Bescheid 6786-01-0116 / 42010.0116

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Hybridaspen (*Populus tremula* L. x *P. tremuloides* Michx.) T89-35S-Bar im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 23. Mai 2000

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 native *bar*-Gen

Das *bar*-Gen aus *S. hygroscopicus* kodiert für eine Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT), die die Acetylierung von L-Phosphinothricin katalysiert. L-Phosphinothricin, der aktive Bestandteil des herbiziden Wirkstoffs Glufosinat-Ammonium (=Ammonium-D,L-Phosphinothricin), ist ein Glutaminsäure-Analogon und inhibiert die Glutaminsynthetase. Nach Anwendung von Glufosinat-Ammonium-haltigen Herbiziden (z. B. Handelsprodukt Bas-

ta®) kommt es in nicht transgenen Pflanzen zu einer Akkumulation von Ammonium im grünen Pflanzengewebe und infolgedessen zum Absterben der Pflanzen. In gentechnisch veränderten Pflanzen, die das *bar*-Gen exprimieren, wird L-Phosphinothricin durch die Acetylierung in das Derivat N-Acetyl-Phosphinothricin überführt, das keine herbizide Wirkung besitzt. Die Bildung weiterer Stoffwechselprodukte ist nicht wahrscheinlich, da als Substrate für das PAT-Enzym nur dem Phosphinothricin strukturverwandte Aminosäuren, wie z.B. Glutamat, in Frage kommen. Entsprechende Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass selbst Glutamat und andere Strukturverwandte kaum umgesetzt werden.

Üblicherweise wird das *bar*-Gen (oder das nahe verwandte *pat*-Gen aus *S. viridochromogenes*) zur gentechnischen Entwicklung von herbizidtoleranten landwirtschaftlichen Kulturpflanzen verwendet. Im Vorhaben der BFH dagegen soll das *bar*-Gen genutzt werden, um einen horizontalen Gentransfer von den genetisch veränderten Hybridaspen auf Ektomykorrhizapilze nachweisen zu können. Dazu sind eine Ausprägung der Herbizidtoleranz in den Hybridaspen sowie die Applikation des Komplementärherbizids in dem Pflanzenbestand nicht erforderlich. In Ektomykorrhizapilzen sollten jedoch das *bar*-Gen nach einem erfolgreichen horizontalen Gentransfer exprimiert und das PAT-Enzym gebildet werden.

Aus diesem Grund wurde ein Konstrukt entwickelt, bei dem das native *bar*-Gen unter der Kontrolle von zwei verschiedenen Promotoren exprimiert wird: der Promotor des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens (GPD-Promotor) aus dem Pilz *Cochliobolus heterostrophus* befindet sich am 5‘-Ende des *bar*-Gens und soll zum Nachweis eines erfolgten horizontalen Gentransfers die Selektion transgener Ektomykorrhizapilze ermöglichen. Als zweiter Promotor wurde der 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) verwendet. Die Anordnung des 35S-Promotors entgegengesetzt zur normalen Transkriptionsrichtung am 3‘-Ende des *bar*-Gens hat die Expression des Gens in *antisense*-Orientierung zur Folge. Mit diesem Ansatz soll die Ausprägung einer Herbizidtoleranz in den gentechnisch veränderten Hybridaspen auch für den Fall verhindert werden, dass der GPD-Promotor auch in Pflanzen aktiv sein sollte. Es liegen keine Daten über eine mögliche Phosphinothricin-Resistenz der transgenen Hybridaspen vor. Der Einsatz von Phosphinothricin-haltigen Herbiziden an den gentechnisch veränderten Pflanzen ist während des Versuchs nicht vorgesehen.

Auch im Falle einer Expression des PAT-Proteins in den gentechnisch veränderten Hybridaspen wären schädliche Einwirkungen bei einem Verzehr von Pflanzenteilen durch Tiere oder - was nicht üblich ist - durch Menschen nicht zu erwarten. Bei einer oralen Aufnahme wäre davon auszugehen, dass das Enzym ebenso wie Proteine im allgemeinen im Verdauungstrakt abgebaut würde. Das PAT-Protein besitzt keine der für allergene Proteine aus Nahrungsmitteln typischen Eigenschaften (Hitzestabilität, Stabilität im Verdauungstrakt) sowie keine Sequenzhomologie zu bekannten Allergenen.

(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 pBI121-Bar wurde aus pBIN19 über pBI121 entwickelt. Bestandteil des Rückgrats dieses Vektors ist u. a. das *npt*III-Gen. Die gentechnisch veränderten Hybridaspen wurden mittels PCR auf Anwesenheit des *npt*III-Gens untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass keine der fünf für die Freisetzung vorgesehenen Primärtransformanten ein vollständiges *npt*III-Gen enthält.

Da keine weitere Analyse der in die Hybridaspen 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 *npt*III-Gen:

(1.) den Replikationsursprung *ori*V des Plasmids RK2;

(2.) die *traF*-Region, enthaltend den *ori*T des Plasmids RP2;

(3.) den *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.) den 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), (4), (5) und (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, 4, 5) in höheren Pflanzen eine Funktion hätten. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (4) 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 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 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 oder das *bar*-Gen unter der Kontrolle nicht-gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor. 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 Hybridaspen zum Versuchsende aus dem Boden zu reißen und zu verbrennen, sofern nicht Teile der Bäume für weitere Untersuchungen verwendet werden. Die Genehmigungsbehörde geht davon aus, dass dies umweltgerecht erfolgen wird. Eventuell übrig bleibendes Material, das zum Wiederaustreiben befähigt ist, soll durch Herbizideinsatz inaktiviert werden. Während zweier Jahre nach Versuchsende soll das Feld kontrolliert und mit Herbizid behandelt werden. Gegebenenfalls auftretende Wurzelschösslinge sollen ausgegraben und kontrolliert abgetötet werden (z. B. durch Verbrennen). In die Kontrolle während und im Anschluss an die Freisetzung ist eine 15 m breite Fläche um die Freisetzungsfläche herum einzubeziehen. Dadurch wird der Möglichkeit Rechnung getragen, dass sich das Wurzelsystem der Hybridaspen dieser Freisetzung und der Espen der derzeit laufenden Freisetzung (Az. 6786-01-0048), die auf einer Fläche in unmittelbarer Nachbarschaft zur bevorzugten Freisetzungsfläche dieses Vorhabens durchgeführt wird, im Verlauf der Freisetzung auch über die Freisetzungsfläche hinaus entwickeln kann und sich an diesen Wurzeln Wurzelschösslinge entwickeln könnten.

Die Wahrscheinlichkeit einer Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen durch nach der Beendigung des Versuchs und den Nachkontrollmaßnahmen möglicherweise im Boden verbliebene Wurzelteile ist nach den Erfahrungen des Antragstellers sehr gering. Demzufolge ist die Möglichkeit, dass gentechnisch veränderte Hybridaspen im Freiland überdauern oder sich auf diesem Wege Pflanzen etablieren, äußerst gering. Hinweise auf eine erhöhte Viabilität und Fertilität, die eine Überdauerung oder Verwilderung der gentechnisch veränderten Pflanzen begünstigen würden, gibt es nicht.

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

Hybridaspen sind diözisch. Die für diese Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Pflanzen gehen auf den Hybridaspenklon T89 zurück, der nur männliche Blüten bildet. Pollen von *Populus*-Arten werden durch den Wind verbreitet. Auskreuzungen auf Pflanzen außerhalb der Freisetzungsfläche könnten nicht ausgeschlossen werden, wenn die Pflanzen aus dem Versuch zum Blühen kämen.

Die gentechnisch veränderten Hybridaspen sollen im Alter von 6 Monaten bis 1 Jahr ausgepflanzt werden. Im allgemeinen erreichen die Hybridaspen die generative Phase nach etwa sieben bis 15 Jahren. 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 Blütenknospen 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.

Die umfangreichen Erfahrungen, die die Antragstellerin im Umgang mit Hybridaspen gesammelt hat, darunter auch gentechnisch veränderte, zeigen, dass die Ausbildung von Blütenknospen an Hybridaspen vor der Blütenöffnung sicher erkannt werden kann. Die Übertragung genetischer Information von diesen gentechnisch veränderten Hybridaspen über Pollen auf andere Pflanzen 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 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, 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 Hybridaspen auf

eine bestimmte Gruppe von Mikroorganismen, die eng mit den Pflanzenwurzeln assoziiert lebenden Mykorrhizapilze, zu gewinnen.

Soweit anzunehmen ist, dass ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Pflanzen und Bakterien oder Mykorrhizapilzen tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmaterial 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 *bar*-Gen

Die Inaktivierung von Phosphinothricin durch Acetylierung ist ein bei Bodenmikroorganismen natürlicherweise vorkommender Prozess. Bakterien mit einer entsprechenden Resistenz sind in der Umwelt verbreitet. Diese Resistenz kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten. Selbst im Falle eines Transfers des *bar*-Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz dieser Resistenz in der Umwelt nicht erkennbar erhöht.

(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 Hybridaspen 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, aus dem ubiquitär verbreiteten Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* und aus dem weit verbreiteten Pilz *Cochliobolus heterostrophus*.

(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 *npt*III-Gens aus *Streptococcus faecalis* (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;

(2.) der Replikationsursprung *ori*V des Plasmids RK2;

(3.) die *tra*F-Region, enthaltend den *ori*T des Plasmids RK2;

(4.) der *trf*A-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);

(5.) ein nicht-funktionales Fragment des *kla*C-Gens aus dem Plasmid RK2;

(6.) das *tet*A-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);

(7.) das Transposon IS1 innerhalb des *npt*III-Gens;

(8.) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Nach einer PCR-Untersuchung der Antragstellerin enthält keines der zur Freisetzung vorgesehenen Linien das vollständige *npt*III-Gen. Das *npt*III-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 Freisetzungsflächen ist jedoch nicht davon auszugehen, dass auch die Anwesenheit eines vollständigen *npt*III-Gens in den gentechnisch veränderten Hybridaspen zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen würde.

RK2 gehört 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).

Auf Grund des vorgelegten Ergebnisses einer PCR-Untersuchung ist nicht zu erwarten, dass das vollständige Insertionselement IS1 in die gentechnisch veränderten Hybridaspen übertragen worden ist. 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 Bakterienspezies, 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 sterile Blätter der Hybridaspen 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.