

G. Leggewie, Referat 403

Az. 6786-01-0168

Berlin, den 1⁴12.2005

Vfg.

**1. Beschluss der „Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit“
zu einem Antrag der
Justus Liebig Universität Gießen
vom 23.11.2005,
auf Durchführung eines Freisetzungsversuchs
mit gentechnisch veränderter Gerste
am Standort Gießen, Hessen,
im Jahr 2006-2008
(Az. 6786-01-0168)**

Empfehlung der ZKBS

Die ZKBS stellt fest, dass von dem geplanten Freisetzungsversuch mit der gentechnisch veränderten Gerste keine schädlichen Einwirkungen auf „Leben und Gesundheit von Menschen, die Umwelt in ihrem Wirkungsgefüge, Tiere, Pflanzen und Sachgüter“ (§ 1, Nr.1, GenTG) zu erwarten sind. Die ZKBS empfiehlt daher dem Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, den Freisetzungsversuch zu genehmigen.

Begründung

1. Beschreibung des Freisetzungsvorhabens

Die Justus-Liebig-Universität Gießen beabsichtigt, einen Freisetzungsversuch mit gentechnisch veränderter Gerste (*Hordeum vulgare* L.) durchzuführen. Gegenstand des Antrags sind Nachkommen der Ausgangstransformanten pYW210-9 und pJH271-Beta-Glu-307, die durch Agrobakterien-vermittelte Transformation der zweizeiligen Sommergerstensorte „Golden Promise“ unter Verwendung der binären Transformationsplasmide pYW210 und pJH271 erzeugt worden sind.

In das Genom der Gerstenlinie pYW210-9 wurden das *cThEn42(GC)*-Gen aus *Trichoderma harzianum*, das für eine 42-kDa Endochitinase kodiert, sowie als Selektionsmarker das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*, kodierend für eine Phosphinothricin-Acetyltransferase, übertragen. Die gentechnische Veränderung soll dazu führen, dass die gentechnisch veränderte Gerste durch die Expression eines Enzyms, das Chitinverbindungen abbaut, weniger anfällig gegen pilzlichen Befall ist als die Ausgangslinie.

In das Genom der Gerstenlinie pJH271-Beta-Glu-307 wurden ein Gen für eine (1,3-1,4)- β -Glucanase integriert, welches durch intragenische Rekombination zweier Gene für (1,3-1,4)- β -Glucanasen aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* generiert wurde. Weiterhin wurde als Selektionsmarker das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* sowie das *sGFP*-Gen, kodierend für das synthetische „Grün Fluoreszierende Protein“ übertragen. Die gentechnische Veränderung soll dazu führen, dass es bei der gentechnisch veränderten Gerste durch die Expression eines (1,3-1,4)- β -Glucane abbauenden Enzyms zu einer verbesserten Nutzung dieses Kohlenhydrates im keimenden Korn kommt als bei Ausgangslinie.

Ziel des Vorhabens ist es, eine gezielte Evaluation von Interaktionen zwischen den gentechnisch veränderten Linien sowie nicht-gentechnisch veränderten Kontrolllinien und einem symbiontischen Pilz (*Glomus intraradices*) durchzuführen. Ein zweites Ziel ist eine umfassende Aufzeichnung auftretender pilzlicher Organismen bzw. sichtbarer Krankheiten auf den gentechnisch modifizierten Pflanzen und der entsprechenden Ausgangssorte (Golden Promise). Dazu sollen auf einer Freisetzungsfäche von 12 m² auf dem Gelände des Institutes für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (IPAZ) in Gießen, Hessen, nicht mehr als 5000 gentechnisch veränderte Gerstenpflanzen pro Jahr während der Vegetationsperioden der Jahre 2006-2008 freigesetzt werden. Die Versuchsfläche (Parzellen mit gentechnisch veränderter und konventioneller Gerste) nimmt eine Fläche von 62 m² ein.

Es ist vorgesehen, um die Versuchspartellen herum eine mindestens 5 m breite Mantelsaat aus nicht gentechnisch veränderter Gerste und um diese Versuchsfläche herum einen mindestens 25 m breiten Pflanzenbestand von dikotylen Pflanzen anzulegen. Es werden keine weiteren Getreidepflanzen in der direkten Nachbarschaft zu den Versuchspartellen angebaut. Die nächste als Ackerland genutzte Fläche liegt ca. 4000 m entfernt. In 50 m Abstand liegt ein S1-Gewächshaus, welches zur Vermehrung von Gerste dient. Nach der manuellen Beerntung

der gentechnisch veränderten Gerste und der Ernte der Gerste der Mantelsaat soll die Fläche mit einem nicht-selektiven Herbizid behandelt und das verbleibende Pflanzenmaterial zerkleinert und in den Boden eingearbeitet werden. Nicht für weitere Versuche benötigte Gerste soll verbrannt werden. Die Gerste ist nicht für den Verzehr oder die Verfütterung vorgesehen. Während des vorgesehenen Nachkontrollzeitraums von einem Jahr soll ggf. auf der Fläche auftretende Gerste entfernt und verbrannt werden. Es ist vorgesehen, die Nachkontrolle um ein Jahr zu verlängern, sollte während des Beobachtungszeitraumes Gerste auf der Fläche gefunden werden.

2. Risikobewertung der übertragenen DNA-Abschnitte in den gentechnisch veränderten Pflanzen

2.1 Gentechnisch veränderte Gerste pYW210-9-(4001-4360)

2.1.1 Das *bar*-Gen

Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* steht in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter der Kontrolle des *pUbi1*-Promotors aus Mais und des *nos*-Gen-Terminators aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid pTiT37. Die Aktivität des *pUbi-1*-Promotors führt zur ubiquitären Expression in der Pflanze. Das *bar*-Gen wurde zur Selektion transformierter Pflanzenzellen verwendet. Das *bar*-Gen kodiert für eine Acetyltransferase (PAT), die sehr spezifisch die Acetylierung von L-Phosphinothricin katalysiert. L-Phosphinothricin ist der aktive Bestandteil des Herbizidwirkstoffs Glufosinat-Ammonium (= Ammonium-D,L-Phosphinothricin). L-Phosphinothricin ist ein Analogon der Glutaminsäure und inhibiert durch kompetitive Hemmung die Glutaminsynthetase. Nach Anwendung von Glufosinat-Ammonium kommt es in nicht-gentechnischen veränderten Geweben zu einer Ammonium-Akkumulation und infolgedessen zum Absterben der Zellen.

Es ist nicht vorgesehen, die gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen im Freisetzungsvorversuch mit Glufosinat-Ammonium zu behandeln.

2.1.2 Das *cTHEn42(GC)*-Gen

Der Bodenpilz *Trichoderma harzianum* parasitiert eine Reihe von wirtschaftlich bedeutenden phytopathogenen Pilzen. Dabei ermöglicht die Bildung von Endo- und Exochitinasen das

Eindringen von *T. harzianum* in seine Wirte. Aus *T. harzianum* wurde die cDNA des *ThEn-42*-Gen isoliert und charakterisiert (Hayes *et al.*, 1994). Das Gen kodiert für eine Endochitinase, die den Zellwandbestandteil von phytopathogenen Pilzen Chitin (Poly-N-acetyl-D-glucosamin) innerhalb des Polymers zufallsverteilt spaltet (Harman *et al.*, 1993).

Die Transkription des *cThEn-42(GC)*-Gens steht in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter der Kontrolle des *pUbi1*-Promotors aus Mais und des *nos*-Gen-Terminators aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid pTiT37. Die Expression soll diesen Pflanzen eine Resistenz gegen die wirtschaftlich bedeutenden Schadpilze *Rhizoctonia solani* AG-8 und *Rhizoctonia oryzae* vermitteln. Dazu wurde das Gen zunächst auf einen G+C-Gehalt von 65.1% codon-optimiert, um die Expression des Gens in der Gerste zu gewährleisten. Das codon-optimierte Gen (*cThEn-42(GC)*) wurde zusammen mit einer Nukleotidsequenz, die für eine *Leader*-Sequenz der 33kDa Endochitinase der Gerste (HvChi33) kodiert und für den Transport in den interzellulären Raum verantwortlich ist, unter der Kontrolle des Promotors des Mais-Ubiquitin Gens und der Terminationssequenz des Nopalin Synthase-Gens (*nos*-Gen) aus *A. tumefaciens* in das Genom der Gerstensorte „Golden Promise“ übertragen (Wu *et al.*, 2003). Western-blot Analysen zeigen Expression der Endochitinase in Blättern und Wurzeln, die Expression wurde nicht quantifiziert.

Der offene Leserahmen der *ThEn-42* homologen cDNA kodiert für eine Endochitinase (ECH42) von 389 AS mit einem errechneten Molekulargewicht von 42,66 kDa (Hayes *et al.*, 1994). Ein Datenbankabgleich der Nukleinsäure- und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz ergab laut Antragstellerin keine Homologien der ECH42 zu bekannten Toxinen oder Allergenen. Homologien wurden zu Endochitinase-Genen und Endochitinasen der Pilzgattungen *Trichoderma*, *Hypocrea*, *Verticillium*, *Metarhizum*, *Neurospora*, *Aspergillus* u.a. gefunden. *T. harzianum* ist weit verbreitet und wird als Pflanzenstärkungsmittel zur Abwehr von Pilzkrankheiten an Pflanzen angewendet.

Erfahrungen zur Expression des *ThEn-42*-Gens aus *T. harzianum* in höheren Pflanzen liegen aus Versuchen mit gentechnisch verändertem Tabak, gentechnisch veränderten Kartoffeln (Lorito *et al.*, 1998), Broccoli (Mora *et al.*, 2001) sowie Äpfeln (Bolar *et al.*, 2000) vor. Hier führte die Expression des Transgens zu einem gegenüber der nicht-gentechnisch veränderten Kontrolle reduzierten Erregerbesatz und zu weniger Krankheitssymptomen. Die Expressionshöhe war mit der Entwicklung der Pilzkrankungen negativ korreliert. Während in gentechnisch veränderten Tabak- und Kartoffelpflanzen auch ein hohes Expressionsniveau keinen erkennbaren Einfluss auf die Pflanzenmorphologie und -entwicklung nahm (Lorito *et*

al., 1998), zeigten die gentechnisch veränderten Äpfel mit hoher ThEn-42-Expression deutlichen Minderwuchs. Einige Pflanzen konnten nicht bewurzelt werden (Bolar *et al.*, 2000, Bolar *et al.*, 2001). Eine generelle Resistenz gegen pilzliche Infektionen durch die gentechnisch veränderte Veränderung in der beantragten Gerste wurde nicht vermittelt, da das Wachstum von drei *Fusarium sp.* auf der gentechnisch veränderten Gerste nicht beeinträchtigt war (Wu *et al.*, 2003).

Chitin ist ein wesentlicher Bestandteil des Exoskelettes von Insekten. Wechselwirkungen der exprimierten Chitinase mit Insekten sind unwahrscheinlich, da Chitin nicht in den äußersten Schicht des Integumentes, der Epikutikula, vorhanden ist und der Zugang zum Chitin der inneren Schichten durch Vernetzung mit Proteinen limitiert ist. Der Anteil von Chitin im Verdauungstrakt ist wesentlich geringer als im Exoskelett, eine Exposition der Verdauungstraktes durch pflanzliche Chitinasen ist bei herbivoren Insekten ständig gegeben.

Zusammenfassend sind schädliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder für die Umwelt aus der Freisetzung dieser gentechnisch veränderten Pflanzen im Rahmen des vorliegenden Vorhabens nicht zu erwarten.

2.2. Gentechnisch veränderte Gerste pJH271-Beta-Glu-307

2.2.1 Das bar-Gen

Das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* steht in den gentechnisch veränderten Pflanzen ebenfalls unter der Kontrolle des *pUbi1*-Promotors aus Mais und des *nos*-Gen-Terminators aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid pTiT37. Das *bar*-Gen wurde zur Selektion transformierter Pflanzenzellen eingesetzt. Eine Bewertung wurde unter 2.1.1 durchgeführt.

2.2.2 Das *sGFP*-Gen

Fluoreszierende Proteine sind stabile Proteine, die speziesunabhängig eingesetzt werden können. Sie eignen sich als Reporter zum Nachweis von Genexpression und Proteinlokalisierung in lebenden Zellen nach Anregung mit UV-Licht. Gene kodierend für fluoreszierende Reporterproteine werden vielfältig in Organismen und Zellkulturen eingesetzt. Das Green fluorescent Protein (GFP) aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* wird in gentechnisch veränderten Pflanzen, Mäusen und Zebrafischen exprimiert. Hinweise auf eine

Beeinträchtigung der Vitalität dieser Organismen liegen nicht vor (Chiu et al., 1996, Hadjantonakis et al., 1998, Higashijima et al., 1997). In Fütterungsstudien an Nagern, über Vergleich der Aminosäuresequenz mit der bekannter Allergene und in Verdaulichkeitsstudien konnte nachgewiesen werden, dass von GFP keine Gesundheitsrisiken ausgehen (Richards et al., 2003). Das vorliegende sGFP wurde durch Codon-Optimierung an die Codon-Usage in Pflanzen angepasst (Chiu et al., 1996). Die Transkription wird durch den Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor (*CaMV35S*) initiiert und durch den Terminator aus dem *nos*-Gen von *Agrobacterium tumefaciens* terminiert. Das *sGFP*-Gen wurde zur Selektion transformierter Pflanzenzellen eingesetzt.

2.2.3 Das (1,3-1,4)- β -Glucanase-Gen

Die biologische Funktion von (1,3-1,4)- β -Glucanasen im keimenden Korn stellt durch Degradation von Glucanen als einem Hauptbestandteil der Zellwände des Gerstenendosperms eine wesentliche Voraussetzung für die enzymatische Mobilisierung des Nährstoffvorrates des Endosperms bei der Keimung dar.

Das in die Gerste eingebrachte Gen wurde durch intragenische Rekombination zweier (1,3-1,4)- β -Glucanasen aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* erzeugt. Das Enzym besteht aus den Aminosäuren 1-12 der Glucanase von *Bacillus amyloliquefaciens* und Aminosäure 13-214 der Glucanase von *Bacillus macerans*. Das Tyrosin an Position 13 wurde deletiert. Ferner wurde der G+C-Gehalt auf 63% erhöht, um die Funktion des ursprünglich mikrobiellen Gens in der Pflanze zu gewährleisten. N-terminal wurde das Gen mit einer Sequenz kodierend für das Signalpeptid des Endosperm-spezifischen D-Hordein Proteins (Signalpeptid Hor-3) versehen. Posttranslational kommt es zu einer Glykosylierung an zwei Aminosäurepositionen des Enzyms. Die Transkription des chimären Gens wird durch den Endosperm-spezifischen Hor3-1 Promotor des D-Hordein Genes aus Gerste gesteuert und durch den *nos*-Gen-Terminator aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid pTiT37 terminiert. Die Funktion des Transgenes ist daher räumlich und zeitlich auf das sich entwickelnde Korn beschränkt. Im Ergebnis führte die gentechnische Veränderung zu einem chimären Enzym, welches eine erhöhte Thermostabilität bei gleicher Substratspezifität aufweist und zu einer besseren Nutzung der (1,3-1,4)- β -Glucane des Endosperms und des Aleurons während der Kornkeimung führt. Eine erhöhte Thermostabilität von (1,3-1,4)- β -Glucanasen ist eine erwünschte Eigenschaft bei der Mälzung von Gerste. Eine Interaktion der gentechnisch veränderten Glucanasen mit Glucanen in den Zellwänden von Pilzen und Bakterien käme nur

dann in Betracht, wenn diese das Korn im keimenden Zustand befielen. Auf Grund der Substratspezifität wäre auch für diesen Fall eine Interaktion mit den Glucanen in der pilzlichen oder bakteriellen Zellwand (hauptsächlich 1,3- β -Glucane) unwahrscheinlich.

Insgesamt ist eine Gefahr für die in §1, Nr1, GenTG genannten Schutzgüter durch die in die Gerstenlinie pJH271-Beta-Glu-307 eingebrachten Gene nicht zu erwarten.

2.3. Weitere Bestandteile der Transformationsplasmide

Die Plasmide pYW210 und pJH271 wurden durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation in die Gerste „Golden Promise“ eingebracht. Mittels Southern blot-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass das *nptIII*-Gen des Vektor-backbones nicht in die genomische DNA der Gerste übertragen wurde. Für weitere DNA-Abschnitte, die außerhalb der T-DNA-border Sequenzen liegen, wurden keine Untersuchungen zur Übertragung in die genomische DNA der Gerste geführt, so dass zu einer Risikobewertung von deren Anwesenheit ausgegangen wird. Diese Teile umfassen den origin of replication (*oriV*) des Plasmides pRK2 aus *E. coli*, ein nicht funktionales Fragment des *kilA*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*, das *trfA*-Gen des Plasmides pRK2, kodierend für zwei Proteine des Replikationsapparates, zwei nicht-funktionale Teilfragmente des *tetA*-Genes des Plasmides pRK2, den *ColE1*-Replikationsursprung des Plasmides ColE1, Teile des *traF*-Gens mit dem *oriT* des Plasmides RP4 aus *E. coli* sowie Bereiche, die keinerlei Homologie zu bekannten Sequenzen haben. Innerhalb der T-DNA liegen Bereiche mit Homologie zu Teilen des *lacZ*-Gens für eine β -Galaktosidase, Teile des origin of replication des *E. coli* Phagen M13, sowie Fragmente des Promotors des *nos*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die Abschnitte sind für die Expression in Bakterien bestimmt und haben in Pflanzen keine Funktion, der Promotor des *nos*-Gens ist durch verschiedenen Klonierungsschritte fragmentiert und daher nicht funktionsfähig. Im Falle einer Übertragung dieser DNA-Abschnitte in das Genom der gentechnisch veränderten Gerste wäre nicht mit ihrer Expression zu rechnen. Schädliche Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt sind daher nicht zu erwarten.

3. Risikobewertung der gentechnisch veränderten Pflanzen im Freisetzungsvorschub

3.1. Pollenausbreitung

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) als einjähriges, meist begranntes Ährengras mit Sommer- und Winterformen ist eine bedeutende Kulturpflanze der gemäßigten Breiten. Die Ähre ist aus mehreren, an einer Mittelachse (Rachis) versetzt und wechselseitig angeordneten Ährchen aufgebaut, in welchen die kleistogamen, zwittrigen Blüten sitzen. Je Spindelabsatz finden sich drei einblütige Ährchen, jedes mit zwei schmalen, grannig zugespitzten Hüllspelzen. Nur das zentrale Ährchen der zweizeiligen Sommergerste ist fertil, die beiden äußeren sind steril. Daher werden von oben gesehen nur zwei Reihen Körner sichtbar. Durch die zeitlich versetzte Abfolge des Blühbeginns der einzelnen Blüten eines Ährchens, der gesamten Ähre und der verschiedenen Ähren einer Pflanze am Haupt- und den diversen Nebentrieben kann die Blühzeit aller Blüten einer Gerstenpflanze über eine Woche betragen. In der Regel tritt Selbstbestäubung noch vor der Blütenöffnung ein, doch ist in gewissem Umfang, beeinflusst vom Genotyp und den klimatischen Bedingungen zur Blütezeit, Fremdbefruchtung möglich. Die hier beantragte Sommergerste ist im allgemeinen strenger autogam als die Wintergerste.

Die bisher vorliegenden Erkenntnisse über die Möglichkeiten des Auskreuzens bei Gerste unter Berücksichtigung der Blütenbiologie und Befruchtungsökologie fassen Eastham & Sweet (2002) zusammen. Gerstenpollen wird vom Wind verbracht, doch wird die Möglichkeit der Verbreitung durch die Empfindlichkeit des Pollens und die Möglichkeit der Fremdbestäubung durch die geringe Pollenproduktion eingeschränkt. Pollen von Gerste zeigt eine hohe Empfindlichkeit gegenüber Hitze und Trockenheit, aber auch gegen zu große Feuchtigkeit, Kälte oder Sonneneinstrahlung, welche die Dauer der Funktionsfähigkeit des Pollens bei der Gerste so stark einschränkt, dass er in der Luft keine längeren Strecken ohne den Verlust seiner Keimfähigkeit überwinden kann (Hammer, 1977). Ferner produziert Gerste nur 10% der Pollenmenge des typischen Windbestäubers Roggen. Untersuchungen zur Pollenausbreitung von Gerste zeigten einen Samenansatz von ca. 0.84 % an Pollenrezipienten, wenn dem Donor ein physischer Kontakt zum Rezipienten ermöglicht wurde. Ein Abstand von 30 cm ließ die Auskreuzungsrate bereits auf 0.23% fallen (Wagner und Allard, 1991). Bei Hybrisisierungsversuchen zwischen gentechnisch veränderter und verschiedenen konventionellen Gerstensorten wurde in Finnland Auskreuzungsraten von 2 bis <0.5% in 1 m Abstand gemessen. Sehr geringe Auskreuzungsraten konnten allerdings noch in einem Abstand von 50 m nachgewiesen werden (Ritala et al., 2002). Die Saatgutverordnung sieht als Maßnahme zur Abschirmung von unerwünschten Einkreuzungen in Gerstenvermehrungsflächen die Anlage eines Trennstreifens (ohne Angabe einer Breite) zu benachbarten Getreidebeständen vor. Weitere Mindestabstände sind nicht einzuhalten.

Als wichtige Kulturpflanze ist Gerste seit langer Zeit Gegenstand von Kreuzungsversuchen innerhalb und außerhalb der Gattung *Hordeum*. Eine Hybridisierung zwischen Gerste und Weizen kommt unter natürlichen Bedingungen nicht vor, kann aber nach Bestäubung unter Einsatz spezieller Methoden (embryo rescue) zu Bildung von Nachkommen führen, die allerdings männlich steril sind. Gleiches gilt auch für Gerste-Roggen-Kreuzungen. Kulturgerste kann mit Spezies der Haargersten (*Elymus sp.*) gekreuzt werden, wobei auch hier männliche Sterilität bei den Hybriden auftritt. Die Möglichkeit des Auftretens von Spontanhybriden unter Freilandbedingungen wird als sehr gering angesehen. Dazu tragen neben der genetisch bedingten Inkompatibilität der Kreuzungspartner weitere Anforderungen bei, die für eine erfolgreiche Hybridisierung unter Freilandbedingungen erfüllt sein müssen, wie z.B. die zeitlich synchrone Blühphase beider Partner. Mit allen anderen bekannten *Hordeum*-Arten in gemäßigten Klimazonen hybridisiert Kulturgerste nach heutiger Kenntnislage nicht.

Es ist auch unter Berücksichtigung der biologischen Eigenschaften der Gerste und der von der Antragstellerin vorgesehenen Maßnahmen nicht völlig auszuschließen, dass es vereinzelt zur Auskreuzung der gentechnischen Eigenschaften in Gerstenbestände außerhalb der Freisetzungsfläche kommen könnte. Auf Grund der unter 2. ausgeführten Bewertung der übertragenen Eigenschaften sind daraus keine schädlichen Einwirkungen auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt zu erwarten.

Die Antragstellerin sieht vor, dafür zu sorgen, dass im Umkreis von 35 m um die Freisetzungsfläche herum keine wilden, mit Gerste kreuzbaren Pflanzen vorhanden sind. Nach Abschluß des Versuches wird das gesamte Freisetzungsareal mit einem Gräserherbizid behandelt.

Ggf. dennoch stattgefundenene einzelne Bastardierungsereignisse zwischen den gentechnisch veränderten Pflanzen und Wildpflanzen würden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht zu einer Ausbreitung der übertragenen Fremdgene in Wildpflanzenpopulationen führen, da dafür sich anschließende Rückkreuzungen des Bastards mit der Wildpflanzenart erforderlich wären.

3.2 Überdauerung

Nach Beendigung der generativen Phase sterben Gerstenpflanzen ab. Neue Pflanzen können aus den gebildeten Samen entstehen. Die bespelzten Samen (Karyopse) werden während der

Ernte aus den Ähren gedroschen. Sie sind nach Eintritt in eine sekundäre Keimruhe unter günstigen Bedingungen einige Jahre im Boden überdauerungsfähig, ohne ihre Keimfähigkeit einzubüßen. Unter günstigen Bedingungen können sie in folgenden Kulturpflanzenbeständen keimen. Aus der gentechnischen Veränderung ergeben sich keine Anhaltspunkte für eine gegenüber nicht gentechnisch veränderter Gerste veränderte Überdauerungsfähigkeit.

Die Antragstellerin hat vorgesehen, die Ähren der gentechnisch veränderten Gerste und der nicht gentechnisch veränderten Kontrollpflanzen, die für Analysen verwendet werden sollen, von Hand zu ernten, bevor die Totreife erreicht wird. So soll spontanem Samenausfall vorgebeugt werden. Die übrigen Ähren der Kontrollparzellen werden ebenfalls von Hand geerntet, die Mantelsaat mechanisch. Die geernteten und nicht für Analysen benötigten Samen sollen verbrannt werden. Nach einer Herbizidbehandlung der Fläche ist vorgesehen, die noch verbliebenen Pflanzenreste zu zerkleinern und in den Boden einzuarbeiten.

Im Anschluss an das Freisetzungsvorhaben soll die Fläche in der folgenden Vegetationsperiode mit einer dikotylen Feldfrucht bestellt werden, die das Erkennen von ggf. auflaufender Gerste ermöglicht. Durchwachsende Gerstenpflanzen sollen entfernt werden. Es ist vorgesehen, diese Anbaupause und die Nachkontrolle zu verlängern, falls Gerstendurchwuchs beobachtet wurde.

3.3. Ausbreitung

Gerste ist eine alte Kulturpflanze; auf Grund der langen Züchtung besitzt die Ähre keine Spindelbrüchigkeit mehr, was die Samenausbreitung der Gerste völlig von ackerbaulichen Kulturmaßnahmen abhängig macht. Folglich kommt Gerste nur in der Nachbarschaft zu landwirtschaftlichen Anbauflächen und hier vereinzelt an Wegrändern und auf Ruderalflächen als Unkraut vor. In natürlichen, intakten Pflanzengesellschaften ist eine Etablierung von Gerste nicht bekannt.

Die Erfahrungen aus Freisetzungen beider Linien in den USA (Washington State University, Pullman) erbrachten laut Antragstellerin keine Hinweise darauf, dass sich die gentechnisch veränderte Gerste aufgrund der gentechnischen Veränderungen diesbezüglich von nicht gentechnisch veränderter Gerste unterscheidet.

4. Risikobewertung einer Ausbreitung der Transgene

4.1. Die zur Transformation verwendeten Agrobakterien

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen diente ein *Agrobacterium*-vermitteltes binäres Transformationssystem. Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm enthält ein „entschärftes“ Helferplasmid, in dem die T-DNA-Region deletiert worden ist, und ein Plasmid, dessen T-DNA in das Pflanzengenom integriert werden kann. Dieser *Agrobacterium*-Stamm ist nicht in der Lage, Pflanzentumore zu erzeugen. Ob die gentechnisch veränderte Gerste auf Abwesenheit von Agrobakterien untersucht wurde, ist nicht bekannt. Auf Grund der generativen Vermehrung über mehrere Generationen ist jedoch zu erwarten, dass die Pflanzen keine gentechnisch veränderten Agrobakterien mehr enthalten.

Selbst wenn noch wenige Agrobakterien im gentechnisch veränderten Pflanzenmaterial verblieben sein sollten, besteht nach Ansicht der ZKBS kein Risiko. In Betracht zu ziehen wäre in diesem Fall die Möglichkeit einer Übertragung der Transgene durch die Agrobakterien auf andere Pflanzen. Eine solche Übertragung, wenn sie stattfände, wäre ohne weitere Auswirkungen, denn nach der Transformation einer Pflanzenzelle durch die modifizierten Agrobakterien müsste diese spontan zu einer fertilen Pflanze regenerieren, damit die Transgene an die Nachkommen weitergegeben werden können. Damit ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu rechnen.

Weiterhin wäre eine mögliche Übertragung der Transgene aus Agrobakterien durch horizontalen Gentransfer in andere Bakterien in der Umwelt in Betracht zu ziehen (siehe 4.2).

4.2. Horizontaler Gentransfer

Ein horizontaler Gentransfer von Pflanzen auf Mikroorganismen kann nicht ausgeschlossen werden (De Vries & Wackernagel, 1998, Gebhard & Smalla, 1998, Nielsen et al., 2000, De Vries et al., 2004). Sollte ein solcher Gentransfer möglich sein, würde es sich um einen natürlichen Mechanismus handeln. Ökologisch relevante Auswirkungen eines Gentransfers wären nur bei Vorliegen eines Selektionsdrucks zugunsten des übertragenen Gens zu erwarten. Weiterhin müsste bei der Bewertung berücksichtigt werden, ob es sich hierbei um ein in entsprechenden Populationen bereits vorhandenes oder um ein neues Gen handelt. Ökologische Konsequenzen eines solchen Gentransfers ohne Vorliegen eines Selektionsdruckes hält die ZKBS jedoch für nicht wahrscheinlich.

4.2.1. Das *cThEn42(GC)*-Gen

Das *cThEn42(GC)*-Gen wurde aus dem bodenbürtigen Pilz *Trichoderma harzianum* isoliert. Selbst im Falle eines Transfers dieses Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz der damit verbundenen Expression einer Endochitinase in der Umwelt nicht erkennbar erhöht. Die Codon-Anpassung an die pflanzliche Codonusage machen zudem eine effiziente Translatierung in Mikroorganismen unwahrscheinlich.

4.2.2. Das *(1,3-1,4)-β-Glucanase*-Gen

Das *(1,3-1,4)-β-Glucanase*-Gen stammt aus einer intragenischen Rekombination zweier Glucanasen aus den bodenbürtigen Bakterien *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans*. Auch dieses Gen wurde codon-optimiert, um eine gute Expression in höheren Pflanzen zu gewährleisten. Selbst im Falle eines Transfers dieses Gens von den gentechnisch veränderten Pflanzen in Mikroorganismen würde das Auftreten des damit verbundenen Phänotyps einer thermostabilen Variante der *(1,3-1,4)-β-Glucanase* keinen erkennbaren Selektionsvorteil mit sich bringen.

4.2.3. 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. Auch für das *bar*-Gen ist also die Möglichkeit der Ausbreitung durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen gegeben. 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.

4.2.4 Das *sGFP*-Gen

Das *sGFP*-Gen entstand durch Austauschmutationen in verschiedenen Tripletts des Gens des „Green Fluorescent Proteins“ aus der Qualle *Aequorea victoria*, das seit langem als Reporter bei Expressionsuntersuchungen an Pro- und Eukaryoten eingesetzt wird. Hinweise auf eine schädigende Wirkung oder einen Selektionsvorteil im Falle einer Übertragung auf Mikroorganismen liegen nicht vor.

4.2.5 Innerhalb der T-DNA gelegene sonstige DNA-Abschnitte

4.2.5.1. Die kodierende Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase sowie *lacI*-Sequenzen aus *E. coli*

Die gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen wurden durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt. Bei diesem Vektor befindet sich die „multiple cloning site“ innerhalb der für das α -Fragment der β -Galaktosidase aus *E. coli* kodierenden Sequenz. Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das α -Fragment alleine ist enzymatisch nicht aktiv. Zudem ist das α -Fragment in den gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen durch Insertion der in die „multiple cloning site“ klonierten Gene unterbrochen, so dass kein funktionsfähiges Genprodukt gebildet werden kann. Dies wäre auch in Bakterien, die das Gen durch einen horizontalen Gentransfer erhalten würden, der Fall.

4.2.5.2. Promotorfragment des *nos*-Gens aus *A. tumefaciens*

Die gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen enthalten innerhalb der T-DNA ein Fragment des Promotors des *nos*-Genes. Auch bei einer Übertragung dieses Fragmentes ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten, da *A. tumefaciens* ein ubiquitär im Boden vorkommendes Bakterium ist. Zudem der Promotor durch zahlreiche Klonierungsschritte nur fragmentarisch erhalten.

4.2.5.3. M13-Sequenzen

pBin19 und Derivate enthalten innerhalb der T-DNA zwei Abschnitte aus M13mp19, nämlich einen 440 bp großen Abschnitt, der einen Teil eines offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfasst sowie einen 433 bp großen Abschnitt, der den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält. Der Phage M13 zählt zu den F-spezifischen *E. coli*-Phagen. Für diese Nukleinsäureabschnitte 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. Sollte es zu einer Expression des Genabschnitts für das Strukturprotein kommen, so würde dies nicht zu einem funktionsfähigen Protein führen, da der Abschnitt nur

für 167 von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Mit einer Funktionsfähigkeit dieses Teils des Strukturproteins in Bakterien ist nicht zu rechnen.

4.2.6. Außerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Mittels Southern Blot-Untersuchung konnte gezeigt werden, dass der bakterielle Selektionsmarker *nptIII* zusammen mit dem inserierten Transposon IS1 aus *Bacillus subtilis* nicht in die Genome der für die Freisetzung vorgesehenen Transformanten übertragen worden ist. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob Teile des übrigen Plasmid-Rückgrates in die gentechnisch veränderte Gerste übertragen worden sind:

- das *tetA*-Gen des Plasmids pRK2, unterbrochen durch die T-DNA;
- das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- ein Fragment des *kilA*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- ein *traF*-Fragment, enthaltend den *oriT* des Plasmids RP4, aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung des Plasmids pUC (*ColE1 ori*) aus *E. coli*.

RK2 gehört zu einer Gruppe von *broad host range*-Plasmiden (u. a. RP1, RP4, R18, R68), die in einer Vielzahl gram-negativer Bakterien replizierbar sind. Für die aus RK2 stammenden DNA-Abschnitte 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 (*kilA*, *tetA*).

Das pUC-Replikon 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 pUC im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

4.2.7. Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *Zea mays*, Cauliflower Mosaic Virus (*CaMV*) und *Agrobacterium tumefaciens*, Genfragmente kodierend für Signalpeptide aus *Hordeum vulgare*. *A. tumefaciens* ist in der Umwelt verbreitet. In Wildtyp-Agrobakterien befinden sich die genannten Sequenzen 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. Mais und Gerste werden als landwirtschaftliche Nutzpflanzen weltweit angebaut..

5. Entsorgung und Nachkontrolle

Es ist vorgesehen, die geernteten Gerstenähren, die nicht für Analysen verwendet werden sollen, zu verbrennen. Die Versuchsfläche soll nach Beendigung der Freisetzung mit einem Herbizid behandelt, und auf der Fläche verbliebene Pflanzenteile sollen zerkleinert und in den Boden eingearbeitet werden. Als Folgefrucht sind dikotyle Kulturpflanzen vorgesehen, die das Auffinden von ggf. auftretenden Gerstenpflanzen ermöglichen. Diese sollen entfernt und vernichtet werden. Es ist vorgesehen, die Nachbeobachtungszeit zu verlängern, falls im Jahr nach der Freisetzung Gerste auf der Freisetzungsfäche aufgefunden wird.

Diese Maßnahmen sind nach Ansicht der ZKBS zur sachgerechten Entsorgung des gentechnisch veränderten Pflanzenmaterials und zur Nachkontrolle der Versuchsfläche ausreichend.

Literatur:

- Bolar, J.P., Norelli, J.L., Wong, K.-W., Hayes, C.K., Harman, G.E., Aldwinckle, H.S. (2000) Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90, 72-77.
- Bolar, J.P., Norelli, J.L., Harman, G.E., Brown, S.K. Aldwinckle, H.S. (2001) Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (T.

- harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10: 533-543.
- Chiu, W.L., Niwa, Y., Zeng, W., Hirano, T., Kobayashi, H., and Sheen, J. (1996) Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Current Biology* 6: 325-330
- De Vries, J., and Wackernagel, W. (1998) Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 257: 606-613.
- De Vries, J., Herzfeld, T, Wackernagel, W. (2004) Transfer of plastid DNA from tobacco to the soil bacterium *Acinetobacter* sp. by natural transformation. *Molecular Microbiology* 53, 323-334.
- Eastham, K., and Sweet, J. (2002) Genetically modified organisms(GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer. *Environmental Issue Report 28*, European Environment Agency, Copenhagen
- Gebhard, F. and Smalla, C. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugarbeet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1550-1154.
- Hadjantonakis, A.K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., and Nagy, A. (1998) Generating green fluorescent mice in germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mechanisms of Development* 76: 79-90
- Hammer, K. (1977) Fragen der Eignung des Pollens der Kulturgerste (*Hordeum vulgare* L.s.l.) für die Windbestäubung. *Kulturpflanze* 25: 13-23
- Higashijima, S., Okamoto, H., Ueno, N., Hotta, Y., and Eguchi, G. (1997) High frequency generation of transgenic zebra fish which reliably express GFP in whole muscles or the whole body by using promoters of zebra fish origin. *Developmental Biology* 192: 289-299
- Harman, G.E., Hayes, C.K., Lorito, M., Broadway, R.M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Tronsmo, A. (1993) Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of chitobiosidase and endochitinase. *Phytopathology* 83, 313-318.
- Hayes, C.K., Klemsda, S., Lorito, M., Di Pietro, A., Peterbauer C., Nakas, J.P., Tronsmo, A., Harman, G.E. (1994) Isolation and sequence of an endochitinase encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. *Gene* 138, 143-148.

- Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toros, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F. (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. PNAS 95, 7860-7865.
- Mora, A., and Earle, E.D. (2001) Resistance to *Alternaria brassiciola* in transgenic broccoli expressing a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. Molecular breeding 8(1):1-9
- Nielsen, K.M., Elsas, J.D. van, Smalla, K. (2000) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 (pFG4 Δ nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and effects of kanamycin on selection of transformants. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1237-1242.
- Richards, H.A., Han, C.T., Hopkins, R.G., Failla, M.L., Ward, W.W., and Steward, Jr., C.N. (2003) Safety assessment of recombinant green fluorescent protein orally administered to weaned rats. Journal of Nutrition 133: 1909-1912
- Ritala, A., Nuutila, A.M., Aikasalo, R., Kauppinen, V., and Tammissola, J. (2002) Measuring gene flow in the cultivation of transgenic barley. Crop Science 42: 278-285
- Wagner, D.B., and Allard, W.B. (1991) Pollen migration in predominately self-fertilising plants: Barley. Journal of heredity 82: 392-404
- Wu, Y. (2003) Transformation of barley for resistance to *Rhizoctonia* root rot. Ph.D. thesis. Washington State University, Department of Plant Pathology

Abstimmungsergebnis:

Berlin, den 07.02.2005

Prof. Dr. Schaal

Vorsitzender der ZKBS

Legu 14/12 05

2. v. A. z. K.: 403 *Lh 14/12 05*
3. Koord: An die Mitglieder des Arbeitskreises Freisetzung *HL 16/12.05 Ree*
4. Kopie der Reinschrift an: G. Leggewie *HL*.
5. z. d. A.

\Sekretariat2-(ab2004)\ZKBS\FREISTEL\Entwürfe\168 Stellungnahme ZKBS Entwurf.DOC