der Versuchsflächen ist aufgrund der vorgesehenen Maßnahmen ebensowenig zu erwarten wie ihre Überdauerung bzw. Etablierung.

Die freigesetzten Weinreben sollen nach Beendigung der Freisetzung gerodet, zerkleinert und in den Boden eingearbeitet werden, soweit keine Probennahme erfolgt. Bei dieser Vorgehensweise ist nicht zu erwarten, daß regenerationsfähiges Pflanzenmaterial in den Weinbergen verbleibt.

Die Kulturrebe wird vegetativ vermehrt und erfordert intensive Pflegemaßnahmen. Sie hat ein extrem geringes Etablierungs- und Ausbreitungspotential. Weinreben befinden sich in Deutschland an der nördlichen Grenze ihrer Anbauzone, die zwischen 30 und 50 Grad nördlicher Breite liegt. Über Einzelpflanzen außerhalb von Weinbergen wurde nur in Ausnahme-

fällen berichtet. Durch herabfallende Beeren und das bei der normalen Kultivierung übliche Ausbringen von Trester werden viele Samen in die Weinberge verbracht. Auf diese Weise soll auch in diesem Freisetzungsvorhaben verfahren werden. Gelegentlich auflaufende Sämlinge sind nach aller Erfahrung in den weit auseinander stehenden Reihen der älteren Holzgewächse leicht erkennbar, und sie werden bei der regulären Weinbergbearbeitung entfernt. Die Antragstellerin sieht vor, die Freisetzungsfläche im Jahr nach Beendigung des Vorhabens auf Weinreben zu kontrollieren. Es ist vorgesehen, gegebenenfalls aufgelaufene oder ausgeschlagene Reben zu inaktivieren.

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

Die Weinrebe ist selbstfertil. Pollen von Weinreben können durch Insekten und durch den Wind übertragen werden. Die Freisetzungsflächen sind von Weinbergen umgeben. Es gehört zu den Zielen des Freilandversuchs, die Auskreuzung auf benachbarte nicht transgene Weinreben mithilfe des *gus*-Gens zu messen. Ein Isolationsabstand zu nicht gentechnisch veränderten Weinreben ist nicht vorgesehen.

Die Folge einer erfolgreichen Befruchtung von Blüten an nicht transgenen Weinreben mit Pollen der transgenen Weinreben wäre die Entwicklung von gentechnisch veränderten Samen in den Weinbeeren. Auf Grund der unter III.1.2.2. beschriebenen Maßnahmen ist trotz der Möglichkeit, daß diese Samen in den Weinbergen ausgebracht werden und keimen könnten, eine Verbreitung, Überdauerung oder Etablierung von gentechnisch veränderten Weinreben auch außerhalb der Freisetzungsfläche nicht zu erwarten.

Die die Freisetzungsfläche umgebenden Weinberge dienen der Erzeugung von Most und Wein. Tafeltrauben werden in den Regionen im allgemeinen nicht erzeugt. Da nur die Samen die gentechnische Veränderung aufweisen - die Zellen des Fruchtfleisches gehen auf somatisches Gewebe der pollenempfangenden Pflanze zurück - ist zu erwarten, daß die Genprodukte nur in geringer Menge in den ganzen Beeren nachzuweisen wären. Sollten Produkte der Transgene in Beeren, Most oder Wein vorkommen, ist nach allen vorliegenden Kenntnissen zu erwarten, daß sie im Verdauungsprozeß von Mensch und Tier degradiert werden. Schädliche Einwirkungen auf Leben und Gesundheit von Menschen wären nicht zu erwarten.

Eine Einkreuzung der gentechnisch veränderten Weinreben in einheimische Wildpflanzen ist nicht zu erwarten. Die Abstammung der Kulturrebe von der in Auwäldern des Oberrheins selten vorkommenden zweihäusigen Wildrebe *Vitis vinifera silvestris* GMELIN ist zwar nicht gesichert, Kreuzungen werden jedoch für möglich gehalten. Wildreben kommen in der Nähe der beiden Standorte der Freisetzung nicht vor.

III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von den gentechnisch veränderten Weinreben über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind integriert in Chromosomen der Empfängerorganismen. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen folgern, daß 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 Samenpflanzen 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 Erbmaterial, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

Ökologische Konsequenzen eines solchen Gentransfers ohne Vorliegen eines Selektionsdrucks für die mit den Genen übertragenen Eigenschaften werden nicht erwartet.

(a) Die Gene zur Pilzresistenz

Die verwendeten Pilzresistenz-Gene stammen aus Gerste, kommen also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen.

(b) Das *gus*-Gen

Das *gus*-Gen, das aus *E. coli* stammt, wurde zu Kontrollzwecken eingeführt und kodiert für eine β -Glucuronidase. Bei Mikroorganismen sind Glucuronidasen verbreitet, so daß hier, selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers, keine erkennbare Erhöhung der Gesamtfrequenz eintreten würde.

(c) Das *nptII*-Gen

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(e) 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 Weinreben auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

(d) Weitere, außerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Die zur Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten möglicherweise außerhalb der Borderregionen die Replikationsursprünge RK2 *oriV* und *traF* zur Replikation in *E. coli* und *A. tumefaciens*, das Element IS1 und weitere bakterielle Fragmente (s.o.). Die gentechnisch veränderten Weinreben wurden mittels PCR auf Anwesenheit des auf den verwendeten Transformationsvektoren außerhalb der Borderregionen gelegenen *nptIII*-Gens untersucht. Keine der freizusetzenden Linien enthält das vollständige Gen.

Für alle diese Nukleinsäureabschnitte ist 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. Außerdem ist nicht zu erwarten, daß die Übertragung eines unvollständigen *nptIII*-Gens auf Mikroorganismen diesen eine Antibiotikaresistenz verleihen würde.

(e) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in den Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *A. tumefaciens* und CaMV. *A. tumefaciens* sind in der Umwelt weit verbreitet, und die genannten Sequenzen befinden sich in Wildtyp-Agrobakterien auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation zwischen verschiedenen Rhizobiaceen ausgetauscht werden können. CaMV ist ein pflanzeninfizierendes doppelsträngiges DNA-Virus, das in Pflanzen weit verbreitet ist.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden verwundete pflanzliche Explantate in Suspension mit Agrobakterien inkubiert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen des binären Vektorplasmids enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien 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 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.