



Justus-Liebig-Universität Gießen - Postfach 11 14 40 - 35359 Gießen

Dezernat B -

Recht, Zentrale Aufgaben, Sicherheit
und Angelegenheiten der Studierenden

Telefon [REDACTED]

Telefax [REDACTED]

E-Mail: [REDACTED]

35390 Gießen, 15.10.2008
Ludwigstraße 23

Bearbeiter: [REDACTED]
Az.: B 3.3 - GenTG Freisetzung
Freisetz IPAZ-BVL16.doc

An das
Bundesamt für Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit (BVL)
Abteilung 4 „Gentechnik“
Mauerstr. 39-42
10117 Berlin

L	BVL	Mauerstraße 39-42 10117 Berlin				
Pr	17. Okt. 2008 16526					
Z						
Vw						
IT						
WV						
Abt. Refr.			1	2	3	4

ivl 20.10.08

iv. legs 400 Jahre
UNIVERSITÄT GIESSEN

*Word: 2. Betriebsbeho 1607-2007
+ Land, 2. d. A.*

Vollzug des Gesetzes zur Regelung der Gentechnik (GenTG)

Beantragung der Genehmigung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen gemäß § 14 Abs. 1 Satz 1 Nr. 1 in Verbindung mit §§ 15 (1) und 16 GenTG

Freisetzung gentechnisch veränderter Gerste auf dem Gelände der Fa. AgroBiotechnikum, Bioinnovativ GmbH, Groß Lüsewitz (Kreis Bad Doberan, Mecklenburg-Vorpommern) in den Vegetationsperioden (März-September) der Jahre 2009 und 2010

Sehr geehrte Damen und Herren,

als Anlage sende ich Ihnen die Antragsunterlagen in 6-facher Ausführung für die Genehmigung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen (Gerste, *Hordeum vulgare*). Das Original mit der rechtsverbindlichen Unterschrift wird Ihnen über den Dienstweg durch das Hessische Ministerium für Wissenschaft und Kunst (HMWK) zugeleitet.

Der geplante Freisetzungsversuch soll vom Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (IPAZ), Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen, unter der Projektleitung von [REDACTED] in den Jahren 2009-2010 durchgeführt und im Rahmen eines BMBF-geförderten Projektes zur biologischen Sicherheitsforschung wissenschaftlich betreut werden.

Mit freundlichen Grüßen

i.A. Dr. Wilfried Lühs

Anlage (Antrag 6-fach)

**Antrag auf Freisetzung von gentechnisch modifizierter Gerste nach
dem Gentechnikgesetz v. 16.12.1993 in seiner novellierten Fassung
vom 01.04.2008**

Folgende Gesetze und Verordnungen regeln die Freisetzung von GVO:

1. Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz – GenTG) zuletzt geändert durch Art. 1 G v. 1.4.2008; I 499,

Antrag auf Freisetzung von gentechnisch modifizierter Gerste nach dem Gentechnikgesetz v. 16.12.1993 in seiner novellierten Fassung vom 01.04.2008	1
I. Kurzbeschreibung des Vorhabens	6
Betreiber	6
Zweck der Freisetzung	6
Kurze Beschreibung der freizusetzenden Organismen	6
Ort und Zeitraum der Freisetzung, Größe der Freisetzungsfäche.....	7
Anzahl der freizusetzenden Organismen	8
Kurze Beschreibung der Versuchsdurchführung.....	8
Zusammenfassung der Risikobewertung.....	8
II. Angaben zum Betreiber und Projektleiter.....	11
a) Betreiber	11
Name, Qualifikation und Erfahrung der verantwortlichen Wissenschaftler	11
b) Projektleiter	11
III. Angaben zum Beauftragten für biologische Sicherheit.....	13
Name, Qualifikation und Erfahrung der verantwortlichen Wissenschaftler	13
c) Beauftragter für biologische Sicherheit (BBS)	13
IV. Ausführliche Information zum Vorhaben.....	14
A. Generelle Information	14
1. Name und Adresse des Betreibers	14
2. Zweck der Freisetzung	14
3. Titel des Projekts	14
B. Informationen über (A) die Empfänger – oder (B) (falls zutreffend) auf die Elternpflanzen – <i>Hordeum vulgare</i> L.....	15
1. Vollständiger Name: <i>Hordeum vulgare</i> L.	15
2. (a) Information über die Fortpflanzung	15
(i) Form(en) der Fortpflanzung	15
(ii) gegebenenfalls spezielle, die Fortpflanzung beeinflussende Faktoren	15
(iii) Generationsdauer	15
(b) Kreuzbarkeit mit anderen Kultur- und Wildpflanzenarten	15
3. Überlebensfähigkeit	16
(a) Fähigkeit zur Bildung von Überlebens- oder Dormanzstrukturen:	16
(b) gegebenenfalls spezielle, die Überlebensfähigkeit beeinflussende Faktoren:	17
4. Ausbreitungsfähigkeit	17
(a) Art und Grad der Ausbreitungsfähigkeit	17
(b) gegebenenfalls spezielle, die Ausbreitungsfähigkeit beeinflussende Faktoren:	17
5. Geographische Verbreitung	17
6. Bei Pflanzen die im/in Mitgliedstaat(en) üblicherweise nicht angebaut werden, Beschreibung des natürlichen Lebensraumes der Pflanze, einschließlich Informationen über natürliche Episiten, Parasiten, Konkurrenten und Symbionten	17
7. Möglicherweise signifikante Wechselwirkungen der Pflanze mit nichtpflanzlichen Organismen im Ökosystem, in dem sie üblicherweise angebaut wird, einschließlich Informationen über toxische Effekte auf Mensch und Tier oder andere Organismen.	17
C. Informationen über die gentechnische Veränderung	19

1.	Beschreibung der zur genetischen Veränderung angewandten Verfahren	19
2.	Art und Herkunft des verwendeten Vektors	19
3.	Größe, Herkunft (Bezeichnung des Spenderorganismus/der Spenderorganismen) und geplante Funktion jedes konstituierenden Fragments der für die Insertion vorgesehenen Region	20
D.	Informationen über die gentechnisch veränderte Pflanze (GVP).....	22
1.	Beschreibung der eingeführten oder veränderten Merkmale und Eigenschaften	22
2.	Informationen über die tatsächlich eingefügten/deletierten Sequenzen	23
(a)	Größe und Struktur des Inserts und Verfahren zu dessen Charakterisierung, einschließlich Informationen über jegliche in die GVP eingeführte Teile des Vektors oder einen Carrier oder fremde DNA, die im GVP bleibt:	23
(b)	bei einer Deletion, Größe und Funktion des/der deletierten Abschnitt(e):	24
(c)	Lokalisation des Inserts in den Pflanzenzellen (integriert in nicht integrierter Form in: Chromosom, Chloroplasten, Mitochondrien) und Verfahren zu seiner Bestimmung	24
(d)	Anzahl der Kopien des Inserts:	24
3.	Informationen über die Expression des Inserts	25
(a)	Informationen über die Expression des Inserts und Verfahren für ihre Charakterisierung:	25
(b)	Pflanzenteile, in denen das eingefügte Insert exprimiert wird (z.B. Wurzeln, Spross, Pollen usw.)	25
4.	Informationen über Unterschiede zwischen der GVP und der Empfängerpflanze im Hinblick auf	25
(a)	Form(en) und/oder Rate der Fortpflanzung:	25
(b)	Ausbreitungsfähigkeit	26
(c)	Überlebensfähigkeit	26
5.	Genetische Stabilität des Inserts	26
6.	Fähigkeit zum Transfer des gentechnisch eingefügten oder veränderten Materials von GVP in andere Organismen	26
7.	Informationen über toxische, allergene oder schädliche Effekte auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt, die durch die gentechnische Veränderung hervorgerufen werden	27
8.	Informationen über die Sicherheit der GVP für die Tiergesundheit, insbesondere in Bezug auf toxische, allergene oder sonstige schädliche Effekte auf Grund der genetischen Modifikation, falls die GVP für die Verwendung in Tierfutter vorgesehen ist	29
9.	Mechanismen der Wechselwirkung zwischen den GVP und den Zielorganismen (falls zutreffend)	29
10.	Mögliche signifikante Wechselwirkungen mit Nichtzielorganismen	31
11.	Mögliche Wechselwirkungen mit der abiotischen Umgebung	32
12.	Beschreibung der Nachweis- und Identifizierungsverfahren für die GVP	32
13.	Gegebenenfalls Informationen über frühere Freisetzungen der GVP	32
E.	Informationen über den Ort der Freisetzung	33
1.	Lage und Größe der Freisetzungsfläche	33
2.	Beschreibung des Ökosystems am Ort der Freisetzung, einschließlich Klima, Flora und Fauna	34
3.	Vorhandensein geschlechtlich kompatibler, wilder verwandter Arten oder Kulturpflanzen	35

4.	Nähe zu offiziell anerkannten geschützten Biotopen oder Schutzgebieten, die betroffen werden können	35
F.	Informationen über die Freisetzung (nur bei Anmeldungen gemäß Artikel 5).....	37
1.	Zweck der Freisetzung	37
2.	Zeitplan für die Freisetzung einschließlich Zeitpunkt(e) und Dauer der Freisetzung(en)	37
3.	Für die Freisetzung angewandte Methoden	37
4.	Verfahren zur Vorbereitung und Überwachung des Freisetzungsgeländes vor, während und nach der Freisetzung, einschließlich Anbaupraktiken und Ernteverfahren	38
5.	Ungefähre Anzahl der Pflanzen (oder Pflanzen pro m ²)	38
G.	Informationen über Überwachung, Kontrollmaßnahmen, Notfallplan und Entsorgung (Nur für Anmeldungen gemäß Artikel 5)	39
1.	Vorgesehene Vorsichtsmaßnahmen	39
(a)	Abstand zu kreuzbaren Pflanzenarten	39
(b)	Verfahren zur Minimierung/Vermeidung von Pollen- oder Samenverbreitung	39
2.	Beschreibung der Verfahren zur Behandlung des Versuchsbereiches nach der Freisetzung	40
3.	Beschreibung der Verfahren zur Behandlung von GVP-Ernten; geplante Entsorgungsverfahren	40
4.	Beschreibung von Überwachungstechniken und -plänen	40
5.	Beschreibung der Notfallpläne	41
6.	Methoden und Verfahren zum Schutz des Standortes	41
H.	Informationen über die möglichen Umweltauswirkungen der Freisetzung der GVP	42
	Merkmale der GVP und der Freisetzung	42
1.	Risikoabschätzung	43
i.	Wahrscheinlichkeit einer gesteigerten Persistenz der GVP in landwirtschaftlichen Habitaten bzw. einer gesteigerten Invasivität in natürlichen Habitaten	43
ii.	Selektionsvor- und -nachteile, die den GVP verliehen werden	44
iii.	Potenzial für Gentransfer zu denselben oder anderen kreuzbaren Pflanzenarten unter den Anbaubedingungen der GVP und diesen Pflanzenarten verliehene Selektionsvor- und -nachteile	45
iv.	Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Umweltauswirkungen, resultierend aus direkten oder indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Zielorganismen, wie Prädatoren, Parasitoiden und Pathogenen (falls zutreffend)	46
v.	Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Umweltauswirkungen, resultierend aus direkten oder indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Nichtzielorganismen (unter Berücksichtigung von Organismen, bei denen Wechselwirkungen mit Zielorganismen bestehen), einschließlich Auswirkungen auf die Populationsgrößen von Kompetitoren, Herbivoren, Symbionten (falls zutreffend), Parasiten und Pathogenen	47
vi.	Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, die aus potenziellen direkten und indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Personen resultieren, die mit	

der GVP arbeiten oder in direkten Kontakt damit kommen oder in die Nähe der GVP-Freisetzung(en) kommen	49
vii. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Auswirkungen auf die Tiergesundheit und Konsequenzen für die Nahrungsmittel-/Futterkette, die aus dem Verzehr der GVP und jeglicher davon stammender Produkte resultieren, falls diese als Tierfutter verwendet werden sollen	50
viii. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Auswirkungen auf biogeochemische Prozesse, die die Tiergesundheit und Konsequenzen für die Nahrungsmittel-/Futterkette, die aus potenziellen direkten und indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Ziel- und Nichtzielorganismen in der Nähe der GVP-Freisetzung(en) resultieren	50
ix. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende, direkte oder indirekte Umweltauswirkungen der bei der GVP angewendeten spezifischen Kultivierungs-, Bearbeitungs- und Erntetechniken, falls diese sich von den bei nicht-GVP angewendeten Techniken unterscheiden	51
V. Literatur	52
VI. Anhang I.....	55
Anhang II.....	74
Anhang III.....	82
Anhang IV.....	83
Anhang V.....	84

I. Kurzbeschreibung des Vorhabens

Betreiber

Die Justus-Liebig-Universität Gießen, vertreten durch den Präsidenten, Ludwigstraße 23, 35390 Gießen, beantragt gemäß § 14 Abs. 1 Satz 1 Nr. 1 in Verbindung mit § 15 Abs. 1 GenTG die Genehmigung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Gerstenpflanzen. Die Durchführung und wissenschaftliche Betreuung des Freisetzungsversuchs erfolgt durch das Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie (IPAZ), Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Gießen.

Zweck der Freisetzung

Die Feldstudien beinhalten eine gezielte Evaluation der Interaktionen zwischen den transgenen Gerstenlinien pYW210-9-(4001-4360) bzw. pJH271-Beta-Glu-307 und einem symbiontischen Pilz (*Glomus intraradices*, kommerzielles Präparat Amykor® Wurzel-Vital). Ein weiteres Ziel ist eine umfassende epidemiologische Aufzeichnung auftretender pilzlicher Krankheiten auf den gentechnisch modifizierten Pflanzen im Vergleich zur/m respektiven Empfängerpflanze (Golden Promise) bzw. Kreuzungselter (Baronesse). pYW210-9-(4001-4360) wurde mit einer 42-kDa *Endochitinase* (*cThEn42(GC)*) aus dem bodenbürtigen Mycoparasiten *Trichoderma harzianum* transformiert, um die Resistenz von Gerste gegenüber den pilzlichen Schaderregern *Rhizoctonia solani* AG-8 und *Rhizoctonia oryzae* zu erhöhen. Die *Endochitinase* steht in pYW210-9-(4001-4360) unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors des *Ubiquitin*-Gens aus Mais und dem Signalpeptid der 33 kDa *Chitinase* der Gerste. Das Gen wird daher in allen Pflanzenteilen exprimiert. Die *Endochitinase* bewirkt den Abbau von Chitin, das Bestandteil der Hyphenwänden echter Pilze (Fungi), die entweder Schaderreger oder Symbionten sein können. Somit ist ein Einfluss sowohl auf pilzliche Schaderreger als auch Symbionten denkbar. Die Expression der *(1,3-1,4)-β-Glucanase* in pJH271-Beta-Glu-307 wird durch den Endosperm-spezifischen Promotor und das Signalpeptid des *D Hordein*-Gens *Hor 3-1* aus Gerste kontrolliert. Die *Glucanase* wurde durch intragenische Rekombination zweier *(1,3-1,4)-β-Glucanasen* aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* generiert. Auf Grund des verwendeten Endosperm-spezifischen Promotors ist die Expression des Gens räumlich und zeitlich auf das sich entwickelnde Korn begrenzt. Die Aktivität des rekombinanten Enzyms bleibt jedoch bis zur Kornkeimung erhalten. Daher sind keine Effekte auf pilzliche Blattpathogene zu erwarten. Dennoch ist von einer räumlich begrenzten Exposition der *Glucanase* vom keimenden Korn in den Boden auszugehen, was die Besiedlung der Wurzel durch symbiontische und parasitische Pilze beeinflussen könnte.

Mit Hilfe der Freisetzungsversuche können Erkenntnisse über den Wirkungsgrad und über die Spezifität der rekombinanten Proteine gewonnen werden. Die Freisetzungsversuche erlauben auftretende pilzliche Krankheiten in den GVP zu erfassen und epidemiologisch zu bewerten sowie die wichtige Frage nach dem Einfluss der rekombinanten Proteine auf mutualistische Wechselwirkungen von Pflanze und symbiontischem Pilz unter Feldbedingungen zu untersuchen.

Kurze Beschreibung der freizusetzenden Organismen

Bei den freizusetzenden Organismen handelt es sich um gentechnisch veränderte Gerstenpflanzen (*Hordeum vulgare* L.) der Varietät Golden Promise. Auf Grund wiederholter Kreuzungen basiert die Linie pJH271-Beta-Glu-307 auf der Varietät Baronesse. pYW210-9-(4001-4360) wurde mit einer 42-kDa *Endochitinase* (*cThEn42(GC)*) aus dem bodenbürtigen Mycoparasiten *Trichoderma harzianum* transformiert, die unter der Kontrolle eines Promotors des *Ubiquitin*-Gens aus Mais steht und dem Signalpeptid der 33 kDa *Chitinase* der Gerste. Folglich wird das Transgen in allen Pflanzenteilen exprimiert. Der G+C-Gehalt des Gens wurde von 53,3% auf 65,1% erhöht, um die Expression des mikrobiellen Enzyms in der Gerste zu ermöglichen. pJH271-Beta-Glu-307 exprimiert eine *(1,3-1,4)-β-Glucanase*, die über den aus Gerste isolierten Endosperm-spezifischen Promotor des *D Hordein*-Gens *Hor*

3-1 und dessen Signalpeptid kontrolliert wird, wodurch die Expression des Gens auf die Phase der Kornentwicklung begrenzt ist. Die Aktivität des rekombinanten Enzyms setzt sich jedoch bis zur Kornkeimung fort. Die (1,3-1,4)- β -Glucanase entstand durch intragenische Rekombination zweier (1,3-1,4)- β -Glucanasen aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans*. Das Gen entstand durch die Hybridisierung der Aminosäuren 1-12 von *B. amyloliquefaciens* und der Aminosäuren 13-214 von *B. macerans*, wobei die Aminosäure 13 aus *B. amyloliquefaciens* entfernt wurde. Um die Synthese des Gens in Gerste zu gewährleisten, wurde der G+C-Gehalt im kodierenden Bereich des Gens auf 63% erhöht. Dies geschah durch den Austausch von A oder T zu G oder C an der dritten Position von 141 Codons. Das Enzym ist an zwei Stellen glykosyliert, um dessen Hitzestabilität zu erhöhen. Die in pJH271-Beta-Glu-307 exprimierte (1,3-1,4)- β -Glucanase besitzt eine Halbwertszeit von 4 h bei 70°C und einem pH Wert von 5,0.

Zur Transformation der Pflanzen wurde der „*Agrobacterium*-vermittelte Gentransfer“ eingesetzt. Bei dieser Art der Übertragung von Erbinformationen auf Pflanzen wird die natürliche Fähigkeit des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* genutzt, einen bestimmten Bestandteil von Plasmiden, nämlich die so genannte T-DNA (Transfer-DNA) der Ti-Plasmide, stabil in das Erbgut von Pflanzen einzubauen. Man bezeichnet die Plasmide, die eine übertragbare T-DNA besitzen, als "Vektoren". Die aus dem Vektor in das pflanzliche Erbgut stabil eingefügten DNA-Sequenzen werden wie die pflanzeigene Erbinformation vererbt. Beim Transformationsprozess werden immer nur wenige Zellen der Ausgangspflanze transformiert. Um diese Zellen von den übrigen unterscheiden zu können, werden sie mit einem "Marker" versehen. Für die oben beschriebenen Linien wurde als Marker das *Bar*-Gen verwendet. Bei diesem Gen handelt es sich um die *Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT)*, die ebenfalls unter Kontrolle des Promotors des *Ubiquitin*-Gens (*Ubi-1*) aus Mais steht. Dieses Markergen ermöglicht transformierten Zellen, auf einem mit dem Herbizid Bialaphos versetzten Medium zu wachsen. Als zusätzliches Markergen wurde in der Linie pJH271-Beta-Glu-307 das *synthetische Grün Fluoreszierende Protein (sGFP)* verwendet. Da GFP bei einer bestimmten Wellenlänge des Lichts fluoresziert, können transformierte Zellen identifiziert werden. Das Gen steht unter Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohl-Mosaik-Virus (*CaMV*). Die Transkription der *Endochitinase (cThEn42(GC))*, (1,3-1,4)- β -Glucanase und aller Markergene wird durch das Polyadenylierungssignal des *Nopalin-Synthase*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* terminiert. Die Genprodukte des Bialaphos-Resistenzgens, der *Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT)*, und des sGFP sind gut untersucht und es besteht kein Hinweis auf Allergenität. Fütterungsversuche mit Mäusen zeigten keine Toxizität. PAT wurde zudem durch die EPA (Environmental Protection Agency, USA) 1997 von einer Toleranzkennzeichnung für alle landwirtschaftlichen Rohstoffe befreit. Für die in den jeweiligen Gerstenlinien exprimierten Genprodukte, Endochitinase und (1,3-1,4)- β -Glucanase, gibt es keine Hinweise auf toxische oder allergene Wirkungen.

Die *Endochitinase (cThEn42(GC))* in Linie pYW210-9-(4001-4360) zielt auf eine erhöhte Resistenz gegenüber den pilzlichen Schaderregern *Rhizoctonia solani* AG-8 und *Rhizoctonia oryzae* ab, während die auf das sich entwickelnde Korn räumlich und zeitlich begrenzte Expression der (1,3-1,4)- β -Glucanase in Linie pJH271-Beta-Glu-307 einen verbesserten Abbau der (1,3-1,4)- β -Glucane im Endosperm und Aleuron während der Keimung bewirkt. Diese Modifikation verbessert den Futterwert der Gerstenkörner und die Mälzungseigenschaften im Bierbrauprozess.

Ort und Zeitraum der Freisetzung, Größe der Freisetzungsfäche

Die Freisetzung der gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen soll auf dem Gelände des AgroBiotechnikums Gemeinde 18184-Thulendorf (Mecklenburg-Vorpommern, Landkreis Bad Doberan) stattfinden. Die Freisetzung erfolgt in der Gemarkung Klein Lüsewitz. Die vorgesehene Versuchsfläche erstreckt sich über die Flure 1 (Flurstücke: 54, 18, 19) und 2 (Flurstücke: 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54). Sie hat eine Gesamtfläche von 46,3 ha und befindet sich nördlich der B110 zwischen Rostock und Sanitz. An das Feldstück grenzt im Westen die Ortschaft Sagerheide. In etwa 1 km Entfernung liegt die Ortschaft Groß Lüsewitz, Sanitz ist etwa 3 km entfernt. Der Versuchsumfang beinhaltet maximal 4000 GVP auf einer

Versuchsfläche von ca. 777,6 m² inklusive Mantelsaat. Die Freisetzungsfläche (= mit GVP bestandene Fläche) beträgt 9,6 m² (s. Anhang III).

Die Freisetzung ist für die Vegetationsperiode (März-September) der Jahre 2009-2010 geplant.

Anzahl der freizusetzenden Organismen

In den Jahren 2009-2010 werden die zwei transgenen Linien und die respektiven Ausgangspflanzen in einer Aussaatstärke von 300 Körnern/m² ausgesät. Der Freisetzungsversuch wird mit drei randomisierten Wiederholungen pro Linie und Behandlung in einer Spaltanlage durchgeführt. Es werden maximal 4000 transgene Pflanzen pro Jahr angebaut.

Kurze Beschreibung der Versuchsdurchführung

Der Freisetzungsversuch wird in einer Spaltanlage mit drei randomisierten Wiederholungen pro Linie und Behandlung durchgeführt. Es werden insgesamt 4 Linien (2 transgene, 2 konventionelle) 3 Behandlungen unterzogen (Gesamtanzahl der Parzellen: 36).

Die Aussaat erfolgt mit in Versuchsarbeiten üblichen Drillmaschinen oder durch andere geeignete Verfahren (einschließlich Handaussaat). Die Drillmaschinen werden nach der Aussaat auf dem Freisetzungsgelände von eventuell noch vorhandenem transgenem Saatgut gereinigt. Dadurch wird eine Verschleppung transgenen Saatguts verhindert.

Der Freisetzungsversuch wird von einem 5 m breiten Randstreifen mit konventioneller Gerste (Sorte Scarlett) umfasst, der wiederum von Schwarzbrache (Breite: 5 m) umgeben ist.

Nach der Beendigung des Versuchs werden die Ähren der GVP und konventionellen Kulturgerste der Parzellen per Hand geerntet. Der Randstreifen mit der konventionellen Gerste wird maschinell geerntet. Geerntete Ähren/Körner werden sofort in entsprechend deklarierte Säcke verpackt und in geschlossenen Behältnissen in zertifizierte S1-Laboratorien verbracht (laut Richtlinie 90/219/EEC).

Nicht benötigtes Saatgut und nicht für Analysen benötigtes Erntegut (auch das aus der Mantelsaat) wird durch Hitzebehandlung inaktiviert.

Zusammenfassung der Risikobewertung

Die zwei gentechnisch modifizierten Gerstenlinien pYW210-9-(4001-4360) und pJH271-Beta-Glu-307 unterscheiden sich von konventioneller Gerste durch die Expression einer *Endochitinase* und einer *Phosphinothricin-Acetyltransferase* bzw. einer (1,3-1,4)- β -*Glucanase*, einer *Phosphinothricin-Acetyltransferase* und eines *synthetischen Grün Fluoreszierenden Proteins*. Unter nicht selektiven Bedingungen sind die Pflanzen phänotypisch nicht von untransformierten Kontrollpflanzen zu unterscheiden. Chitin und (1,3-1,4)- β -Glucane, die Substrate der respektiven, rekombinanten Enzyme der transgenen Gerstenlinien, sind Polysaccharide und Bestandteil der Hyphenwände pflanzenbesiedelnder, pilzlicher Organismen bzw. der Zellwände der Poaceae. Ob Glucane pilzlicher Hyphenwände von der hier beschriebenen (1,3-1,4)- β -Glucanase abgebaut werden können, wurde bisher nicht untersucht. Es ist denkbar, dass beide transgene Linien ein generell verbessertes Abwehrpotenzial gegenüber pilzlichen Schaderregern besitzen, wenngleich im Falle von pJH271-Beta-Glu-307 die Aktivität der (1,3-1,4)- β -Glucanase räumlich und zeitlich auf das sich entwickelnde und keimende Korn begrenzt ist, und somit nur in diesem Bereich interagierende Schaderreger betroffen wären. Dies könnte bei starkem Auftreten von Schaderregern zumindest bei pYW210-9-(4001-4360) zu einem Selektionsvorteil gegenüber konventioneller Gerste führen. Dieser Aspekt soll in den Freisetzungsversuchen evaluiert werden. Ein negativer Effekt könnte die Expression beider Transgene auf

wurzelbesiedelnde, pilzliche Symbionten ausüben. Sollte die antifungale Wirkung der rekombinanten Enzyme auf pilzliche Symbionten übertragen werden, würden die gentechnisch veränderten Pflanzen mit einem geringeren Wachstum auf nährstoffarmen Böden reagieren. Folgerichtig ist die Analyse der Besiedlung der transgenen Linien ebenfalls Bestandteil der Freisetzungsversuche. Bisherige Untersuchungen in Tabak zeigten keinen Einfluss verschiedener, konstitutiv exprimierter Chitinasen auf die Besiedlung durch den Mykorrhizapilz *Glomus mosseae*. Neben der Wirkungsspezifität der rekombinanten Proteine kann mit Hilfe der Freisetzungsversuche der Einfluss der modifizierten Pflanzen auf pilzliche Organismen definiert werden.

Direkte Auswirkungen der GVP auf Nichtzielorganismen sind in diesen Feldversuchen unwahrscheinlich. (i) Betrachtet man die Wirkungsweise der Glucanase, spricht deren auf die Kornkeimung begrenzte Expression und hohe Substratspezifität für die (1,3-1,4)- β -Glucane des Endosperms und Aleurons gegen direkte Auswirkungen. (ii) Im Falle der Endochitinase werden Insekten als Nichtzielorganismen angesehen. Auf Grund der Zusammensetzung und/oder des Aufbaus Chitin enthaltender Kompartimente (Exoskelett, peritrophe Membran) ist eine negative Wirkung des Enzyms sehr unwahrscheinlich. (iii) Bisherige Feldversuch in den USA zeigten keine Auffälligkeiten in der Entwicklung und dem Fressverhalten von Schädlingen (z.B. Blattläuse) und Prädatoren (z.B. Marienkäfer) und sonstiger Nichtzielorganismen. (iv) Es handelt sich bei dem Feldversuch um eine Freisetzung von geringem Umfang. Pflanzenteile oder -organe werden nicht in die Nahrungs- oder Futterkette gelangen.

Eine Übertragung in Pflanzen eingeführter Gene auf Organismen anderer Reiche (Horizontaler Gentransfer), insbesondere auf Bodenmikroorganismen kann nicht ausgeschlossen werden, wird aber derzeit als sehr unwahrscheinlich bewertet. Sie beruht auf der Aufnahme von DNA durch Bodenbakterien oder Pilze. Um zur Ausprägung zu gelangen, müsste das Gen in Bakterien übertragen und dort repliziert werden. Da hierzu mindestens vier Schritte notwendig sind, (i) Entlassung des intakten Resistenzgens mit einem "origin of replication" aus der Pflanzenzelle, (ii) Aufnahme durch kompetente Bakterien, (iii) Ringschluss zu einem Plasmid und (iv) Expression des Gens, ist der Gentransfer von Pflanzen auf Bakterien und deren Ausprägung ein sehr seltenes Ereignis.

Die für die Transformation verwendeten Plasmide (pJH271, pYW210) basieren auf dem Plasmid pBIN 19. Außerhalb der T-DNA des pBIN19 ist ein Kanamycin-Resistenzgen gelegen (*nptIII*), welches eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase kodiert. In seltenen Fällen können Vektorsequenzen über die T-DNA hinaus übertragen werden. Southern Blot Analysen zeigten jedoch, dass *nptIII* weder in seiner Gesamtheit noch in Fragmenten in das Genom der Linien pJH271-Beta-Glu-307 und pYW210-9-(4001-4360) integriert wurde (s. Anhang V und Abschnitt D 2 (a) b)). Daher kann in diesem Fall eine Übertragung des Gens auf Mikroorganismen ausgeschlossen werden

Die fehlende Konkurrenzfähigkeit und folglich fehlende Invasivität der Kulturgerste in natürliche Habitate in Deutschland bewirkt, dass ihr Wachstum und ihre Ausbreitung strikt an ackerbauliche Maßnahmen gebunden sind. Neben der Samenausbreitung ist bei Gerste auch die Pollenausbreitung stark reduziert. Gerste ist Selbstbestäuber mit einer Selbstbefruchtungsrate von ~99%, was durch die kleistogame Blütenmorphologie unterstützt wird. Als potenzielle Pollenempfänger müssen andere Getreidearten, *Elymus* sp. und Wildgersten angesehen werden, wenngleich Kreuzbestäubungen unter natürlichen Bedingungen nur mit *Elymus* sp. möglich sind, aber kaum stattfinden. Die künstlich oder natürlich erzeugten Hybriden sind jedoch in jedem Fall steril.

Der Aufbau des Feldversuchs beinhaltet Maßnahmen zur Minimierung des Pollenflugs und der Kreuzbestäubung. (i) Die Flora der Versuchsfläche wird vor, während und nach Beendigung der Freisetzung auf mögliche, sexuell kompatible Arten überprüft. Auftretende Arten werden entfernt und durch Hitzebehandlung inaktiviert (ii) Das Versuchsfeld wird von einem 5 m breiten Randstreifen mit konventioneller Gerste (Sorte Scarlett) umfasst, der wiederum von Schwarzbrache umgeben ist (Breite: 5 m). (iii) Daran schließt sich ein 25 m breiter Streifen einer dikotylen Kultur an. (iv) Die konventionelle Gerste des Randstreifens wird nach Versuchende maschinell geerntet und inaktiviert.

Gerste kann durch ihre Samen überdauern bzw. überwintern und im Folgejahr auskeimen. Daher wird die Versuchsfläche während und nach Beendigung der Freisetzung sorgfältig und regelmäßig kontrolliert. Um Durchwuchs im folgenden Jahr eindeutig zu identifizieren, wird die Versuchsfläche mit einer dikotylen Kulturpflanze bestellt. Durchwachsende Gerstenpflanzen werden entfernt und durch Hitzebehandlung inaktiviert bzw. mit einem entsprechenden Herbizid vernichtet. Im Falle von Durchwuchs verlängert sich der Beobachtungszeitraum automatisch um ein Jahr.

Zusammenfassend handelt es sich bei diesem Feldversuch um eine epidemiologische Evaluation pilzlicher Krankheiten an gentechnisch modifizierten Gerstenpflanzen verbunden mit einer für die Sicherheitsforschung relevanten Fragestellung über den Einfluss der rekombinanten Proteine auf symbiontische Pflanze-Pilz Interaktionen. Die Feldversuche sind von geringem Umfang und sorgfältig geplant, um eine Isolation der GVP bestmöglich zu gewährleisten. In der vorab durchgeführten Risikoabschätzung wurden die Auswirkungen auf Mensch und Umwelt als minimal bewertet. Ähnliche seit etwa 8 Jahren in den USA in großem Maßstab mit denselben GVO durchgeführte Feldversuche ergaben keine unerwünschten Auswirkungen auf Menschen und Umwelt.

Adressen:

Feldversuchsstandort:
AgroBiotechnikum
Biovativ GmbH
18184 Thulendorf
Landkreis Bad Doberan
Mecklenburg-Vorpommern

Betreiber:

Justus-Liebig-Universität, der Präsident, Ludwigstrasse 23, 35390 Gießen
Ausführend Stelle: Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie, Heinrich-Buff-Ring
26-32, 35392 Gießen

II. Angaben zum Betreiber und Projektleiter

a) Betreiber

Justus-Liebig-Universität Gießen,
Der Präsident
Ludwigstraße 23,
35390 Gießen

Ansprechpartner: [REDACTED]
Verwaltung
Dezernat B, Abteilung B 3.3
Ludwigstrasse 23
35390 Gießen
Tel [REDACTED]

[REDACTED]
Präsident
der Justus-Liebig-Universität
Ludwigstraße 23
D-35390 Gießen

14.10.08
Datum

[Handwritten Signature]
Unterschrift des Betreibers

Name, Qualifikation und Erfahrung der verantwortlichen Wissenschaftler

b) Projektleiter

1. Name, Vorname:

[REDACTED]
Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie
Heinrich-Buff-Ring 26-32
35392 Gießen
Tel [REDACTED]

2. Sachkunde

- 2.1. Abschluss eines Studiums der Naturwissenschaften
Diplom-Biologe, RWTH Aachen 1981
- 2.2. Mindestens dreijährige Tätigkeit auf dem Gebiet der Gentechnik, insbesondere Molekularbiologie.
Seit 1990 ununterbrochen tätig in registrierten S1-Genlaboren
- 2.3. Abschluss einer anderen Aus-, Fort- oder Weiterbildung
- 2.3.2. Praktische Erfahrungen im Umgang mit Mikroorganismen: Ja
- 2.4. Fortbildungsveranstaltung zu Sicherheitsmaßnahmen/Arbeitsschutz: Ja
- 2.4.1. Wurde eine Fortbildungsveranstaltung zu Sicherheitsmaßnahmen und Arbeitsschutz bei gentechnischen Arbeiten besucht? Ja,
Fortbildungsveranstaltung gemäß §15 Abs. 4 Satz 2 GenTSV,
Phillips-Universität Marburg, 6.-8.10. 1997
- 2.4.2. Die folgenden Themen wurden behandelt: Gefährdungspotenziale von Organismen unter besonderer Berücksichtigung der Mikrobiologie; Sicherheitsmaßnahmen für gentechnische Laboratorien und Produktionsbereiche; Rechtsvorschriften zu Sicherheitsmaßnahmen für gentechnische Laboratorien und Produktionsbereiche und zum Arbeitsschutz
- 2.5. War der Projektleiter in dieser Eigenschaft mindestens zwei Jahre in einem nach den Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in vitro* neukombinierte Nukleinsäuren-registrierten Genlabor tätig? Ja
Projektleiter: RP Giessen, Hessen, 07.01.1998, 32-GT/53o 06.05.02 A-Uni GI 7/97,
BBS: RP Giessen, Hessen, 21.05.2004, IVMr46-53r 30.03.UGI 74.12.01

2006-2008 Projektleiter für Freilandversuch mit GVP

3. Erlaubnis zum Arbeiten mit Krankheitserregern: Es liegt keine Erlaubnis nach den aufgeführten Bestimmungen vor. Bei den freizusetzenden Organismen bestehen keine pathogenen Eigenschaften.

01.04.2008

Datum






Unterschrift des Projektleiters

III. Angaben zum Beauftragten für biologische Sicherheit

Name, Qualifikation und Erfahrung der verantwortlichen Wissenschaftler

c) Beauftragter für biologische Sicherheit (BBS)

1. Name, Vorname:


 Institut für Phytopathologie und Angewandte Zoologie
 Heinrich-Buff-Ring 26-32
 35392 Gießen
 Tel 


2. Sachkunde

2.1. Abschluss eines Studiums der Naturwissenschaften
 Diplom-Biologe, RWTH Aachen 1991

2.2. Mindestens dreijährige Tätigkeit auf dem Gebiet der Gentechnik, insbesondere Molekularbiologie

Seit 1995 ununterbrochen tätig in registrierten S1-Genlaboren

2.3. Abschluss einer anderen Aus-, Fort- oder Weiterbildung

2.3.2. Praktische Erfahrungen im Umgang mit Mikroorganismen: ja

2.4. Fortbildungsveranstaltung zu Sicherheitsmaßnahmen/Arbeitsschutz: Ja

2.4.1. Wurde eine Fortbildungsveranstaltung zu Sicherheitsmaßnahmen und Arbeitsschutz bei gentechnischen Arbeiten besucht?

Fortbildungsveranstaltung nach §15 Abs. 2 Satz 1 Nr. 3 GenTSV,
 Phillips-Universität Marburg, 6.-8.10.1997

2.4.2. Die folgenden Themen wurden behandelt: Gefährdungspotenziale von Organismen unter besonderer Berücksichtigung der Mikrobiologie; Sicherheitsmaßnahmen für gentechnische Laboratorien und Produktionsbereiche; Rechtsvorschriften zu Sicherheitsmaßnahmen für gentechnische Laboratorien und Produktionsbereiche und zum Arbeitsschutz

2.5. War der Beauftragte in dieser Eigenschaft mindestens zwei Jahre in einem nach den Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in-vitro* neukombinierte Nukleinsäuren-registrierten Genlabor tätig?

Projektleiter: RP Giessen, Hessen, 14.02.2000, IVMr46-53r 30.03.UGI 82.12.01,
 BBS: RP Giessen, Hessen, 28.11.2001, IVMr46-53r 30.03.UGI 55.12.03

3. Erlaubnis zum Arbeiten mit Krankheitserregern: Im Aufgabenbereich des Beauftragten für Biologische Sicherheit wird nicht mit Pathogenen gearbeitet.

4. Ist der Beauftragte betriebszugehörig? Ja

01.07.2002

Datum



Unterschrift des Beauftragten

IV. Ausführliche Information zum Vorhaben

A. Generelle Information

1. Name und Adresse des Betreibers

Justus-Liebig-Universität Gießen, der Präsident, Ludwigstraße 23, 35390 Gießen
(Ansprechpartner: Dr. Wilfried Lühs, Verwaltung, Dez. B, Abt. B 3.3).

2. Zweck der Freisetzung

Der Zweck der Freisetzung ist eine gezielte Evaluation der Besiedlung der transgenen Gerstenlinien pYW210-9-(4001-4360) bzw. pJH271-Beta-Glu-307 durch einen symbiontischen Pilz (*Glomus intraradices*, kommerzielles Präparat Amykor[®] Wurzel-Vital). Ein weiteres Ziel ist eine umfassende epidemiologische Aufzeichnung auftretender pilzlicher Krankheiten auf den gentechnisch modifizierten Pflanzen im Vergleich zur/m respektiven Empfängerpflanze (Golden Promise) bzw. Kreuzungselter (Baronesse).

Die Gerstenlinie pYW210-9-(4001-4360) wurde mit einer DNA kodierend für eine 42-kDa *Endochitinase (cThEn42(GC))* aus dem bodenbürtigen Mycoparasiten *Trichoderma harzianum* transformiert, um das Resistenzpotenzial in dieser Linie gegenüber den pilzlichen Schaderregern *Rhizoctonia solani* AG-8 und *Rhizoctonia oryzae* zu erhöhen. *In vitro* Versuche zeigten, dass das rekombinante Protein das Wachstum beider Pathogene verhindert (Wu 2003). Die Wirkungsweise der Endochitinase beruht auf dem Abbau von Chitin, das Bestandteil pilzlicher Zellwände der Schaderreger. Die *Endochitinase* steht in pYW210-9-(4001-4360) unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors des *Ubiquitin*-Gens aus Mais und dem Signalpeptid der 33 kDa *Chitinase* der Gerste. Folglich wird das Transgen in allen Pflanzenteilen exprimiert. Da das Zellwandmaterial Chitin unter pflanzenbesiedelnden Pilzen weit verbreitet ist, ist ein Einfluss der Endochitinase sowohl auf andere pilzliche Schaderreger als auch Symbionten denkbar.

In der Gerstenlinie pJH271-Beta-Glu-307 wird eine $(1,3-1,4)$ - β -Glucanase unter Kontrolle des Endosperm-spezifischen Promotors und des Signalpeptids des *D Hordein*-Gens *Hor 3-1* aus Gerste exprimiert. Die Glucanase wurde durch intragenische Rekombination zweier $(1,3-1,4)$ - β -Glucanase aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* generiert. Auf Grund des verwendeten Endosperm-spezifischen Promotors ist die Expression des Gens räumlich und zeitlich auf das sich entwickelnde Korn begrenzt, während die Aktivität des rekombinanten Enzyms bis zur Kornkeimung erhalten bleibt (Horvath et al. 2000). Daher sind keine Effekte auf pilzliche Blattpathogene zu erwarten. Da aber von einer räumlich begrenzten Exposition der Glucanase vom keimenden Korn in den Boden auszugehen ist, könnte die Besiedlung der Wurzel durch symbiontische und antagonistische Pilze beeinflusst werden.

Die Expression antimikrobiell bzw. antifungal wirkender Gene in Kulturpflanzen verfolgt das Ziel, die pflanzliche Abwehrkraft gegenüber Schaderregern zu erhöhen, um letztendlich eine hohe Ertragsstabilität zu erhalten und die Applikation von Pestiziden zu reduzieren. Im Falle der Verwendung von Genen mit geringer Wirkungsspezifität, ist es notwendig, mögliche nachteilige Effekte auf nützliche Organismen zu analysieren. Mit Hilfe des Freisetzungsversuchs können nähere Angaben zum Wirkungsgrad und zur Spezifität der in beiden gentechnisch modifizierten Linien exprimierten, rekombinanten Proteine gemacht werden. Der Freisetzungsversuch erlaubt eine epidemiologische Untersuchung von pilzlichen Krankheiten, die nur unter Feldbedingungen möglich ist, verbunden mit einer für die Sicherheitsforschung relevanten Fragestellung über den Einfluss der rekombinanten Proteine auf symbiontische Pflanze-Pilz Interaktionen.

3. Titel des Projekts

Zur biologischen Sicherheit von gentechnisch verändertem Getreide: Auswirkungen der transgenen Pflanzen auf nützliche pilzliche Mikroorganismen.

B. Informationen über (A) die Empfänger – oder (B) (falls zutreffend) die Elternpflanzen – *Hordeum vulgare* L.

1. Vollständiger Name: *Hordeum vulgare* L.

- (a) Familie: Poaceae (Gramineae)
 (b) Gattung: Hordeum
 (c) Art: vulgare
 (d) Unterart:

Sorte/Linie:

Zu testende Transfromationsereignisse:

- pYW210-9-(4001-4360) enthält Transgen *cThEn42(GC)*,
- pJH271-Beta-Glu-307 enthält Transgen *(1,3-1,4)- β -Glucanase*.

Beide Linien sind Nachkommen der herkömmlichen Zuchtlinie Golden Promise, welche zur Insertion der beschriebenen Gene verwendet wurde. pJH271-Beta-Glu-307 wurde über mehrere Generation mit der Sorte Baronesse gekreuzt.

- (e) Trivialbezeichnung: Sommergerste

2. (a) Information über die Fortpflanzung

(i) Form(en) der Fortpflanzung

Gerste ist eine einjährige, diploide ($2n=2x=14$), selbstbefruchtende Pflanze. Die Reproduktion erfolgt sexuell über Samenproduktion.

Der Blütenstand (Ähre) der Gerste ist aus mehreren an einer Mittelachse (Rachis) versetzt und wechselseitig angeordneten Ährchen aufgebaut. Die Ährchen bestehen aus der kleistogamen, zwittrigen Blüte, welche von Spelzen umgeben ist. Bei der zweizeiligen Sommergerste ist nur das zentrale Ährchen fertil, während die beiden äußeren Ährchen steril sind. Die Ähre blüht innerhalb von zwei-drei Tagen asynchron ab, wobei ein Ährchen im mittleren Drittel der Ähre mit dem Blühen beginnt. Von dort aus schreitet das Blühen nach oben und unten fort.

(ii) gegebenenfalls spezielle, die Fortpflanzung beeinflussende Faktoren

Gerste ist Selbstbestäuber mit einer Selbstbefruchtungsrate von ~99%, was durch die kleistogame Blütenmorphologie unterstützt wird. Verbunden mit einer im Vergleich zu fremdbefruchtenden Roggen niedrigen Pollenproduktion (~10%) wird die Auskreuzungswahrscheinlichkeit stark reduziert (Eastham und Sweet 2002). Hammer (1977) sieht vor allem die Empfindlichkeit des Pollens gegenüber Umweltbedingung und der daraus resultierenden, kurzen Lebensfähigkeit als limitierend an. Dennoch ist eine Hybridisierung zwischen unterschiedlichen Gerstensorten möglich. Wind stellt hier das wahrscheinlichste Medium zur Pollenverbreitung dar (Hammer 1975, 1977, Eastham und Sweet 2002).

(iii) Generationsdauer

Gerste ist ein annuelles Getreide mit einer Generationszeit von 6-7 Monaten. In Abhängigkeit von der Witterung erfolgt in Deutschland die Aussaat Mitte März/Mitte April.

(b) Kreuzbarkeit mit anderen Kultur- und Wildpflanzenarten

Unter dem Gesichtspunkt der Erhöhung der Fremdbefruchtungsrate in Gerste, untersuchten Abdel-Ghani et al. (2004) die Auskreuzungsereignisse von angebauten Landrassen der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und Wildgerste (*H. spontaneum*) in Jordanien. Die Auskreuzungsrate lag bei 0-1,8% ($\mu = 0,34\%$) und war übereinstimmend mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen (Chaudhary et al. 1980, Tammisola 1998, Wagner und Allard 1991). Allerdings führten hohe Niederschlagsmengen und niedrige Temperaturen zu einer wenn auch nicht signifikant erhöhten Auskreuzungsrate (Abdel-Ghani et al. 2004). Unter Verwendung von männlich-sterilen Empfängerpflanzen, konnten Ritala et al. (2002) eine Kreuzbestäubung in einem Abstand von bis zu 50 Metern nachweisen, wobei die Frequenz äußerst gering war. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Wagner und Allard (1991). Allerdings wurde die Auskreuzungsrate von Ritala et al. (2002) durch die Verwendung eines offen abblühenden Gerstentyps als Pollenempfänger und auf Grund des Versuchsaufbaus als überschätzt bewertet.

Eine Hybridisierung zwischen Weizen (Pollenempfänger) und Gerste kommt unter natürlichen Bedingungen nicht vor und ist durch künstliche Bestäubung unter Verwendung spezieller Methoden (z.B. „Embryo rescue“) begrenzt möglich, da die Nachkommenschaft männlich steril ist (Fedak 1992, Molnar-Lang und Sutka 1994). Gleiches gilt für Hybridkreuzungen zwischen Gerste und Roggen. *Hordeum vulgare* L. kann mit *Elymus* sp. gekreuzt werden bzw. es kommt zu natürlicher intergenerischer Kreuzung zwischen *Hordeum* sp. und *Elymus* sp., wobei resultierende Hybride in allen Fällen männlich bzw. komplett steril sind.

Alle bisherigen Daten weisen darauf hin, dass Kulturgerste mit keiner anderen Kulturpflanze und Wildgerstenart unter natürlichen Bedingungen hybridisiert oder entstehende Hybride steril sind (Fedak 1992). Weltweit kommen ca. 25 *Hordeum* Arten in gemäßigten Klimazonen vor. Einige hiervon sind in Europa vertreten. Beispiele hierfür sind *H. geniculatum*, *H. jubatum* L., *H. marinum*, *H. murinum* L., *H. murinum* ssp. *murinum*, *H. murinum* ssp. *leporinum*, *H. murinum* ssp. *glaucum*, *H. nodosum* L., *H. pubiflorum*, *H. pusillum*, *H. secalinum*, *H. hystrix*, *H. bulbosum*, *H. bogdanii*, *H. brevisubulatum*, *Hordelymus europaeus*.

Unter Berücksichtigung der hohen Selbstbefruchtungsrate und der starken Hybridisierungsbarrieren zwischen *Hordeum*-Arten, ist das Risiko der Auskreuzung zwischen Kultur- und Wildgersten sehr gering.

3. Überlebensfähigkeit

(a) Fähigkeit zur Bildung von Überlebens- oder Dormanzstrukturen:

Gerste ist ein in gemäßigten Klimaten vorkommendes, annuelles Getreide, deren Reproduktion über Samen erfolgt. Im Anbau wird zwischen sommer- und winterannuellen Sorten unterschieden, die unterschiedliche Anforderung an das Klima (z.B. Kältetoleranz, Trockenstresstoleranz) stellen und somit die Überlebensfähigkeit der Pflanze vorgeben. Daneben haben biotische Faktoren (pilzliche, bakterielle und tierische Schaderreger, Unkräuter und -gräser) starken Einfluss auf die Überlebensfähigkeit. Auf Grund der Züchtung und Selektion auf Ertragsmerkmale und Standortansprüche ist die Gerste als Kulturpflanze außerhalb der landwirtschaftlichen Umgebung gegenüber der einheimischen Flora nicht konkurrenzfähig. Die fehlende Spindelbrüchigkeit der Ähre verhindert zudem die natürliche Samenausbreitung.

Bei winterannuellen Gerstensorten kann Ausfallgetreide überwintern und im folgenden Frühjahr auskeimen. Da der genetische Hintergrund der zu untersuchenden transgenen Pflanzen auf den Sommergersten Baroness (bei pJH271-Beta-Glu-307) bzw. Golden Promise (pYW210-9-(4001-4360)) basiert, ist die Überwinterungsfähigkeit (bzw. Frosthärte) eingeschränkt. Im Falle von Durchwuchs lassen sich Pflanzen leicht mit Herbiziden oder mechanischen Maßnahmen kontrollieren.

(b) gegebenenfalls spezielle, die Überlebensfähigkeit beeinflussende Faktoren:

Die Überlebensfähigkeit der Gerste wird von abiotischen (Klima, Boden, Licht, Wasser usw.) und biotischen Faktoren (pilzliche, bakterielle und tierische Schaderreger, Unkräuter und -gräser) beeinflusst. Diese Einflüsse wirken sortenspezifisch. Gerste ist ein in den gemäßigten Breiten vorkommendes Getreide, dessen Konkurrenzfähigkeit durch die lange Domestikation stark eingeschränkt ist. Eine Ansiedlung außerhalb der landwirtschaftlichen Umgebung ist daher nicht möglich. Auf Grund der Züchtung besitzen heutige Kultursorten keine spindelbrüchigen Ähren, was die Samenausbreitung stark begrenzt.

4. Ausbreitungsfähigkeit**(a) Art und Grad der Ausbreitungsfähigkeit**

Genetische Informationen können sich über Pollen bzw. Samen verbreiten. Die Ausbreitung durch Pollen und Samen wurde bereits in Abschnitt 2 und 3 ausgeführt.

Angemerkt werden muss, dass eine Verbreitung der Gerstensamen durch Vögel und Kleinsäuger vorkommen kann, denen die Körner als Futter dienen.

(b) gegebenenfalls spezielle, die Ausbreitungsfähigkeit beeinflussende Faktoren:

Auf Grund der Züchtung besitzen heutige Kultursorten keine spindelbrüchigen Ähren, was die Samenausbreitung stark begrenzt. Folglich ist die Samenausbreitung völlig vom Menschen bzw. ackerbaulichen Kulturmaßnahmen abhängig.

5. Geographische Verbreitung

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist geschichtlich unsere älteste Getreideart. Sie wird bereits in prähistorischen Funden nachgewiesen, die älter als 6.000 Jahre sind. Die Gerste stammt ursprünglich aus Ostasien. Sie kann bis weit in die nördlichen Breiten und in die Höhenlagen der Gebirge angebaut werden. Die Züchtung der heutigen Kulturgerstensorten bewirkte, dass deren Kultivierung und Ausbreitung vollkommen vom Menschen abhängig ist. Die Gerstenähren haben in der Regel lange Grannen und sind meist geneigt. Wintergerste wird im Herbst gesät und überwiegend als Futtergetreide verwendet.

Die im Frühjahr gesäte Sommergerste dient in erster Linie als Braugerste für die Bierherstellung. In Deutschland dehnte sich die Anbaufläche für Wintergerste in den letzten Jahrzehnten besonders stark aus. Das liegt an der großen Nachfrage nach Gerste für Futterzwecke. Es wurden hier im Jahr 2000 rund 2,0 Mio. ha Gerste angebaut. Das sind etwa 19% der Ackerfläche.

6. Bei Pflanzen die im/in Mitgliedstaat(en) üblicherweise nicht angebaut werden, Beschreibung des natürlichen Lebensraumes der Pflanze, einschließlich Informationen über natürliche Epiphyten, Parasiten, Konkurrenten und Symbionten

Gerste wird in Deutschland als Sommer- und Wintergerste angebaut

7. Möglicherweise signifikante Wechselwirkungen der Pflanze mit nichtpflanzlichen Organismen im Ökosystem, in dem sie üblicherweise

angebaut wird, einschließlich Informationen über toxische Effekte auf Mensch und Tier oder andere Organismen.

Gerste wird von mehreren tierischen Schaderregern (Nematoden, Thripse, Getreideblattläuse, Drahtwürmer, Getreidewickler) befallen. Daneben ist sie Wirtspflanze verschiedener pilzlicher (Brandpilze, Roste, Fusariosen, Mehltau, Blatt- und Netzfleckenkrankheiten, Schwarzbeinigkeit, Halmbruchkrankheit, usw.) und viraler (Gelbverzwergungsvirus) Erreger. Eine Symbiose geht die Gerste mit arbuskulären Mykorrhizapilzen (z.B. *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae*, *Gigaspora rosea*) ein.

In Bezug auf die menschliche Gesundheit ist die Pollenallergie als potenzielle Interaktion zu erwähnen. Gerstenpollen kann, wie andere Pflanzenpollen auch, beim Einatmen allergische Reaktionen bei sensibilisierten Menschen hervorrufen.

C. Informationen über die gentechnische Veränderung

1. Beschreibung der zur genetischen Veränderung angewandten Verfahren

a) pYW210-9-(4001-4360)

Die Transformationen wurden unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* am „Department of Crop and Soil Sciences“ an der Washington State University, Pullman (USA) durchgeführt.

Die Transformation wurde durch Co-Kultivierung unreifer Embryonen mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL-1 durchgeführt. Der verwendete *A. tumefaciens* Stamm enthielt ein nicht funktionsfähiges („disarmed“) Ti-Plasmid und war transformiert mit pYW210 (s.u., Punkt 2. und VI. Anhang I, Abb. 1+2). Unreife, zygote Embryos (1,5 – 2,5 mm) der Gerstensorte Golden Promise wurden longitudinal halbiert und in Kallus-Induktionsmedium („callus-induction medium“, CIM) (Horvath *et al.*, 2002) bei 24 °C im Dunkeln für zwei Tage inkubiert. Die Embryohälften wurden schließlich mit einer Übernachtskultur von *A. tumefaciens* versetzt und unter gleichen Bedingungen für zwei weitere Tage co-kultiviert. Die Embryohälften wurden nach der Co-Kultivierung mit LB Medium gewaschen und auf CIM übertragen. Dieses Medium enthielt 200 mg Timentin/l (zur Eliminierung von *Agrobacterium*) und 4 mg Bialaphos/l, um Kalluswachstum zu induzieren und transformierte Zellen zu isolieren.

Selektierte Kalli wurden auf spezielles Medium zur Induktion des Sprosswachstums („shoot-generation medium“, SGM) (Horvath *et al.*, 2002) überführt, welches 3 mg Bialaphos/l Medium enthielt, und für einen Monat inkubiert. Die so gewonnenen Pflänzchen wurden für einen weiteren Monat auf ein Medium zur Induktion des Wurzelwachstums („root-generation medium“, RGM) übersetzt und die daraus generierten Pflänzchen schließlich in Erde gepflanzt. Die Bezeichnung pYW210-9 verweist auf die Gerstenpflanze 9 der Generation T₀, die erfolgreich mit pYW210 transformiert wurde (Wu 2003).

b) pJH271-Beta-Glu-307

Die Transformationen wurden unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* am „Department of Crop and Soil Sciences“ an der Washington State University, Pullman (USA) durchgeführt (Horvath *et al.* 2000, 2002).

Der Ablauf und die Methodik der Transformation waren identisch zu der in Abschnitt C a) beschriebenen.

2. Art und Herkunft des verwendeten Vektors

Tabelle 1: Spezifikation der Plasmide

Sequenzen	pYW210 16509 bp	pJH271 15110 bp
Gen	<i>cThEn42(GC)</i> (Acc. AY701743)	(1,3-1,4)- β -Glucanase <i>H(A12-M)ΔY13-GC-N</i>
Promotor	<i>pUbi-1</i>	<i>HvHor3</i>
Signalpeptid	<i>HvChi33</i> (Acc. L34211)	<i>HvHor3</i>
Terminator	<i>nos</i>	<i>nos</i>
Markergen	<i>bar</i>	(1) <i>bar</i> (2) <i>sGFP</i>
Promotor	<i>pUbi-1</i>	(1) <i>pUbi-1</i> (2) <i>CaMV 35S</i>
Terminator	<i>nos</i>	(1) <i>nos</i> (2) <i>nos</i>

a) pYW210-9-(4001-4360)

Die codon-optimierte 42-kDa *Endochitinase cThEn42(GC)* (GenBank accession AY701743) wurde mit einer Nukleotidsequenz ligiert, welche für ein Signalpeptid der 33-kDa Gersten-*Endochitinase* (*HvChi33*; GenBank Accession L34211) kodiert.

Das Plasmid pYW210 (Vektorkarte, s. Anhang I) umfasst ein Konstrukt, welches *cThEn42(GC)* unter der Steuerung eines Ubiquitinpromotors (pYW210) aus Mais (pUbi-1) enthält. Das Plasmid entstammt dem binären Klonierungsvektor pJH260, der wiederum auf pBIN19 basiert (Bevan 1984; Horvath, *et al.* 2000, Wu 2003).

Das Plasmid pYW210 entstand durch den Verdau von Plasmid pAM100b-*HindIII*-pUbi-SP(*HVChi33*)-*cThEn42(GC)*-nos-*NotI* mit den Enzymen *HindIII* und *NotI*, woraus das Fragment *pUbi-SP(HVChi33)-cThEn42(GC)-nos* resultierte. Dieses Fragment wurde anschließend in das Plasmid pAM300-*HindIII*-*NotI*-RB-LB-pUbi-BAR-nos-*EcoRI* (verdaut mit *HindIII* und *NotI*) kloniert, um Plasmid pAM300-*HindIII*-pUbi-SP(*HVChi33*)-*cThEn42(GC)*-nos-*NotI*-RB-LB-pUbi-BAR-nos-*EcoRI* zu erhalten. Durch dessen Verdau mit *HindIII* und *EcoRI* konnte das Fragment *pUbi-SP(HVChi33)-cThEn42(GC)-nos-RB-LB-pUbi-BAR-nos* isoliert werden, welches in das Plasmid pJH260-LB-*HindIII*-pUbi-BAR-nos-*EcoRI*-RB (verdaut mit *HindIII* und *EcoRI*) ligiert wurde, um das Plasmid pYW210 mit dem Konstrukt *LB-pUbi-SP(HVChi33)-cThEn42(GC)-nos-RB-LB-pUbi-BAR-nos-RB* zu erhalten (Wu 2003).

b) pJH271-Beta-Glu-307

Der *Agrobacterium*vektor pJH271 wurde für die Transformation der Gerstensorte Golden Promise verwendet, der auf der Grundlage des binären Klonierungsvektors pJH2600 basiert, der sich wiederum von pBIN19 ableitet (Bevan 1984, Horvath *et al.* 2000). Die diversen Klonierungsschritte, um pJH271 zu erhalten, sind detailliert bei Jensen *et al.* (1998) und Horvath *et al.* (2000) beschrieben.

3. Größe, Herkunft (Bezeichnung des Spenderorganismus/der Spenderorganismen) und geplante Funktion jedes konstituierenden Fragments der für die Insertion vorgesehenen Region

Die Plasmide tragen eine Kombination der folgenden Gene:

Die Vektorkarten und -sequenzen der Donorplasmide pYW210 und pJH271 sind im VI. Anhang I aufgeführt.

Tabelle 2 (s. Seite 21) beschreibt die Art und Herkunft der DNA-Sequenzen in pYW210 und pJH271.

Tabelle 2: Elemente der T-DNA-Fragmente der Plasmide pJH271 und pYW210

Kodierungssequenz	Größe	Funktion und Herkunft der Sequenz
pJH271		
<i>Ubi-1</i>	1953 bp	Promotor des Mais- <i>Ubiquitin</i> -Gens zusammen mit dem 1. Intron (White et al. 1990) zur konstitutiven Expression des Transgens in allen Pflanzenteilen.
<i>CaMV 35S</i>	209 bp ¹	Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus (CaMV) zur konstitutiven Expression des <i>sGFP</i> - Markergens (in pJH271) in allen Pflanzenteilen.
Signalpeptid <i>Hor-3</i>	62 bp	Signalpeptid des <i>D Hordein</i> -Gens <i>Hor3-1</i> , welches im sich entwickelnden Endosperm exprimiert wird (Horvath et al. 2000).
<i>Hor-3</i>	433 bp	Promotor des Endosperm-spezifischen <i>D Hordein</i> -Gens <i>Hor3-1</i> zur gezielten Expression des Transgens während der Kornentwicklung (Horvath et al. 2000).
<i>(1,3-1,4)-β-Glucanase</i>	644 bp	<i>Glucanase</i> -Gen, generiert durch intragenische Rekombination zweier <i>(1,3-1,4)-β-Glucanasen</i> aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> und <i>Bacillus macerans</i> (Borriss et al. 1989, Politz et al. 1993). Die Gensequenz wurde auf einen G+C-Gehalt von 63% codon-optimiert, um die Expression des mikrobiellen Gens in Gerste zu gewährleisten (Jensen et al. 1996).
<i>Bar</i>	557 bp	<i>Phosphinothricin-Acetyltransferase</i> -Gen, isoliert von <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (De Block et al. 1987, Thompson et al. 1987). Das Gen dient als Marker für die Transformation und vermittelt Resistenz gegenüber dem Herbizid Bialaphos (Glufosinat-Ammonium).
<i>sGFP</i>	719 bp	<i>Synthetisches Grün Fluoreszierendes Protein</i> , isoliert von <i>Aequorea victoria</i> (Chiu et al. 1996).
<i>nos Term</i>	264-283 bp	Terminationssequenz des <i>Nopalinsynthase</i> -Gens, isoliert von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Depicker et al. 1982, Bevan et al. 1983).
pYW210		
<i>Ubi-1</i>	1953 bp	Promotor des Mais- <i>Ubiquitin</i> -Gens zusammen mit dem 1. Intron (White et al. 1990) zur konstitutiven Expression des Transgens in allen Pflanzenteilen.
Signalpeptid <i>HvChi33</i>	80 bp	Signalpeptid der 33-kDa <i>Endochitinase</i> der Gerste (Kragh et al. 1991).
<i>cThEn42(GC)</i>	1169 bp	42 kDa <i>Endochitinase</i> -Gen, isoliert von <i>Trichoderma harzianum</i> mit antifungaler Aktivität (Hayes et al. 1994, Lorito et al. 1998). Die Gensequenz wurde auf einen G+C-Gehalt von 65,1% codon-optimiert, um die Expression des fungalen Gens in Gerste zu gewährleisten (Wu 2003).
<i>Bar</i>	557 bp	<i>Phosphinothricin-Acetyltransferase</i> -Gen, isoliert von <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (De Block et al. 1987, Thompson et al. 1987). Das Gen dient als Marker für die Transformation und vermittelt Resistenz gegenüber dem Herbizid Bialaphos (Glufosinat-Ammonium).
<i>nos Term</i>	264-283 bp	Terminationssequenz des <i>Nopalinsynthase</i> -Gens, isoliert von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Depicker et al. 1982, Bevan et al. 1983).

D. Informationen über die gentechnisch veränderte Pflanze (GVP)

1. Beschreibung der eingeführten oder veränderten Merkmale und Eigenschaften

a) pYW210-9-(4001-4360)

Bei diesem Versuch handelt es sich um ein individuelles Transformationsereignis. Diese beinhaltet:

- Ein Gen, das für eine codon-optimierte 42 kDa Endochitinase (cThEn42(GC)) kodiert und dessen Genprodukt *in vitro* das Wachstum der pilzlichen Schaderreger *Rhizoctonia solani* AG-8 und *Rhizoctonia oryzae* hemmt. Dieses Gen wird durch den verwendeten Promotor (Ubiquitin) in allen Pflanzenteilen exprimiert und auf Grund des eingesetzten Signalpeptids (*HvChi33*) in den Apoplasten sekretiert. Der G+C-Gehalt wurde auf 65,1% erhöht, um die Expression des fungalen Gens in Gerste zu gewährleisten. Bei Kontakt der Endochitinase mit den pilzlichen Myzelien, deren Struktur auf Chitin basiert, erfolgt deren enzymatischer Abbau, und folglich eine effektive Prävention pilzlicher Infektion bzw. Kolonisation (Wu 2003).
- Ein zur Selektion verwendetes Markergen, welches transformierten Pflanzen ermöglicht, auf einem mit dem Herbizid Bialaphos versetzten Medium zu wachsen. Das Gen (*Bar*) kodiert für die Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) und steht unter Kontrolle des Promotors des *Ubiquitin*-Gens (*Ubi-1*). *PAT* wurde von *Streptomyces hygroscopicus* isoliert. Das von *S. hygroscopicus* synthetisierte Antibiotikum Bialaphos besteht aus Phosphinothricin (PPT) und zwei L-Arginin-Resten und ist ein Inhibitor der Glutaminsynthetase. Die Behandlung mit Bialaphos führt zu einer toxischen Akkumulation von Ammonium in pflanzlichen Zellen. Pflanzen hingegen, die *PAT* exprimieren, können die Toxizität durch die Acetylierung der freien NH_2 -Gruppe des PPT verhindern. Erfolgreich transformierte Pflanzenembryos können positiver Selektion durch die Regeneration auf Bialaphos-haltigem Medium ausgesetzt werden. Ausschließlich erfolgreich transformierte Pflanzen sind überlebensfähig (De Block et al. 1987, Thompson et al. 1987).

b) pJH271-Beta-Glu-307

Bei diesem Versuch wurde ein individuelles Transformationsereignis verwendet. Dieses beinhaltet:

- Ein Gen, das für eine codon-optimierte (1,3-1,4)- β -Glucanase kodiert. Das Gen wurde durch intragenische Rekombination zweier (1,3-1,4)- β -Glucanase aus *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* erzeugt (Borriss et al. 1989, Politz et al. 1993). Beide Glucanasen besitzen die gleiche Substratspezifität wie jenes Enzym in Gerste, das die Mobilisierung der Stärke und Proteine während der frühen Keimlingsentwicklung fördert. Das Gen steht unter der Kontrolle des Promotors des Endosperm-spezifischen *D Hordein*-Gens *Hor3-1* und dessen Signalpeptid. Daraus resultiert eine zeitlich und räumlich begrenzte Genexpression während der Kornentwicklung. Das Enzym besteht aus den Aminosäuren 1-12 von *Bacillus amyloliquefaciens* und Aminosäuren 13-214 von *Bacillus macerans*, in dem Tyr-13 von *Bacillus amyloliquefaciens* entfernt wurde (Politz et al. 1993, Jensen et al. 1996). Dies bewirkt eine Erhöhung der Halbwertszeit des Enzyms von über 4 Stunden bei 70°C und einem pH 5,0. Innerhalb der Gerstenzelle wird das Enzym an zwei Positionen glykosyliert, was dessen Hitzestabilität zusätzlich unterstützt. Der G+C-Gehalt wurde auf 63% erhöht, um die Funktion des mikrobiellen Gens in der pflanzlichen Zelle zu gewährleisten (Jensen et al. 1996).
- Als Markergen diente ebenfalls *Bar* (für Details siehe Abschnitt D 1 a).

(b) Ausbreitungsfähigkeit

Die wahrscheinlichsten Ausbreitungswege erfolgen über Samen und Pollen. Bei den ausgewählten Gerstenlinien handelt es sich um die T₄ (pYW210-9-(4001-4360)) bzw F₇ Generationen (pJH271-Beta-Glu-307). Die Pflanzen jeder Generation blühten normal und erzeugten Samen. Wissenschaftliches Fachpersonal konnte in bisherigen Gewächshaus- und Feldversuchen an der Washington State University, Pullman (USA) oder an der Justus-Liebig-Universität Gießen keinen Unterschied zwischen gentechnisch modifizierten Linien und der Empfängerpflanze (Golden Promise) bzw. dem Kreuzungselter (Baronesse) in Bezug auf Form und Rate der Ausbreitung beobachten.

Auf die Argumentation des vorherigen Abschnitts verweisend, kann auf Grund der vorgenommenen Modifikationen nicht davon ausgegangen werden, dass die transgenen Pflanzen sich in ihrer Ausbreitungsfähigkeit von der Empfängerpflanze bzw. Kreuzungselter unterscheiden.

(c) Überlebensfähigkeit

Das Samenkorn ist die Überdauerungs- und Verbreitungsform der Gerste. Das zu verwendende transgene Pflanzenmaterial wurde im Gewächshaus und im Feld seit mehreren Jahren vermehrt. Basierend auf Beobachtung durch wissenschaftliches Fachpersonal sind sowohl Blüte als auch Samenproduktion als normal zu bewerten, so dass die genetische Modifikation auf keine zu den Empfängerpflanzen veränderte Überlebensfähigkeit schließen lässt.

In dieser Hinsicht konnten durch die Zerstörung der Freisetzungsversuche in 2006 und 2007 keine Erkenntnisse aus der Freisetzung 67860-0168 in Giessen erzielt werden.

- Als zusätzliches Markergen wurde das *synthetische Grün Fluoreszierende Protein* (sGFP) verwendet. GFP wurde von *Aequorea victoria* isoliert und besteht aus 238 Aminosäuren. Die Biolumineszenz in *A. victoria* entsteht durch die Reaktion der Seitenketten von Serin-, Tyrosin- und Glycinresten, wodurch der fluoreszierende Farbstoff gebildet wird (Tsien 1998). Das Gen steht unter Kontrolle eines CaMV 35S Promotors.

2. Informationen über die tatsächlich eingefügten/deletierten Sequenzen

(a) Größe und Struktur des Inserts und Verfahren zu dessen Charakterisierung, einschließlich Informationen über jegliche in die GVP eingeführte Teile des Vektors oder einen Carrier oder fremde DNA, die im GVP bleibt:

Vektorkarten und –sequenzen sind in Anhang I und wesentliche Vektorkomponenten in Tabelle 2 (Abschnitt C3) aufgeführt.

a) pYW210-9-(4001-4360)

Für die Transformation wurde die Gerstensorte Golden Promise verwendet. Die resultierenden, transgenen Gerstenlinien wurden unter Verwendung eines für die rekombinante Endochitinase spezifischen Antikörpers in Western Blot Analysen sowie unter Verwendung von Endochitinase-spezifischen Primern in PCR Analysen selektiert. Die Bezeichnung pYW210-9 verweist auf die Gerstenpflanze 9 der Generation T₀ (Primärtransformant), die erfolgreich mit pYW210 transformiert wurde (Wu 2003, S. 58-59, 62-66). Die Linie pYW210-9-(4001-4360) ist ein direkter Nachkomme (T₄ Generation) dieser T₀-Pflanze.

Am „Department of Crop and Soil Sciences“ der Washington State University, Pullman (USA) wurden PCR - und Western Blot Analysen an Blättern von T₀ Pflanzen durchgeführt (Wu 2003, S. 58-59, 62-66). Direkte T₂ Nachkommen der positiv getesteten T₀ Pflanze pYW210-9 wurden mittels PCR individuell getestet. Die Körner der PCR-positiven Pflanzen wurden geerntet. Die Identifikation homozygoter Pflanzen erfolgte über einen Enzymaktivitätsassay. Mit Hilfe diese Assays konnten transgene Körner identifiziert und folglich auch die Homozygotie von T₂ Pflanzen bestimmt werden (unpublizierte Resultate; s. Details in Anhang IV).

b) pJH271-Beta-Glu-307

Für die Transformation wurde die Gerstensorte Golden Promise verwendet. Am „Department of Crop and Soil Sciences“ der Washington State University, Pullman (USA) wurden die Transgenen Nachkommenschaften näher charakterisiert. Im Jahr 1998 konnten 10 transgene Gerstenlinien (271.0.1 bis 271.0.10) regeneriert werden und anhand der reifen T₁ Körner konnte deren (1,3-1,4)- β -Glucanase-Aktivität mittels Zymogramm und Enzymaktivitätsassay bestimmt werden. Segregationsanalysen der T₂ Körner ergab eine Vererbung den Mendelschen Vererbungsgesetzen folgend (Horvath et al. 2000). Die für die Feldversuche vorgesehene Linie (271.0.6) wurde 1999 erstmal im Feld angebaut und über mehrere Jahre mit cv. Baroness gekreuzt. Die zu verwendende Linie ist die F7.

Zusätzlich wurden weitere Sequenzen, die innerhalb der T-DNA liegen, in die pflanzliche Zelle transferiert. Die Endochitinase-exprimierende Linie (pYW210-9-(4001-4360) enthält die pBIN19 Sequenzen 5928-6777 und 9140-9421. Die Beta-Glucanase-exprimierende Linie (pJH271-Beta-Glu-307) enthält die pBIN19 Sequenzen 5928-6768 und 9209-9421

Die T-DNA enthält an Position 6043-6190, bzw. 9260-9421, die linke, bzw. die rechte Randsequenz, die für ihre Integration in das pflanzliche Genom benötigt werden. Die Nukleotide 6191-6321 und 6623-6917 umfassen Teile des *lacZ*-Gens aus *E. coli*, die in Pflanzen nicht funktional sind. Die Nukleotide 6322-6622 umfassen Teile (den Ursprung der

Replikation) des *E. coli*-Phagen M13, die in Pflanzen nicht funktional sind. Die Nukleotide 8953-9259 umfassen den Promotor des *Nos*-Gens (*Nopalinn-Synthase*) aus *Agrobacterium tumefaciens*, der aber auf Grund der diversen Klonierungsschritte nur fragmentarisch in den Nukleotiden 9140-9421 von pYW210 und 9209-9421 von pJH271 vorliegt (vgl. Anhang I, Abb. 5, Frisch et al. 1995).

Solange keine genaue Analyse der in die Pflanze integrierten Sequenz durchgeführt worden ist, muss der Risikoabschätzung zugrunde gelegt werden, dass der gesamte Vektor integriert ist. Der Vektor pBIN19 wurde vollständig sequenziert (Anhang I, Abbildung 5; Frisch et al. 1995). Auf Grund der Sequenz ergeben sich folgende Teilstücke außerhalb der T-DNA: Die Nukleotide 1-618 umfassen den *oriV*, den Ursprung der Replikation des Plasmids pRK2 aus *E. coli*. Die Nukleotide 693-964 umfassen ein nicht funktionales Teilstück des *kilA*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*. Die Nukleotide 965-1315 und 2086-3078 umfassen das *nptIII*-Gen aus *Streptococcus faecalis*. In dieses Gen ist das „transposable element“ IS1 zwischen den Positionen 1316-2085 inseriert, was aber die Funktionalität nicht beeinträchtigt, denn es vermittelt mit dem Plasmid transformierten *E. coli* und *A. tumefaciens* Kanamycinresistenz und dient in den Bakterien als selektierbarer Marker; ist jedoch nicht in Pflanzen funktional. Die Nukleotide 3079-4560 umfassen das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2, das für zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids in Bakterien, jedoch nicht in Pflanzen, notwendig sind. Die Nukleotide 4561-5603, 9434-10617 umfassen das *tetA*-Gen des Plasmids pRK2, das nicht funktional ist, da es zwischen den Positionen 6043-9421 durch die T-DNA unterbrochen ist. Die Nukleotide 10610-10988 umfassen den ColE1 *ori*, den Ursprung der Réplikation von dem Plasmid ColE1. Die Nukleotide 10982-11765 umfassen Teile des *traF*-Gens, die den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli* enthalten, der für triparentale Paarungen benötigt wird, in Pflanzen jedoch nicht funktional ist. Die Nukleotide 619-692, 5604-6042, 9422-9433 und 11766-11777 umfassen Bereiche, die keine Homologien zu bisher bekannten Sequenzen aufweisen.

Um die Übertragung des *nptIII*-Gens in seiner Gesamtheit bzw. in Fragmenten auszuschließen, wurden Southern Blot Analysen durchgeführt (Southern 1975; s. Ergebnisse in Anhang V). Die genomische DNA von vier Pflanzen der Linien pYW210-9-(4001-4360) bzw. fünf Pflanzen der Linie pJH271-Beta-Glu-307 wurden auf eine Nylonmembran geblottet. Die für die Hybridisierung verwendete Sonde basiert auf einem PCR-Produkt, welches die kodierenden Bereiche des *nptIII*-Gens (Position 965-1315 + 2086-3078) und des inserierten „transposable element“ IS1 (Position 1316-2085) komplett umfasst. Auf Grund fehlender Hybridisierungssignale in den transgenen Linien wird eine Integration des *nptIII*-Gens in das Genom der Linien pYW210-9-(4001-4360) und pJH271-Beta-Glu-307 ausgeschlossen.

(b) bei einer Deletion, Größe und Funktion des/der deletierten Abschnitt(e):

entfällt

(c) Lokalisation des Inserts in den Pflanzenzellen (integriert in nicht integrierter Form in: Chromosom, Chloroplasten, Mitochondrien) und Verfahren zu seiner Bestimmung

Bei sexuellen Kreuzungen folgt die Vererbung der $(1,3-1,4)\text{-}\beta\text{-Glucanase}$ den Mendelschen Vererbungsgesetzen (Segregationsanalyse der T_2). Es wird gefolgert, dass die inserierten Gene in die Zellkern-Chromosomen integriert werden (Horvath et al. 2000). Das rekombinante Enzym Endochitinase wird seit mehreren Generationen stabil in allen Pflanzen der Linie pYW210-9-(4001-4360) exprimiert. Es wird gefolgert, dass die inserierten Gene in die Zellkern-Chromosomen integriert werden.

(d) Anzahl der Kopien des Inserts:

a) pYW210-9-(4001-4360)

Es wurden keine Analysen zur Bestimmung der Kopienzahl der *Endochitinase* durchgeführt. Auf Grund von Erfahrungen besitzen durch Agrobakterien erstellte transgene Pflanzen 1-5 Kopien des Inserts.

b) pJH271-Beta-Glu-307

Die Kopienzahl in mit pJH271 erstellten Pflanzen ergab eine Kopienzahl von 1-4 (Horvath et al. 2000).

3. Informationen über die Expression des Inserts

(a) Informationen über die Expression des Inserts und Verfahren für ihre Charakterisierung:

a) pYW210-9-(4001-4360)

Die Quantifizierung des rekombinanten Proteins wurde mittels Aktivitätsassay an einzelnen Körnern durchgeführt (s. Anhang IV und Abschnitt D 2 (a) a)). Dabei wurde ein durchschnittlicher Enzymgehalt von $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Saatgut gemessen (unpublizierte Resultate).

b) pJH271-Beta-Glu-307

Die für die Versuche ausgewählte, transgene Gerstenlinie (271.0.6) wurde mittels des Zymogramm-Plattenassays charakterisiert. Der Enzymgehalt im Korn betrug $900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (Horvath et al. 2000, 2002)

(b) Pflanzenteile, in denen das eingefügte Insert exprimiert wird (z.B. Wurzeln, Spross, Pollen usw.)

a) pYW210-9-(4001-4360)

Die Endochitinase (*cThEn42(GC)*) steht unter der Kontrolle des von Mais isolierten Promotors des *Ubiquitin*-Gens. Das Enzym wurde mittels des Aktivitätsassays (s. Anhang IV und Abschnitt D 2 (a) a)) in Wurzeln, Blättern und Körnern nachgewiesen und es muss davon ausgegangen werden, dass es ebenfalls in der Ähre exprimiert wird. Die Untersuchungen in Wurzeln und Blättern hatten rein qualitativen Charakter und wurden nicht quantitativ evaluiert. Es muss aber davon ausgegangen werden, dass die Gehalte an rekombinantem Enzym in diesen Pflanzenteilen im Wesentlichen den Gehalten der Körner entsprechen.

b) pJH271-Beta-Glu-307

Unter Verwendung eines Konstrukts zur Transformation von Gerste bei welchem GFP unter Kontrolle des Promotors des *Hor3-1*-Gens stand, konnten Cho et al. (2002) die Endosperm-spezifische Expression von GFP zeigen. Die *(1,3-1,4)-β-Glucanase* steht unter der Kontrolle des Promotors und Signalpeptids des gleichen Endosperm-spezifischen *D Hordein*-Gens *Hor3-1*. Daraus resultiert eine zeitlich und räumlich begrenzte Expression während der Kornentwicklung (Horvath et al. 2000).

4. Informationen über Unterschiede zwischen der GVP und der Empfängerpflanze im Hinblick auf

(a) Form(en) und/oder Rate der Fortpflanzung:

Die sexuelle Reproduktion von Gerste erfolgt über Samen. Da die beabsichtigte Wirkung der rekombinanten Endochitinase (cThEn42(GC)) auf eine Erhöhung des Resistenzpotenzials der transformierten Gerste gegenüber zweier pilzlicher Phytopathogene abzielt, ist ein Einfluss auf die Fortpflanzung unwahrscheinlich.

Im Falle der mit (1,3-1,4)- β -Glucanase transformierten Pflanzen, ist auf Grund der Verwendung des Promotors die Expression des Transgens zeitlich und räumlich auf das sich entwickelnde Korn beschränkt, während die Aktivität des rekombinanten Enzyms bis zur Kornkeimung erhalten bleibt (Horvath et al. 2000). Da die Funktion des Transgens in einer verbesserten Nutzung der (1,3-1,4)- β -Glucane des Endosperms und Aleurons während der Kornkeimung besteht, ist nicht davon auszugehen, dass die genetische Veränderung einen Einfluss auf die Fortpflanzung hat.

Die hier beschriebenen Linien haben mehrere Sexualzyklen in Gewächshaus- und Feldversuchen durchlaufen. Basierend auf Beobachtung durch wissenschaftliches Fachpersonal unterscheiden sich die transgenen Linien pYW210-9-(4001-4360) und pJH271-Beta-Glu-307 nicht in Bezug auf Blüten und Samenbildung im Vergleich zu der für die Transformation bzw. Kreuzung verwendeten Kulturgersten Golden Promise und Baronesse. Diese Angaben basieren auf in den USA durchgeführten Untersuchungen.

(b) Ausbreitungsfähigkeit

Die wahrscheinlichsten Ausbreitungswege erfolgen über Samen und Pollen. Bei den ausgewählten Gerstenlinien handelt es sich um die T₄ (pYW210-9-(4001-4360)) bzw. F₇ Generationen (pJH271-Beta-Glu-307). Die Pflanzen jeder Generation blühten normal und erzeugten Samen. Wissenschaftliches Fachpersonal konnte in bisherigen Gewächshaus- und Feldversuchen an der Washington State University, Pullman (USA) oder an der Justus-Liebig-Universität Gießen keinen Unterschied zwischen gentechnisch modifizierten Linien und der Empfängerpflanze (Golden Promise) bzw. dem Kreuzungselter (Baronesse) in Bezug auf Form und Rate der Ausbreitung beobachten.

Auf die Argumentation des vorherigen Abschnitt verweisend, kann auf Grund der vorgenommenen Modifikationen nicht davon ausgegangen werden, dass die transgenen Pflanzen sich in ihrer Ausbreitungsfähigkeit von der Empfängerpflanze bzw. Kreuzungselter unterscheiden.

(c) Überlebensfähigkeit

Das Samenkorn ist die Überdauerungs- und Verbreitungsform der Gerste. Das zu verwendende transgene Pflanzenmaterial wurde im Gewächshaus und im Feld seit mehreren Jahren vermehrt. Basierend auf Beobachtung durch wissenschaftliches Fachpersonal sind sowohl Blüte als auch Samenproduktion als normal zu bewerten, so dass die genetische Modifikation auf keine zu den Empfängerpflanzen veränderte Überlebensfähigkeit schließen lässt.

In dieser Hinsicht konnten durch die Zerstörung der Freisetzungsvorversuche in 2006 und 2007 keine Erkenntnisse aus der Freisetzung 67860-0168 in Giessen erzielt werden.

5. Genetische Stabilität des Inserts

Die zu verwendenden Linien wurden 1998 (pJH271-Beta-Glu-307) bzw. 2000 (pYW210-9-(4001-4360)) erstellt. Mehrere Generationen Selbstbefruchtung mit stabiler Expression der beiden Enzyme weisen auf eine stabile Integration des Inserts in das pflanzliche Genom hin.

6. Fähigkeit zum Transfer des gentechnisch eingefügten oder veränderten Materials von GVP in andere Organismen

Die Pollenverbreitung ist die realistischste Form des Transfers von genetischem Material auf andere Organismen. Auf die Wahrscheinlichkeiten der Genübertragung über Gerstenpollen auf verwandte Wildarten sowie andere Gräser unter Berücksichtigung der Kreuzbestäubung bzw. Auskreuzungsmöglichkeit wurde bereits in Abschnitt B 2 eingegangen.

Bodenmikroorganismen stellen eine andere Gruppe von Nichtzielorganismen dar, bei denen ein Gentransfer in Erwägung gezogen werden muss. Um zur Ausprägung zu gelangen, müssten die Gene in Bakterien übertragen und dort repliziert werden. Da hierzu mindestens vier Schritte notwendig sind, (i) Entlassung des intakten Resistenzgens mit einem "origin of replication" aus der Pflanzenzelle, (ii) Aufnahme durch kompetente Bakterien, (iii) Ringschluss zu einem Plasmid und (iv) Expression des Gens, ist der Gentransfer von Genen von Pflanzen auf Bakterien und deren Ausprägung ein seltenes Ereignis. Bisherige Untersuchungen belegen, dass die Wahrscheinlichkeit auch unter optimierten Laborbedingungen sehr gering ist und ein horizontaler Gentransfer unter Feldbedingungen nicht nachgewiesen werden konnte (Nielsen et al. 1997, Gebhard and Smalla 1998).

Ein Gentransfer auf Menschen und Nutztiere ist praktisch ausgeschlossen, da keine pflanzlichen Bestandteile des Feldversuchs in die Nahrungs- bzw. Futterkette gelangen werden.

7. Informationen über toxische, allergene oder schädliche Effekte auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt, die durch die gentechnische Veränderung hervorgerufen werden

Keine pflanzlichen Bestandteile des Feldversuchs werden in die menschliche oder tierische Nahrungskette gelangen. Eine schädliche oder toxische Auswirkung der genetischen Modifikation auf den Menschen kann nicht angenommen werden, da die bewirkte Veränderung (a) auf einer erhöhten Degradation von Chitin beruht, die wiederum Resistenz gegenüber den pilzlichen Phytopathogenen *Rhizoctonia solani* AG-8 und *R. oryzae* vermitteln soll, bzw. (b) auf einen verbesserten Abbau von β -Glucanen im Endosperm und Aleuron des Gerstenkorns abzielen.

Auf mögliche Auswirkung der Endochitinase (cThEn42(GC)) und (1,3-1,4)- β -Glucanase auf pilzliche und bakterielle Organismen sowie Insekten wird in Abschnitt D 9 eingegangen. Da sowohl Chitin als auch Glucane Bestandteile der Zellwände bzw. des Exoskeletts dieser Organismen darstellen, sind Wechselwirkungen mit invasiven Organismen denkbar. Die Wechselwirkungen mit symbiontischen Organismen (Mykorrhizapilzen, kommerzielles Produkt Amykor[®] Wurzel-Vital) soll im Rahmen dieser Studien untersucht werden.

Basierend auf mündlichen Mitteilungen wissenschaftlichen Fachpersonals gab es in bisherigen Gewächshaus- und Feldversuchen in den USA keine Hinweise auf negative Auswirkungen auf Menschen und Umwelt.

Für die beiden in den jeweiligen Gerstenlinien exprimierten Genprodukte, Endochitinase und (1,3-1,4)- β -Glucanase, gibt es keine Hinweise auf toxische oder allergene Wirkungen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz mit einer Allergen-Datenbank ergab keine Sequenzhomologien > 36% bzw. > 31% zu bekannten Allergenen und keine Übereinstimmungen von mehr als 4 aufeinander folgenden Aminosäuren. Es wurden keine Homologien zu Toxinen gefunden.

Das *Bar*-Gen bzw. dessen Genprodukt (Phosphinothricin-Acetyltransferase, PAT) wurde nach umfangreichen Sicherheitsuntersuchungen als nicht gesundheitsgefährdend eingeordnet. PAT besitzt keine N-Glykosylierungsstellen und das Enzym besitzt keine Ähnlichkeit (Identität war < 35%) und keine Homologien von mehr als 8 konsekutiven Aminosäuren zu Allergenen oder Toxinen. Intravenöse Injektion (bis 10 mg/kg Körpergewicht) von PAT in Mäuse zeigte keinerlei toxische Symptome. Das Enzym ist

hitzestabil. Die Enzymaktivität wird allerdings ab einer Temperatur von 60°C und 10 minütiger Exposition inaktiviert (Herouet et al. 2005). Das PAT Enzym wurde durch die EPA (Environmental Protection Agency) von einer Toleranzkennzeichnung für alle landwirtschaftlichen Rohstoffe befreit (EPA 1997).

Das *sGFP*-Gen wurde von Chiu et al. (1996) beschrieben. Sicherheitsuntersuchungen ergaben keine toxischen Effekte in Fütterungsversuchen mit Mäusen (1 mg aufgereinigtes GFP/Tag über 26 Tage). Der Vergleich des Proteins mit Aminosäuresequenzen bekannter Allergene ergab keine Homologien > 4 konsekutiver Aminosäuren. Das Protein zeigt keine Stabilität gegenüber Verdauungsprozessen in Mensch und Tier, was seine potenzielle Allergenität unwahrscheinlich macht. Transformierte Zebrafische und Mäuse, die konstitutiv *GFP* exprimierten, waren gesund (Higashijima et al. 1997, Hadjantonakis et al. 1998). Dies deckt sich im Falle der Mäuse mit den Ergebnissen aus den Fütterungsversuchen (Richards et al. 2003).

Zusätzlich wurden weitere Sequenzen, die innerhalb der T-DNA liegen, in die pflanzliche Zelle transferiert. Die Endochitinase-exprimierende Linie (pYW210-9-(4001-4360)) enthält die pBIN 19 Sequenzen 5928-6777 und 9140-9421. Die Beta-Glucanase-exprimierende Linie (pJH271-Beta-Glu-307) enthält die pBIN 19 Sequenzen 5928-6768 und 9209-9421. Die T-DNA enthält an Position 6043-6190 bzw. 9260-9421 die linke bzw. die rechte Randsequenz, die für ihre Integration in das pflanzliche Genom benötigt werden. Die Nukleotide 6191-6321 und 6623-6917 umfassen Teile des *lacZ*-Gens aus *E. coli*, die in Pflanzen nicht funktional sind. Die Nukleotide 6322-6622 umfassen Teile (den Ursprung der Replikation) des *E. coli*-Phagen M13, die in Pflanzen nicht funktional sind. Die Nukleotide 8953-9259 umfassen den Promotor des *Nos*-Gens (*Nopalinsynthase*) aus *Agrobacterium tumefaciens*, der aber auf Grund der diversen Klonierungsschritte nur fragmentarisch in den Nukleotiden 9140-9421 von pYW210 und 9209-9421 von pJH271 vorliegt (vgl. Anhang II, Abb. 5, Frisch et al. 1995).

Die für die Erstellung der Linien pJH271-Beta-Glu-307 und pYW210-9-(4001-4360) verwendeten Plasmide (pJH271 bzw. pYW210) basieren auf dem Plasmid pBIN19. Außerhalb der T-DNA des pBIN19 ist ein Kanamycin-Resistenzgen gelegen (*nptIII*), welches eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase kodiert. In seltenen Fällen können Vektorsequenzen über die T-DNA hinaus übertragen werden. Da das *nptIII*-Gen unter Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht, sollte es in Pflanzen nicht exprimiert werden. Southern Blot Analysen zeigten, dass *nptIII* weder in seiner Gesamtheit noch in Fragmenten in das Genom der Linien pJH271-Beta-Glu-307 und pYW210-9-(4001-4360) integriert wurde (s. Anhang V und Abschnitt D 2 (a) b)). Da keine genaue Analyse zur Integration der restlichen außerhalb der T-DNA liegenden Sequenzen in das Pflanzengenom der beiden Linien durchgeführt wurde, wird der Risikoabschätzung zugrunde gelegt, dass diese Sequenzen integriert sind. Der Vektor pBIN19 wurde vollständig sequenziert (Anhang II, Abbildung 5; Frisch et al. 1995). Auf Grund der Sequenz ergeben sich folgende Teilstücke außerhalb der T-DNA: Die Nukleotide 1-618 umfassen den *oriV*, den Ursprung der Replikation des Plasmids pRK2 aus *E. coli*. Die Nukleotide 693-964 umfassen ein nicht funktionales Teilstück des *kilA*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*. Die Nukleotide 3079-4560 umfassen das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2, das für zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids in Bakterien, jedoch nicht in Pflanzen, notwendig sind. Die Nukleotide 4561-5603, 9434-10617 umfassen das *tetA*-Gen des Plasmids pRK2, das nicht funktional ist, da es zwischen den Positionen 6043-9421 durch die T-DNA unterbrochen ist. Die Nukleotide 10610-10988 umfassen den ColE1 *ori*, den Ursprung der Replikation von dem Plasmid ColE1. Die Nukleotide 10982-11765 umfassen Teile des *traF*-Gens, die den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli* enthalten, der für triparentale Paarungen benötigt wird, in Pflanzen jedoch nicht funktional ist. Die Nukleotide 619-692, 5604-6042, 9422-9433 und 11766-11777 umfassen Bereiche, die keine Homologien zu bisher bekannten Sequenzen aufweisen.

8. Informationen über die Sicherheit der GVP für die Tiergesundheit, insbesondere in Bezug auf toxische, allergene oder sonstige schädliche Effekte auf Grund der genetischen Modifikation, falls die GVP für die Verwendung in Tierfutter vorgesehen ist

- Keine pflanzlichen Bestandteile des Feldversuchs werden in die menschliche oder tierische Nahrungskette gelangen.

9. Mechanismen der Wechselwirkung zwischen den GVP und den Zielorganismen (falls zutreffend)

Die Feldstudien ermöglichen eine epidemiologische Aufzeichnung auftretender pilzlicher Krankheiten auf den gentechnisch modifizierten Pflanzen und den/m entsprechenden Empfängerpflanzen (Golden Promise) bzw. Kreuzungselter (Baronesse). Zielorganismen sind folglich alle auftretenden pilzlichen Schaderreger.

Die möglichen Wechselwirkungen zwischen pilzlichen Organismen und den zu verwendenden transgenen Linien basieren auf der Eigenschaft der Transgene, Chitin oder Glucane zu hydrolisieren und somit invasive, pilzliche Organismen an der Infektion und Besiedlung pflanzlichen Gewebes zu hindern.

Chitin ist ein aus N-Acetylglucosaminen aufgebautes Polysaccharid. Es ist Bestandteil pilzlicher Hyphenwände und kann durch Chitinasen abgebaut werden. *In vitro* Versuche mit axenischen Pilzkulturen von *Rhizoctonia solani* AG-8, *R. oryzae* und *Gaeumannomyces graminis* zeigten, dass die zur Transformation verwendete *Endochitinase (cThEn42(GC))* die pilzliche Entwicklung hemmt und in höheren Konzentrationen auch verhindert. Von einer generellen, antifungalen Wirkung der Endochitinase kann nicht ausgegangen werden, da das Wachstum von drei *Fusarium* sp. (*F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*) nicht beeinflusst war (Wu 2003). Dennoch ist eine Wechselwirkung mit anderen pilzlichen Schaderregern nicht auszuschließen.

(1,3-1,4)- β -Glucane sind Polysaccharide in Zellwänden Höherer Pflanzen der Familie der Poaceae und hier im speziellen der Gramineen (Planas 2000). Hier ist sie verstärkt in den Zellwänden des Endosperms von Getreide zu finden. Diese β -Glucane unterscheiden sich von den Glucanen bakterieller und pilzlicher Zellwänden. Die enzymatische Depolymerisierung von (1,3-1,4)- β -Glucanen wird von verschiedenen β -Glucanasen durchgeführt, unter denen die (1,3-1,4)- β -Glucanasen (EC 3.2.1.73) das aktivste Enzym darstellen. (1,3-1,4)- β -Glucanasen besitzen eine strikte Substratspezifität für die Spaltung L-1,4 glykosidischer Bindungen 3-O-substituierter Glukopyranoseeinheiten. Die Endprodukte der Hydrolyse von Gerste β -Glucanen sind Trisaccharide (3-O- β -Cellobiosyl-D-Glukopyranose) und Tetrasaccharide (3-O- β -Cellotriosyl-D-Glukopyranose). Neben Pflanzen gibt es auch einige Bakterien, welche (1,3-1,4)- β -Glucanasen sekretieren. In *Bacillus* sp. haben diese Enzyme die gleiche Substratspezifität wie jene Glucanasen in Gerste, die für die Mobilisierung von Stärke und Proteinen im Endosperm während der frühen Kornkeimung benötigt werden (Borriss et al. 1989, Jensen et al. 1996, Planas 2000). Bakterielle und pflanzliche (1,3-1,4)- β -Glucanasen besitzen weder eine Ähnlichkeit auf Aminosäuresequenzebene noch ähnliche dreidimensionale Enzymstrukturen, was ihre unterschiedlich evolutionäre Entwicklung, obgleich ihrer gleichartigen Substratspezifität, belegt (Planas 2000).

Die (1,3-1,4)- β -Glucanase, mit welcher Golden Promise transformiert wurde, basiert auf einer intragenischen Rekombination eines Gens von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans*. Das Gen enthält die Aminosäuren 1-12 von *B. amyloliquefaciens* und 13-214 von *B. macerans*, wobei Tyr 13 von *B. amyloliquefaciens* entfernt wurde. Dies bewirkt eine

erhöhte Hitzestabilität des Enzyms von mehr als 4 h bei 70°C und pH 5,0 (Borriss et al. 1989, Politz et al. 1993, Jensen et al. 1996).

Nach heutigem Wissen ist ein Einfluss auf pilzliche (und bakterielle) Organismen nicht auszuschließen. Einige Fakten wirken allerdings limitierend auf mögliche Interaktionen zwischen dem rekombinanten Enzym und nicht-pflanzlichen Organismen: (a) Die Kontrolle des Transgens durch den D *Hordein*-Promotor begrenzt seine Expression auf das Endosperm. (b) Die Expression des rekombinanten Enzyms ist zeitlich auf die Kornentwicklung und -keimung reduziert. (c) Das rekombinante Enzym besitzt eine hohe Substratspezifität für die (1,3-1,4)- β -Glucane des Endosperms und Aleurons.

Gemäß dem Bescheid des Bundesamtes für Verbraucherschutz und Lebensmittel-Sicherheit (BVL, Berlin, vom 03. April 2006; Az. 6786-01-0168), erfolgte am 25.04.2006 (s. Zwischenbericht 2006) die Durchführung der Freisetzung der gentechnisch veränderten Gerste auf dem Versuchsgelände des Instituts für Phytopathologie und Angewandte Zoologie der Universität Gießen im Alter Steinbacher Weg 44, 35394 Gießen, Flur/Flurstück 15/75/2 (s. den Versuchsplan Abbildung 1). Dieses Vorhaben wurde am 28.03.2007 unter der gleichen Bedingung wiederholt.

Bei der Ernte wurden die transgenen Pflanzen sowie die nicht-transgenen Elternpflanzen mit Hilfe eines Spatens aus dem Boden gehoben und anschließend mit Wasser sorgfältig und vorsichtig von anhaftender Erde an der Wurzeln noch auf dem Versuchsfeld befreit. Junges Wurzelmaterial wurde schließlich in verschließbare Reaktionsgefäße überführt. Pro Parzelle wurden sechs Pflanzenwurzeln geerntet. Eine Hälfte des Probenmaterials wurde sofort in flüssigem Stickstoff zur molekularen Analysen schockgefroren. Die andere Hälfte wurde für die zytologischen Untersuchungen in einer Fixierlösung aufbewahrt.

DNA-Extrakte aus Wurzel

Aus dem Wurzelmaterial von 3 Pflanzen (pro Parzelle) wurde separat die DNA extrahiert und bis zur weiteren Untersuchung mittels Polymerasekettenreaktion bei -20°C aufbewahrt.

Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde sowohl mit den universellen Primern NS5 (5'- AAC TTA AAG GAA TTG ACG GAA G-3') und der rDNA Internal Transcribed Spacers (ITS4: 5'- CTC CGC TTA TTG ATA TGC T-3') als auch mit Gerste ubiquitin-primer (Hv-Ubi60deg-rev 5'-CAG TAG TGG CGG TCG AAG TG-3'; Hv-Ubi60deg-fwd 5'-ACC CTC GCC GAC TAC AAC AT-3) als Kontrolle durchgeführt. Dieses Amplikon dient als Matrix zur Bestimmung der Untergruppen unter Verwendung AM spezifischer Primer (VANS1fwd 5'-GTCTAGTATAATCGTTATACAGG-3'; NS31 fwd 5'- TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC und AM1rev 5'- GTTTCCCGTAAGGCGCCGAA-3').

Mikroskopische Untersuchungen

Die Besiedlung der Wurzel mit AM Pilzen wurde ermittelt. Es wurden 100 Wurzelsegmente pro Wiederholung untersucht Zur Visualisierung des Pilzes wurde der Farbstoff WGA-Alexa Fluor 488 bzw. Trypan Blau verwendet. Bonitierung erfolgte nach den folgenden Kriterien:

1. Gesamtverpilzung (Besiedlungsgrad %, Intensität der Mykorrhizierung %)
2. intraradikale Hyphen
3. Arbuskeln
4. Vesikel

Eine kurze Zusammenfassung der erzielten Ergebnissen erfolgt in D.13.

10. Mögliche signifikante Wechselwirkungen mit Nichtzielorganismen

Nichtzielorganismen, bei denen eine Wechselwirkung mit den transgenen Linien denkbar wäre, sind tierische Organismen, welchen Gerstenkörner oder -pflanzen als Futter dienen sowie bodenbürtige Bakterien und mykösymbiontische Organismen.

Da die gentechnische Modifikation auf einer verstärkten Expression einer Endochitinase (cThEn42(GC)) bzw. einer (1,3-1,4)- β -Glucanase beruht, ist eine Wechselwirkung mit Säugetieren unwahrscheinlich.

Für mögliche signifikante Wechselwirkungen der rekombinanten (1,3-1,4)- β -Glucanase mit Nichtzielorganismen gilt das bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnte.

Chitin ist als Bestandteil pilzlicher Hyphenwände auch in Mykorrhizapilzen anzutreffen. Chitin ist ein Polysaccharid, das aus mehreren N-Acetylglucosaminen besteht. Somit ist die konstitutive Expression der Endochitinase in den transgenen Pflanzen potenziell schädigend für invasive Organismen.

Bisherige Untersuchungen belegen keinen antifungalen Effekt von Chitinasen bei der Mykorrhizierung:

- Verschiedener Chitinasen (Klasse III) zeigten eine erhöhte Transkription in *Medicago truncatula* während der Besiedlung durch *Glomus intraradices* (Salzer et al. 2000).
- Die konstitutive Überexpression verschiedener Chitinasen (Klasse I, II, III) unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors in Tabakwurzeln zeigte keine Unterschiede im Besiedlungsverhalten von *Glomus mosseae* im Vergleich zur Wurzelbesiedlung von Kontrollpflanzen (Vierheilig et al. 1995).

Dennoch sind Wechselwirkungen mit pilzlichen Symbionten nicht auszuschließen. Die Feldversuche haben das Ziel, mögliche Wechselwirkungen zu identifizieren.

Wechselwirkungen mit Insekten sind aus mehreren Gründen unwahrscheinlich:

- Das Exoskelett bzw. die Kutikula der Insekten besteht zwar aus bis zu 40% Chitin, jedoch ist Chitin nicht in der äußersten Schicht des Integuments, der Epikutikula, vorhanden.
- Das Chitin der inneren Schichten der Kutikula (Exo-, Endokutikula) ist eng mit Proteinen verbunden und folglich ist der Zugang für Chitinasen eingeschränkt. So sind auch vornehmlich Proteasen in die Häutung der Insekten involviert.
- Die peritrophe Membran des Verdauungskanal der Insekten enthält ebenfalls Chitin. Sie besteht aber durchschnittlich nur zu 3-13% aus Chitin während Proteine, Glykoproteine und Proteoglykane die Hauptbestandteile darstellen (Merzendorf und Zimoch 2003).
- Herbivore Insekten sind in allen Ökosystemen ständig mit pflanzlichen Chitinasen konfrontiert, die sich jedoch nicht schädigend auswirken.
- Basierend auf mündlichen Mitteilungen wissenschaftlichen Fachpersonals zeigten bisherige Feldversuch in den USA keine Auffälligkeiten in der Entwicklung und dem Fressverhalten von Schädlingen (z.B. Blattläuse) und Prädatoren (z.B. Marienkäfer)

Bodenmikroorganismen stellen eine andere Gruppe von Nichtzielorganismen dar, bei denen ein Gentransfer in Erwägung gezogen werden muss. Bisherige Untersuchungen konnten keinen horizontalen Gentransfer mit nicht-homologer DNA unter Feldbedingungen nachweisen. Das Fazit dieser Untersuchungen war, dass die Wahrscheinlichkeit eines solchen Gentransfers als sehr gering eingestuft werden muss (Nielsen et al. 1997, Gebhard and Smalla 1998).

In dieser Hinsicht konnten durch die Zerstörung der Freisetzungsvorversuche in 2006 und 2007 keine Erkenntnisse aus der Freisetzung 67860-0168 in Gießen erzielt werden.

11. Mögliche Wechselwirkungen mit der abiotischen Umgebung

Definiert man die abiotische Umgebung als Umweltfaktoren (z.B. Klima, Atmosphäre, Boden, Wasser, Wärme, Temperatur usw.), die nicht direkt durch Lebewesen beeinflusst werden, so werden keine Auswirkungen auf die verschiedenen Parameter erwartet.

Es ist davon auszugehen, dass physikalische und chemische Prozesse des Proteinabbaus bzw. der Blattzerlegung des modifizierten Pflanzenmaterials dem der Empfängerpflanze bzw. Kreuzungspartner (Golden Promise, Baroness) entspricht.

Basierend auf mündlichen Mitteilungen wissenschaftlichen Fachpersonals konnten in bisherigen Feldversuchen an der Washington State University, Pullman (USA) keine Unterschiede im Abbau des gentechnisch veränderten Pflanzenmaterials im Vergleich zum Pflanzenmaterial der Empfängerpflanze beobachtet werden. Diese Beobachtungen sind rein qualitativ und beruhen nicht auf einer quantitativen Auswertung. Sie sind möglich, da nach den Richtlinien des „Animal and Plant Health Inspection Service – APHIS“ dem Anbau von modifizierten Pflanzen in den USA eine Schwarzbranche folgt.

12. Beschreibung der Nachweis- und Identifizierungsverfahren für die GVP

Die gentechnisch veränderten Pflanzen sind mit mehreren Methoden identifizierbar:

- PCR, Western Blots und genomische Southern Blots zum Nachweis der Transgene.
- Enzymassay für die Aktivität der (1,3-1,4)- β -Glucanase (Horvath et al. 2000) und der Endochitinase (cThEn42(GC)).

13. Gegebenenfalls Informationen über frühere Freisetzungen der GVP

Die beiden hier verwendeten transgenen Pflanzen wurden seit 1999 (pJH271-Beta-Glu-307) bzw. seit 2004 (pYW210-9-(4001-4360)) an der Washington State University, Pullman (USA) im Feld angebaut. Für das Jahr 2005 wurden folgende Aktenzeichen für die Freisetzungsvorversuche durch die „Animal and Plant Health Inspection Service – APHIS“ der Vereinigten Staaten von Amerika vergeben:

- Release Notification No. 05-035-13n (Th42-2) für pYW210-9-(4001-4360)
- Release Notification No. 05-035-14n (di 04-029-02n) für pJH271-Beta-Glu-307

Dieselben Transformationsereignisse wurden im Jahr 2006 und 2007 in Gießen auf dem Feld der Universität angebaut: Bescheid des BVL, Berlin, vom 03. April 2006: Az. 6786-01-0168.

Zusammenfassung der erzielten Ergebnisse:

1. Eine erfolgreiche Besiedlung von transgenen wie nicht-transgenen Elternpflanzen (Kontrollpflanzen) mit Mykorrhizapilzen unter Freiland- und

Gewächshausbedingungen konnte durch mikroskopische Analysen nachgewiesen werden.

2. Durch molekulare Analyse konnte die Mykorrhizierung auch quantitativ analysiert und bestätigt werden.
3. Hinweise auf eine gestörte Wechselwirkung von Wirtspflanze mit Mykorrhiza-Pilzen wurden nicht erhalten.
4. Eine AM-spezifische Analyse und Quantifizierung der Verpilzung unter Verwendung des NS5/ITS4-Amplikon wird noch durchgeführt werden.
5. Hinsichtlich der Vermeidung von Durchwuchs wurde das generative Pflanzenmaterial (Ährenstroh) der Versuchsfläche und der Mantelsaat geerntet und durch Autoklavieren inaktiviert. Bei Kontrollen im Abstand von zwei Wochen konnte kein Durchwuchs beobachtet werden.

E. Informationen über den Ort der Freisetzung

Alle dazu benötigten Kartenübersichten sind in Anhang zu finden (VI. Anhang II).

1. Lage und Größe der Freisetzungsfäche

Die Versuchsfläche befindet sich auf den Flächen des AgroBiotechnikums Gemeinde 18184 Thulendorf (Mecklenburg-Vorpommern, Landkreis Bad Doberan).

Die Freisetzung erfolgt in der Gemarkung Klein Lüsewitz, Gemeinde 18184 Thulendorf. Die vorgesehene Versuchsfläche erstreckt sich über die Flure 1 und 2 (Flurstücke s.u.). Sie hat eine Gesamtfläche von 46,3 ha und befindet sich nördlich der B110 zwischen Rostock und Sanitz. An das Feldstück grenzt im Westen die Ortschaft Sagerheide. In etwa 1 km Entfernung liegt die Ortschaft Groß Lüsewitz, Sanitz ist etwa 3 km entfernt.

Die Versuchsfläche liegt aufgrund ihrer topographischen Lage nicht im Überschwemmungsgebiet. Die Versuchsfläche grenzt im Osten an das FFH Gebiet „Billenhäger Forst“. In allen anderen Richtungen ist sie von Ackerland umgeben.

Der Versuchsumfang beinhaltet maximal 4000 GVP auf einer Versuchsfläche von ca. 777,6 m² inklusive Mantelsaat. Die Freisetzungsfäche (= mit GVP bestandene Fläche) beträgt 9,6 m² (s. Anhang III).

Kreis: Bad Doberan

Gemarkung: Klein Lüsewitz,

Gemeinde 18184 Thulendorf

Flur: 1 und 2

Flurstück: 54, 18, 19 (Flur 1) und 46, 47, 49, 50, 51, 52, 54 (Flur 2)

Schlag: 3/12

Schlaggröße: 46,3 ha

Eigentümer: Land Mecklenburg

Pächter: [REDACTED]

Bewirtschaftender Betrieb: [REDACTED]

Geographische, geologische und bodenkundliche Eigenschaften

Bodenart: lehmiger Sand

Bodenzahl/Ackerzahl: 42

natürliche Standorteinheit D3b2 (Bodenform Sandtieflehm-Braunstaugley).

Geplante Erschließungen oder Geländeumwidmungen

Es sind keine Erschließungen oder Geländeumwidmungen geplant.

Umfang der ortsansässigen Bevölkerung

Gemeinde Thulendorf (Hohenfelde, Klein Lüsewitz, Neu Fienstorf, Neu Thulendorf, Sagerheide und Thulendorf) : 524 Einwohner.

Gemeinde Sanitz (Groß Freienholz, Gubkow, Hohen Gubkow, Horst, Klein Freienholz, Klein Wehendorf, Neu Kokendorf, Neu Wendorf, Niekrenz, Oberhof, Reppelin, Sanitz, Toitendorf, Vietow, Wendfeld, Wendorf, Groß Lüsewitz): 5884 Einwohner.

Wirtschaftliche Tätigkeiten der ortsansässigen Bevölkerung, die sich auf die natürlichen Ressourcen des Gebietes stützen

Landwirtschaft, Forstwirtschaft, Pflanzenzüchtung

2. Beschreibung des Ökosystems am Ort der Freisetzung, einschließlich Klima, Flora und Fauna**Klimatische Merkmale des Gebietes**

Das Gebiet zählt zum Ostseeküstenklima mit einer Jahresdurchschnittstemperatur von 6,9°C und einem mittleren Niederschlagsniveau von 580-640 mm. Die vorherrschende Windrichtung geht von West nach Ost.

Jahresniederschlag: 580 – 640 mm
 Jahresdurchschnittstemperatur: 6,9 °C
 Höhe über NN: 15 m.

Vorhandene Pflanzen- und Tiergesellschaften einschließlich Nutzpflanzen, Nutztieren und wandernden Arten

Das Versuchsgelände ist Ackerland. Die Ackerflächen in der Umgebung der Fläche besitzen etwa die gleiche natürliche Standorteinheit und Bodenart und werden ebenfalls ackerbaulich genutzt. Der Ackerbau umfasst Getreide (etwa 50 %), Silomais, Kartoffeln und Raps.

Wildlebende Tiere wie Kaninchen, Hasen, Rehe, Schwarzwild und Vögel (ortsfeste und ziehende: Saatkrähen, Wildtauben, Wildgänse, Mäusebussarde, Spatzen, Kohlmeisen und andere Finkenvögel sowie Kraniche) treten im Ökosystem auf. Insekten wie Wildbienen und Hummeln kommen in natürlichen Populationen vor, darüber hinaus auch Bienenvölker in jährlich variierender Anzahl. Am Standort typische Unkräuter sind Weißer Gänsefuß (*Chenopodium album*), Acker-Hellerkraut (*Thlaspi arvense*), Flohknöterich (*Polygonum persicaria*), Hirtentäschel (*Capsella bursa pastoris*), Gemeiner Windenknöterich (*Fallopia convolvus*) und Purpurrote Taubnessel (*Lamium purpureum*). Diese Angaben wurden durch eine Standorterfassung im Juni 2003 durch Mitarbeiter der Universität Rostock erhoben (FINAB e.V., 2003).

Gesetzlich geschützte Arten an den Standorten Sanitz/Groß Lüsewitz und Thulendorf/Klein Lüsewitz (Angaben nach Biovativ, [REDACTED] gemäß Datenabfragen beim Landesamt für Naturschutz und Geologie, Mecklenburg-Vorpommern (LUNG), siehe auch ergänzende Information im Anhang II Karte 7): Kraniche, Überwinternde Feldgänse, Marderhund, Weißstorch, Fischotter, Bachneunauge, Rotbauchunke, Kammmolch, Laubfrosch (*Hyla arborea*), Moorfrosch (*Rana arvalis*), Knoblauchkröte (*Pelobates fuscus*), Wechselkröte (*Bufo viridis*), Wasserfrosch (*Rana esculenta*), Grasfrosch (*Rana temporaria*) Amphibien.

Wie bereits in Abschnitt H iv+V beschrieben, ist die Beeinträchtigen der Tiergesundheit auszuschliessen

In Abhängigkeit der Bewirtschaftung leben in den Feldfluren Feldhasen, Feldmäuse, Füchse, Marder, Dachse sowie verschiedene Kleinsäuger und Insekten.

Nach Abschluss des Versuches ist eine weitere ackerbauliche Nutzung vorgesehen. Bisherige Fruchtfolge:

2003/04	Winterraps
2004/05	Winterweizen
2005/06	Kartoffeln
2006/07	Winterweizen + Sommergerste
2007/08	Triticale + Sommergerste

3. Vorhandensein geschlechtlich kompatibler, wilder verwandter Arten oder Kulturpflanzen

Der kommerzielle Anbau von Gerste im Umkreis der geplanten Freisetzungsfläche ist ca. 50 m entfernt. Damit können Wechselwirkungen zwischen Freisetzung und kommerziellem Anbau praktisch ausgeschlossen werden.

Bisher wurden keine Wildgerstenarten dort beobachtet (mündliche Mitteilung des die Fläche bewirtschaftenden Landwirts).

4. Nähe zu offiziell anerkannten geschützten Biotopen oder Schutzgebieten, die betroffen werden können

Nähe zu Gebieten, die zum Zwecke der Trinkwassergewinnung geschützt werden

Der Schlag 3/12 und die benachbarten Flächen des Schlages 3/14 befinden sich in der Trinkwasserschutzzone III der Warnow.

Nähe zu Gebieten, die aus Umweltgründen geschützt werden

Auf dem Schlag und den Nachbarfeldstücken befinden sich Kleinbiotope in Form von Senken (Söllen), Kleingewässer, Kleingehölzen und naturnahe Feldhecken, teilweise mit Wasser gefüllt (siehe Tabelle unten). Eine Beeinträchtigung der Biotope ist nicht zu erwarten.

Der Schlag 3/12 grenzt an der Ostseite an das FFH Gebiet „Billenhäger Forst“. Die kleinstmögliche Entfernung zwischen der Freisetzungsfläche und diesem FFH-Gebiet beträgt 25 m. Durch die beantragte Freisetzung wird das angrenzende FFH Gebiet nicht beeinträchtigt, da es sich um einen Laubmischwaldkomplex mit einer Vielzahl von unterschiedlichen Laubwaldgesellschaften handelt und das Schutzziel der Erhalt und teilweise die Entwicklung eines Waldkomplexes mit mehreren Waldlebensraumtypen darstellt.

Bemerkung: Das Flurstück selbst grenzt genau an ein FFH Gebiet. Allerdings gibt es zwischen Ackerfläche und dem benachbarten FFH Gebiet noch einen etwa 25 m breiten Grasstreifen, der zum beantragten Flurstück gehört. Damit können wir nur im Abstand von 25 m Versuche anlegen.

Im Umkreis von 5 km befinden sich keine Naturschutzgebiete, Nationalparks oder Biosphärenreservate.

Auf der zur Verfügung stehenden Fläche und im Umfeld von 500 m befinden sich keine geschützten Gebiete nach § 23, §24, §25.

Liste der Schutzgebiete

BNatSchG	Nummer	Entfernung (m)	Himmelsrichtung
Natura 2000 – Vorschlagsgebiet	DE 1840-302		Osten
§30 Biotope:			
Naturnahe Feldhecke	07557	Ca. 500	Norden
Soll	07554	Auf der Fläche	Norden
Naturnahe Feldgehölze	07539	Ca. 500	Nordwesten
Soll	07536	Ca. 400	Nordwesten
Soll	07534	Ca. 200	Westen
Stehendes Kleingewässer einschl. Ufervegetation	07525	Ca. 400	Westen
Soll	07550	Auf der Fläche	Norden
Soll	07543	Auf der Fläche	Norden
Naturnahe Feldhecke	07565	Ca. 500	Nordosten
Soll	07564	Ca. 500	Nordosten
Soll	07567	Ca. 550	Nordosten
Soll	07562	Ca. 550	Osten
Soll	07537	Auf der Fläche	Osten
Soll	07522	Ca. 100	Westen
Soll	07529	Auf der Fläche	Mitte
Soll	07523	Auf der Fläche	Süden
Soll	07521	Ca. 100	Süden
Naturnahe Feldhecke	07518	Ca. 200	Süden
Naturnahe Bruch-, Sumpf- und Auwälder	07516	Ca. 400	Süden
Soll	07510	Ca. 450	Süden

F. Informationen über die Freisetzung (nur bei Anmeldungen gemäß Artikel 5)

1. Zweck der Freisetzung

Die Feldstudien umfassen eine gezielte Evaluation von Interaktionen zwischen den transgenen Linien und dem symbiontischen Pilz *Glomus intraradices* (kommerzielles Präparat Amykor® Wurzel-Vital). Ein zweites Ziel ist eine umfassende epidemiologische Aufzeichnung auftretender, pilzlicher Organismen bzw. sichtbarer Krankheiten auf gentechnisch modifizierten Pflanzen und der/m entsprechenden Empfängerpflanze (Golden Promise) und Kreuzungselter (Baronesse).

Mit Hilfe dieser Feldstudien können nähere Angaben zum Wirkungsgrad und zur -spezifität der rekombinanten Proteine gemacht und der Einfluss der modifizierten Linie auf pilzliche Organismen definiert werden.

Es wird ein randomisierter Versuchsaufbau eingerichtet mit drei Wiederholungen pro Genotyp und Behandlung (s. Anhang III).

2. Zeitplan für die Freisetzung einschließlich Zeitpunkt(e) und Dauer der Freisetzung(en)

Die Freisetzung ist während der normalen Anbausaison (Ende März/Anfang April – August/September) für Sommergerste in Deutschland für das Jahr 2009-2010 vorgesehen.

3. Für die Freisetzung angewandte Methoden

Der Freisetzungsversuch wird in einer Spaltanlage mit drei randomisierten Wiederholungen pro Linie und Behandlung durchgeführt. Es werden insgesamt 4 Linien (2 transgene, 2 konventionelle) 3 Behandlungen unterzogen (Gesamtanzahl der Parzellen: 36).

Behandlung 1: Ausbringung des Mykorrhizapilzes *Glomus intraradices* mittels des kommerziellen Produkts Amykor® Wurzel-Vital (Fa. Amykor, Wolfen). Das Trägermaterial ist Blähton. Die Aufwandmenge ist 50 ml/m². Zusätzlich wird das Produkt in gleicher Aufwandmenge unter das für die Behandlung vorgesehene Saatgut gemischt und mit dem Saatgut gedrillt.

Behandlung 2: Trägermaterial (Blähton ohne Mykorrhizapilz).

Behandlung 3: Kontrolle.

Der Blähton mit und ohne Mykorrhizapilz wird unmittelbar vor der Aussaat per Hand ausgestreut und eingearbeitet.

Die Aussaat erfolgt mit in Versuchsarbeiten üblichen Drillmaschinen oder durch andere geeignete Verfahren (einschließlich Handaussaat). Die Drillmaschinen werden nach der Aussaat auf dem Versuchsgelände von eventuell noch vorhandenem transgenem Saatgut gereinigt. Dadurch wird eine Verschleppung transgenen Saatguts verhindert.

Das Versuchsgelände wird von einem 5 m breiten Randstreifen mit konventioneller Gerste (Sorte Scarlett) umfasst, der wiederum von Schwarzbrache (Breite: 5 m) umgeben ist.

Nach der Beendigung des Versuchs werden die Ähren der GVP und konventionellen Kulturgerste der Parzellen per Hand geerntet. Der Randstreifen mit der konventionellen Gerste wird maschinell geerntet. Geerntete Ähren/Körner werden sofort in entsprechend deklarierte Säcke verpackt und in geschlossenen Behältnissen in zertifizierte S1-Laboratorien verbracht (laut Richtlinie 90/219/EEC).

Nicht benötigtes Saatgut und nicht für Analysen benötigtes Erntegut (auch das aus der Mantelsaat) wird durch Hitzebehandlung inaktiviert.

4. Verfahren zur Vorbereitung und Überwachung des Freisetzungsgeländes vor, während und nach der Freisetzung, einschließlich Anbaupraktiken und Ernteverfahren

Nach Aberntung der Vorfrucht wird eine Stoppelbearbeitung durchgeführt, die anschließende Grundbodenbearbeitung (Pflug, Grubber oder sonstiges Gerät) wird im Herbst oder Frühjahr vorgenommen. Im Frühjahr erfolgt die Saatbettbereitung mit praxisüblichen, dafür geeigneten Maschinen bzw. Werkzeugen oder Werkzeugkombinationen. Welche konkret eingesetzt werden, hängt vom Bodenzustand und den Witterungsverhältnissen ab.

Im Verlauf des Pflanzenwachstums wird erneut einmal gedüngt. Unkrautdruck wird mit einem Herbizid entgegengewirkt, Schädlingsdruck wird mit Insektiziden behoben.

Das Pflanzenwachstum wird wöchentlich protokolliert. Während der Vegetationsperiode werden zu verschiedenen Zeiten Proben genommen.

Nach der Beendigung des Versuchs erfolgt eine Stoppelbearbeitung (Scheibenegge), mit der ein erneutes Auskeimen des Ausfallkorns angeregt wird. Der erneute Gerstenaufwuchs wird noch im selben Jahr mit Roundup behandelt. Im nächsten Frühjahr werden aufgelaufene Gerstenpflanzen in den Versuchspartellen bonitiert und es wird in der Folgefrucht ein Herbizid zu deren Vernichtung eingesetzt. Im Folgejahr werden auf der Freisetzungsfäche andere Kulturpflanzen als Gerste angebaut, so dass eventuell austreibende Durchwuchspflanzen sicher erkannt und gegebenenfalls abgetötet werden können.

Die für den Freisetzungsversuch verwendete Fläche rotiert in den beiden Anbaujahren auf dem Freisetzungsgelände, sodass in jedem Versuchsjahr nur ein Teil des gesamten Freisetzungsgeländes tatsächlich für den Anbau gentechnisch veränderter Gerste genutzt wird. Die Versuchsfläche wird nach Beendigung der Freisetzungsversuche ein Jahr überwacht. Während der Vegetationszeit der Folgekultur erfolgen 4-wöchentliche Kontrollen. Möglicherweise auflaufende Durchwuchspflanzen werden mechanisch, manuell oder chemisch bekämpft.

5. Ungefähre Anzahl der Pflanzen (oder Pflanzen pro m²)

Der Versuchsplan sieht eine Aussaatdichte von 300 Körnern pro m² vor (300 Pflanzen pro Parzelle). Der Versuchsplan ist in Anhang III aufgeführt. Es werden maximal 4000 GVP angebaut.

G. Informationen über Überwachung, Kontrollmaßnahmen, Notfallplan und Entsorgung (Nur für Anmeldungen gemäß Artikel 5)

1. Vorgesehene Vorsichtsmaßnahmen

(a) Abstand zu kreuzbaren Pflanzenarten

Gerste ist Selbstbestäuber mit einer Selbstbefruchtungsrate von ~99%, was durch die kleistogame Blütenmorphologie unterstützt wird. Verbunden mit einer im Vergleich zu fremdbefruchtenden Roggen niedrigen Pollenproduktion (~10%) werden Fremdbestäubungs- und Auskreuzungswahrscheinlichkeiten stark reduziert (Eastham und Sweet 2002). Dennoch ist eine Hybridisierung zwischen unterschiedlichen Gerstensorten über Windbestäubung möglich (Eastham und Sweet 2002, Hammer 1975, 1977).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Wagner und Allard (1991) bzw. Ritala et al. (2002) (siehe Abschnitt B2a(ii)) werden die Versuchspartzellen einen Abstand von mindestens 35 m zu möglichen Pollenempfängern im Feld einhalten.

In Abschnitt B 2 (b) wurden bereits die möglichen Pollenempfänger diskutiert. Auch wenn eine Hybridisierung ein sehr seltenes Ereignis darstellt und unter natürlichen Bedingungen die Hybridnachkommen steril sind, wird die Freisetzungsfläche zur benachbarten Vegetation abgegrenzt. Wie bereits erwähnt, werden die Versuchspartzellen auf einer Breite von 5 m mit konventioneller Gerste bepflanzt, an die sich ein vegetationsloser Bereich von 5 m Breite anschließt.

Als potenzielle Pollenempfänger müssen andere Getreidearten, *Elymus* sp. und Wildgersten angesehen werden (Fedak 1992). Von diesen drei Gruppen können die beiden Ersteren auf der Versuchsfläche auftreten und werden daher während der Versuchsperiode 2009-2010 mechanisch und chemisch kontrolliert.

(b) Verfahren zur Minimierung/Vermeidung von Pollen- oder Samenverbreitung

Pollenverbreitung:

Folgende Maßnahmen werden getroffen, um die Pollenausbreitung zu minimieren:

- Das Versuchsfeld wird auf eine Breite von 5 m mit konventioneller Gerste (Sorte Scarlett) umgeben sein, an die ein 5 m breiter, vegetationsloser Streifen folgt. Die bepflanzten Randstreifen fungieren als Pollenfallen. Der Randstreifen mit der konventionellen Gerste wird nach Abschluss der Versuche wie GVP behandelt.
- Die Versuchsfläche wird vor und während der Freisetzung auf potenzielle Pollenempfänger untersucht.

Der Versuchsplan ist in Anhang III dargestellt.

Samenverbreitung:

Das höchste Risiko der Samenverbreitung besteht während der Aussaat und der Ernte.

- Das gesamte Saatgut wird in zertifizierten S1-Labors gelagert.
- Konventionelles und GV Saatgut wird entweder mit einer Zürn 150 Parzellen Präzisionssämaschine (Typ Hege 80) gedreht – dann wird die Sämaschine nach der Aussaat einer Linie/Kultursorte gereinigt. Diese Sämaschine wurde für solche Versuche konzipiert. Oder es erfolgt die Aussaat per Hand, dann ist keine Reinigung notwendig.
- Die Ähren der GVP und konventionellen Kulturgerste werden per Hand geerntet, bevor sie die volle Reife erreichen, um das Ausfallen von Körnern zu vermeiden.

- Geerntete Ähren/Körner werden sofort in entsprechend deklarierte Säcke verpackt, in geschlossenen Behältnissen gelagert und thermisch inaktiviert, sofern sie nicht für weitere Versuchszwecke benötigt werden.
- Auf der Parzelle verbleibende Ähren werden mit der Hand geerntet. Der Randstreifen mit der konventionellen Gerste wird maschinell geerntet. Alle Körner werden in Säcke verpackt und thermisch inaktiviert.
- Auf der Versuchsfläche wird ein nicht-selektives Herbizid eingesetzt und nach der Applikation zurückbleibendes, totes Pflanzenmaterial wird zerkleinert und in den Boden eingearbeitet. In der Regel ist dies einen Monat nach der Herbizidbehandlung abgeschlossen.

2. Beschreibung der Verfahren zur Behandlung des Versuchsbereiches nach der Freisetzung

Hier gilt das bereits im vorherigen Abschnitt erwähnte.

Im folgenden Versuchsjahr wird die Versuchsfläche mit einer Kulturpflanze bestellt, in der Durchwuchs eindeutig identifiziert werden kann. Durchwachsende Gerstenpflanzen werden entfernt und thermisch inaktiviert bzw. mit einem entsprechenden Herbizid vernichtet.

Alle als potenzielle Pollenempfänger angesehenen Gräser (Getreidearten, *Elymus* sp. und Wildgersten) werden vor und während der Freisetzung der GVP mechanisch und chemisch kontrolliert. Die Versuchsfläche wird regelmäßig auf diese Gräser kontrolliert.

3. Beschreibung der Verfahren zur Behandlung von GVP-Ernten; geplante Entsorgungsverfahren

Die Ähren der GVP und konventionellen Kulturgerste der Parzellen werden per Hand geerntet, bevor sie die volle Reife erreichen, um das Ausfallen von Körnern zu vermeiden. Geerntete Ähren/Körner werden sofort in entsprechend deklarierte Säcke verpackt, in geschlossenen Behältnissen gelagert und, sofern nicht für weitere Versuchszwecke benötigt, thermisch inaktiviert. Für Versuchszwecke benötigtes Saatgut wird in zertifizierten S1-Laboratorien gelagert und eindeutig als gentechnisch verändertes Saatgut gekennzeichnet (laut Richtlinie 90/219/EEC). Alle Analysen werden ausschließlich in autorisierten und für Arbeiten mit GVO zugelassenen Laboratorien durchgeführt.

Auf der Parzelle verbleibende Ähren werden mit der Hand geerntet. Der Randstreifen mit der konventionellen Gerste wird maschinell geerntet. Alle Körner werden in Säcke verpackt und thermisch inaktiviert. Abschließend wird auf der Versuchsfläche ein nicht-selektives Herbizid eingesetzt. Nach der Applikation zurückbleibendes, totes Pflanzenmaterial wird zerkleinert und in den Boden eingearbeitet. In der Regel ist dies einen Monat nach der Herbizidbehandlung abgeschlossen.

Alle Pflanzen des Randstreifens werden nach Ende des Feldversuchs als GVP behandelt.

4. Beschreibung von Überwachungstechniken und -plänen

Die Versuchsfläche wird während der Freisetzungsversuche wöchentlich und im Jahr nach Beendigung der Versuche vierwöchentlich überwacht. Diese Überwachung dient der Identifikation potenzieller Pollenempfänger (Wildgersten, *Elymus* sp. alle Getreidearten) bzw. von Durchwuchspflanzen und deren umgehende Vernichtung durch thermisches Inaktivieren oder Herbizidapplikation.

Durchwachsende Gerstenpflanzen bzw. potenzielle Pollenempfänger sind einfach zu identifizieren und werden sofort entfernt und thermisch inaktiviert.

5. Beschreibung der Notfallpläne

Der Feldversuch kann durch klimatische Bedingungen und mutwillige Zerstörung geschädigt werden.

a) Klimatische Bedingungen (Hagel, Unwetter usw.):

i) Beschädigungen vor der Blüte:

- partielle Zerstörung: Der Versuch würde fortgeführt, beschädigte Pflanzen eingesammelt und vernichtet.
- Vollständige Zerstörung: Der Versuch würde komplett mit einem nicht-selektiven Herbizid behandelt, das nach der Applikation zurückbleibende, tote Pflanzenmaterial zerkleinert und in den Boden eingearbeitet.

ii) Beschädigung nach der Blüte:

- partielle Zerstörung: Der Versuch würde fortgeführt, beschädigte Pflanzen eingesammelt und vernichtet.
- Vollständige Zerstörung: Der Versuch würde komplett mit einem nicht-selektiven Herbizid behandelt, das nach der Applikation zurückbleibende, tote Pflanzenmaterial zerkleinert und in den Boden eingearbeitet. Die Versuchsfläche stünde für ein Jahr unter Beobachtung, um durchwachsende Gerste zu vernichten.

b) Mutwillige Zerstörung:

Hier gilt das gleiche wie das oben bereits erwähnte.

In jedem Fall würden die zuständigen Behörden umgehend unterrichtet.

6. Methoden und Verfahren zum Schutz des Standortes

Das Versuchsgelände ist mit einem Zaun umgeben, um die Zugänglichkeit der Versuchsfläche zu beschränken. Zudem ist der Versuchsstandort während der täglichen Arbeitszeiten unter Aufsicht von Mitarbeitern der bioativ GmbH, um das Betreten durch unbefugte Personen zu verhindern.

H. Informationen über die möglichen Umweltauswirkungen der Freisetzung der GVP

Merkmale der GVP und der Freisetzung

Hier eine Zusammenfassung der Information aus den bisherigen Abschnitten.

Für die Freisetzung sind 2 gentechnisch veränderte Organismen vorgesehen.

Organismus	Familie: Poaceae (Gramineae) Gattung: Hordeum Art: vulgare Unterart: Sorte/Linie: Nachkomme einer herkömmlichen Zuchtlinie von Golden Promise bzw. Baronesse, welche zur Insertion der beschriebenen Gene verwendet wurde bzw. als Kreuzungselter diente. Es werden zwei Transformationsereignisse getestet: <ul style="list-style-type: none"> • pYW210-9-(4001-4360) • pJH271-Beta-Glu-307 Trivialbezeichnung: Sommergerste
Modifikation	1. cThEn42(GC) Endochitinase, Gen aus <i>Trichoderma harzianum</i> , dessen Genprodukt in vitro das Wachstum von <i>Rhizoctonia solani</i> AG-8 und <i>R. oryzae</i> hemmt. 2. (1,3-1,4)-β-Glucanase Gen mit verbesserter Substratspezifität für (1,3-1,4)- β -Glucane im keimenden Korn. 3. Bar Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT), Gen aus <i>Streptomyces hygroscopicus</i> , das Toleranz gegenüber dem Herbizid Bialaphos vermittelt. 4. sGFP Synthetisches Grün Fluoreszierendes Protein, isoliert von <i>Aequorea victoria</i> .
Freisetzung	Der Versuchsumfang beinhaltet maximal 4000 GVP auf einer Versuchsfläche von ca. 777,6 m ² inklusive Mantelsaat. Die Freisetzungsfläche (= mit GVP bestandene Fläche) beträgt 9,6 m ² (s. Anhang III).
Dauer	Die Versuche werden zwischen März und Ende September 2009-2010 stattfinden.
Beendigung	Nach Beendigung des Versuchs werden die Ähren der GVP und konventionellen Gerste der Parzellen per Hand bzw. der Randstreifen mit der konventionellen Gerste wird maschinell geerntet. Alle Körner werden in Säcke verpackt und, sofern nicht für weitere Versuchszwecke benötigt, verbrannt. Abschließend wird auf der Versuchsfläche ein nicht-selektives Herbizid eingesetzt. Nach der Applikation zurückbleibendes, totes Pflanzenmaterial wird zerkleinert und in den Boden eingearbeitet. In der Regel ist dies einen Monat nach der Herbizidbehandlung abgeschlossen. Evt. durchwachsende Gerste wird in den folgenden Monaten und im darauf folgenden Jahr vernichtet.

In seltenen Fällen können Vektorsequenzen über die T-DNA hinaus übertragen werden. Da keine genaue Analyse der in die Pflanze integrierten Sequenz durchgeführt worden ist, wird der Risikoabschätzung zugrunde gelegt, dass der gesamte Vektor integriert ist. Außerhalb

der T-DNA des pBIN19 liegt ein Kanamycin-Resistenzgen (*nptIII*), welches eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase kodiert. Da das *nptIII*-Gen unter Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht, sollte es in Pflanzen nicht exprimiert werden. Eine Auswirkung des Gens auf den pflanzlichen Stoffwechsel ist daher nicht zu erwarten. Ferner enthält die T-DNA das *lacZ*-Gen aus *E. coli* und Teile (Ursprung der Replikation) des *E. coli*-Phagen M13, die nicht in Pflanzen funktional sind. Der in der T-DNA lokalisierte Promotor des *Nos*-Gens (*Nopalinn-Synthase*) aus *Agrobacterium tumefaciens* liegt auf Grund der diversen Klonierungsschritte nur fragmentarisch vor und ist folglich nicht funktional.

1. Risikoabschätzung

Zur Einschätzung der potenziellen unerwünschten Einflüsse auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt durch die in diesem Antrag beschriebenen, gentechnisch veränderten Gerstenpflanzen wurde eine Bewertung aller möglichen direkten und indirekten, kurzfristig und langfristig, sofortigen und verzögerten Auswirkungen durchgeführt.

Es muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei dem vorliegenden Freisetzungsantrag um Feldversuche mit geringem Umfang handelt, deren Zweck die Untersuchung des Einflusses einer Endochitinase (cThEn42(GC)) und einer (1,3-1,4)- β -Glucanase als gentechnisch veränderte Merkmale zweier Gerstenlinien (pYW210-9-(4001-4360), pJH271-Beta-Glu-307) auf die Entwicklung phytopathogener Schaderreger und eines bodenbürtigen Mycosymbionten (*Glomus intraradices*, kommerzielles Präparat Amykor[®] Wurzel-Vital) im Vergleich zu zwei konventionellen Gerstensorten (Empfängerpflanze bzw. Kreuzungselter) ist. Die Versuche der Jahre 2009-2010 laufen unter gewöhnlichen landwirtschaftlichen Bedingungen ab. Gegen Ende der Feldversuche werden alle Pflanzen geerntet und für nachfolgende Laboranalysen in eindeutig deklarierten Behältnissen aufbewahrt bzw. vernichtet. Somit wird gewährleistet, dass keine Bestandteile der GVP in die Nahrungs- oder Tierfutterkette gelangen. Grundsätzlich ist davon auszugehen, betrachtet man die Modifikationen in den GVP, deren Eigenschaften und den Versuchsaufbau, dass potenziell denkbare Auswirkungen räumlich und zeitlich auf das Versuchsfeld begrenzt sind und als kurzfristig anzusehen sind.

Die Risikoabschätzung für transgene Pflanzen, die auch Sequenzen außerhalb der T-DNA übernommen haben könnten, unterscheidet sich von der Risikoabschätzung derjenigen Pflanzen, die ausschließlich Integration der T-DNA aufweisen, dahingehend, dass die Anwesenheit des *nptIII*-Gens in Betracht gezogen werden muss. Das *nptIII*-Gen wurde vom EFSA GMO Panel 2004 der Gruppe III zugeordnet (Anonymous 2004). Diese Gruppe enthält Antibiotika-Resistenzgene, deren relevante Antibiotika in der Humanmedizin von Bedeutung sind. Das *nptIII*-Gen verleiht nicht nur Resistenz gegen Kanamycin und Neomycin, sondern auch gegen Amikacin. Amikacin stellt ein wichtiges Reserveantibiotikum von therapeutischer Bedeutung dar. Unter Berücksichtigung, dass, wenn überhaupt, (a) nur wenige transgene Pflanzen das *nptIII*-Gen tragen, (b) die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen-DNA auf Mikroorganismen sehr gering ist und (c) auf der Freisetzungsfäche kein Selektionsdruck mit Antibiotika vorhanden ist, muss davon ausgegangen werden, dass es zu keiner signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen kommen wird.

i. Wahrscheinlichkeit einer gesteigerten Persistenz der GVP in landwirtschaftlichen Habitaten bzw. einer gesteigerten Invasivität in natürlichen Habitaten

Gerste ist eine annuelle Kulturpflanze und ist nicht-invasiv in natürliche Habitats in Deutschland. Auf Grund von Züchtung und Selektion auf Ertragsmerkmale und Standortansprüche ist die Kulturgerste außerhalb der landwirtschaftlichen Umgebung

gegenüber einheimischer Flora nicht konkurrenzfähig. Die fehlende Spindelbrüchigkeit der Ähre verhindert zudem die natürliche Samenausbreitung. Obgleich durchwachsende Gerste im konventionellen Gerstenanbau vorkommt, ist dies unter der Versuchsdurchführung im Rahmen dieses Freisetzungsantrags eingeschränkt. Es ist keine gesteigerte Persistenz und Invasivität auf Grund der genetischen Veränderungen in den freigesetzten, transgenen Gerstenlinien zu erwarten. Frühere Versuche in den USA mit den hier beschriebenen, transgenen Gerstenlinien haben keine Auffälligkeiten in diesen Merkmalen gezeigt.

Die gentechnischen Modifikationen der Gerstenlinien umfassen zum einen die Markergene *Bar*, welches die Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) kodiert und Toleranz gegenüber dem Herbizid Bialaphos vermittelt, und *sGFP*, welches das Grün Fluoreszierende Protein kodiert. Zum zweiten enthalten diese Gerstenlinien entweder eine 42-kDa Endochitinase (*cThEn42(GC)*), welche *in vitro* das Wachstum von *Rhizoctonia solani* AG-8 und *R. oryzae* beeinträchtigt oder eine (1,3-1,4)- β -Glucanase, die einen verbesserten Abbau von (1,3-1,4)- β -Glucanen während der Kornkeimung verleiht.

Bei den beschriebenen Feldversuchen handelt es sich um Studien mit GVP von geringem Umfang in Kombination mit einer Durchführung unter „Guter Experimenteller Praxis“. Dies hat folgende Konsequenzen für den Versuchsablauf:

- Das Freisetzungsareal wird vor der Freisetzung mit einem nicht-selektiven Herbizid behandelt bzw. Unkräuter und Ungräser werden mechanisch entfernt.
- Während der Versuchsperiode unterliegt die Versuchsfläche regelmäßiger Beobachtung, um Unkräuter und Ungräser zu kontrollieren.
- Das Versuchsfeld umgibt ein 5 m breiter Randstreifen mit konventioneller Kulturgerste, um Parzellenrandeffekte zu minimieren. Gleichzeitig dienen diese Pflanzen als Pollenfalle.
- Die Ähren der GVP und konventionellen Kulturgerste der Parzellen werden per Hand geerntet, bevor sie die volle Reife erreichen, um das Ausfallen von Körnern zu vermeiden. Geerntete Ähren/Körner werden sofort in entsprechend deklarierte Säcke verpackt, in geschlossenen Behältnissen in zertifizierten S1-Laboratorien gelagert und, sofern nicht für weitere Versuchszwecke benötigt, thermisch inaktiviert.
- Auf den Parzellen verbleibende Ähren werden mit der Hand geerntet. Der Randstreifen mit der konventionellen Gerste wird maschinell geerntet. Die Körner werden in Säcke verpackt und thermisch inaktiviert.
- Abschließend wird auf der Versuchsfläche ein nicht-selektives Herbizid eingesetzt. Nach der Applikation zurückbleibendes, totes Pflanzenmaterial wird zerkleinert und in den Boden eingearbeitet. In der Regel ist dies einen Monat nach der Herbizidbehandlung abgeschlossen.
- Um der Gefahr des Durchwuchs im folgenden Jahr zu begegnen, wird die Versuchsfläche mit einer entsprechenden Kulturpflanze bestellt. Durchwachsende Gerstenpflanzen werden identifiziert, entfernt und thermisch inaktiviert bzw. mit einem entsprechenden Herbizid vernichtet.

Zusammenfassend sei angemerkt, dass die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten Persistenz oder Invasivität dieser Gerstenpflanzen auf Grund der Freisetzung als sehr gering angesehen werden muss.

ii. **Selektionsvor- und -nachteile, die den GVP verliehen werden**

Die Gerstenpflanzen verfügen auf Grund der gentechnischen Veränderungen über Gene, die ihnen Toleranz gegenüber dem Herbizid Bialaphos verleihen. pJH271-Beta-Glu-307 exprimiert zusätzlich ein sGFP. Mit sGFP transformierte Zellen fluoreszieren grün unter Anregungen durch Licht einer bestimmten Wellenlänge. Es ist nicht davon auszugehen, dass die Expression der Gene einen Selektionsvor- oder -nachteil in den transgenen Pflanzen bewirken. Neben dieser Herbizidtoleranz besitzen die Gerstenlinien ein antifungal wirkendes Enzym (cThEn42(GC)), welches *in vitro* das Wachstum von *Rhizoctonia solani* AG-8 und *R. oryzae* hemmt, oder eine (1,3-1,4)- β -Glucanase, die einen verbesserten Abbau von (1,3-1,4)- β -Glucanen während der Kornkeimung ermöglicht. Die *Endochitinase* steht unter Kontrolle eines Promotors des *Ubiquitin*-Gens aus Mais sowie dem Signalpeptid einer 33-kDa *Chitinase* aus Gerste und wird daher in allen Pflanzenteilen exprimiert. Die Glucanase steht unter Kontrolle eines Endosperm-spezifischen Promotors des *D Hordein*-Gens. Daher ist das rekombinante Enzym nur während der Kornentwicklung und -keimung nachweisbar. Beide Gene vermitteln in den modifizierten Gerstenlinien einen möglichen Selektionsvorteil durch eine mögliche antifungale Wirkungsweise, die die Entwicklung phytopathogener Schaderreger auf der Pflanze einschränkt. Ein Selektionsnachteil muss erwogen werden, sollten die Transgene antifungales Potenzial gegenüber symbiontischen Pilzen entwickeln. Da keine genaue Analyse der in die Pflanze integrierten Sequenz durchgeführt worden ist, wird der Risikoabschätzung zugrunde gelegt, dass der gesamte Vektor pBIN19 integriert ist. Die potenziell integrierten Sequenzen außerhalb und innerhalb der T-DNA der beiden Transformationsereignisse sind in Pflanzen nicht funktional und vermitteln folglich keine Selektionsvor- und -nachteile.

Ein Selektionsvor- bzw. -nachteil war in jedem Fall unter Feldbedingungen und im Gewächshaus in den USA bisher nicht erkennbar.

PCR Analysen zeigten die Integration der Gene in die transgenen Gerstenlinien. Enzymaktivitätsassays belegten, dass diese Enzyme seit mehreren Generationen in den Pflanzen exprimiert werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass für die Pflanzen aus der Modifikation kein Umweltnachteil resultiert.

iii. Potenzial für Gentransfer zu denselben oder anderen kreuzbaren Pflanzenarten unter den Anbaubedingungen der GVP und diesen Pflanzenarten verliehene Selektionsvor- und -nachteile

Gerste ist Selbstbestäuber mit einer Selbstbefruchtungsrate von ~99%, was durch die kleistogame Blütenmorphologie unterstützt wird. Verbunden mit einer im Vergleich zu fremdbefruchtenden Roggen niedrigen Pollenproduktion (~10%) wird die Auskreuzungswahrscheinlichkeit stark reduziert (Eastham und Sweet 2002). Hammer (1977) sieht vor allem die Empfindlichkeit des Pollens gegenüber Umweltbedingung und der daraus resultierenden, kurzen Lebensfähigkeit als limitierend an. Dennoch ist eine Hybridisierung zwischen unterschiedlichen Gerstensorten möglich. Wind stellt hier das wahrscheinlichste Medium zur Pollenverbreitung dar (Hammer 1975, 1977, Eastham und Sweet 2002).

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Wagner und Allard (1991) bzw. Ritala et al. (2002) (siehe Abschnitt B 2 a (ii)) wird die Freisetzungsfläche einen Abstand von mindestens 35 m zu möglichen Pollenempfängern einhalten, was mögliche Hybridisierungen sehr unwahrscheinlich macht.

Auch wenn Hybridisierung ein sehr seltenes Ereignis darstellt, wird das Versuchsfeld zur benachbarten Vegetation abgegrenzt. Die gesamte Versuchsanordnung mit Randstreifen aus konventioneller Gerste (Sorte Scarlett), Schwarzbrache und dikotyler Kultur isoliert das Versuchsfeld und dient als Pollenfalle, was den ohnehin geringen Pollenflug insgesamt minimiert.

Die zur Vermehrung im S1-Bereich des Gewächshauses der Versuchsstation angebauten Gersten (in Gießen) besitzen einen Mindestabstand von 50 m zu den Versuchspartellen.

In Abschnitt B 2 (b) wurden bereits die möglichen Pollenempfänger diskutiert. Als potenzielle Pollenempfänger müssen andere Getreidearten, *Elymus* sp. und Wildgersten angesehen

werden (Fedak 1992). Alle bisherigen Daten weisen darauf hin, dass Kulturgerste mit keiner anderen Kulturpflanze unter natürlichen Bedingungen hybridisiert und künstlich erzeugte Hybride männlich bzw. komplett steril sind. *Hordeum vulgare* L. kann mit *Elymus* sp. gekreuzt werden bzw. es kommt zu natürlicher intergenerischer Kreuzung zwischen *Hordeum* sp. und *Elymus* sp., wobei resultierende Hybride in allen Fällen männlich bzw. komplett steril sind. Unter Berücksichtigung der hohen Selbstbefruchtungsrate und der starken Hybridisierungsbarrieren zwischen *Hordeum*-Arten, ist das Risiko der Auskreuzung in Wildgersten sehr gering (Fedak 1992). Von den drei genannten Pflanzengruppen können die beiden Ersteren auf der Versuchsfläche auftreten und werden daher vor, während und nach den Versuchsperioden kontrolliert. Im Anschluss wird eine dikotyle Kultur auf der Versuchsfläche angebaut, um durchwachsende Gerstenpflanzen frühzeitig zu erkennen. Durchwuchs wird sofort entfernt und verbrannt. Sollte im Jahr nach Beendigung der Versuche durchwachsende Gerste auftreten, verlängert sich der Beobachtungszeitraum um ein Jahr.

Zusammenfassend ist der - Gentransfer zu denselben oder anderen kreuzbaren Pflanzenarten durch die kleistogame Blüte und die geringe Pollenproduktion der Gerste, den fehlenden Hybridisierungspartner, den Versuchsaufbau mit Randstreifen aus konventioneller Gerste und einer dikotylen Kultur in Kombination mit der Distanz zu benachbarten Getreidekulturen (~ 50m) als sehr gering zu bewerten. Somit muss auch die Übertragung von Selektionsvor- und -nachteilen auf diese Arten als minimal angesehen werden.

iv. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Umweltauswirkungen, resultierend aus direkten oder indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Zielorganismen, wie Prädatoren, Parasitoiden und Pathogenen (falls zutreffend)

Ziel ist eine umfassende, epidemiologische Aufzeichnung auftretender, pilzlicher Krankheiten auf gentechnisch modifizierten Pflanzen und den/m entsprechenden Empfängerpflanzen und Kreuzungselter. Zudem soll der Einfluss der GVP auf einen Mycosymbionten (*Glomus intraradices*) untersucht werden. Mit Hilfe der Freisetzungsversuche können nähere Angaben zum Wirkungsgrad und zur -spezifität der rekombinanten Proteine gemacht werden, um den Einfluss der rekombinanten Proteine in den modifizierten Linien auf pilzliche Organismen zu definieren.

Die beabsichtigten Effekte der Modifizierungen sind folgende:

- Eine erhöhte Resistenz gegenüber den pilzlichen Schaderregern *Rhizoctonia solani* AG-8 und *R. oryzae* (pYW210-9-(4001-4360)). Die *Endochitinase ThEn42* wurde aus dem mycoparasitischen Pilz *Trichoderma harzianum* isoliert und vermittelte in Tabak und Kartoffel eine erhöhte Resistenz gegenüber *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *A. solani* und *Botrytis cinerea* (Lorito et al. 1998). *In vitro* Versuche belegten ein durch die Endochitinase gehemmtes Wachstum von *Rhizoctonia solani* AG-8, *R. oryzae* und *Gaeumannomyces graminis* (Wu 2003).
- Eine verbesserte Mobilisierung von Kohlenhydraten und stickstoffhaltigen Verbindungen aus Stärke und Proteinen des Endosperms und Aleurons während der Samenkeimung (bei der Linie pJH271-Beta-Glu-307) erhöht den Futterwert des Korns bzw. verbessert dessen Mälzungseigenschaften im Brauprozess (Jensen et al. 1998, Horvath et al. 2002).

Die möglichen Wechselwirkungen zwischen pilzlichen Organismen und den zu verwendenden transgenen Linien basieren auf der Bedeutung der rekombinanten Enzyme, Chitin und (1,3-1,4)- β -Glucane zu hydrolisieren. Chitin ist Bestandteil des Exoskeletts und peritrophen Membran von Insekten bzw. der Zellwände pilzlicher Organismen. (1,3-1,4)- β -

Glucane sind Polysaccharide in Zellwänden höherer Pflanzen der Familie der Poaceae und hier im speziellen der Gramineen.

Eine direkte Wechselwirkung der Endochitinase in pYW210-9-(4001-4360) ist folglich mit invasiven, pilzlichen Organismen denkbar. Auf Grund der verwendeten Promotoren (*Ubi-1*) sind etwaige Wechselwirkungen in allen Pflanzteilen möglich. Sollte die Schädigung der Pflanze durch pilzliche Schaderreger verhindert oder reduziert werden, würden die transgenen Pflanzen eine verbesserte Entwicklung und höhere Überlebensfähigkeit im Vergleich zu nicht-modifizierten Pflanzen besitzen.

Eine direkte Wechselwirkung von pJH271-Beta-Glu-307 wäre nur dann wahrscheinlich, wenn das rekombinante Enzym die Glucane der Zellwände antagonistischer Pilze und Bakterien hydrolysieren könnte. Allerdings müssten phytopathogene Erreger das sich entwickelnde oder keimende Korn befallen, da das Transgen unter dem Endosperm-spezifischen Promotor des *D Hordein*-Gens steht. D.h. die Expression des rekombinanten Enzyms ist zeitlich und räumlich begrenzt. Zieht man zusätzlich die Substratspezifität in Betracht ist eine direkte Wechselwirkung eher unwahrscheinlich.

Sollten die transgenen Gerstenkörner in geringerem Umfang geschädigt werden, hätte dies einen erhöhten Aufgang im Vergleich zu nicht-modifizierten Pflanzen zur Folge. Das Transgen hätte aber keinen Einfluss auf die weitere Pflanzenentwicklung.

Eine indirekte Wechselwirkung wäre in beiden Fällen eine im Vergleich zu nicht-modifizierten Pflanzen erhöhte Überlebensfähigkeit nach dem Befall durch antagonistische Organismen. Es ist aber unwahrscheinlich, dass die modifizierten Gerstenlinien diese erhöhte Überlebensfähigkeit zeigen, wenn konventionelle Gerstensorten gezielt mit Fungiziden gegen auftretende Schaderreger behandelt werden.

v. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Umweltauswirkungen, resultierend aus direkten oder indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Nichtzielorganismen (unter Berücksichtigung von Organismen, bei denen Wechselwirkungen mit Zielorganismen bestehen), einschließlich Auswirkungen auf die Populationsgrößen von Konkurrenten, Herbivoren, Symbionten (falls zutreffend), Parasiten und Pathogenen

Nichtzielorganismen (im Sinne unserer Versuchsziele), bei denen eine Wechselwirkung eintreten könnte, sind in der Fauna zu finden und umfassen herbivore Insekten, denen Pflanzenorgane und Samen als Futter dienen, und symbiotische Pilze und Bakterien. Da der tierische Organismus weder Glucane noch Chitin enthält, sind keine Wechselwirkungen zwischen GVP und Kleinsäugetieren/Vögeln nach dem Fressen der GV Körner und GVP zu erwarten.

a) Direkte Wechselwirkungen

Eine direkte Wechselwirkung von pJH271-Beta-Glu-307 auf Nichtzielorganismen besitzt die gleiche geringe Wahrscheinlichkeit wie direkte Wechselwirkung mit Zielorganismen.

- Die Expression des rekombinanten Enzyms ist auf Grund des verwendeten des Endosperm-spezifischen Promotors des *D Hordein*-Gens zeitlich und räumlich auf das sich entwickelnde oder keimende Korn begrenzt.
- Die (1,3-1,4)- β -Glucanase besitzen eine strikte Substratspezifität für die Spaltung L-1,4 glykosidischer Bindungen 3-O-substituierter Glukopyranoseeinheiten. Das rekombinante Enzym basiert auf zwei (1,3-1,4)- β -Glucanasen von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans*, welches die gleiche Substratspezifität wie Gersten-Glucanasen hat, die für die Mobilisierung von Stärke und Proteinen im Endosperm und Aleuron während der frühen Kornkeimung benötigt werden (Borriss et al. 1989, Jensen et al. 1996, Planas 2000).

- Die zu verwendende transformierte Gerstenlinie wurde bereits in Feldversuchen in den USA freigesetzt, in denen keine schädliche Auswirkung auf Nichtzielorganismen beobachtet wurde.
- Es handelt sich bei dem vorliegenden Freisetzungsantrag um Feldversuche mit geringem Umfang, und keine Pflanzenbestandteile und -organe gelangen in die Nahrungs- oder Futterkette.

Eine direkte Wechselwirkung der pYW210-9-(4001-4360) auf herbivore Insekten ist aus folgenden Gründen sehr unwahrscheinlich:

- Das Exoskelett bzw. die Kutikula der Insekten besteht zwar aus bis zu 40% Chitin, jedoch ist Chitin nicht in der äußersten Schicht des Integuments, der Epikutikula, vorhanden.
- Das Chitin der inneren Schichten der Kutikula (Exo-, Endokutikula) ist eng mit Proteinen verbunden und folglich ist der Zugang für Chitinasen begrenzt. So sind auch vor allem Proteasen in die Häutung der Insekten involviert.
- Die peritrophe Membran des Verdauungskanals der Insekten enthält ebenfalls Chitin. Sie besteht aber durchschnittlich nur zu 3-13% aus Chitin während Proteine, Glykoproteine und Proteoglykane die Hauptbestandteile darstellen (Merzendorf und Zimoch 2003).
- Herbivore Insekten sind ständig mit pflanzlichen Chitinasen konfrontiert, die sich nicht schädigend auswirken.
- Basierend auf mündlichen Mitteilungen wissenschaftlichen Fachpersonals zeigten bisherige Feldversuch in den USA keine Auffälligkeiten in der Entwicklung und dem Fressverhalten von Schädlingen (z.B. Blattläuse) und Prädatoren (z.B. Marienkäfer)

Bisherige in der Literatur beschriebene Untersuchungen belegen keinen antifungalen Effekt der Chitinasen bei der Mykorrhizierung:

- Verschiedener Chitinasen (Klasse III) zeigten eine erhöhte Transkription in *Medicago truncatula* während der Besiedlung durch *Glomus intraradices* (Salzer et al. 2000).
- Die konstitutive Überexpression verschiedener Chitinasen (Klasse I, II, III) unter Kontrolle des CaMV 35S Promotors in Tabakwurzeln zeigte keine Unterschiede im Besiedlungsverhalten von *Glomus mosseae* im Vergleich zur Wurzelbesiedlung von Kontrollpflanzen (Vierheilig et al. 1995).

Dennoch sind Wechselwirkungen mit pilzlichen Symbionten nicht auszuschließen. Die Folge einer Wechselwirkung wäre eine beeinträchtigte oder verhinderte Symbiose. Die Feldversuche haben das Ziel mögliche Wechselwirkungen zu identifizieren.

Die eingefügten Gene stammen von natürlich vorkommenden Organismen; die *Endochitinase* (*cThEn42*) von dem ubiquitär auftretenden Bodenzpilz *Trichoderma harzianum* und die *(1,3-1,4)- β -Glucanase* von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans*. Letzteres wurde durch intragenische Rekombination erstellt, was aber nicht in einer veränderten Substratspezifität resultierte. Die G+C-optimierte Gensequenz der *Endochitinase* und *(1,3-1,4)- β -Glucanase* bedeutet keine Veränderung in der Aminosäuresequenz und folglich ist eine veränderte Enzymwirkung unwahrscheinlich.

b) Indirekte Wechselwirkungen

Indirekte Wirkungen auf Grund der Modifikation der Gerstenpflanzen sind ebenfalls als sehr unwahrscheinlich einzustufen:

- Ein horizontaler Gentransfer in Darmbakterien des Menschen oder Nutztiere ist unwahrscheinlich, da keine Pflanzenorgane oder Körner in die Nahrungs- oder

Futterkette gelangen werden und es sich um einen Feldversuch von geringem Umfang handelt.

- Bisherige Untersuchungen konnten keinen horizontalen Gentransfer mit nicht-homologer DNA unter Feldbedingungen nachweisen. Um zur Ausprägung zu gelangen, müssten die Gene in Bakterien übertragen und dort repliziert werden. Da hierzu mindestens vier Schritte notwendig sind, (i) Entlassung des intakten Resistenzgens mit einem "origin of replication" aus der Pflanzenzelle, (ii) Aufnahme durch kompetente Bakterien, (iii) Ringschluss zu einem Plasmid und (iv) Expression des Gens, ist der Gentransfer von Genen von Pflanzen auf Bakterien und deren Ausprägung ein seltenes Ereignis. Nielsen et al (1997) und Gebhard and Smalla (1998) stuften die Wahrscheinlichkeit als sehr gering ein. Auf Grund des begrenzten Versuchsumfangs ist ein horizontaler Gentransfer sehr unwahrscheinlich. Obwohl die Transgene in ihrem G+C-Gehalt, bzw im Falle der (1,3-1,4)- β -Glucanase zusätzlich durch intragenische Rekombination verändert wurde, wurde ihre Substratspezifität nicht modifiziert. Die ursprünglichen Gene leiten sich von Genen ab, die in der Natur weit verbreitet sind.
- Exsudate aus Wurzeln bzw. keimenden Körnern stellen zwar Quellen für die Exposition der rekombinanten Enzyme in den Boden dar. Aber wie bereits erwähnt sind die Gene in der Natur weit verbreitet und die Genproduktsequenzen zeigen keine Homologien zu bekannten Allergenen oder Toxinen (vgl. Abschnitt D 7).
- Von den außerhalb der T-DNA liegenden und potenziell integrierbaren Sequenzen muss das *nptIII*-Gen in Betracht gezogen werden. Das *nptIII*-Gen wurde vom EFSA GMO Panel der Gruppe III zugeordnet (Anonymous 2004). Diese Gruppe enthält Antibiotika-Resistenzgene, deren relevante Antibiotika in der Humanmedizin von Bedeutung sind. Das *nptIII*-Gen verleiht nicht nur Resistenz gegen Kanamycin und Neomycin, sondern auch gegen Amikacin. Amikacin stellt ein wichtiges Reserveantibiotikum von therapeutischer Bedeutung dar. Southern Blot Analysen zeigten, dass *nptIII* weder in seiner Gesamtheit noch in Fragmenten in das Genom der Linien pJH271-Beta-Glu-307 und pYW210-9-(4001-4360) integriert wurde (s. Anhang V und Abschnitt D 2 (a) b)).

Zusammenfassend muss man die Wahrscheinlichkeit von direkt, indirekt, sofort oder verzögert eintretenden Auswirkungen auf Nichtzielorganismen als sehr gering einstufen. Allerdings müssen die Auswirkungen auf symbiotische Pilze erwogen werden und werden daher im Rahmen der Feldversuche untersucht. Es muss aber angemerkt werden, sollten Wechselwirkungen eintreten, sind diese auf Grund des geringen Versuchsumfangs, und dessen zeitlich begrenzter Durchführung, von kurzer Dauer. Die bisherigen Feldversuche in den USA geben keinen Anlass, von Auswirkungen auf Nichtzielorganismen auszugehen.

vi. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, die aus potenziellen direkten und indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Personen resultieren, die mit der GVP arbeiten oder in direkten Kontakt damit kommen oder in die Nähe der GVP-Freisetzung(en) kommen

Da die Feldversuche in sehr begrenztem Umfang durchgeführt werden und keine Pflanzenteile oder -organe in die Nahrungskette gelangen, kann von keinen direkten Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit ausgegangen werden.

Das *Bar*-Gen bzw. dessen Genprodukt (Phosphinothricin-Acetyltransferase, PAT) wurde nach umfangreichen Sicherheitsuntersuchungen als nicht gesundheitsgefährdend eingeordnet. PAT besitzt keine N-Glykosylierungstellen und weder das gesamte Enzym noch kurze Aminosäuresequenzen zeigten Homologien zu Allergenen oder Toxinen. Intravenöse Injektion (bis 10 mg/kg Körpergewicht) von PAT in Mäuse zeigte keinerlei toxische Symptome. Das Enzym ist hitzestabil. Die Enzymaktivität wird allerdings ab einer

Temperatur von 60°C und 10 min Exposition inaktiviert (Herouet et al. 2005). Das PAT Enzym wurde durch die EPA (Environmental Protection Agency) von einer Toleranzkennzeichnung für alle landwirtschaftlichen Rohstoffe befreit (EPA 1997).

Das *sGFP*-Gen wurde von Chiu et al. (1996) beschrieben. Sicherheitsuntersuchungen ergaben keine toxischen Effekte in Fütterungsversuchen mit Mäusen (1 mg aufgereinigtes GFP/Tag über 26 Tage). Der Vergleich des Protein mit Aminosäuresequenzen bekannter Allergene ergab keine Homologien > 4 konsekutiver Aminosäuren. Das Protein zeigt keine Stabilität gegenüber Verdauungsprozessen in Mensch und Tier, was seine potenzielle Allergenität unwahrscheinlich macht. Transformierte Zebrafische und Mäuse, die konstitutiv *GFP* exprimierten, waren gesund (Higashijima et al. 1997, Hadjantonakis et al. 1998), was sich im Falle der Mäuse mit den Ergebnissen aus den Fütterungsversuchen deckt (Richards et al. 2003).

cThEn42(GC) und *(1,3-1,4)-β-Glucanase*:

Beide Gene kodieren für Enzyme die im menschlichen Körper nicht vorkommen. Es gibt keine Berichte einer allergenen oder toxischen Wirkung dieser Enzyme. Zudem zeigen beide Enzyme keine Homologien zu bekannten bzw. in Datenbanken veröffentlichten Toxinen und Allergenen (vgl. Abschnitt D 7).

Es gibt keinen wissenschaftlichen Grund die indirekten Auswirkungen der modifizierten Gerstenlinien auf die menschliche Gesundheit anders zu betrachten als die Auswirkungen des Anbaus konventioneller Kulturgersten. In Bezug auf die menschliche Gesundheit ist die Pollenallergie als potenzielle Interaktion denkbar. Gerstenpollen kann, wie andere Pflanzenpollen auch, beim Einatmen zu allergischen Reaktionen bei sensibilisierten Menschen hervorrufen. Allerdings besteht kein Anhaltspunkt von einer erhöhten Allergenität durch transgenen im Vergleich zu nicht-modifizierten Gerstenpollen auszugehen.

Zusammenfassend muss man die Wahrscheinlichkeit von direkt, indirekt, sofort oder verzögert eintretenden Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit, verursacht durch direkte oder indirekte Wechselwirkung zwischen Personen und den im Antrag beschriebenen modifizierten Gerstenlinien, durch Arbeiten an oder direkten Kontakt mit diesen GVP, oder durch Aufenthalt in der Nähe der GVP-Freisetzung, als sehr gering einstufen. Die bisherigen Feldversuche in den USA zeigen keine Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit.

vii. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Auswirkungen auf die Tiergesundheit und Konsequenzen für die Nahrungsmittel-/Futterkette, die aus dem Verzehr der GVP und jeglicher davon stammender Produkte resultieren, falls diese als Tierfutter verwendet werden sollen

Die Feldversuche werden in sehr begrenztem Umfang durchgeführt und keine Pflanzenteile oder -organe werden in die Nahrungs- oder Futterkette gelangen.

viii. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Auswirkungen auf biogeochemische Prozesse, die die Tiergesundheit und Konsequenzen für die Nahrungsmittel-/Futterkette, die aus potenziellen direkten und indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Ziel- und Nichtzielorganismen in der Nähe der GVP-Freisetzung(en) resultieren

Auf mögliche sofort und/oder verzögert eintretende Umweltauswirkungen, resultierend aus potenziellen direkten und indirekten Wechselwirkungen zwischen der GVP und Ziel- und Nichtzielorganismen wurde bereits in Abschnitt H iv + v eingegangen. Da jede Art dieser Auswirkungen als gering eingestuft wird, gibt es keinen Grund anzunehmen, dass die GVP über direkte oder indirekte Auswirkungen biogeochemische Prozesse in der Weise

verändern, die die Tiergesundheit beeinträchtigen oder Konsequenzen für die Nahrungs-/Futterkette haben.

Lediglich der Einfluss auf pilzliche Symbiosen wurde nicht ausgeschlossen. Zentraler Punkt des Freisetzungsantrags ist allerdings, die GVP-Symbiont Interaktionen unter Verwendung des Präparats Amykor[®] Wurzel-Vital (Produkt enthält den Symbiont *Glomus intraradices*) zu untersuchen. Aber auch hier muss angemerkt werden, dass, auf Grund des räumlich und zeitlich sehr begrenzten Freisetzungsversuchs, die potenziell auftretenden Wechselwirkungen zu eher vorübergehenden als nachhaltigen Auswirkungen führen.

Es ist davon auszugehen, dass physikalische und chemische Prozesse des Proteinabbaus bzw. der Blätterzersetzung des modifizierten Pflanzenmaterials dem der Empfängerpflanze (Golden Promise) bzw. dem des Kreuzungselters (Baronesse) entspricht.

In bisherigen Feldversuchen an der Washington State University, Pullman (USA) konnten keine Unterschiede im Abbau des gentechnisch veränderten Pflanzenmaterials im Vergleich zum Pflanzenmaterial der/s Empfängerpflanze/Kreuzungselters beobachtet werden. Diese Beobachtungen sind möglich, da nach den Richtlinien des „Animal and Plant Health Inspection Service – APHIS“ der USA einem Anbau gentechnisch modifizierter Pflanzen eine Schwarzbrache folgt.

ix. Mögliche sofort und/oder verzögert eintretende, direkte oder indirekte Umweltauswirkungen der bei der GVP angewendeten spezifischen Kultivierungs-, Bearbeitungs- und Erntetechniken, falls diese sich von den bei nicht-GVP angewendeten Techniken unterscheiden

Die Techniken zur Bestandesführung und Ernte unterscheiden sich nicht zwischen GVP und nicht-GVP.

V. Literatur

Abdel-Ghani, A.H., Parzies, H.K., Omary, A., and Geiger, H.H. (2004). Estimating the outcrossing rate of barley landraces and wild barley populations collected from ecologically different regions of Jordan. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 588-595

Anonymous (2004). Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. *EFSA Journal* 48: 1-18

Bevan, M., Barnes, W.M., and Chilton, M.-D. (1983). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Research* 11: 369-385

Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12: 8711-8721.

Borriss, R., Olsen, O., Thomsen, K.K., and von Wettstein, D. (1989). Hybrid Bacillus endo-(1,3-1,4)- β -glucanases: Construction of recombinant genes and molecular properties of the gene products. *Carlsberg Research Communications* 54: 41-54

Chaudhary, H.R., Jana, S., and Acharya, S.N. (1980). Outcrossing rates in barley populations in the Canadian prairies. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 22: 353-360

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

Cho, M.-J., Choi, H.-W., Jiang, W., Ha, C.D., and Lemaux, P.G. (2002). Endosperm-specific expression of green fluorescent protein driven by the hordein promoter is stably inherited in transgenic barley (*Hordeum vulgare*) plants. *Physiologia Plantarum* 115: 144-154

De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., Rao Mowva, N., Thompson, C., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO Journal* 6: 2513-2518

Depicker, A., Stachel, S., Dhaese, P., Zambryski, P., and Goodman, H.M. (1982). Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics* 1: 561-573

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

EPA (Environmental Protection Agency, 1997). Phosphinothricin acetyltransferase and the genetic material necessary for its production in all plants – exemption from the requirement of a tolerance on all raw agricultural commodities. *Federal Register* 70, pp. 17717-17720

Fedak, G. (1992). Intergenic hybrids with *Hordeum*. *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. Shewry, P.R., ed.. Wallingford, UK, pp. 45-70

Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., and Hall, T.C. (1995). Complete sequence of the binary vector Bin19. *Plant Molecular Biology* 27: 405-409

Gebhard, F. and Smalla, K. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1550-1554

Hadjantonakis, A. K., Gertsenstein, M., Ikawa, M., Okabe, M., and Nagy, A. (1998). Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mechanisms of Development* 76: 79-90

Hammer, K. (1975). Die Variabilität einiger Komponenten der Allogamieeignung bei der Kulturgerste (*Hordeum vulgare* L.s.l.). Kulturpflanze 23: 167-180

Hammer, K. (1977). Fragen der Eignung des Pollens der Kulturgerste (*Hordeum vulgare* L.s.l.) für die Windbestäubung. Kulturpflanze 25: 13-23

Hayes, C.K., Klemsdal, S., Lorito, M., Di Pietro, A., Peterbauer, C., Nakas, J.P., Tronsmo, A., and Harman, G.E. (1994). Isolation and sequence of an endochitinase-encoding gene from a cDNA library of *Trichoderma harzianum*. Gene 138: 143-148

Herouet, C., Esdaile, D.J., Mallyon, B.A., Debruyne, E., Schulz, A., Currier, T., Hendrickx, K., van der Klis, R.-J., and Rouan, D. (2005). Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the *pat* and *bar* sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology 41: 134-149.

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

Horvath, H., Huang, J., Wong, O., Kohl, E., Okita, T., Kannangara, C.G., and von Wettstein, D. (2000). The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 1914-1919

Horvath, H., Huang, J.T., Wong, O.T., and von Wettstein, D. (2002). Experiences with genetic transformation of barley and characteristics of transgenic plants. Barley Science. G.A. Slafer, J.L. Moliua-Cayo, R. Savin, J.L. Araus and J. Ramagosa, eds. The Harworth Press, New York, pp. 143-176

Jensen, L.G., Olsen, O., Kops, O., Wolf, N., Thomsen, K.K., and von Wettstein, D. (1996). Transgenic barley expressing a protein-engineered, thermostable (1,3-1,4)- β -glucanase during germination. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93: 3487-3491

Jensen, L.G., Politz, O., Olsen, O., Thomsen, K.K., and von Wettstein, D. (1998). Inheritance of a codon-optimized transgene expressing heat stable (1,3-1,4)- β -glucanase in scutellum and aleurone of germinating barley. Hereditas 129: 215-225

Kragh, K.M., Jacobsen, S., Mikkelsen, J.D., and Nielsen, K.A. (1991). Purification and characterization of three chitinases and one β -1,3-glucanase accumulating in the medium of cell suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Science 76: 65-77

Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F. (1998). Gene from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 7860-7865.

Merzendorfer, H. and Zimoch, L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. Journal of Experimental Biology 206: 4393-4412

Molnár-Láng, M. and Sutka, J. (1994). The effect of temperature on seeds set and embryo development in reciprocal crosses of wheat and barley. Euphytica 78: 53-58

Nielsen, K.M., van Elsas, J.D., and Smalla, K. (1997). Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413(pFG4 Δ nptII) with transgenic plant DNA in soil microcosms and Effects of kanamycin on selection of transformants. Applied and Environmental Microbiology 66: 1237-1242

Planas, A. (2000). Bacterial (1,3-1,4)- β -glucanase: structure, function and protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta 1543: 361-382

Politz, O., Simon, O., Olsen, O., and Borriss, R. (1993). Determinants for the enhanced thermostability of hybrid (1,3-1,4)- β -glucanases. *European Journal of Biochemistry* 216: 829-834

Richards, H.A., Han, C.-T., Hopkins, R.G., Failla, M.L., Ward, W.W., and Stewart, 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

Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vogeli-Lange, R., Aeschbacher, R.A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D.R., and Boller, T. (2000). Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 763-777

Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503-517

Tammissola, J. (1998) Transgene flow in barley cultivation. In: Past, Present and Future Considerations in Risk Assessment when using GMOs. de Vries, G., ed. Workshop Proceedings, Leeuwenhorst Congress Centre, Netherlands

Thompson, C.J., Moval, N.R., Tizard, R., Crameri, R., Davies, J.E., Lauwereys, M., and Botterman, J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO Journal* 6: 2519-2523

Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual Review in Biochemistry* 67: 509-544

Vierheilig, H., Alt, M., Lange, J., Gut-Rella, M., Wiemken, A., and Boller, T. (1995). Colonization of transgenic tobacco constitutively expressing pathogenesis-related proteins by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3031-3034

Wagner, D.B. and Allard, W.B. (1991). Pollen migration in predominantly self-fertilising plants: Barley. *Journal of Heredity* 82: 392-404.

White, J., Chang, S.-Y.P., Bibb M.J., and Bibb, M.J. (1990). A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 18: 1062

Wu, Y. (2003). Transformation of barley for resistance to *Rhizoctonia* root rot. Ph.D. thesis. Washington State University, Department of Plant Pathology

VI. Anhang I

Abbildung 1: Vektorkarte: pYW210

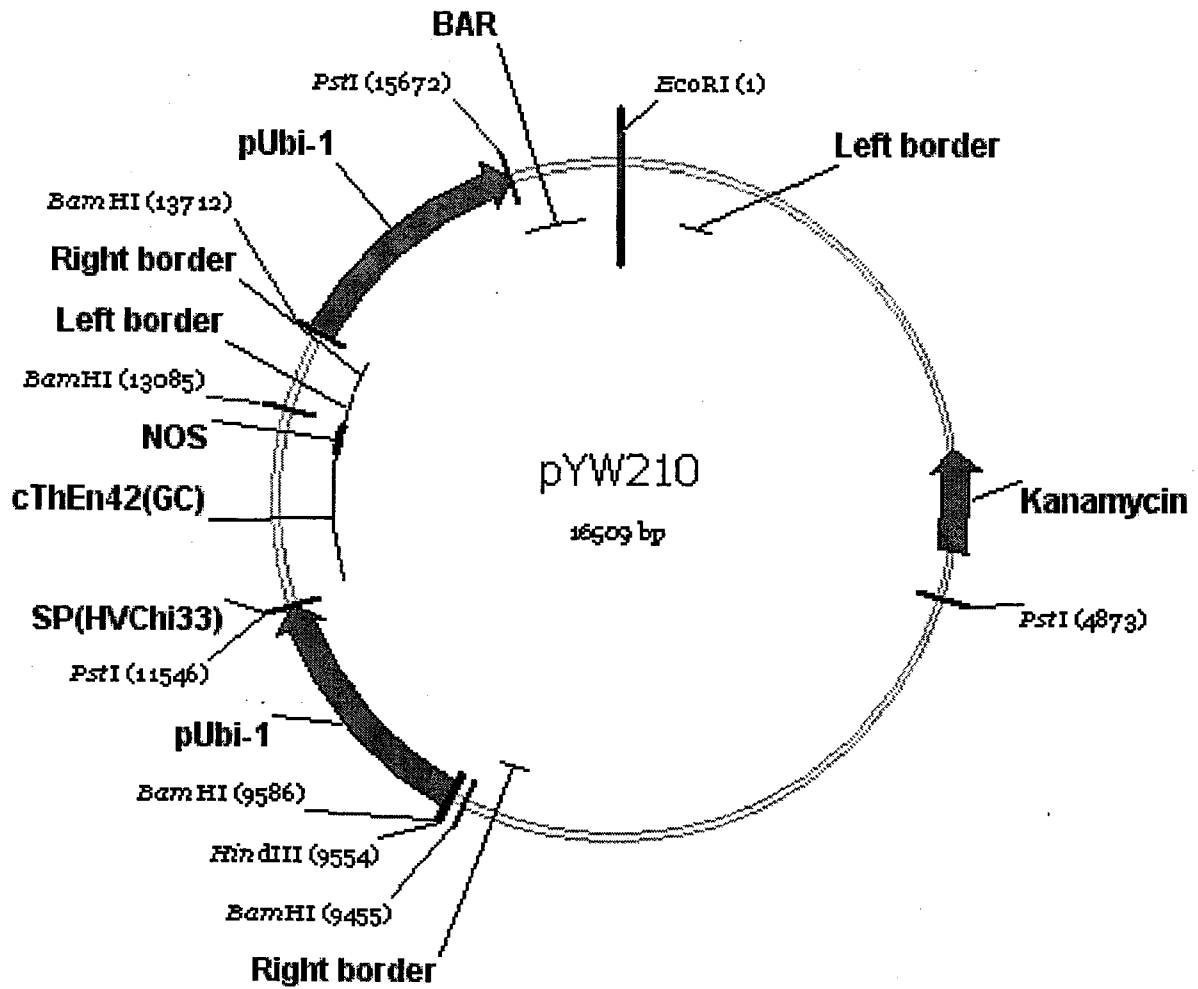


Abbildung 2: Vektorsequenz pYW210

1 AATTCACTGG CCGTCGTTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT
 51 TACCCAACTT AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA
 101 ATAGCGAAGA GGCCCGCACC GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG
 151 AATGGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTTC TC GCCACGTTCCG
 201 CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTA AATCGGG GGCTCCCTTT AGGGTTCCGA
 251 TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCAAA AA ACTTGATT TGGGTGATGG
 301 TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTCGC CCTTTGACGT
 351 TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC TGGAAACAACA
 401 CTCAACCCTA TCTCGGGCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA TTTTGCCGAT
 451 TTCGGAACCA CCATCAAACA GGATTTTCGC CTGCTGGGGC AAACCAGCGT
 501 GGACCGCTTG CTGCAACTCT CTCAGGGCCA GGCGGTGAAG GGCAATCAGC
 551 TGTTGCCCGT CTCACTGGTG AAAAGAAAAA CCACCCAGT ACATTAAAAA
 601 CGTCCGCAAT GTGTTATTAA GTTGTCTAAG CGTCAATTTG TTTACACCAC
 651 AATATATCCT GCCACCAGCC AGCCAACAGC TCCCGACCG GCAGCTCGGC
 701 ACAAAATCAC CACTCGATAC AGGCAGCCCA TCAGTCCGGG ACGGCGTCAG
 751 CGGGAGAGCC GTTGTAAAGC GGCAGACTTT GCTCATGTTA CCGATGCTAT
 801 TCGGAAGAAC GGCAACTAAG CTGCCGGGTT TGAAACACGG ATGATCTCGC
 851 GGAGGGTAGC ATGTTGATTG TAACGATGAC AGAGCGTTGC TGCCTGTGAT
 901 CAAATATCAT CTCCTCGCA GAGATCCGAA TTATCAGCCT TCTTATTCAT
 951 TTCTCGCTTA ACCGTGACAG GCTGTGATC TTGAGAATA TGCCGACATA
 1001 ATAGGAAATC GCTGGATAAA GCCGCTGAGG AAGCTGAGTG GCGCTATTTT
 1051 TTTAGAAAGT AACGTTGACG ATATCAACTC CCTATCCAT TGCTACCCGA
 1101 ATGGTACAGG TCGGGGACCC GAAGTCCGA CTGTGCGCCT GATGCATCCC
 1151 CGGCTGATCG ACCCCAGATC TGGGGCTGAG AAAGCCAGT AAGGAAACAA
 1201 CTGTAGGTTT GAGTCGCGAG ATCCCCGGA ACCAAAGGAA GTAGGTTAAA
 1251 CCCGCTCCGA TCAGGCCGAG CCACGCCAGG CCGAGAACAT TGGTTCCTGT
 1301 AGGCATCGGG ATTGGCCGAT CAAACACTAA AGCTACTGGA ACGCAGAGAA
 1351 GTCCCTCCGGC CGCCAGTTGC CAGGCGGTAA AGGTGAGCAG AGGCACGGGA
 1401 GGTTGCCACT TCGGGGTCAG CACGGTTCGG AACGCCATGG AAACCGCCCC
 1451 CGCCAGGCC GCTGCGACGC CGACAGGATC TAGCGCTGCG TTTGGTGTCA
 1501 ACACCAACAG CGCCACGCCC GCAGTTCGCG AAATAGCCCC CAGGACCGCC
 1551 ATCAATCGTA TCGGGCTACC TAGCAGAGCG GCAGAGATGA ACACGACCAT
 1601 CAGCGGCTGC ACAGCGCCTA CCGTCGCCGC GACCCCGCCC GGCAGGCGGT
 1651 AGACCGAAAT AAACAACAAG CTCCAGAATA GCGAAATATT AAGTCCGCCG
 1701 AGGATGAAGA TGCGCATCCA CCAGATTCCC GTTGGAACTT GTCGGACGAT
 1751 CATCAGGAGC AATAAACCCG CCGGCAACGC CCGCAGCAGC ATACCGGCGA
 1801 CCCCTCGGCC TCGCTGTTTC GGCTCCACGA AAACGCCGGA CAGATGCGCC
 1851 TTGTGAGCGT CCTTGGGGCC GTCCTCCTGT TTGAAGACCG ACAGCCCAAT
 1901 GATCTCGCCG TCGATGTAGG CGCCGAATGC CACGGCATCT CGCAACCGTT
 1951 CAGCGAACGC CTCCATGGGC TTTTTCTCCT CGTGCTCGTA AACGGACCCG
 2001 AACATCTCTG GAGCTTCTT CAGGGCCGAC AATCGGATCT CGCGGAAATC
 2051 CTGCACGTCG GCCGCTCCAA GCCGTCGAAT CTGAGCCTTA ATCACAATTG
 2101 TCAATTTTAA TCCTCTGTTT ATCGGCAGTT CGTAGAGCGC GCCGTGCGTC
 2151 CCGAGCGATA CTGAGCGAAG CAAGTGCCTC GAGCAGTGCC CGCTTGTTC
 2201 TGAAATGCCA GTAAAGCGCT GGCCTGCTGAA CCCCCAGCCG GAACTGACCC
 2251 CACAAGGCC TAGCGTTTGC AATGCACCAG GTCATCATTT ACCCAGGCGT
 2301 GTTCCACCAG GCCGCTGCCT CGCAACTCTT CGCAGGCTTC GCCGACCTGC
 2351 TCGCGCCACT TCTTACGCG GGTGGAATCC GATCCGCACA TGAGGCGGAA
 2401 GGTTTCCAGC TTGAGCGGGT ACGGCTCCCG GTGCGAGCTG AAATAGTCGA
 2451 ACATCCGTCG GGCCGTCGGC GACAGCTTGC GGTACTTCTC CCATATGAAT
 2501 TTCGTGTAGT GGTGCGCCAGC AAACAGCAGC ACGATTTCTT CGTCGATCAG
 2551 GACCTGGCAA CGGGACGTTT TCTTGCCACG GTCCAGGACG CGGAAGCGGT
 2601 GCAGCAGCGA CACCGATTCC AGGTGCCCAA CGCGGTCGGA CGTGAAGCCC
 2651 ATCGCCGTCG CCTGTAGGCG CGACAGGCAT TCCTCGGCCT TCGTGTAAATA
 2701 CCGGCCATTT ATCGACCAGC CCAGGTCCTG GCAAAGCTCG TAGAACGTGA
 2751 AGGTGATCGG CTCGCCGATA GGGGTGCGCT TCGCGTACTC CAACACCTGC
 2801 TGCCACACCA GTTCGTCATC GTCGGCCCGC AGCTCGACGC CGGTGTAGGT

2851 GATCTTCACG TCCTTGTTGA CGTGGAAAAAT GACCTTGTTT TGCAGCGCCT
 2901 CGCGCGGGAT TTTCTTGTTG CGCGTGGTGA ACAGGGCAGA GCGGGCCGTG
 2951 TCGTTTGGCA TCGCTCGCAT CGTGTCCGGC CACGGCGCAA TATCGAACAA
 3001 GGAAAGCTGC ATTTCTTGA TCTGCTGCTT CGTGTGTTT CAGCAACGCGG
 3051 CCTGCTTGGC CTCGCTGACC TGTTTTGCCA GGTCTCGCC GCGGTTTTTT
 3101 CGCTTCTTGG TCGTCATAGT TCCTCGCGTG TCGATGGTCA TCGACTTCGC
 3151 CAAACCTGCC GCCTCCTGTT CGAGACGACG CGAACGCTCC ACGGCGGCCG
 3201 ATGGCGCGGG CAGGGCAGGG GGAGCCAGTT GCACGCTGTC GCGCTCGATC
 3251 TTGGCCGTAG CTTGCTGGAC CATCGAGCCG ACGGACTGGA AGGTTTCGCG
 3301 GGGCGCACGC ATGACGGTGC GGCTTGCAT GGTTCGGCA TCCTCGGCGG
 3351 AAAACCCCGC GTCGATCAGT TCTTGCCCTGT ATGCCTTCCG GTCAAACGTC
 3401 CGATTCATTC ACCCTCCTTG CGGGATTGCC CCGACTCAG CCGGGGCAAT
 3451 GTGCCCTTAT TCCTGATTTG ACCCGCCTGG TGCCTTGGTG TCCAGATAAT
 3501 CCACCTTATC GGCAATGAAG TCGGTCCCCT AGACCGTCTG GCCGTCCTTC
 3551 TCGTACTTGG TATTCCGAAT CTTGCCCTGC ACGAATACCA GCGACCCCTT
 3601 GCCCAAATAC TTGCCGTGGG CCTCGGCTG AGAGCCAAAA CACTTGATGC
 3651 GGAAGAAGTC GGTGCGCTCC TGCTTGTGCG CGGCATCGTT GCGCCACATC
 3701 TAGGTACTAA AACAATTCAT CCAGTAAAAAT ATAATATTTT ATTTTCTCCC
 3751 AATCAGGCTT GATCCCCAGT AAGTCAAAAA ATAGCTCGAC ATACTGTTCT
 3801 TCCCCGATAT CCTCCCTGAT CGACCGGACG CAGAAGGCAA TGTCATACCA
 3851 CTTGTCCGCC CTGCCGCTTC TCCCAAGATC AATAAAGCCA CTTACTTTGC
 3901 CATCTTTCAC AAAGATGTTG CTGTCTCCCA GGTGCGCGTG GGAAAAGACA
 3951 AGTTCCTCTT CGGGCTTTTC CGTCTTTAAA AAATCATACA GCTCGCGCGG
 4001 ATCTTTAAAT GGAGTGTCTT CTTCCAGTT TTCGCAATCC ACATCGGCCA
 4051 GATCGTTATT CAGTAAGTAA TCCAATTCGG CTAAGCGGCT GTCTAAGCTA
 4101 TTCGTATAGG GACAATCCGA TATGTGATG GAGTGAAAGA GCCTGATGCA
 4151 CTCCGCATAC AGCTCGATAA TCTTTTCAGG GCTTTGTTCA TCTTCATACT
 4201 CTTCCGAGCA AAGGACGCCA TCGGCCTCAC TCATGAGCAG ATTGCTCCAG
 4251 CCATCATGCC GTTCAAAGTG CAGGACCTTT GGAACAGGCA GCTTTCCTTC
 4301 CAGCCATAGC ATCATGTCTT TTTCCGTTT CACATCATAG GTGGTCCCTT
 4351 TATACCGGCT GTCCGTCATT TTTAAATATA GGTTTTCATT TTCTCCACC
 4401 AGCTTATATA CCTTAGCAGG AGACATTCCT TCCGTATCTT TTACGCAGCG
 4451 GTATTTTTTCG ATCAGTTTTT TCAATTCGGG TGATATTCTC ATTTTAGCCA
 4501 TTTATTATTT CCTTCTCTT TTCTACAGTA TTTAAAGATA CCCCAGAAAG
 4551 CTAATTATAA CAAGACGAAC TCCAATTCAC TGTTCCCTGC ATTCTAAAAC
 4601 CTTAAATACC AGAAAACAGC TTTTTCAAAG TTGTTTTCAA AGTTGGCGTA
 4651 TAACATAGTA TCGACGGAGC CGATTTTGAA ACCACAATTA TGGGTGATGC
 4701 TGCCAACTTA CTGATTTAGT GTATGATGGT GTTTTTGAGG TGCTCCAGTG
 4751 GCTTCTGTGT CTATCAGCTG TCCCTCCTGT TCAGCTACTG ACGGGGTGGT
 4801 GCGTAACGGC AAAAGCACCG CCGGACATCA GCGCTATCTC TGCTCTCACT
 4851 GCCGTA AAC ATGGCAACTG CAGTTCACTT ACACCGCTTC TCAACCCGGT
 4901 ACGCACCAGA AAATCATTGA TATGGCCATG AATGGCGTTG GATGCCGGGC
 4951 AACAGCCCGC ATTATGGGCG TTGGCCTCAA CACGATTTTA CGTCACTTAA
 5001 AAAACTCAGG CCGCAGTCGG TAACCTCGCG CATAAGCCG GGCAGTGACG
 5051 TCATCGTCTG CGCGGAAATG GACGAACAGT GGGGCTATGT CGGGGCTAAA
 5101 TCGCGCCAGC GCTGGCTGTT TTACGCGTAT GACAGTCTCC GGAAGACGGT
 5151 TGTTGCGCAC GTATTCCGGT AACGCACTAT GCGGACGCTG GGGCGTCTTA
 5201 TGAGCTGCTG GTCACCCTTT GACGTGGTGA TATGGATGAC GGATGGCTGG
 5251 CCGCTGTATG AATCCCGCCT GAAGGGAAAG CTGCACGTAA TCAGCAAGCG
 5301 ATATACGCAG CGAATTGAGC GGCATAACCT GAATCTGAGG CAGCACCTGG
 5351 CACGGCTGGG ACGGAAGTCG CTGTCTGTTCT CAAAATCGGT GGAGCTGCAT
 5401 GACAAAGTCA TCGGGCATTG TCTGAACATA AAACACTATC AATAAGTTGG
 5451 AGTCATTACC CAATTATGAT AGAATTTACA AGCTATAAGG TTATTGTCTT
 5501 GGGTTTCAAG CATTAGTCCA TGCAAGTTTT TATGCTTTGC CCATTCTATA
 5551 GATATATTGA TAAGCGCGCT GCCTATGCCT TGCCCCCTGA AATCCTTACA
 5601 TACGGCGATA TCTTCTATAT AAAAGATATA TTATCTTATC AGTATTGTCA
 5651 ATATATTCAA GGCAATCTGC CTCCTCATCC TCTTCATCCT CTTGCTCTTG
 5701 GTAGCTTTTT AAATATGGCG CTTCATAGAG TAATCTGTA AAGGTCCAAT
 5751 TCTCGTTTTT ATACCTCGGT ATAATCTTAC CTATCACCTC AAATGGTTTCG
 5801 CTGGGTTTAT CGCACCCCG AACACGAGCA CGGCACCCGC GACCACTATG

5851 CCAAGAATGC CCAAGGTAAA AATTGCCGGC CCCGCCATGA AGTCCGTGAA
5901 TGCCCCGACG GCCGAAGTGA AGGGCAGGCC GCCACCCAGG CCGCCGCCCT
5951 CACTGCCCGG CACCTGGTCG CTGAATGTCT ATGCCAGCAC CTGCGGCACG
6001 TCAATGCTTC CGGGCGTCGC GCTCGGGCTG ATCGCCCATC CCGTTACTGC
6051 CCCGATCCCG GCAATGGCAA GGACTGCCAG CGCTGCCATT TTTGGGGTGA
6101 GGCCGTTTCG GGCCGAGGGG CGCAGCCCCT GGGGGGATGG GAGGCCCGCG
6151 TTAGCGGGCC GGGAGGGTTC GAGAAGGGGG GGCACCCCCC TTCGGCGTGC
6201 GCGGTCACGC GCACAGGGCG CAGCCCTGGT TAAAAACAAG GTTTATAAAT
6251 ATTGGTTTAA AAGCAGGTTA AAAGACAGGT TAGCGGTGGC CGAAAAACGG
6301 GCGGAAACCC TTGCAAATGC TGGATTTTCT GCCTGTGGAC AGCCCTCAA
6351 ATGTCAATAG GTGCGCCCCT CATCTGTGAG CACTCTGCCC CTCAAGTGTG
6401 AAGGATCGCG CCCCTCATCT GTCAGTAGTC GCGCCCCTCA AGTGTCAATA
6451 CCGCAGGGCA CTTATCCCCA GGCTTGTCCA CATCATCTGT GGGAAACTCG
6501 CGTAAATCA GCGTTTTTCG CCGATTTGCG AGGCTGGCCA GCTCCACGTC
6551 GCCGGCCGAA ATCGAGCCTG CCCCTCATCT GTCAACGCCG CGCCGGGTGA
6601 GTCGGCCCCT CAAGTGTCAA CGTCCGCCCC TCATCTGTCA GTGAGGGCCA
6651 AGTTTTCCGC GAGGTATCCA CAACGCCGGC GGCCGCGGTG TCTCGCACAC
6701 GGCTTCGACG GCGTTTCTGG CGCGTTTGA GGGCCATAGA CCGCCGCCAG
6751 CCCAGCGGCG AGGGCAACCA GCCCGGTGAG CGTCGCAAAG GCGCTCGGTC
6801 TTGCCTTGCT CGTCGGTGAT GTACTTCACC AGCTCCGCGA AGTCGCTCTT
6851 CTTGATGGAG CGCATGGGGA CGTGCTTGGC AATCACGCGC ACCCCCCGGC
6901 CGTTTTAGCG GCTAAAAAAG TCATGGCTCT GCCCTCGGGC GGACCACGCC
6951 CATCATGACC TTGCCAAGCT CGTCCTGCTT CTCTTCGATC TTCGCCAGCA
7001 GGGCGAGGAT CGTGGCATCA CCGAACC GCG CCGTGC GCGG GTCGTCGGTG
7051 AGCCAGAGTT TCAGCAGGCC GCCCAGGCGG CCCAGGTGCG CATTGATGCG
7101 GGCCAGCTCG CGGACGTGCT CATAGTCCAC GACGCCCGTG ATTTTGTAGC
7151 CCTGGCCGAC GGCCAGCAGG TAGGCCGACA GGCTCATGCC GGCCGCCGCC
7201 GCCTTTTCTT CAATCGCTCT TCGTTTCTCT GGAAGGCAGT ACACCTTGAT
7251 AGGTGGGCTG CCCTTCCTGG TTGGCTTGGT TTCATCAGCC ATCCGCTTGC
7301 CCTCATCTGT TACGCCGGCG GTAGCCGGCC AGCCTCGCAG AGCAGGATTC
7351 CCGTTGAGCA CCGCCAGGTG CGAATAAGGG ACAGTGAAGA AGGAACACCC
7401 GCTCGCGGGT GGGCCTACTT CACCTATCCT GCCCGGCTGA CGCCGTTGGA
7451 TACACCAAGG AAAGTCTACA CGAACCCCTT GGCAAAATCC TGTATATCGT
7501 GCGAAAAAGG ATGGATATAC CGAAAAAATC GCTATAATGA CCCC GAAGCA
7551 GGGTTATGCA GCGGAAAAGC GCCACGCTTC CCGAAGGGAG AAAGCGGGAC
7601 AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTCCGGAACA GGAGAGCGCA CGAGGGAGCT
7651 TCCAGGGGGA AACGCCGTGT ATCTTTATAG TCCTGTGCGG TTTCCGCCACC
7701 TCTGACTTGA GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA
7751 TGGA AAAACG CCAGCAACGC GGCCTTTTTA CGGTTTCTGG CCTTTTGCTG
7801 GCCTTTTGCT CACATGTTCT TTCCTGCGTT ATCCCCTGAT TCTGTGGATA
7851 ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA CCGCTCGCCG CAGCCGAACG
7901 ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC GCCAGAAGGC
7951 CGCCAGAGAG GCCGAGCGCG GCCGTGAGGC TTGGACGCTA GGGCAGGGCA
8001 TGAAAAGCC CGTAGCGGGC TGCTACGGGC GTCTGACGCG GTGGAAGGG
8051 GGAGGGGATG TTGTCTACAT GGCTCTGCTG TAGTGAGTGG GTTGC GCTCC
8101 GGCAGCGGTC CTGATCAATC GTCACCCCTT CTCGGTCTTT CAACGTTCTT
8151 GACAACGAGC CTCCTTTTTCG CCAATCCATC GACAATCACC GCGAGTCCCT
8201 GCTCGAACGC TGGTCCGGA CCGGCTTCGT CGAAGGCGTC TATCGCGGCC
8251 CGCAACAGCG GCGAGAGCGG AGCCTGTTCA ACGGTGCCGC CGCGCTCGCC
8301 GGCATCGCTG TCGCCGGCCT GCTCCTCAAG CACGGCCCCA ACAGTGAAGT
8351 AGCTGATTGT CATCAGCGCA TTGACGGCGT CCCC GGCCGA AAAACCCGCC
8401 TCGCAGAGGA AGCGAAGCTG CGCGTCGGCC GTTTCCATCT GCGGTGCGCC
8451 CGGTTCGCGT CCGGCATGGA TGCGCGCGCC ATCGCGGTAG GCGAGCAGCG
8501 CCTGCCTGAA GCTGCGGGCA TTCCCGATCA GAAATGAGCG CCAGTCGTCG
8551 TCGGCTCTCG GCACCGAATG CGTATGATTC TCCGCCAGCA TGGCTTCGGC
8601 CAGTGCCTCG AGCAGCGCCC GCTTGTTCCT GAAGTGCCAG TAAAGCGCCG
8651 GCTGCTGAAC CCCC AACCGT TCCGCCAGTT TGCGTGTGCT CAGACCGTCT
8701 ACGCCGACCT CGTTCAACAG GTCCAGGGCG GCACGGATCA CTGTATTGCG
8751 CTGCAACTTT GTCATGCTTG ACACTTTATC ACTGATAAAC ATAATATGTC
8801 CACCAACTTA TCAGTGATAA AGAATCCGCG CGTTCAATCG GACCAGCGGA

8851 GGCTGGTCCG GAGGCCAGAC GTGAAACCCA ACATACCCCT GATCGTAATT
8901 CTGAGCACTG TCGCGCTCGA CGCTGTCCGC ATCGGCCTGA TTATGCCGGT
8951 GCTGCCGGGC CTCCTGCGCG ATCTGGTTCA CTCGAACGAC GTCACCGCCC
9001 ACTATGGCAT TCTGCTGGCG CTGTATGCGT TGGTGCAATT TGCCTGCGCA
9051 CCTGTGCTGG GCGCGCTGTC GGATCGTTTC GGGCGGCGGC CAATCTTGCT
9101 CGTCTCGCTG GCCGGCGCCA GATCTGGGGA ACCCTGTGGT TGGCATGCAC
9151 ATACAAATGG ACGAACGGAT AAACCTTTTC ACGCCCTTTT AAATATCCGA
9201 TTATTCTAAT AAACGCTCTT TTCTCTTAGG TTTACCCGCC AATATATCCT
9251 GTCAAACACT GATAGTTTAA ACTGAAGGCG GGAAACGACA ATCTGATCAT
9301 GAGCGGAGAA TTAAGGGAGT CACGTTATGA CCCCCGCCGA TGACGCGGGA
9351 CAAGCCGTTT TACGTTTGGG ACTGACAGAA CCGCAACGTT GAAGGAGCCA
9401 CTCAGCCGCG GGTGTGGAG CTCCACCGCG GTGGCGGCCG CTCTAGAACT
9451 AGTGATCCC CCCTGGCGAA AGGGGGATGT GCTGCAAGGC GATTAAGTTG
9501 GGTAACGCCA GGGTTTTCCC AGTCACGACG TTGTAAAACG ACGGCCAGTG
9551 CCAAGCTTGC ATGCGGCTCC AGGTCGACTC TAGAGGATCC TAATGAGCAT
9601 TGCATGTCTA AGTTATAAAA AATTACCACA TATTTTTTTT GTCACACTTG
9651 TTTGAAGTGC AGTTTATCTA TCTTTATACA TATATTTAAA CTTTACTCTA
9701 CGAATAATAT AATCTATAGT ACTACAATAA TATCAGTGTT TTAGAGAATC
9751 ATATAAATGA ACAGTTAGAC ATGGTCTAAA GGACAATTGA GTATTTTGAC
9801 AACAGGACTC TACAGTTTTA TCTTTTTAGT GTGCATGTGT TCTCCTTTTT
9851 TTTTGCAAAT AGCTTACCT ATATAATACT TCATCCATTT TATTAGTACA
9901 TCCATTTAGG GTTTAGGGTT AATGGTTTTT ATAGACTAAT TTTTTTAGTA
9951 CATCTATTTT ATTCTATTTT AGCCTCTAAA TTAAGAAAAC TAAAACCTTA
10001 TTTTAGTTTT TTTATTTAAT AATTTAGATA TAAAATAGAA TAAAATAAAG
10051 TGAATAAAA TTAACAAAT ACCCTTTAAG AAATAAAAA AACTAAGGAA
10101 ACATTTTTCT TGTTCGAGT AGATAATGCC AGCCTGTAA ACGCCGTCGA
10151 CGAGTCTAAC GGACACCAAC CAGCGAACCA GCAGCGTCGC GTCGGGCCAA
10201 GCGAAGCAGA CGGCACGGCA TCTCTGTGCG TGCCCTGGA CCCCTCTCGA
10251 GAGTTCGCT CCACCGTTGG ACTTGCTCCG CTGTCCGCAT CCAGAAATTG
10301 CGTGGCGGAG CGGCAGACGT GAGCCGGCAC GGCAGGCGGC CTCCTCCTCC
10351 TCTCACGGCA CGGCAGCTAC GGGGGATTCC TTTCCACCG CTCCTTCGCT
10401 TTCCCTTCCT CGCCCGCCGT AATAAATAGA CACCCCTCC ACACCCCTCT
10451 TCCCAACCT CGTGTGTTT GAGCGCACA CACACACAAC CAGATCTCCC
10501 CCAAATCCAC CCGTCGGCAC CTCGGTTCA AGGTACGCCG CTCGTCTCC
10551 CCCCCCCCC CTCTCTACCT TCTCTAGATC GCGTTCGGG TCCATGGTTA
10601 GGGCCCGGTA GTTCTACTTC TGTTTATGTT TGTGTTAGAT CCGTGTGTTG
10651 GTTAGATCCG TGCTGCTAGC GTTCGTACAC GGATGCGACC TGTACGTCAG
10701 ACACGTTCTG ATTGCTAACT TGCCAGTGTT TCTCTTTGGG GAATCCTGGG
10751 ATGGCTCTAG CCGTTCGCA GACGGGATCG ATTTTATGAT TTTTTTTGTT
10801 TCGTTGCATA GGGTTTGGTT TGCCCTTTTC CTTTATTTCA ATATATGCCG
10851 TGCAGTTGTT TGTCGGGTCA TCTTTTCATG CTTTTTTTTG TCTTGGTTGT
10901 GATGATGTGG TCTGTTGGG CGGTCGTTCT AGATCGGAGT AGAATTAATT
10951 CTGTTTCAA CTACCTGGTG GATTTATTAA TTTTGGATCT GTATGTGTTG
11001 GCCATACATA TTCATAGTTA CGAATTGAAG ATGATGGATG GAAATATCGA
11051 TCTAGGATAG GTATACATGT TGATGCGGGT TTTACTGATG CATATACAGA
11101 GATGCTTTTT GTTCGCTTGG TTGTGATGAT GTGGTGTGGT TGGGCGGTCG
11151 TTCATTCGTT CTAGATCGGA GTAGAATACT GTTCAAACCT ACCTGGTGTA
11201 TTTATTAATT TTGGAAGTGT ATGTGTGTGT CATACTCTT CATAGTTACG
11251 AGTTTAAGAT GGATGGAAT ATCGATCTAG GATAGGTATA CATGTTGATG
11301 TGGGTTTTAC TGATGCATAT ACATGATGGC ATATGCAGCA TCTATTCTATA
11351 TGCTCTAACC TTGAGTACCT ATCTATTATA ATAAACAAGT ATGTTTTATA
11401 ATTATTTTGA TCTTGATATA CTTGGATGAT GGCATATGCA GCAGCTATAT
11451 GTGGATTTTT TTAGCCCTGC CTTCATACGC TATTTATTTG CTTGGTACTG
11501 TTTCTTTTGT CGATGCTCAC CCTGTTGTTT GGTGTTACTT CTGCAGATGA
11551 GAGGCCCGAG TGTGGTGGTG GCCATCGTGG CCATCGTCCT GTCGGCGGCG
11601 CTCGCCATGG CCATGGTGGT CCGCGCAGCC AGCGGGTACG CCAACGCCGT
11651 CTAATTCACC AACTGGGGGA TCTACGGCCG CAACTTCAG CCGCAGAACC
11701 TGGTCGCGTC GGACATCAG CACGTCATCT ACTCGTTCAT GAACTTCAG
11751 GCCGACGGCA CGGTCGCTC CGGCGACGCC TACGCCGACT ACCAGAAGCA
11801 CTACGACGAC GACTCCTGGA ACGACGTCGG GAACAACGCG TACGGCTGCG

11851 TGAAGCAGCT CTTCAAGCTG AAGAAGGCCA ACCGCAACCT CAAGGTGATG
11901 CTCTCCATCG GGGGCTGGAC CTGGTCCACC AACTTCCCCT CCGCCGCCAG
11951 CACCGACGCC AACCGCAAGA ACTTCGCCAA GACGGCCATC ACCTTCATGA
12001 AGGACTGGGG CTTGACGGG ATCGACGTCG ACTGGGAGTA CCCCGCCGAC
12051 GACACCCAGG CCACCAACAT GGTGCTCCTG CTCAAGGAGA TCCGCTCCCA
12101 GCTCGACGCC TACGCCGCGC AGTACGCCCC GGGCTACCAC TTCCTCCTCT
12151 CCATCGCCGC CCCC GCCGGC CCGGAGCACT ACTCCTTCTT GCACATGTCC
12201 GACCTCGGCC AGGTGCTCGA CTACGTCAAC CTCATGGCCT ACGACTACGC
12251 CGGGTCTTGG AGCAGCTACT CCGGCCACGA CGCCAACCTG TTCGCCAACC
12301 CGTCCAACCC CAACTCCTCC CCGTACAACA CCGACCAGGC CATCAAGGAC
12351 TACATCAAGG GGGGGGTGCC CGCCAGCAAG ATCGTGCTCG GCATGCCCAT
12401 CTACGGCCGC GCCTTCGAGA GCACCGGGGG CATCGGCCAG ACCTACAGCG
12451 GCATCGGCTC CGGCAGCTGG GAGAACGGCA TCTGGGACTA CAAGGTGCTC
12501 CCCAAGGCCG GCGCCACGGT CCAGTACGAC TCCGTGCCCC AGGCCTACTA
12551 CAGCTACGAC CCCAGCAGCA AGGAGCTGAT CTCCTTCGAC ACCCCGGACA
12601 TGATCAACAC CAAGGTCTCC TACCTCAAGA ACCTCGGCCT GGGCGGCAGC
12651 ATGTTCTGGG AGGCCTCCGC CGACAAGACC GGCTCCGACT CCCTCATCGG
12701 GACCAGCCAC CGCGCCCTCG GCAGCCTCGA CTCCACGCAG AACCTCCTGA
12751 GCTACCCCAA CTCCCAGTAC GACAACATCC GCAGCGGCCT CAACTAGGAG
12801 CTCGAATTTT CCGGATCGTT CAAACATTTG GCAATAAAGT TTCTTAAGAT
12851 TGAATCCTGT TGCCGGTCTT GCGATGATTA TCATATAATT TCTGTTGAAT
12901 TACGTTAAGC ATGTAATAAT TAACATGTAA TGCATGACGT TATTTATGAG
12951 ATGGGTTTTT ATGATTAGAG TCCC GCAATT ATACATTTAA TACGCGATAG
13001 AAAACAAAAT ATAGCGCGCA AACTAGGATA AATTATCGCG CGCGGTGTCA
13051 TCTATGTTAC TAGATCGGGC GGCCGCATCT AGAGGATCCC CCTGTTGCCC
13101 GTCTCACTGG TGAAAAGAAA AACCACCCCA GTACATTTAA AACGTCCGCA
13151 ATGTGTTATT AAGTTGTCTA AGCGTCAATT TGTTTACACC ACAATATATC
13201 CTGCCACCAG CCAGCCAACA GCTCCCCGAC CGGCAGCTCG GCACAAAATC
13251 ACCACTCGAT ACAGGCAGCC CATCAGTCCG GGACGGCGTC AGCGGGAGAG
13301 CCGTTGTAAG GCGGCAGACT TTGCTCATGT TACCGATGCT ATTCGGAAGA
13351 ACGGCAACTA AGCTGCCGGG TTTGAAACAC GGATGATCTC GGGGTACCGA
13401 GCTCGAATTA ATTCGAGCTC GGTACCCCGC TGTCGGATCG TTTCCGGCGG
13451 CGGCCAATCT TGCTCGTCTC GCTGGCCGGC GCCAGATCTG GGAACCCTG
13501 TGGTTGGCAT GCACATACAA ATGGACGAAC GGATAAACCT TTTACGCCC
13551 TTTTAAATAT CCGATTATTC TAATAAACGC TCTTTTCTCT TAGGTTTACC
13601 CGCCAATATA TCCTGTCAA CACTGATAGT TTAAACTGAA GGCGGGAAC
13651 GACAATCTGA TCATGAGCGG AGAATTAAGG AGTCACGTTA TGACCCCGC
13701 CGATGACGGG GGATCCTAAT GAGCATTGCA TGTCTAAGTT ATAAAAAATT
13751 ACCACATATT TTTTTTGTCA CACTTGTGTTG AAGTGCAGTT TATCTATCTT
13801 TATACATATA TTTAACTTT ACTCTACGAA TAATATAATC TATAGTACTA
13851 CAATAATATC AGTGTTTTAG AGAATCATAT AAATGAACAG TTAGACATGG
13901 TCTAAAGGAC AATTGAGTAT TTTGACAACA GGACTCTACA GTTTTATCTT
13951 TTTAGTGTGC ATGTGTTCTC CTTTTTTTTT GCAAATAGCT TCACCTATAT
14001 AATACTTCAT CCATTTTATT AGTACATCCA TTTAGGGTTT AGGGTTAATG
14051 GTTTTTTATAG ACTAATTTTT TTAGTACATC TATTTTATTC TATTTTAGCC
14101 TCTAAATTAA GAAAAC TAAA ACTCTATTTT AGTTTTTTTTA TTTAATAATT
14151 TAGATATAAA ATAGAATAAA ATAAAGTGAC TAAAATTAA ACAATACCC
14201 TTTAAGAAAT TAAAAAACT AAGGAAACAT TTTTCTTGTT TCGAGTAGAT
14251 AATGCCAGCC TGTTAAACGC CGTCGACGAG TCTAACGGAC ACCAACCAGC
14301 GAACCAGCAG CGTCGCGTCG GGCCAAGCGA AGCAGACGGC ACGGCATCTC
14351 TGTCGCTGCC TCTGGACCCC TCTCGAGAGT TCCGCTCCAC CGTTGGACTT
14401 GCTCCGCTGT CGGCATCCAG AAATTGCGTG GCGGAGCGGC AGACGTGAGC
14451 CGGCACGGCA GCGGCCTCC TCCTCCTCTC ACGGCACGGC AGCTACGGGG
14501 GATTCCTTTT CCACCGCTCC TTCGCTTTCC CTTCCCTCGCC CGCCGTAATA
14551 AATAGACACC CCCTCCACAC CCTCTTTCCC CAACCTCGTG TTGTTGGGAG
14601 CGCACACACA CACAACCAGA TCTCCCCCAA ATCCACCCGT CGGCACCTCC
14651 GCTTCAAGGT ACGCCGCTCG TCCTCCCCC CCCCCCTCT CTACCTCTC
14701 TAGATCGGCG TTCCGGTCCA TGTTAGGGC CCGGTAGTTC TACTTCTGTT
14751 CATGTTTGTG TTAGATCCGT GTTTGTGTTA GATCCGTGCT GCTAGCGTTC
14801 GTACACGGAT GCGACCTGTA CGTCAGACAC GTTCTGATTG CTAACCTGCC

14851 AGTGTTTCTC TTTGGGGAAT CCTGGGATGG CTCTAGCCGT TCCGCAGACG
14901 GGATCGATTT CATGATTTTT TTTGTTTCGT TGCATAGGGT TTGGTTTGCC
14951 CTTTCCCTTT ATTTCAATAT ATGCCGTGCA CTTGTTTGTC GGGTCATCTT
15001 TTCATGCTTT TTTTGTCTT GGTGTGATG ATGTGGTCTG GTTGGGCGST
15051 CGTCTAGAT CGGAGTAGAA TTAATTCTGT TTCAAACCTAC CTGGTGGATT
15101 TATTAATTTT GGATCTGTAT GTGTGTGCCA TACATATTCA TAGTTACGAA
15151 TTGAAGATGA TGGATGGAAA TATCGATCTA GGATAGGTAT ACATGTTGAT
15201 GCGGGTTTTA CTGATGCATA TACAGAGATG CTTTTTGTTT GCTTGGTTGT
15251 GATGATGTGG TGTGGTTGGG CGGTCGTTCA TTCGTTCTAG ATCGGAGTAG
15301 AATACTGTTT CAAACTACCT GGTGTATTTA TTAATTTTGG AACTGTATGT
15351 GTGTGTCATA CATCTTCATA GTTACGAGTT TAAGATGGAT GGAAATATCG
15401 ATCTAGGATA GGTATACATG TTGATGTGGG TTTTACTGAT GCATATACAT
15451 GATGGCATAT GCAGCATCTA TTCATATGCT CTAACCTTGA GTACCTATCT
15501 ATTATAATAA ACAAGTATGT TTTATAATTA TTTTGATCTT GATATACTTG
15551 GATGATGGCA TATGCAGCAG CTATATGTGG ATTTTTTTAG CCCTGCCTTC
15601 ATACGCTATT TATTTGCTTG GACTGTTTC TTTTGTGCGAT GCTCACCTG
15651 TTGTTTGGTG TTACTTCTGC AGATGAGCCC AGAACGACGC CCGGCCGACA
15701 TCCGCCGTGC CACCGAGGCG GACATGCCGG CGGTCTGCAC CATCGTCAAC
15751 CACTACATCG AGACAAGCAC GGTCAACTTC CGTACCGAGC CGCAGGAACC
15801 GCAGGAGTGG ACGGACGACC TCGTCCGTCT GCGGGAGCGC TATCCCTGGC
15851 TCGTCGCCGA GGTGGACGGC GAGGTCGCCG GCATCGCCTA CGCGGGCCCC
15901 TGGAAGGCAC GCAACGCCTA CGACTGGACG GCCGAGTCGA CCGTGTACGT
15951 CTCCCCCGC CACCAGCGGA CGGGACTGGG CTCCACGCTC TACACCACC
16001 TGCTGAAGTC CCTGGAGGCA CAGGGCTTCA AGAGCGTGGT CGCTGTCATC
16051 GGGCTGCCCA ACGACCCGAG CGTGCGCATG CACGAGGCGC TCGGATATGC
16101 CCCCCGCGC ATGCTGCGGG CGGCCGGCTT CAAGCACGGG AACTGGCATG
16151 ACGTGGGTTT CTGGCAGCTG GACTTCAGCC TGCCGGTACC GCCCCGTCCG
16201 GTCCTGCCCG TCACCGAGAT CTGATGACCC GGGTACCGAG CTCGAATTC
16251 CCCGATCGTT CAAACATTTG GCAATAAAGT TTCTTAAGAT TGAATCCTGT
16301 TGCCGGTCTT GCGATGATTA TCATATAATT TCTGTTGAAT TACGTTAAGC
16351 ATGTAATAAT TAACATGTAA TGCATGACGT TATTTATGAG ATGGGTTTTT
16401 ATGATTAGAG TCCC GCAATT ATACATTTAA TACCGATAG AAAACAAAAT
16451 ATAGCGCGCA AACTAGGATA AATTATCGCG CCGGTGTCA TCTATGTTAC
16501 TAGATCGGG

Abbildung 3: Vektorkarte: pJH271-Beta-Glu-307

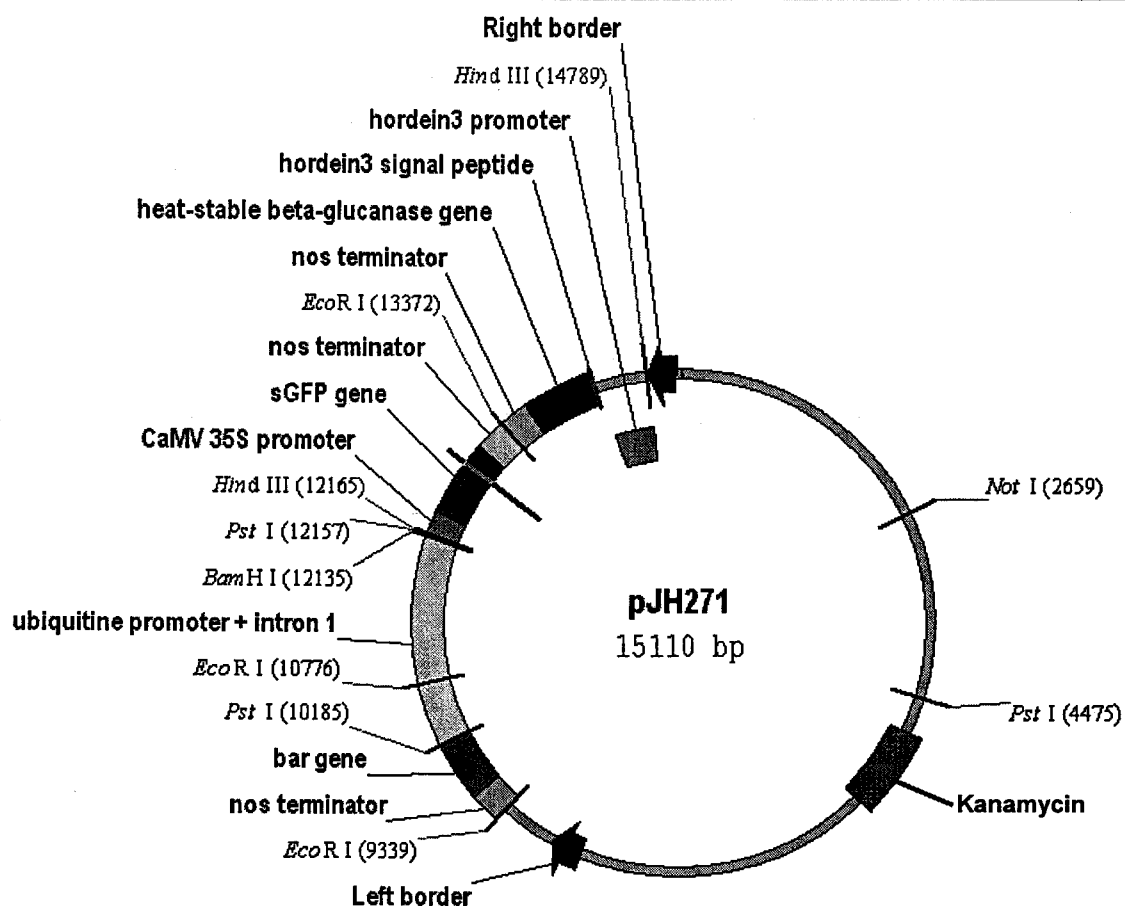


Abbildung 4: Vektorsequenz pJH271

```

1  CATCGGCGGG  GGTGATAACG  TGA CTCCCTT  AATTCTCCGC  TCATGATCAG
51  ATTGTCGTTT  CCCGCCTTCA  GTT TAAACTA  TCAGTGT TTG  ACAGGATATA
101  TTGGCGGGTA  AACCTAAGAG  AAAAGAGCGT  TTATTAGAAT  AATCGGATAT
151  TTAAAAGGGC  GTGAAAAGGT  TTATCCGTTT  GTCCATTTGT  ATGTGCATGC
201  CAACCACAGG  GTTCCCCAGA  TCTGGCGCCG  GCCAGCGAGA  CGAGCAAGAT
251  TGGCCGCCGC  CCGAAACGAT  CCGACAGCGC  GCCCAGCACA  GGTGCGCAGG
301  CAAATTGCAC  CAACGCATAC  AGCGCCAGCA  GAATGCCATA  GTGGGCGGGT
351  ACGTCGTTTC  AGTGAACCAG  ATCGCGCAGG  AGGCCCGGCA  GCACCGGCAT
401  AATCAGGCCG  ATGCCGACAG  CGTCGAGCGC  GACAGTGCTC  AGAATTACGA
451  TCAGGGGTAT  GTTGGGTTTC  ACGTCTGGCC  TCCGGACCAG  CCTCCGCTGG
501  TCCGATTGAA  CGCGCGGATT  CTTTATCACT  GATAAGTTGG  TGGACATATT
551  ATGTTTATCA  GTGATAAAGT  GTCAAGCATG  ACAAAGTTGC  AGCCGAATAC
601  AGTGATCCGT  GCCGCCCTGG  ACCTGTTGAA  CGAGGTCGGC  GTAGACGGTC
651  TGACGACACG  CAAACTGGCG  GAACGGTTGG  GGGTTCAGCA  GCCGGCGCTT
701  TACTGGCACT  TCAGGAACAA  GCGGGCGCTG  CTCGACGCAC  TGGCCGAAGC
751  CATGCTGGCG  GAGAATCATA  CGCATTCGGT  GCCGAGAGCC  GACGACGACT
801  GCGGCTCATT  TCTGATCGGG  AATGCCCGCA  GCTTCAGGCA  GGCGCTGCTC
851  GCCTACCGCG  ATGGCGCGCG  CATCCATGCC  GGCACGCGAC  CGGGCGCACC
901  GCAGATGGAA  ACGGCCGACG  CGCAGCTTCG  CTTCTCTGTC  GAGGCGGGTT
951  TTTCCGCCGG  GGACGCCGTC  AATGCGCTGA  TGACAATCAG  CTACTTCACT
1001  GTTGGGGCCG  TGCTTGAGGA  GCAGGCCGGC  GACAGCGATG  CCGGCGAGCG
1051  CGGCGGCACC  GTTGAACAGG  CTCCGCTCTC  GCCGCTGTTG  CGGGCCGCGA
1101  TAGACGCCCT  CGACGAAGCC  GGTCCGGACG  CAGCGTTCGA  GCAGGGACTC
1151  GCGGTGATTG  TCGATGGATT  GCGGAAAAGG  AGGCTCGTTG  TCAGGAACGT
1201  TGAAGGACCG  AGAAAGGGTG  ACGATTGATC  AGGACCGCTG  CCGGAGCGCA
1251  ACCCACTCAC  TACAGCAGAG  CCA TG TAGAC  AACATCCCCT  CCCCTTTTCC
1301  ACCGCGTCAG  ACGCCCCTAG  CAGCCCCTA  CGGGCTTTTT  CATGCCCTGC
1351  CCTAGCGTCC  AAGCCTCAGC  GCCGCGCTCG  GCCTCTCTGG  CGGCCTTCTG
1401  GCGCTCTTCC  GCTTCTCTCG  TCACTGACTC  GCTGCGCTCG  GTCGTTCCGG
1451  TGCGGCGAGC  GGTATCAGCT  CACTCAAAGG  CGGTAATACG  GTTATCCACA
1501  GAATCAGGGG  ATAACGCAGG  AAAGAACATG  TGAGCAAAAG  GCCAGCAAAA
1551  GGCCAGGAAC  CGTAAAAAGG  CCGCGTTGCT  GCGGTTTTTC  CATAGGCTCC
1601  GCCCCCCTGA  CGAGCATCAC  AAAAAATCGAC  GCTCAAGTCA  GAGGTGGCGA
1651  AACCCGACAG  GACTATAAAG  ATACCAGGCG  TTTCCCCCTG  GAAGCTCCCT
1701  CGTGCGCTCT  CCTGTTCCGA  CCCTGCCGCT  TACCGGATAC  CTGTCCGCTT
1751  TTCTCCCTTC  GGGAAAGCGT  GCGCTTTTCC  GCTGCATAAC  CCTGCTTCGG
1801  GGTCAATTATA  GCGATTTTTT  CGGTATATCC  ATCCTTTTTT  GCACGATATA
1851  CAGGATTTTG  CCAAAGGGTT  CGTGTAGACT  TTCCTTGGTG  TATCCAACGG
1901  CGTCAGCCGG  GCAGGATAGG  TGAAGTAGGC  CCACCCGCGA  GCGGGTGTTC
1951  CTTCTTCACT  GTCCCTTATT  CGCACCTGGC  GGTGCTCAAC  GGAATCCTG
2001  CTCTGCGAGG  CTGGCCGGCT  ACCGCCGGCG  TAACAGATGA  GGGCAAGCGG
2051  ATGGCTGATG  AAACCAAGCC  AACCAGGAAG  GGCAGCCCAC  CTATCAAGGT
2101  GTACTGCCTT  CCAGACGAAC  GAAGAGCGAT  TGAGGAAAAG  GCGGCGGCGG
2151  CCGGCATGAG  CCTGTCCGCC  TACCTGCTGG  CCGTCGGCCA  GGGCTACAAA
2201  ATCACGGGCG  TCGTGGACTA  TGAGCACGTC  CGCGAGCTGG  CCCGCATCAA
2251  TGGCGACCTG  GGCCGCCTGG  GCGGCCTGCT  GAAACTCTGG  CTCACCGACG
2301  ACCCGCGCAC  GCGCGGTTT  GGTGATGCCA  CGATCCTCGC  CCTGCTGGCG
2351  AAGATCGAAG  AGAAGCAGGA  CGAGCTTGGC  AAGGTCATGA  TGGGCGTGGT
2401  CCGCCCGAGG  GCAGAGCCAT  GACTTTTTTA  GCCGCTAAAA  CGGCCGGGGG
2451  GTGCGCGTGA  TTGCCAAGCA  CGTCCCCTAT  CGCTCCATCA  AGAAGAGCGA
2501  CTTGCGGGAG  CTGGTGAAGT  ACATCACCAG  CGAGCAAGGC  AAGACCGAGC
2551  GCCTTTGCGA  CGCTCACCAG  GCTGGTTGCC  CTCGCCGCTG  GGCTGGCGGC
2601  CGTCTATGGC  CCTGCAAACG  CGCCAGAAAC  GCCGTCGAAG  CCGTGTGCGA
2651  GACACCGCGG  CCGCCGGCGT  TGTGGATACC  TCGCGGAAAA  CTTGGCCCTC
2701  ACTGACAGAT  GAGGGGCGGA  CGTTGACACT  TGAGGGGCGG  ACTCACCCGG
2751  CGCGGCGTTG  ACAGATGAGG  GGCAGGCTCG  ATTTCCGGCC  GCGACGTGGA
2801  GCTGGCCAGC  CTCGCAAATC  GCGGAAAACG  CCTGATTTTA  CGCGAGTTTC

```

2851 CCACAGATGA TGTGGACAAG CCTGGGGATA AGTGCCCTGC GGTATTGACA
 2901 CTTGAGGGGC GCGACTACTG ACAGATGAGG GCGCGATCC TTGACACTTG
 2951 AGGGGCAGAG TGCTGACAGA TGAGGGGCGC ACCTATTGAC ATTTGAGGGG
 3001 CTGTCCACAG GCAGAAAATC CAGCATTTCG AAGGGTTTCC GCCCGTTTTT
 3051 CGGCCACCGC TAACCTGTCT TTTAACCTGC TTTTAAACCA ATATTTATAA
 3101 ACCTTGTTTT TAACCAGGGC TGCGCCCTGT GCGCGTGACC GCGCACGCCG
 3151 AAGGGGGGTG CCCCCCTTC TCGAACCCTC CCGGCCCGCT AACCGGGGCC
 3201 TCCCATCCCC CCAGGGGCTG CGCCCTCGG CCGCGAACGG CCTCACCCCA
 3251 AAAATGGCAG CGCTGGCAGT CCTTGCCATT GCCGGGATCG GGGCAGTAAC
 3301 GGGATGGGCG ATCAGCCCGA GCGCGACGCC CGGAAGCATT GACGTGCCGC
 3351 AGGTGCTGGC ATCGACATTC AGCGACCAGG TGCCGGGCGAG TGAGGGCGGC
 3401 GGCCTGGGTG GCGGCCTGCC CTTCACTTCG GCCGTGCGGG CATTACGCGA
 3451 CTTTCATGGCG GGGCCGGCAA TTTTACCTT GGGCATTCTT GGCATAGTGG
 3501 TCGCGGGTGC CGTGCTCGTG TTCGGGGGTG CGATAAACCC AGCGAACCAT
 3551 TTGAGGTGAT AGGTAAGATT ATACCGAGGT ATGAAAACGA GAATTGGACC
 3601 TTTACAGAAT TACTCTATGA AGCGCCATAT TTAAAAAGCT ACCAAGACGA
 3651 AGAGGATGAA GAGGATGAGG AGGCAGATTG CTTGAATAT ATTGACAATA
 3701 CTGATAAGAT AATATATCTT TTATATAGAA GATATCGCCG TATGTAAGGA
 3751 TTTCAGGGGG CAAGGCATAG GCAGCGCGCT TATCAATATA TCTATAGAAT
 3801 GGGCAAAGCA TAAAACTTG CATGGACTAA TGCTTGA AAC CCAGGACAAT
 3851 AACCTTATAG CTTGTAAATT CTATCATAAT TGGGTAATGA CTCCAACCTA
 3901 TTGATAGTGT TTTATGTTCA GATAATGCCG GATGACTTTG TCATGCAGCT
 3951 CCACCGATTT TGAGAACGAC AGCGACTTCC GTCCAGCCG TGCCAGGTGC
 4001 TGCCTCAGAT TCAGGTTATG CCGCTCAATT CGCTGCGTAT ATCGCTTGCT
 4051 GATTACGTGC AGCTTTCCTT TCAGGCGGGA TTCATACAGC GGCCAGCCAT
 4101 CCGTCATCCA TATCACCAGG TCAAAGGGTG ACAGCAGGCT CATAAGACGC
 4151 CCCAGCGTCG CCATAGTGCG TTCACCGAAT ACGTGCGCAA CAACCGTCTT
 4201 CCGGAGACTG TCATACGCGT AAAACAGCCA GCGCTGGCGC GATTTAGCCC
 4251 CGACATAGCC CCACTGTTTG TCCATTTCCG CGCAGACGAT GACGTCCTG
 4301 CCCGGCTGTA TGCGCGAGGT TACCGACTGC GGCCTGAGTT TTTTAAGTGA
 4351 CGTAAATCG TGTTGAGGCC AACGCCATA ATGCGGGCTG TTGCCGGCA
 4401 TCCAACGCCA TTCATGGCCA TATCAATGAT TTTCTGGTGC GTACCGGGTT
 4451 GAGAAGCGGT GTAAGTGAAC TGCAGTTGCC ATGTTTTACG GCAGTGAGAG
 4501 CAGAGATAGC GCTGATGTCC GCGGGTCTT TTGCCGTTAC GCACCACCCC
 4551 GTCAGTAGCT GAACAGGAGG GACAGCTGAT AGACACAGAA GCCACTGGAG
 4601 CACCTCAAAA ACACCATCAT ACACTAAATC AGTAAGTTGG CAGCATCACC
 4651 CATAATTGTG GTTTCAAAAA CCGCTCCGTC GATACTATGT TATACGCCAA
 4701 CTTTGAAAAC AACTTTGAAA AAGCTGTTTT CTGGTATTTA AGGTTTTAGA
 4751 ATGCAAGGAA CAGTGAATTG GAGTTCGTCT TGTTATAATT AGCTTCTTGG
 4801 GGTATCTTTA AATACTGTAG AAAAGAGGAA GGAATAATA AATGGCTAAA
 4851 ATGAGAATAT CACCGGAATT GAAAAAATG ATCGAAAAAT ACCGCTGCGT
 4901 AAAAGATACG GAAGGAATGT CTCCTGCTAA GGTATATAAG CTGGTGGGAG
 4951 AAAATGAAAA CCTATATTTA AAAATGACGG ACAGCCGGTA TAAAGGGACC
 5001 ACCTATGATG TGGAACGGGA AAAGGACATG ATGCTATGGC TGGAAAGAAA
 5051 GCTGCCTGTT CCAAAGGTCC TGCACTTTGA ACGGCATGAT GGCTGGAGCA
 5101 ATCTGCTCAT GAGTGAGGCC GATGGCGTCC TTTGCTCGGA AGAGTATGAA
 5151 GATGAACAAA GCCCTGAAAA GATTATCGAG CTGTATGCGG AGTGATCAG
 5201 GCTCTTTTAC TCCATCGACA TATCGGATTG TCCCTATACG AATAGCTTAG
 5251 ACAGCCGCTT AGCCGAATTG GATTACTTAC TGAATAACGA TCTGGCCGAT
 5301 GTGGATTGCG AAAACTGGGA AGAAGACACT CCATTTAAAG ATCCGCGCGA
 5351 GCTGTATGAT TTTTAAAGA CCGAAAAGCC CGAAGAGGAA CTGTCTTTTT
 5401 CCCACGGCGA CCTGGGAGAC AGCAACATCT TTGTGAAAGA TGGCAAAGTA
 5451 AGTGGCTTTA TTGATCTTGG GAGAAGCGGC AGGGCGGACA AGTGGTATGA
 5501 CATTGCCTTC TGCGTCCGGT CGATCAGGGA GGATATCGGG GAAGAACAGT
 5551 ATGTCGAGCT ATTTTTTGAC TTA CTGGGGA TCAAGCCTGA TTGGGAGAAA
 5601 ATAAAATATT ATATTTTACT GGATGAATTG TTTTAGTACC TAGATGTGGC
 5651 GCAACGATGC CGGCGACAAG CAGGAGCGCA CCGACTTCTT CCGCATCAAG
 5701 TGTTTTGGCT CTCAGGCCGA GGCCACGGC AAGTATTTGG GCAAGGGGTC
 5751 GCTGGTATTC GTGCAGGGCA AGATTCCGAA TACCAAGTAC GAGAAGGACG
 5801 GCCAGACGGT CTACGGGACC GACTTCATTG CCGATAAGGT GGATTATCTG

5851 GACACCAAGG CACCAGGCGG GTCAAATCAG GAATAAGGGC ACATTGCCCC
5901 GCGGTGAGTC GGGGCAATCC CGCAAGGAGG GTGAATGAAT CGGACGTTTG
5951 ACCGGAAGGC ATACAGGCAA GAACTGATCG ACGCGGGGTT TTCCGCCGAG
6001 GATGCCGAAA CCATCGCAAG CCGCACCGTC ATGCGTGCGC CCCGCGAAAC
6051 CTTCCAGTCC GTCGGCTCGA TGGTCCAGCA AGCTACGGCC AAGATCGAGC
6101 GCGACAGCGT GCAACTGGCT CCCCCTGCCC TGCCCGCGCC ATCGGCCGCC
6151 GTGGAGCGTT CGCGTCGTCT CGAACAGGAG GCGGCAGGTT TGGCGAAGTC
6201 GATGACCATC GACACGCGAG GAACTATGAC GACCAAGAAG CGAAAAACCG
6251 CCGGCGAGGA CCTGGCAAAA CAGGTCAGCG AGGCCAAGCA GGCCCGGTTG
6301 CTGAAACACA CGAAGCAGCA GATCAAGGAA ATGCAGCTTT CCTTGTTCGA
6351 TATTGCGCCG TGGCCGGACA CGATGCGAGC GATGCCAAAC GACACGGCCC
6401 GCTCTGCCCT GTTCACCACG CGCAACAAGA AAATCCCGCG CGAGGCGCTG
6451 CAAAACAAGG TCATTTTCCA CGTCAACAAG GACGTGAAGA TCACCTACAC
6501 CGGCGTCGAG CTGCGGGCCG ACGATGACGA ACTGGTGTGG CAGCAGGTGT
6551 TGGAGTACGC GAAGCGCACC CCTATCGGCG AGCCGATCAC CTTACGTTT
6601 TACGAGCTTT GCCAGGACCT GGGCTGGTCG ATCAATGGCC GGTATTACAC
6651 GAAGGCCGAG GAATGCCTGT CGCGCCTACA GCGACGGCG ATGGGCTTCA
6701 CGTCCGACCG CGTTGGGCAC CTGGAATCGG TGTGCTGCT GCACCGCTT
6751 CGCGTCTGG ACCGTGGCAA GAAAACGTCC CGTTGCCAGG TCCTGATCGA
6801 CGAGGAAATC GTCGTGCTGT TTGCTGGCGA CCACTACAG AAATTCATAT
6851 GGGAGAAGTA CCGCAAGCTG TCGCCGACGG CCCGACGGAT GTTCGACTAT
6901 TTCAGCTCGC ACCGGGAGCC GTACCCGCTC AAGCTGGAAA CCTTCCGCCT
6951 CATGTGCGGA TCGGATTCCA CCCGCGTGAA GAAGTGGCG GAGCAGGTG
7001 GCGAAGCCTG CGAAGAGTTG CGAGGCAGCG GCCTGGTGGG ACACGCCTGG
7051 GTCAATGATG ACCTGGTGCA TTGCAAACGC TAGGGCCTTG TGGGGTCAGT
7101 TCCGGCTGGG GGTTCAGCAG CCAGCGCTTT ACTGGCATT CAGGAACAAG
7151 CGGGCACTGC TCGACGCACT TGCTTCGCTC AGTATCGCTC GGGACGCACG
7201 GCGCGCTCTA CGAACTGCCG ATAAACAGAG GATTAAAATT GACAATTGTG
7251 ATTAAGGCTC AGATTGACG GCTTGGAGCG GCCGACGTGC AGGATTTCCG
7301 CGAGATCCGA TTGTCGGCCC TGAAGAAAGC TCCAGAGATG TTCGGGTCCG
7351 TTTACGAGCA CGAGGAGAAA AAGCCATGG AGGCGTTCCG TGAACGGTTG
7401 CGAGATGCCG TGGCATTCGG CGCCTACATC GACGGCGAGA TCATTGGGCT
7451 GTCGGTCTTC AAACAGGAGG ACGGCCCAA GGACGCTCAC AAGGCGCATC
7501 TGTCCGGCGT TTTCTGGGAG CCCGAACAGC GAGGCCGAGG GGTCCGCGGT
7551 ATGCTGCTGC GGGCGTTGCC GCGGGGTTA TTGCTCGTGA TGATCGTCCG
7601 ACAGATTCCA ACGGGAATCT GGTGGATGCG CATCTTCATC CTCGGCGCAC
7651 TTAATATTTT GCTATTCTGG AGCTTGTGT TTATTTCCGT CTACCGCTG
7701 CCGGGCGGGG TCGCGGCGAC GGTAGGCGCT GTGCAGCCGC TGATGGTCTG
7751 GTTCATCTCT GCCGCTCTGC TAGGTAGCCC GATACGATTG ATGGCGGTCC
7801 TGGGGGCTAT TTGCGGAACT GCGGGCGTGG CGCTGTTGGT GTTGACACCA
7851 AACGCAGCGC TAGATCCTGT CGGCGTCGCA GCGGGCCTGG CGGGGCGGT
7901 TTCCATGGCG TTCGGAACCG TGCTGACCCG CAAGTGGCAA CCTCCGCTG
7951 CTCTGCTCAC CTTTACCGCC TGGCAACTGG CGGCCGGAGG ACTTCTGCTC
8001 GTTCCAGTAG CTTTAGTGTG TGATCCGCCA ATCCCGATGC CTACAGGAAC
8051 CAATGTTCTC GGCCTGGCGT GGCTCGGCCT GATCGGAGCG GGTTTAACCT
8101 ACTTCTTTG GTTCCGGGG ATCTCGCGAC TCGAACCTAC AGTTGTTTCC
8151 TTACTGGGCT TTCTCAGCCC CAGATCTGGG GTCGATCAGC CGGGGATGCA
8201 TCAGGCCGAC AGTCGGAACT TCGGGTCCCC GACCTGTACC ATTCGGTGAG
8251 CAATGGATAG GGGAGTTGAT ATCGTCAACG TTCACTTCTA AAGAAATAGC
8301 GCCACTCAGC TTCCTCAGCG GCTTTATCCA GCGATTTCTT ATTATGTCGG
8351 CATAGTTCTC AAGATCGACA GCCTGTCAGG GTTAAGCGAG AAATGAATAA
8401 GAAGGCTGAT AATTCGGATC TCTGCGAGGG AGATGATATT TGATCACAGG
8451 CAGCAACGCT CTGTCAATCGT TACAATCAAC ATGCTACCCT CCGCGAGATC
8501 ATCCGTGTTT CAAACCCGGC AGCTTAGTTG CCGTCTTCC GAATAGCATC
8551 GGTAACATGA GCAAAGTCTG CCGCCTTACA ACGGCTCTCC CGCTGACGCC
8601 GTCCCGGACT GATGGGCTGC CTGTATCGAG TGGTGATTTT GTGCCGAGCT
8651 GCCGGTCGGG GAGCTGTTGG CTGGCTGGTG GCAGGATATA TTGTGGTGTG
8701 AACAAATTGA CGCTTAGACA ACTTAATAAC ACATTGCGGA CGTTTTTAAT
8751 GTACTGGGGT GGTTTTTCTT TTCACCAGTG AGACGGGCAA CAGCTGATTG
8801 CCCTTACCG CCTGGCCCTG AGAGAGTTGC AGCAAGCGGT CCACGCTGGT

8851 TTGCCCCAGC AGGCGAAAAT CCTGTTTGAT GGTGGTTCCG AAATCGGCAA
 8901 AATCCCTTAT AAATCAAAG AATAGCCCGA GATAGGGTTG AGTGTGTGTT
 8951 CAGTTTGAA CAAGAGTCCA CTATTAAAGA ACGTGGACTC CAACGTCAAA
 9001 GGGCGAAAAA CCGTCTATCA GGGCGATGGC CCACTACGTG AACCATCACC
 9051 CAAATCAAGT TTTTGGGGT CGAGGTGCCG TAAAGCACTA AATCGGAACC
 9101 CTAAAGGGAG CCCCCGATTT AGAGCTTGAC GGGGAAAGCC GCGGAACGTG
 9151 GCGAGAAAGG AAGGGAAGAA AGCGAAAGGA GCGGGCGCCA TTCAGGCTGC
 9201 GCAACTGTTG GGAAGGGCGA TCGGTGCGGG CCTCTTCGCT ATTACGCCAG
 9251 CTGGCGAAAG GGGGATGTGC TGCAAGGCGA TTAAGTTGGG TAACGCCAGG
 9301 GTTTTCCAG TCACGACGTT GTAAAACGAC GGCCAGTGAA TTCCCAGTCT
 9351 AGTAACATAG ATGACACCGC GCGCGATAAT TTATCCTAGT TTGCGCGCTA
 9401 TATTTTGTGTT TCTATCGCGT ATTAATGTA TAATTGCGGG ACTCTAATCA
 9451 TAAAAACCCA TCTCATAAAT AACGTCATGC ATTACATGTT AATTATTACA
 9501 TGCTTAACGT AATTCAACAG AAATTATATG ATAATCATCG CAAGACCGGC
 9551 AACAGGATTC AATCTTAAGA AACTTTATTG CCAAATGTTT GAACGATCGG
 9601 GGAAATTCGA GCTCGGTACC CGGGTCATCA GATCTCGGTG ACGGGCAGGA
 9651 CCGGACGGGG CGGTACCGGC AGGCTGAAAGT CCAGCTGCCA GAAACCCACG
 9701 TCATGCCAGT TCCCCTGCTT GAAGCCGGCC GCCCGCAGCA TGCCGCGGGG
 9751 GGCATATCCG AGCGCCTCGT GCATGCGCAC GCTCGGGTCG TTGGGCAGCC
 9801 CGATGACAGC GACCACGCTC TTGAAGCCCT GTGCCTCCAG GGACTTCAGC
 9851 AGGTGGGTGT AGAGCGTGGA GCCCAGTCCC GTCCGCTGGT GCGGGGGGGA
 9901 GACGTACACG GTCGACTCGG CCGTCCAGTC GTAGGCGTTG CGTGCCTTCC
 9951 AGGGGCCCGC GTAGGCGATG CCGGCGACCT CGCCGTCCAC CTCGGCGACG
 10001 AGCCAGGGAT AGCGCTCCCG CAGACGGACG AGGTCGTCCG TCCACTCCTG
 10051 CGGTTCCTGC GGCTCGGTAC GGAAGTTGAC CGTGCTTGTC TCGATGTAGT
 10101 GGTTGACGAT GGTGCAGACC GCCGGCATGT CCGCCTCGGT GGCACGGCGG
 10151 ATGTCGGCCG GCGTCGTTT TGGGCTCATC TGCAGAAGTA ACACCAAACA
 10201 ACAGGGTGAG CATCGACAAA AGAAACAGTA CCAAGCAAAT AAATAGCGTA
 10251 TGAAGGCAGG GCTAAAAAAA TCCACATATA GCTGCTGCAT ATGCCATCAT
 10301 CCAAGTATAT CAAGATCAA ATAATTATAA AACATACTTG TTTATTATAA
 10351 TAGATAGGTA CTCAAGGTTA GAGCATATGA ATAGATGCTG CATATGCCAT
 10401 CATGTATATG CATCAGTAAA ACCCACATCA ACATGTATAC CTATCCTAGA
 10451 TCGATATTTT CATCCATCTT AAACCGTAA CTATGAAGAT GTATGACACA
 10501 CACATACAGT TCCAAAATTA ATAAATACAC CAGGTAGTTT GAAACAGTAT
 10551 TCTACTCCGA TCTAGAACGA ATGAACGACC GCCCAACCAC ACCACATCAT
 10601 CACAACCAAG CGAACAAAA GCATCTCTGT ATATGCATCA GTAAAACCCG
 10651 CATCAACATG TATACCTATC CTAGATCGAT ATTTCCATCC ATCATCTTCA
 10701 ATTCGTAAC ATGAATATGT ATGGCACACA CATAAGATC CAAAATTAAT
 10751 AAATCCACCA GGTAGTTTGA AACAGAATTC TACTCCGATC TAGAACGACC
 10801 GCCCAACCAG ACCACATCAT CACAACCAAG AAAAAAAA GCATGAAAAG
 10851 ATGACCCGAC AAACAAGTGC ACGGCATATA TTGAAATAAA GGAAAAGGGC
 10901 AAACCAAACC CTATGCAACG AAACAATAAA AATCATGAAA TCGATCCCGT
 10951 CTGCGGAACG GCTAGAGCCA TCCCAGGATT CCCCAAAGAG AAACACTGGC
 11001 AAGTTAGCAA TCAGAACGTG TCTGACGTAC AGGTGCGATC CGTGTACGAA
 11051 CGTAGCAGC ACGGATCTAA CACAAACACG GATCTAACAC AAACATGAAC
 11101 AGAAGTAGAA CTACCGGGCC CTAACCATGG ACCGGAACGC CGATCTAGAG
 11151 AAGGTAGAGA GGGGGGGGGG GGGAGGACGA GCGGCGTACC TTGAAGCGGA
 11201 GGTGCCGACG GGTGGATTTG GGGGAGATCT GGTGTGTGT GTGTGCGCTC
 11251 CGAACACAC GAGGTTGGGG AAAGAGGGTG TGGAGGGGGT GTCTATTTAT
 11301 TACGGCGGGC GAGGAAGGGA AAGCGAAGGA GCGGTGGGAA AGGAATCCCC
 11351 CGTAGCTGCC GTGCCGTGAG AGGAGGAGGA GGCCGCTGC CGTGCCGGCT
 11401 CACGTCGTCC GCTCCGCCAC GCAATTTCTG GATGCCGACA GCGGAGCAAG
 11451 TCCAACGGTG GAGCGGAACT CTCGAGAGGG GTCCAGAGGC AGCGACAGAG
 11501 ATGCCGTGCC GTCTGCTTCG CTTGGCCCGA CGCGACGCTG CTGGTTGCGT
 11551 GGTGGGTGTC CGTTAGACTC GTCGACGGCG TTTAACAGGC TGGCATTATC
 11601 TACTCGAAAC AAGAAAAATG TTTCTTAGT TTTTTTAATT TCTTAAAGGG
 11651 TATTTGTTTA ATTTTGTAGT ACTTTATTTT ATTCTATTTT ATATCTAAAT
 11701 TATTAATAA AAAAACTAAA ATAGAGTTTT AGTTTTCTTA ATTTAGAGGC
 11751 TAAAATAGAA TAAAATAGAT GTACTAAAAA AATTAGTCTA TAAAACCAT
 11801 TAACCTAAA CCCTAAATGG ATGTACTAAT AAAATGGATG AAGTATTATA

11851 TAGGTGAAGC TATTTGCAAA AAAAAAGGAG AACACATGCA CACTAAAAAG
 11901 ATAAAAGTGT AGAGTCCTGT TGTCAAATA CTCAATTGTC CTTTAGACCA
 11951 TGTCTAACTG TTCATTTATA TGATTCTCTA AAACACTGAT ATTATTGTAG
 12001 TACTATAGAT TATATTATTC GTAGAGTAAA GTTTAAATAT ATGTATAAAG
 12051 ATAGATAAAC TGCACCTCAA ACAAGTGTGA CAAAAAAAT ATGTGGTAAT
 12101 TTTTATAAC TTAGACATGC AATGCTCATT AGGGGATCCT CTAGAGTCGA
 12151 CCTGCAGGCA TGCAAGCTTC CACTGACGTA AGGGATGACG CACAATCCCA
 12201 CTATCCTTCG CAAGACCCTT CCTCTATATA AGGAAGTTCA TTTCAATTGG
 12251 AGAGGACACG CTGAAATCAC CAGTCTCTCT CTACAAATCT ATCTCTCTCT
 12301 ATTTTCTCCA TAATAATGTG TGAGTAGTTC CCAGATAAGG GAATTAGGGT
 12351 TCTTATAGGG TTTTCGCTCAC GTGTTGAGAT GGTGAGCAAG GGCGAGGAGC
 12401 TGTTACCGG GGTGGTGGCC ATCCTGGTCG AGCTGGACGG CGACGTAAAC
 12451 GGCCACAAGT TCAGCGTGTG CGGCGAGGGC GAGGGCGATG CCACCTACGG
 12501 CAAGCTGACC CTGAAGTTCA TCTGCACCAC CGGCAAGCTG CCCGTGCCCT
 12551 GGCCACCCT CGTGACCACC TTCACCTACG GCGTGCAGTG CTTAGCCGC
 12601 TACCCGACC ACATGAAGCA GCACGACTTC TTCAAGTCCG CCATGCCCGA
 12651 AGGCTACGTC CAGGAGCGCA CCATCTTCTT CAAGGACGAC GGCAACTACA
 12701 AGACCCGCGC CGAGGTGAAG TTCGAGGGCG ACACCCTGGT GAACCGCATC
 12751 GAGCTGAAGG GCATCGACTT CAAGGAGGAC GGCAACATCC TGGGGCACAA
 12801 GCTGGAGTAC AACTACAACA GCCACAACGT CTATATCATG GCCGACAAGC
 12851 AGAAGAACGG CATCAAGGTG AACTTCAAGA TCCGCCACAA CATCGAGGAC
 12901 GGCAGCGTGC AGCTCGCCGA CCACTACCAG CAGAACACCC CCATCGGCGA
 12951 CGGCCCGTG CTGCTGCCCG ACAACCACTA CCTGAGCACC CAGTCGCCCG
 13001 TGAGCAAAGA CCCCACGAG AAGCGCGATC ACATGGTCCT GCTGGAGTTC
 13051 GTGACCGCCG CCGGGATCAC TCTCGGCATG GACGAGCTGT ACAAGTAAGA
 13101 GCTCGAATTT CCCCATCGT TCAAACATTT GGGAATAAAG TTTCTTAAGA
 13151 TTGAAATCCT GTTGCCGGTC TTGCGATGAT TATCATATAA TTTCTGTTGA
 13201 ATTACGTTAA GCATGTAATA ATTAACATGT AATGCATGAC GTTATTTATG
 13251 AGATGGGTTT TTATGATTAC ACTCCCCAA TTATACATTT AATACCGGAT
 13301 AGAAAACAAA ATATAGCGCG CAACTAGGA TAAATTATCG CGCGCGGTGT
 13351 CATCTATGTT ACTAGATCGG GAATTCGCGA TCTAGTAACA TAGATGACAC
 13401 CGCGCGCGAT AATTTATCCT AGTTTGC GCGC CTATATTTTG TTTTCTATCG
 13451 CGTATTAAAT GTATAATTGG GGGAGTGTA TCAATAAAAC CCATCTCATA
 13501 AATAACGTCA TGCATTACAT GTTAATTATT ACATGCTTAA CGTAATTCAA
 13551 CAGAAATTAT ATGATAATCA TCGCAAGACC GGCAACAGGA TTTCAATCTT
 13601 AAGAACTTT ATTCCCAAAT GTTTGAACGA TCGGGGAAAT TCGAGCTCTC
 13651 AGTTGCTGGT GACTTTGACC CAGTCGTA CTGCGGTAGAG CGGGTTGGCG
 13701 CCGTTGTAGC TGCCGAGCCA GTCGTCGACG CCGGTGCCGT TCCAGAGGTT
 13751 CATCATGATC TTGCCCGGGG TGCTCGGGAT GTTGGCGGTG GCGGTGTGCT
 13801 TGAGGACGCC GTCGACGTAC CACTTGATGT AGCCCGGCTG CCAGTCGAAG
 13851 GCGTAGGTGT GGAAGCCCTT GCTGGCGTCG AAGCCGAGGC TGATGACCTT
 13901 CTCGTGGCCG CCGACGCCGT TGGTGTAGTA GTTGAACCTG ACCTTGGTGG
 13951 TGTCCTTGCC GAGGAACTCG ATGTCGATCT CGTCCCCTG GGTGCCGTGG
 14001 GCCGGGCCGG TGTAGGTGAA GAAGCTGCTG ACGATGCCGG TGTTCTTGGC
 14051 CGGCTTCATG CTGACCTCGT AGAGGCCGTA GCCGTAGATG TTGGTGTGCTG
 14101 GGTACTCGGC GCAGTCGAAC TTGTTGTAGG CGCTGCTGGT GAGGCCGAGC
 14151 TTGAGCTTGC CGTCGTTGGT GAAGTTGACG TTGTTGGCGC GCCAGGTGCA
 14201 GPTGAAGACG CCGCCGTTGC TGTAGCCGTC GGCCTTCTCC CAGGTGCTCG
 14251 GGTGAAGCT GTTGAACGGC TCGAAGAAGC TGCCGCCGGT CTGAGCGGTG
 14301 GTGAGAGCCA CGAGGGCGAC GATTACCGCC ACAAGAGGA CCAGCCGCTT
 14351 AGCCATCTCG GTGGACTGTC AATGAATTGA TCTCTAGTTT TGTGGTTCTC
 14401 GGTGTTCTCG GTGATGATGA GATTGTGGAG ATTGGCTGGG CTTTTATAGG
 14451 GACGAGGTGA AGATTCCGGA CCATGGCTAT GTGCACGGCT GTGTTAGTTA
 14501 GCCTAAGAAG AAACACGGGA AGAACAAAAT CGGTTGGACA AGTGCAGTTT
 14551 GCCAACACAA AAGAAATTGG ATAAGCAAGG AGGAATTGGA GCTTTGCAAA
 14601 ACAGTTTTTT TGGACGGTCT GCTAAAGCCG CGTAATCGGC TTAATCCTAG
 14651 TTCTGGGGTA CTGTTTGCTG AAGCGTGGAC GTTGTATCT TGGTCTGTTT
 14701 TCTTCATCTA CGAGAAGTGA TTATTGTTCT GGGGTTTTGG CAGAAATATG
 14751 GTCTGTTAGC CATTGCTGGC AAATCGGCGG GCACTCGAAG CTTGCTCATC
 14801 GGCGGGGGTC ATAACGTGAC TCCTTAATTC TCCGCTCATG ATCAGATTGT

14851 CGTTTCCCGC CTCAGTTTA AACTATCAGT GTTTGACAGG ATATATTGGC
14901 GGGTAAACCT AAGAGAAAAG AGCGTTTATT AGAATAATCG GATATTTAAA
14951 AGGGCGTGAA AAGGTTTATC CGTTCGTCCA TTTGTATGTG CATGCCAACC
15001 ACAGGGTTCC CCAGATCTGG CGCCGGCCAG CGAGACGAGC AAGATTGGCC
15051 GCCGCCCGAA ACGATCCGAC AGCGGGGTAC CGAGCTCGAA TTAATTCGAG
15101 CTCGGTACCC

Abbildung 5: Sequenz des "Broad host range" Plasmids pBIN 19 (GenBank Accession U09365)

Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., and Hall, T.C. (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Molecular Biology* 27: 405-409

1 - 618	oriV	GenBank Accession Number M20134
693 - 964	kilA	GenBank Accession Number M62846
965 - 1315	NPTIII gene	GenBank Accession Number V01547
1316 - 2085	transposable element IS1	GenBank Accession Number X58999
2086 - 3078	NPTIII gene	GenBank Accession Number V01547
3079 - 4560	trfA	GenBank Accession Number X00713
4561 - 5603	tetA	GenBank Accession Number L13842
6043 - 6190	T-DNA left border	GenBank Accession Number J01825
6191 - 6321	lacI	GenBank Accession Number J01636
6322..6622	M13 ori	GenBank Accession Number X02513
6623 - 6917	lacZ	GenBank Accession Number X02513
6918 - 7058	lacI	GenBank Accession Number J01636
7059 - 7500	genelll	GenBank Accession Number V00604
7501 - 7756	Nos terminator	GenBank Accession Number V00087
7757 - 7968	ocd	GenBank Accession Number X07435
7969 - 8952	NPTII gene	GenBank Accession Number V00618
8953 - 9259	Nos promoter	GenBank Accession Number X01077
9260 - 9421	T-DNA right border	GenBank Accession Number J01826
9434 - 10617	tetA	GenBank Accession Number X75761
10610 - 10988	ColE1 ori	GenBank Accession Number V00268
10982 - 11765	traF	GenBank Accession Number X54459

```

1  CCGGGCTGGT TGCCCTCGCC GCTGGGCTGG CGGCCGTCTA TGGCCCTGCA
51 AACGCGCCAG AAACGCCGTC GAAGCCGTGT GCGAGACACC GCGGCCGCCG
101 GCGTTGTGGA TACCTCGCGG AAAACTTGGC CCTCACTGAC AGATGAGGGG
151 CGGACGTTGA CACTTGAGGG GCCGACTCAC CCGGCGCGGC GTTGACAGAT
201 GAGGGGCAGG CTCGATTTCG GCCGGCGACG TGGAGCTGGC CAGCCTCGCA
251 AATCGGCGAA AACGCCTGAT TTTACGCGAG TTTCCACAG ATGATGTGGA
301 CAAGCCTGGG GATAAGTGCC CTGCGGTATT GACACTTGAG GGGCGCGACT
351 ACTGACAGAT GAGGGGCGCG ATCCTTGACA CTTGAGGGGC AGAGTGCTGA
401 CAGATGAGGG GCGCACCTAT TGACATTTGA GGGGCTGTCC ACAGGCAGAA
451 AATCCAGCAT TTGCAAGGAT TTCCGCCCGT TTTTCGGCCA CCGCTAACCT
501 GTCTTTTAAAC CTGCTTTTAA ACCAATATTT ATAAACCTTG TTTTAAACCA
551 GGGCTGCGCC CTGTGCGCGT GACC GCGCAC GCCGAAGGGG GGTGCCCCCC
601 CTTCTCGAAC CCTCCCGGCC CGCTAACGCG GGCTCCCAT CCCCCAGGG
651 GCTGCGCCCC TCGGCCGCGA ACGGCCTCAC CCCAAAATG GCAGCGCTGG
701 CAGTCCTTGC CATTGCCGGG ATCGGGGAG TAACGGGATG GGCGATCAGC
751 CCGAGCGCGA CGCCCGGAAG CATTGACGTG CCGCAGGTGC TGGCATCGAC
801 ATTCAGCGAC CAGGTGCCGG GCAGTGAGGG CGGCGGCCTG GGTGGCGGCC
851 TGCCCTTCAC TTCGGCCGTC GGGGCATTCA CGGACTTCAT GGCGGGGCCG
901 GCAATTTTTTA CCTTGGGCAT TCTTGGCATA GTGGTCGCGG GTGCCGTGCT
951 CGTGTTTCGGG GGTGCGATAA ACCCAGCGAA CCATTTGAGG TGATAGGTAA
1001 GATTATACCG AGGTATGAAA ACGAGAATTG GACCTTTACA GAATTACTCT
1051 ATGAAGCGCC ATATTTAAAA AGCTACCAAG ACGAAGAGGA TGAAGAGGAT
1101 GAGGAGGCAG ATTGCCCTGA ATATATTGAC AATACTGATA AGATAATATA
1151 TCTTTTATAT AGAAGATATC GCCGTATGTA AGGATTTGAG GGGGCAAGGC
1201 ATAGGCAGCG CGCTTATCAA TATATCTATA GAATGGGCAA AGCATAAAAA
1251 CTTGCATGGA CTAATGCTTG AAACCCAGGA CAATAACCTT ATAGCTTGTA
1301 AATTCTATCA TAATTGGGTA ATGACTCCAA CTTATTGATA GTGTTTTATG
1351 TTCAGATAAT GCCCGATGAC TTTGTGATGC AGCTCCACCG ATTTTGAGAA
1401 CGACAGCGAC TTCCGTCCCA GCCGTGCCAG GTGCTGCCTC AGATTCAGGT

```

1451 TATGCCGCTC AATTCGCTGC GTATATCGCT TGCTGATTAC GTGCAGCTTT
1501 CCCTTCAGGC GGGATTCATA CAGCGGCCAG CCATCCGTCA TCCATATCAC
1551 CACGTCAAAG GGTGACAGCA GGCTCATAAG ACGCCCCAGC GTCGCCATAG
1601 TCGGTTCCACC GAATACGTGC GCAACAACCG TCTTCCGGAG ACTGTCATAC
1651 GCGTAAAACA GCCAGCGCTG GCGCGATTTA GCCCCGACAT AGCCCCACTG
1701 TTCGTCCATT TCCGCGCAGA CGATGACGTC ACTGCCCGGC TGTATGCGCG
1751 AGGTTACCGA CTGCGGCCTG AGTTTTTTTAA GTGACGTAAA ATCGTGTGTA
1801 GGCCAACGCC CATAATGCGG GCTGTTGCCG GGCATCCAAC GCCATTCTATG
1851 GCCATATCAA TGATTTTCTG GTGCGTACCG GGTTGAGAAG CGGTGTAAGT
1901 GAACTGCAGT TGCCATGTTT TACGGCAGTG AGAGCAGAGA TAGCGCTGAT
1951 GTCCGGCGGT GCTTTTGCCG TTACGCACCA CCCCCTCAGT AGCTGAACAG
2001 GAGGGACAGC TGATAGACAC AGAAGCCACT GGAGCACCTC AAAAAACCCA
2051 TCATACACTA AATCAGTAAG TTGGCAGCAT CACCCATAAT TGTGGTTTCA
2101 AAATCGGCTC CGTCGATACT ATGTTATACG CCAACTTTGA AAACAACTTT
2151 GAAAAAGCTG TTTTCTGGTA TTTAAGGTTT TAGAATGCAA GGAACAGTGA
2201 ATTGGAGTTC GTCTTGTTAT AATTAGCTTC TTGGGGTATC TTTAAATACT
2251 GTAGAAAAGA GGAAGGAAAT AATAAATGGC TAAAATGAGA ATATCACCGG
2301 AATTGAAAAA ACTGATCGAA AAATACCGCT GCGTAAAAGA TACGGAAGGA
2351 ATGTCTCCTG CTAAGGTATA TAAGCTGGTG GGAGAAAATG AAAACCTATA
2401 TTTAAAAATG ACGGACAGCC GGTATAAAGG GACCACCTAT GATGTGGAAC
2451 GGGAAAAGGA CATGATGCTA TGGCTGGAAG GAAAGCTGCC TGTTCCAAAG
2501 GTCCTGCACT TTGAACGGCA TGATGGCTGG AGCAATCTGC TCATGAGTGA
2551 GGCCGATGGC GTCCTTTGCT CGGAAGAGTA TGAAGATGAA CAAAGCCCTG
2601 AAAAGATTAT CGAGCTGTAT GCGGAGTGCA TCAGGCTCTT TCACTCCATC
2651 GACATATCGG ATTGTCCCTA TACGAATAGC TTAGACAGCC GCTTAGCCGA
2701 ATTGGATTAC TTAAGTAATA ACGATCTGGC CGATGTGGAT TGCGAAAAC
2751 GGGAAGAAGA CACTCCATTT AAAGATCCGC GCGAGCTGTA TGATTTTTTTA
2801 AAGACGGAAA AGCCCGAAGA GGAACCTGTC TTTTCCCACG GCGACCTGGG
2851 AGACAGCAAC ATCTTTGTGA AAGATGGCAA AGTAAGTGGC TTTATTGATC
2901 TTGGGAGAAG CGGCAGGGCG GACAAGTGGT ATGACATTGC CTTCTGCGTC
2951 CGGTGCATCA GGGAGGATAT CGGGGAAGAA CAGTATGTCG AGCTATTTTT
3001 TGACTTACTG GGGATCAAGC CTGATTGGGA GAAAATAAAA TATTATATTT
3051 TACTGGATGA ATTGTTTTAG TACCTAGATG TGGCGCAACG ATGCCGGCGA
3101 CAAGCAGGAG CGCACCAGCT TCTTCCGCAT CAAGTGTTTT GGCTCTCAGG
3151 CCGAGGCCCA CGGCAAGTAT TTGGGCAAGG GGTGCTGGT ATTCTGTCAG
3201 GGCAAGATTC GGAATACCAA GTACGAGAAG GACGGCCAGA CGGTCTACGG
3251 GACCGACTTC ATTGCCGATA AGGTGGATTA TCTGGACACC AAGGCACCAG
3301 GCGGGTCAA TCAGGAATAA GGGCACATTG CCCCGGCGTG AGTCGGGGCA
3351 ATCCCAGCAAG GAGGGTGAAT GAATCGGACG TTTGACCGGA AGGCATACAG
3401 GCAAGAAGT ATCGACGCGG GGTTTTCCGC CGAGGATGCC GAAACCATCG
3451 CAAGCCGCAC CGTCATCGGT GCGCCCCGCG AAACCTTCCA GTCCGTCCGC
3501 TCGATGGTCC AGCAAGCTAC GGCCAAGATC GAGCGCGACA GCGTGCAACT
3551 GGCTCCCCCT GCCCTGCCCG CGCCATCGGC CGCCGTGGAG CGTTCGCGTC
3601 GTCTCGAACA GGAGGCGGCA GGTTTGGCGA AGTCGATGAC CATCGACAGC
3651 CGAGGAACTA TGACGACCAA GAAGCGAAAA ACCGCCGGCG AGGACCTGGC
3701 AAAACAGGTC AGCGAGGCCA AGCAGGCCGC GTTGCTGAAA CACACGAAGC
3751 AGCAGATCAA GGAAATGCAG CTTTCCTTGT TCGATATTGC GCCGTGGCCG
3801 GACACGATGC GAGCGATGCC AAACGACACG GCCCGCTCTG CCCTGTTTAC
3851 CACGCGCAAC AAGAAAATCC CGCGCGAGGC GCTGCAAAAC AAGGTCATTT
3901 TCCACGTCAA CAAGGACGTG AAGATCACCT ACACCGGCGT CGAGCTGCGG
3951 GCCGACGATG ACGAACTGGT GTGGCAGCAG GTGTTGGAGT ACGCGAAGCG
4001 CACCCCTATC GGCGAGCCGA TCACCTTACG GTTCTACGAG CTTTGCCAGG
4051 ACCTGGGCTG GTCGATCAAT GGCCGGTATT ACACGAAGGC CGAGGAATGC
4101 CTGTCGCGCC TACAGGCGAC GGCGATGGGC TTCACGTCCG ACCGCGTTGG
4151 GCACCTGGAA TCGGTGTGCG TGCTGCACCG CTTCCGCGTC CTGGACCGTG
4201 GCAAGAAAAC GTCCCGTTGC CAGGTCTTGA TCGACGAGGA AATCGTCTGT
4251 CTGTTTGCTG GCGACCACTA CACGAAATTC ATATGGGAGA AGTACCGCAA
4301 GCTGTCGCGC ACGGCCCGAC GGATGTTTGA CTATTTTACG TCGCACCGGG
4351 AGCCGTACCC GCTCAAGCTG GAAACCTTCC GCCTCATGTG CGGATCGGAT
4401 TCCACCCGCG TGAAGAAGTG GCGCGAGCAG GTCGGCGAAG CCTGCGAAGA

4451 GTTGCAGAGC AGCGGCCTGG TGGAACACGC CTGGGTCAAT GATGACCTGG
 4501 TGCATTGCAA ACCTAGGGC CTTGTGGGGT CAGTTCGGC TGGGGGTTCA
 4551 GCAGCCAGCG CTTTACTGGC ATTTAGGAA CAAGCGGGCA CTGCTCGACG
 4601 CACTTGCTTC GCTCAGTATC GCTCGGGACG CACGGCGCGC TCTACGAACT
 4651 GCCGATAAAC AGAGGATTAA AATTGACAAT TGTGATTAAG GCTCAGATTC
 4701 GACGGCTTGG AGCGGCCGAC GTGCAGGATT TCCGCGAGAT CCGATTGTCTG
 4751 GCCCTGAAGA AAGCTCCAGA GATGTTCCGG TCCGTTTACG AGCACGAGGA
 4801 GAAAAAGCCC ATGGAGGCGT TCGCTGAACG GTTGCAGAGAT GCCGTGGCAT
 4851 TCGGCGCCTA CATCGACGGC GAGATCATTG GGCTGTCTGGT CTTCAAACAG
 4901 GAGGACGGCC CCAAGGACGC TCACAAGGCG CATCTGTCCG GCGTTTTCTGT
 4951 GGAGCCCGAA CAGCGAGGCC GAGGGGTCTG CCGTATGCTG CTGCGGGCGT
 5001 TGCCGGCGGG TTTATTGCTC GTGATGATCG TCCGACAGAT TCCAACGGGA
 5051 ATCTGGTGGG TGCGCATCTT CATCCTCGGC GCACTTAATA TTTCTGCTATT
 5101 CTGGAGCTTG TTGTTTATTT CGGTCTACCG CCTGCCGGGC GGGGTCTCGG
 5151 CGACGGTAGG CGCTGTGCAG CCGCTGATGG TCGTGTTCAT CTCTGCCGCT
 5201 CTGCTAGGTA GCCCGATACG ATTGATGGCG GTCCTGGGGG CTATTTGCGG
 5251 AACTGCGGGC GTGGCGCTGT TGGTGTGAC ACCAAACGCA GCGCTAGATC
 5301 CTGTCCGGCT CGCAGCGGGC CTGGCGGGGG CCGTTTCCAT GCGTTCGGA
 5351 ACCGTGCTGA CCCGCAAGTG GCAACCTCCC GTGCCTCTGC TCACCTTTAC
 5401 CGCCTGGCAA CTGGCGGCCG GAGGACTTCT GCTCGTTCCA GTAGCTTTAG
 5451 TGTTTGATCC GCCAATCCCG ATGCCTACAG GAACCAATGT TCTCGGCCCTG
 5501 GCGTGGCTCG GCCTGATCGG AGCGGGTTTA ACCTACTTCC TTTGGTTCCG
 5551 GGGGATCTCG CCACTCGAAC CTACAGTTGT TTCCTTACTG GGCTTTCTCA
 5601 GCCCCAGATC TGGGGTCTGAT CAGCCGGGGA TGCATCAGGC CGACAGTCGG
 5651 AACTTCGGGT CCCCACCTG TACCATTCCG TGAGCAATGG ATAGGGGAGT
 5701 TGATATCGTC AACGTTCACT TCTAAAGAAA TAGCGCCACT CAGCTTCCCTC
 5751 AGCGGCTTTA TCCAGCGATT TCCTATTATG TCGGCATAGT TCTCAAGATC
 5801 GACAGCCTGT CACGGTTAAG CGAGAAATGA ATAAGAAGGC TGATAATTCTG
 5851 GATCTCTGCG AGGGAGATGA TATTTGATCA CAGGCAGCAA CGCTCTGTCA
 5901 TCGTTACAAT CAACATGCTA CCCTCCGCGA GATCATCCGT GTTTCAAACC
 5951 CGGCAGCTTA GTTGCCGTTT TTCCGAATAG CATCGGTAAC ATGAGCAAAG
 6001 TCTGCCGCTT TACAACGGCT CTCCCGCTGA CGCCGTCCCG GACTGATGGG
 6051 CTGCCTGTAT CGAGTGGTGA TTTTGTGCCG AGCTGCCGGT CGGGGAGCTG
 6101 TTGGCTGGCT GGTGGCAGGA TATATTGTGG TGTAACAAA TTGACGCTTA
 6151 GACAACCTAA TAACACATTG CGGACGTTTT TAATGTACTG GGGTGGTTTT
 6201 TCTTTTACC AGTGAGACGG GCAACAGCTG ATTGCCCTTC ACCGCCTGGC
 6251 CCTGAGAGAG TTGCAGCAAG CGGTCCACGC TGGTTTGCCC CAGCAGGCGA
 6301 AAATCCTGTT TGATGGTGGT TCCGAAATCG GCAAATCCC TTATAAATCA
 6351 AAAGAATAGC CCGAGATAGG GTTGAGTGTG GTTCCAGTTT GGAACAAGAG
 6401 TCCACTATTA AAGAACGTGG ACTCCAACGT CAAAGGGCGA AAAACCGTCT
 6451 ATCAGGGCGA TGGCCCACTA CGTGAACCAT CACCCAAATC AAGTTTTTTG
 6501 GGGTCTGAGG GCCGTAAAGC ACTAAATCGG AACCTAAAG GGAGCCCCCG
 6551 ATTTAGAGCT TGACGGGGAA AGCCGGCGAA CGTGGCGAGA AAGGAAGGGA
 6601 AGAAAGCGAA AGGAGCGGGC GCCATTCAGG CTGCGCAACT GTTGGGAAGG
 6651 GCGATCGGTG CGGGCCTCTT CGTATTACG CCAGCTGGCG AAAGGGGGAT
 6701 GTGCTGCAAG GCGATTAAGT TGGGTAACGC CAGGGTTTTT CCAGTCACGA
 6751 CGTTGTAATA CGACGGCCAG TGAATTCGAG CTCGGTACCC GGGGATCCTC
 6801 TAGAGTCGAC CTGCAGGCAT GCAAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG
 6851 TTTCTGTGTG GAAATTGTTA TCCGCTCACA ATTCCACACA ACATACGAGC
 6901 CGGAAGCATA AAGTGTAAAG CCTGGGGTGC CTAATGAGTG AGCTAATCTA
 6951 CATTAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCGCTT TCCAGTCGGG AAACCTGTCTG
 7001 TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC GCGGGGAGAG GCGGTTTGGC
 7051 TATTGGGCCA AAGACAAAAG GCGGACATTC AACCGATTGA GGGAGGGAAG
 7101 GTAAATATTG ACGGAAATTA TTCATTAAAG GTGAATTATC ACCGTCACCG
 7151 ACTTGAGCCA TTTGGGAATT AGAGCCAGCA AAATCACCAG TAGCACCATT
 7201 ACCATTAGCA AGGCCGGAAA CGTCACCAAT GAAACCATCG ATAGCAGCAC
 7251 CGTAATCAGT AGCGACAGAA TCAAGTTTGC CTTTAGCGTC AGACTGTAGC
 7301 GCGTTTTCTA CCGCATTFTT GGTTCATAGC CCTTATTAG CGTGTGCCAT
 7351 CTTTTCATAA TCAAATCAC CGGAACCAGA GCCACCACCG GAACCGCCTC
 7401 CCTCAGAGCC GCCACCCTCA GAACCGCCAC CCTCAGAGCC ACCACCCTCA

7451 GAGCCGCCAC CAGAACCACC ACCAGAGCCG CCGCCAGCAT TGACAGGAGG
7501 CCCGATCTAG TAACATAGAT GACACCGCGC GCGATAATTT ATCCTAGTTT
7551 GCGCGCTATA TTTTGTTHTC TATCGCGTAT TAAATGTATA ATTGCGGGAC
7601 TCTAATCATA AAAACCCATC TCATAAATAA CGTCATGCAT TACATGTTAA
7651 TTATTACATG CTTAACGTAA TTCAACAGAA ATTATATGAT AATCATCGCA
7701 AGACCGGCAA CAGGATTCAA TCTTAAGAAA CTTTATTGCC AAATGTTTGA
7751 ACGATCGGGG ATCATCCGGG TCTGTGGCGG GAACTCCACG AAAATATCCG
7801 AACGCAGCAA GATATCGCGG TGCATCTCGG TCTTGCCTGG GCAGTCGCCG
7851 CCGACGCCGT TGATGTGGAC GCCGGGCCCG ATCATATTGT CGCTCAGGAT
7901 CGTGGCGTTG TGCTTGTCGG CCGTTGCTGT CGTAATGATA TCGGCACCTT
7951 CGACCGCCTG TTCCGCAGAG ATCCCGTGGG CGAAGAACTC CAGCATGAGA
8001 TCCCCGCGCT GGAGGATCAT CCAGCCGGCG TCCCCGAAAA CGATTCCGAA
8051 GCCCAACCTT TCATAGAAGG CGGCGGTGGA ATCGAAATCT CGTGATGGCA
8101 GGTTGGGCGT CGCTTGGTCTG GTCATTTCTGA ACCCCAGAGT CCCGCTCAGA
8151 AGAACTCGTC AAGAAGGCGA TAGAAGGCGA TGCGCTGCGA ATCGGGAGCG
8201 GCGATACCGT AAAGCACGAG GAAGCGGTCA GCCCATTTCG CGCCAAGCTC
8251 TTCAGCAATA TCACGGGTAG CCAACGCTAT GTCCTGATAG CGGTCCGCCA
8301 CACCCAGCCG GCCACAGTCG ATGAATCCAG AAAAGCGGCC ATTTTCCACC
8351 ATGATATTCTG GCAAGCAGGC ATCGCCATGG GTCACGACGA GATCATCGCC
8401 GTCGGGCATG CGCGCCTTGA GCCTGGCGAA CAGTTCGGCT GCGCGAGCC
8451 CCTGATGCTC TTCGTCCAGA TCATCCTGAT CGACAAGACC GGCTTCCATC
8501 CGAGTACGTG CTCGCTCGAT GCGATGTTTC GCTTGGTGGT CGAATGGGCA
8551 GGTAGCCGGA TCAAGCSTAT GCAGCCGCCG CATTGCATCA GCCATGATGG
8601 ATACTTTCTC GGCAGGAGCA AGGTGAGATG ACAGGAGATC CTGCCCGGC
8651 ACTTCGCCCA ATAGCAGCCA GTCCTTCCC GCTTCAGTGA CAACGTCGAG
8701 CACAGCTGCG CAAGGAACGC CCGTCGTGGC CAGCCACGAT AGCCGCGCTG
8751 CCTCGTCCTG CAGTTCATTC AGGGCACCGG ACAGGTCGGT CTTGACAAAA
8801 AGAACCAGGC GCCCCTGCGC TGACAGCCGG AACACGGCGG CATCAGAGCA
8851 GCCGATTGTC TGTTGTGCCC AGTCATAGCC GAATAGCCTC TCCACCCAAG
8901 CGGCCGGAGA ACCTGCGTGC AATCCATCTT GTTCAATCAT GCGAAACGAT
8951 CCAGATCCGG TGCAGATTAT TTGGATTGAG AGTGAATATG AGACTCTAAT
9001 TGGATACCGA GGGGAATTTA TGGAACGTCA GTGGAGCATT TTTGACAAGA
9051 AATATTTGCT AGCTGATAGT GACCTTAGGC GACTTTTGAA CGCGCAATAA
9101 TGGTTTCTGA CGTATGTGCT TAGCTCATT AACTCCAGAA ACCCGCGGCT
9151 GAGTGGCTCC TTCAACGTTG CCGTTCTGTC AGTTCCAAAC GTAAAACGGC
9201 TTGTCCCAGG TCATCGGCGG GGGTCATAAC GTGACTCCCT TAATTCTCCG
9251 CTCATGATCA GATTGTCGTT TCCCGCCTTC AGTTTAAACT ATCAGTGTTT
9301 GACAGGATAT ATTGGCGGGT AAACCTAAGA GAAAAGAGCG TTTATTAGAA
9351 TAATCGGATA TTTAAAAGGG CGTGAAAAGG TTTATCCGTT CGTCCATTTG
9401 TATGTGCATG CCAACCACAG GGTTCCCCAG ATCTGGCGCC GGCCAGCGAG
9451 ACGAGCAAGA TTGGCCGCCG CCCGAAACGA TCCGACAGCG CGCCAGCAC
9501 AGGTGCGCAG GCAAATTGCA CCAACGCATA CAGCGCCAGC AGAATGCCAT
9551 AGTGGGCGGT GACGTCGTT GAGTGAACCA GATCGCGCAG GAGGCCCGGC
9601 AGCACCAGCA TAATCAGGCC GATGCCGACA GCGTCGAGCG CGACAGTGCT
9651 CAGAATTACG ATCAGGGGTA TGTTGGGTTT CACGTCTGGC CTCCGGACCA
9701 GCCTCCGCTG GTCCGATTGA ACGCGCGGAT TCTTTATCAC TGATAAGTTG
9751 GTGGACATAT TATGTTTATC AGTGATAAAG TGTCAGCAT GACAAAGTTG
9801 CAGCCGAATA CAGTGATCCG TGCCGCCCTG GACCTGTTGA ACGAGTCCG
9851 CGTAGACGGT CTGACGACAC GCAAACCTGGC GGAACGGTTG GGGTTTCAGC
9901 AGCCGGCGCT TTAATGGCAC TTCAGGAACA AGCGGGCGCT GCTCGACGCA
9951 CTGGCCGAAG CCATGCTGGC GGAGAATCAT ACGCATTCCG TGCCGAGAGC
10001 CGACGACGAC TGGCGCTCAT TTCTGATCGG GAATGCCCGC AGCTTCAGGC
10051 AGGCGCTGCT CGCCTACCGC GATGGCGCGC GCATCCATGC CGGCACGCGA
10101 CCGGGCGCAC CGCAGATGGA AACGGCCGAC GCGCAGCTTC GCTTCTCTG
10151 CGAGGCGGGT TTTTCGGCCG GGGACGCCGT CAATGCGCTG ATGACAATCA
10201 GCTACTTCAC TGTTGGGGCC GTGCTTGAGG AGCAGGCCGG CGACAGCGAT
10251 GCCGGCGAGC GCGGCGGCAC CGTTGAACAG GCTCCGCTCT CGCCGCTGTT
10301 GCGGGCCGCG ATAGACCCCT TCGACGAAGC CGGTCCGGAC GCAGCTTCG
10351 AGCAGGGACT CGCGGTGATT GTCGATGGAT TGGCGAAAAG GAGGCTCGTT
10401 GTCAGGAACG TTGAAGGACC GAGAAAGGGT GACGATTGAT CAGGACCGCT

10451 GCCGGAGCGC AACCCACTCA CTACAGCAGA GCCATGTAGA CAACATCCCC
10501 TCCCCCTTTC CACCGCGTCA GACGCCCGTA GCAGCCCGCT ACGGGCTTTT
10551 TCATGCCCTG CCCTAGCGTC CAAGCCTCAC GGCCGCGCTC GGCTCTCTG
10601 GCGGCCTTCT GCGGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC
10651 GGTTCGTTCCG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC
10701 GGTTATCCAC AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA
10751 GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT
10801 CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC
10851 AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC GTTCCCCCT
10901 GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA
10951 CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GCGGCTTTTC CGCTGCATAA
11001 CCCTGCTTCG GGGTCATTAT AGCGATTTTT TCGGTATATC CATCCTTTTT
11051 CGCACGATAT ACAGGATTTT GCCAAAGGGT TCGTGTAGAC TTTCTTGGT
11101 GTATCCAACG GCGTCAGCCG GGCAGGATAG GTGAAGTAGG CCCACCCGCG
11151 AGCGGGTGTT CCTTCTTCAC TGTCCCTTAT TCGCACCTGG CGGTGCTCAA
11201 CGGGAATCCT GCTCTGCGAG GCTGGCCGGC TACCGCCGGC GTAACAGATG
11251 AGGGCAAGCG GATGGCTGAT GAAACCAAGC CAACCAGGAA GGGCAGCCCA
11301 CCTATCAAGG TGTACTGCCT TCCAGACGAA CGAAGAGCGA TTGAGGAAAA
11351 GGCGGCGGCG GCCGGCATGA GCCTGTCGGC CTACCTGCTG GCCGTCGGCC
11401 AGGGCTACAA AATCACGGGC GTCGTGGACT ATGAGCACGT CCGCGAGCTG
11451 GCCCCATCA ATGGCGACCT GGGCCGCTG GCGGCTGC TGAAACTCTG
11501 GCTCACCGAC GACCCGCGCA CGGCGCGGTT CGGTGATGCC ACGATCCTCG
11551 CCCTGCTGGC GAAGATCGAA GAGAAGCAGG ACGAGCTTGG CAAGGTCATG
11601 ATGGGCGTGG TCCGCCCGAG GGCAGAGCCA TGACTTTTTT AGCCGCTAAA
11651 ACGGCCGGGG GGTGCGCGTG ATTGCCAAGC ACGTCCCAT GCGCTCCATC
11701 AAGAAGAGCG ACTTCGCGGA GCTGGTGAAG TACATCACCG ACGAGCAAGG
11751 CAAGACCGAG CGCCTTTGCG ACGCTCA

Anhang II

Kartenmaterial zum Freisetzungsgelände und der Umgebung

Karte 1

„Versuchsfeld – Standort Thulendorf“ und Umgebung, Maßstab

Karte 2

„Versuchsfeld – Standort Thulendorf“ und Umgebung, Maßstab 1:40000

Karte 3 (Detail)

„Versuchsfeld – Standort Thulendorf“ und Umgebung, Maßstab 1:17000

Karte 4 (Flurkarte)

„Versuchsfeld – Standort Thulendorf“ und Umgebung, Maßstab 1:17000

Karte 5 (FHH)

„Versuchsfeld – Standort Thulendorf“ und Umgebung, Maßstab 1:17000

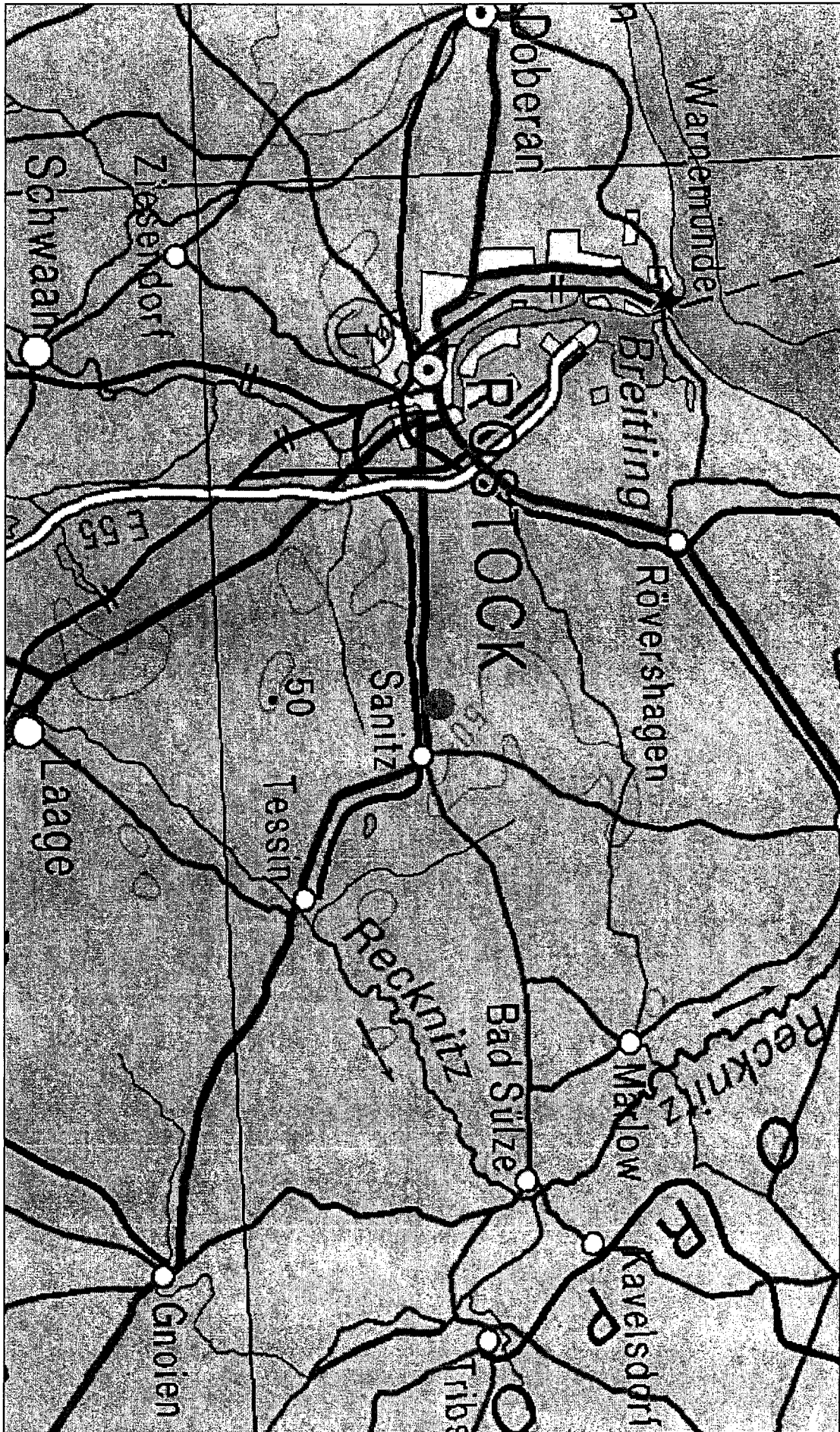
Karte 6

Umgebung des Versuchsfeldes mit Biotop .Maßstab 1:2000

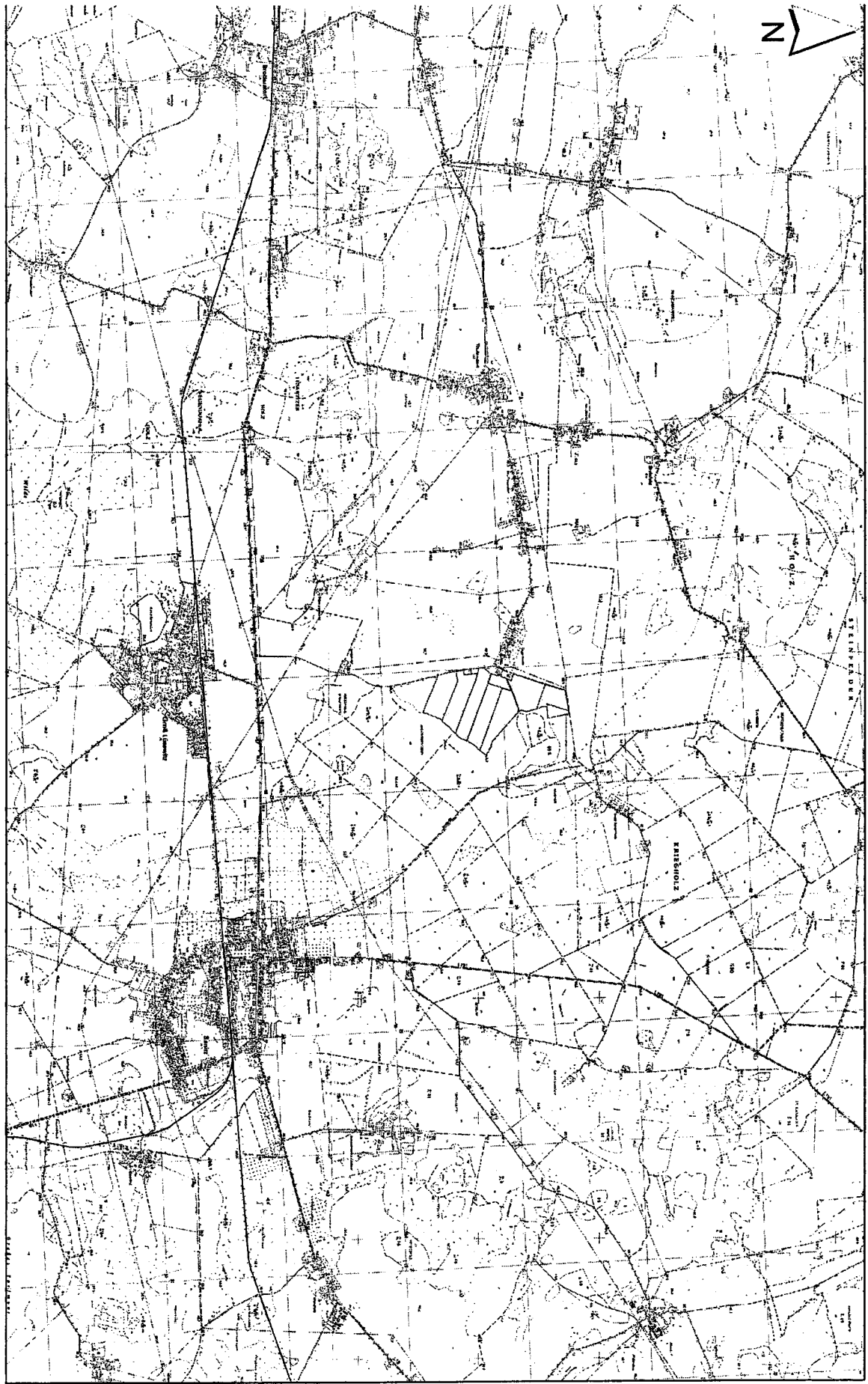
Karte 7

Gesetzlich geschützte Arten an den Standorten Sanitz/Groß Lüsewitz und Thulendorf/Klein Lüsewitz.

Karte 1



Karte 2



Standort Thulendorf

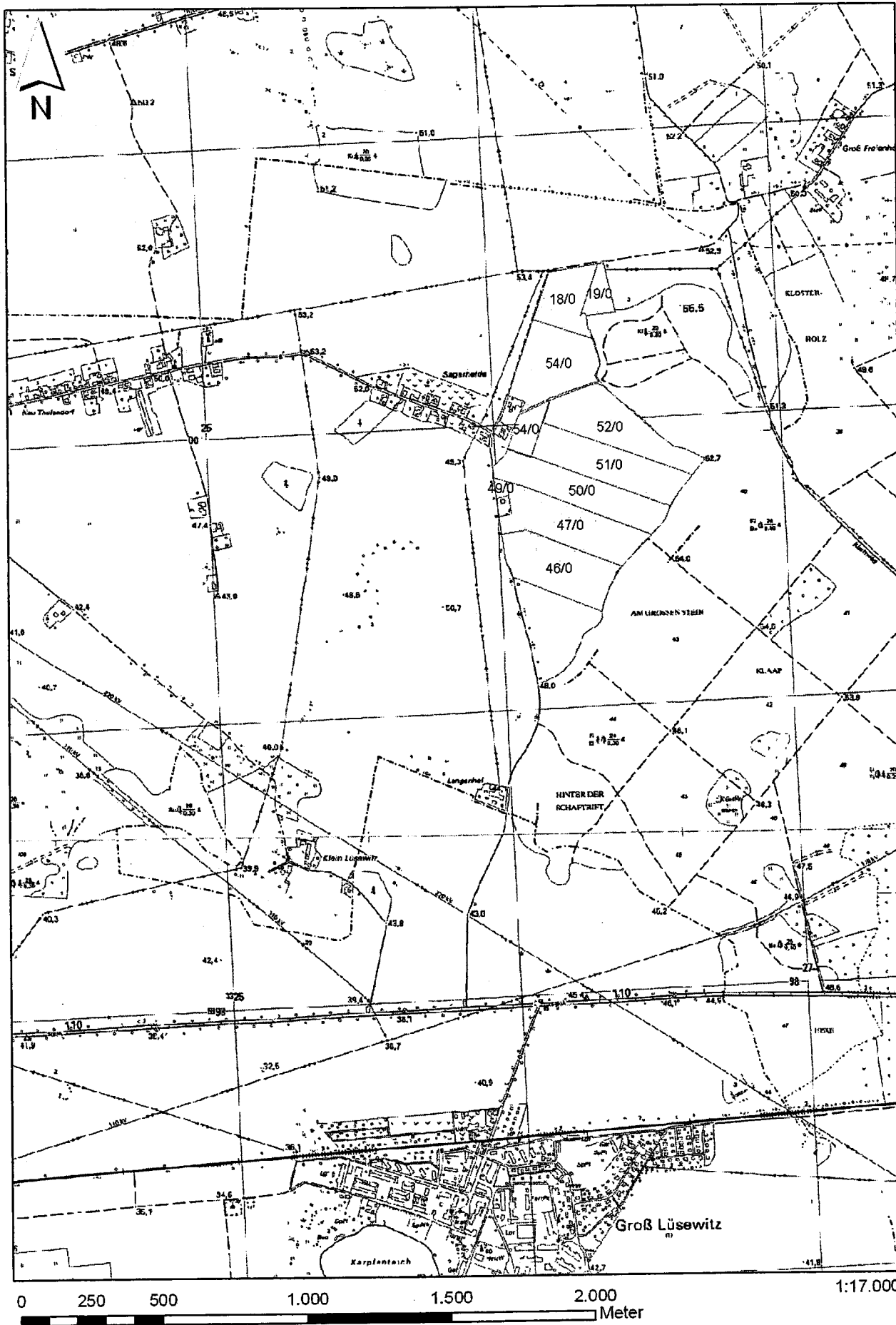
1:40 000

Detail

Karte 3

Standort Thulendorf

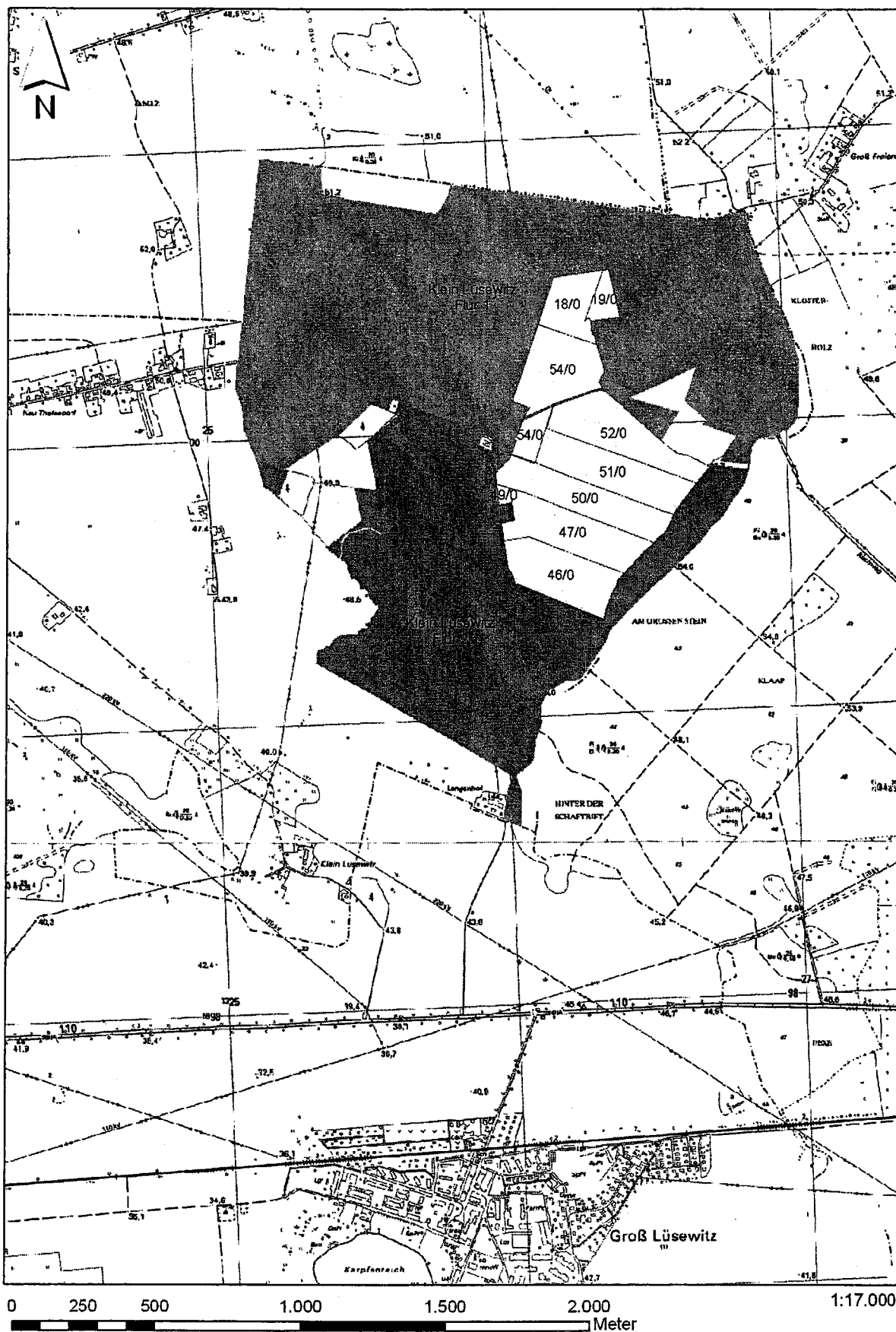
Detail



Karte 4

Standort Thulendorf

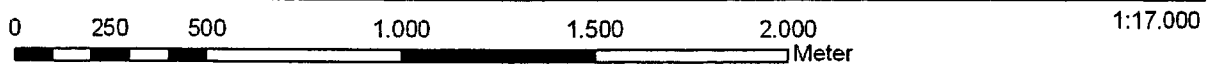
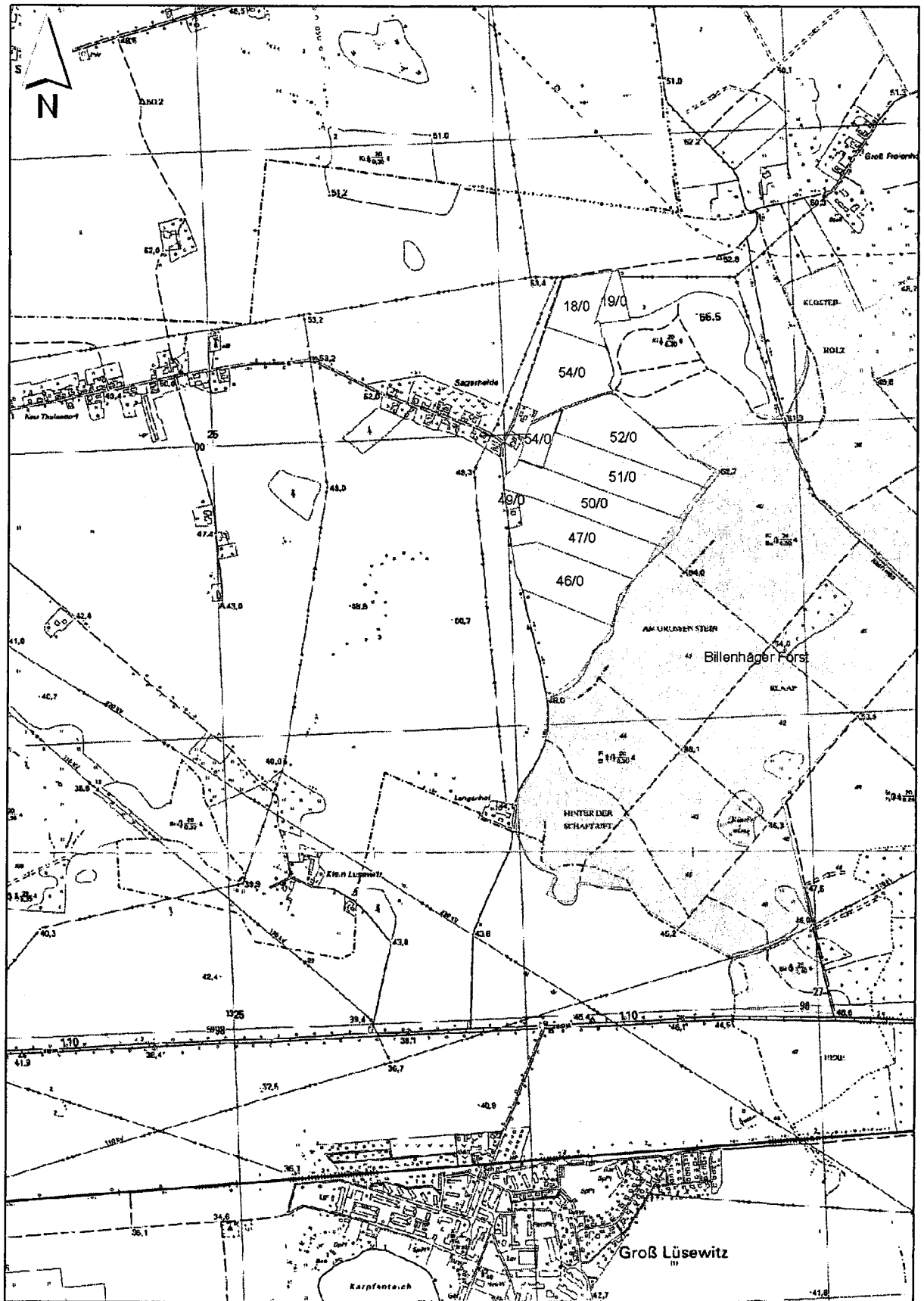
Flurkarte



Karte 5

Standort Thulendorf

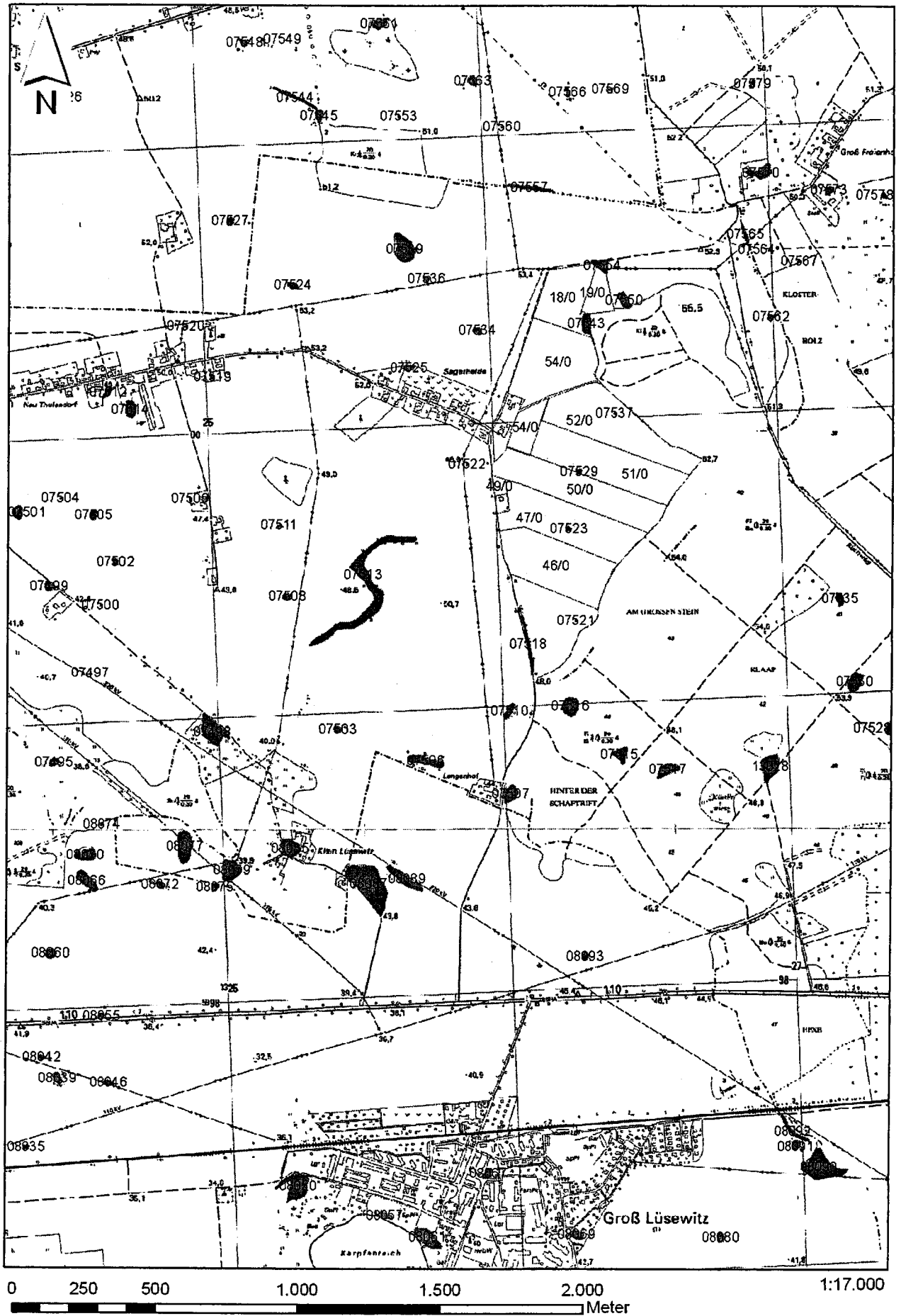
FFH



Karte 6

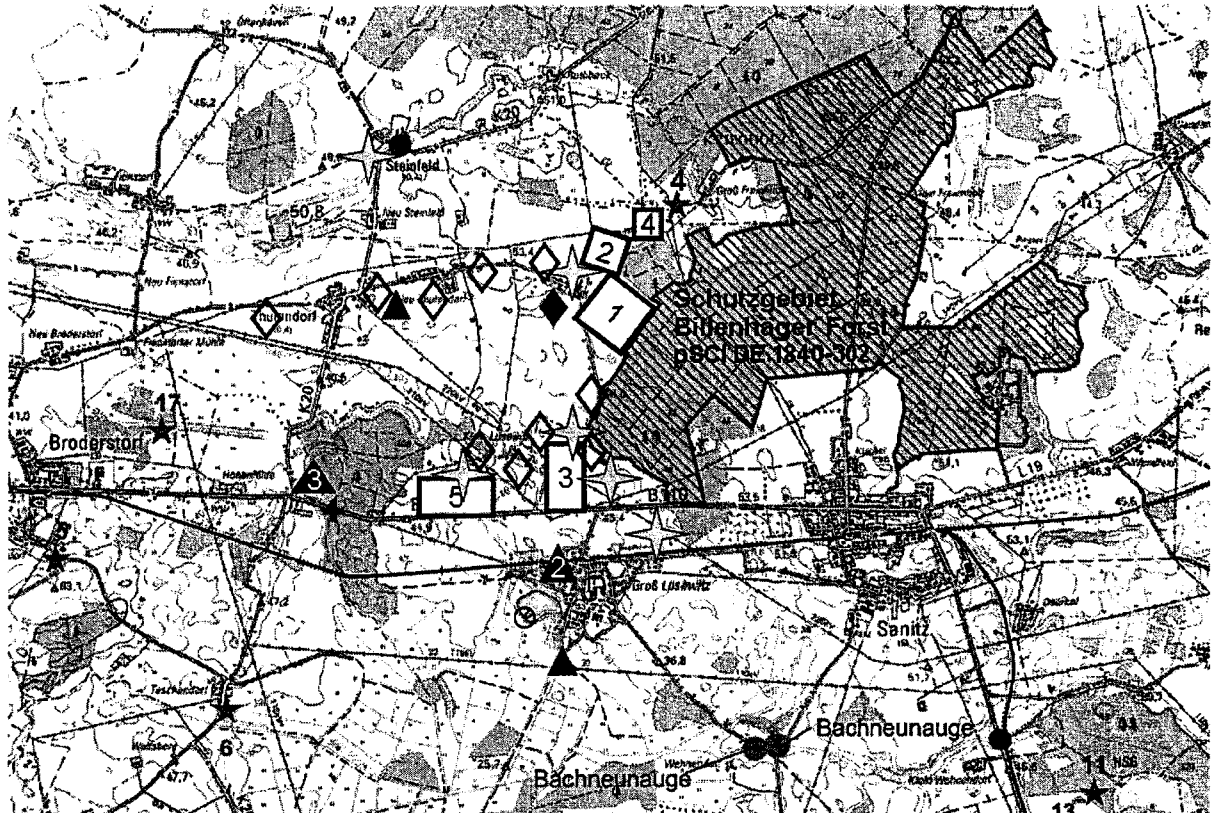
Standort Thulendorf

Biotop



Karte7

Nachweise für Arten nach Anhängen der FFH-RL im Bereich der Vorhabensflächen nach Datenabfrage beim Landesamt für Umwelt, Naturschutz und Geologie, Mecklenburg-Vorpommern. Die ungefähre Lage der Vorhabensflächen ist mit Quadraten markiert. Auch die Lage der Nachweisorte ist nur ungefähr wiedergegeben.



- 3 Lage der bisher genehmigten Vorhabensflächen (Nr. 1 bis 5)
- ★ Pflanzenarten Anhang II und IV FFH-Richtlinie, Nachweis Nr 4: Berg-Wohlerleih, *Arnika montatana*, von 1920 (inzwischen erloschen)
- Fischotter, *Lutra lutra*, Nachweise von 2005 ○ kein Nachweis + Todfund
- ▲ Weißstorch, *Ciconia ciconia*, Nachweise von 2004, ▲ Horstpaar mit 2 ▲ 3 Jungen
- Barchneunauge, *Lampetra planeri*, Nachweise 1996, 1997
- ☆ Rotbauchunke, *Bombina bombina*, Nachweise von 1996, 1997
- ◆ Kammolch, *Triturus cristatus*, Nachweis 1999
- ◇ Wasserfrosch, Grasfrosch, Moorfrosch, Erdkröte, Laubfrosch, Teichmolch, Knoblauchkröte, Wechselkröte Nachweise 1996, 1999

Anhang III

Versuchsplan 2007 (Split-Plot)

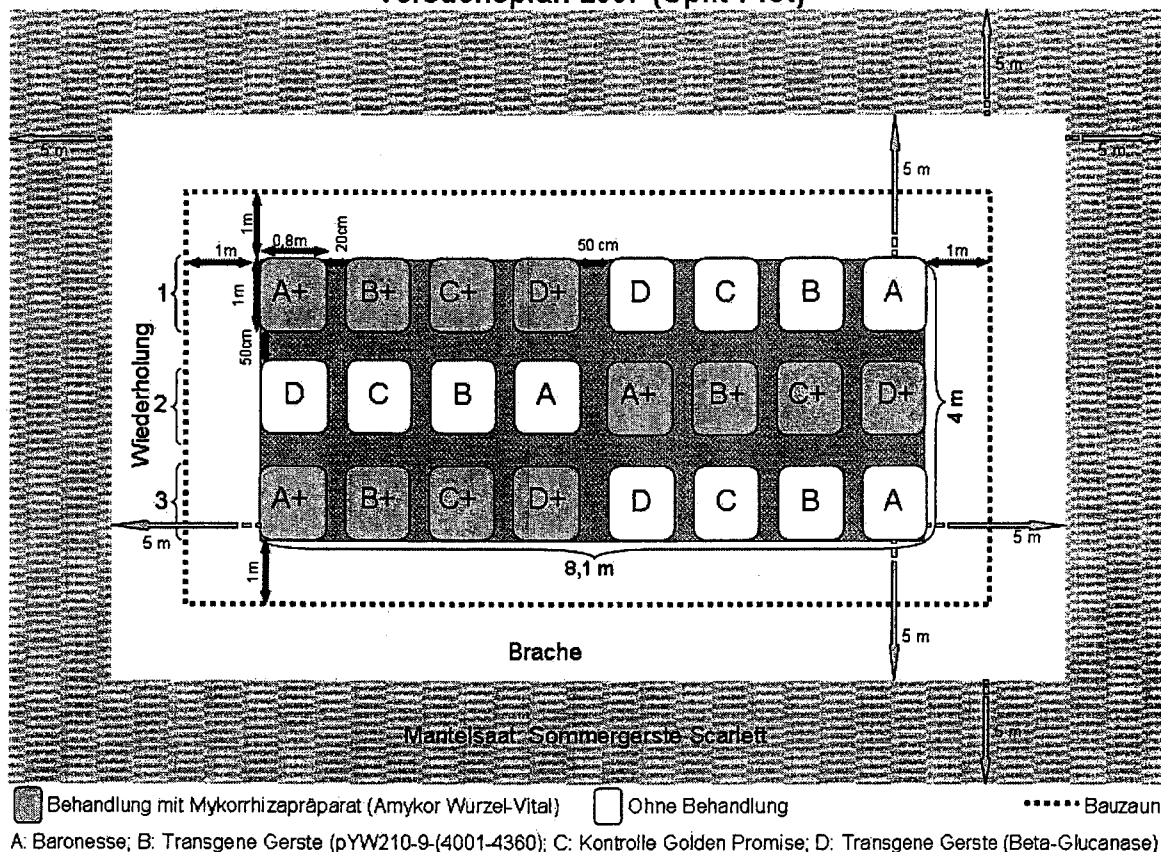


Abbildung 6: Aufbau des Feldversuchs

Der Freisetzungsversuch basiert auf einer randomisierten Spaltanlage mit drei Wiederholungen pro Prüfglied (Baronesse, Golden Promise, pYW210-9-(4001-4360), pJH271-Beta-Glu-307) und Behandlung. Der Boden der Parzellen A1-A4, B1-B4, C1-C4 wird mit dem kommerziellen Mykorrhizapräparat (Amykor® Wurzel-Vital) vor Versuchsbeginn behandelt. Unterschiede in der pflanzlichen Entwicklung, Pathogenese und Epidemiologie werden einerseits zwischen den transgenen Linien und deren Elternpflanzen bzw. zwischen behandelten (A1-A4, B1-B4, C1-C4) und Kontrollparzellen (D1-D4, E1-E4, F1-F4) evaluiert. Die Parzellen besitzen eine Größe von $0,8 \text{ m}^2$ und sind von einem 5 m breiten Randstreifen umgeben, der mit einer Kulturgerstensorte bepflanzt ist. Dieser Randstreifen wird von einem 5 m breiten Streifen Schwarzbrache umgeben. Der Abstand zwischen den Parzellen und zum Randstreifen beträgt $0,5 \text{ m}$. Der Freisetzungsversuch inklusive des Randstreifens mit konventioneller Gerste hat eine Grundfläche von $777,6 \text{ m}^2$ inklusive Mantelsaat m^2 (= Versuchsfläche). Das Versuchsfeld (= Fläche aller Parzellen mit transgener und konventioneller Gerste) hat eine Grundfläche von $4 \text{ m} \times 12,4 \text{ m} = 49,6 \text{ m}^2$, während die Freisetzungsfläche (= mit GVP bestanden Fläche) $9,6 \text{ m}^2$ einnimmt.

Anhang IV

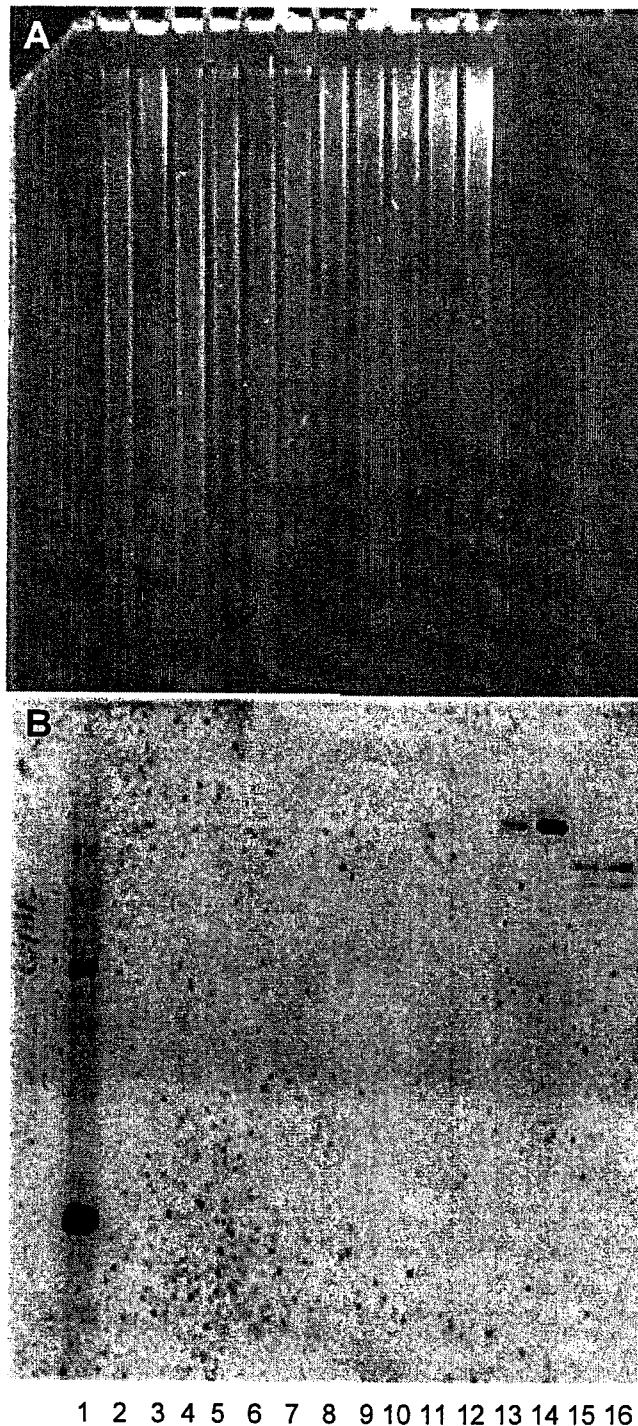
Zusammenfassung der Methode zur Messung der cThEn42(GC)-Aktivität in der Linie pYW210-9-(4001-4360)

T₂ Einzelpflanzen als direkte Nachkommen der T₀ Pflanze pYW210-9 wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des Transgens *cThEn42(GC)* überprüft. Homozygote Pflanzen wurden schließlich mittels eines Enzymaktivitätsassays unter Verwendung von 20 Körnern der positiv getesteten T₂ Pflanzen selektiert. Die rekombinanten Endochitinasen (*cThEn42(GC)*) besitzen eine höhere Aktivität pro Gewichtseinheit Pflanzenmaterial als die pflanzlichen Chitinasen. Folglich wird das Substrat 4-Methylumbelliferyl- β -D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (MUTC) schneller von *cThEn42(GC)* hydrolysiert. Das Substrat beginnt nach der Hydrolyse zu fluoreszieren, was bei einer Wellenlänge von 360/455 nm (Anregung/Emission) fotometrisch gemessen werden kann. Die Quantifizierung der Messdaten erfolgte über eine Standardkurve, deren Einzelwerte die Hydrolyse des Substrats durch definierte Mengen der rekombinanten Endochitinase *cThEn42(GC)* repräsentieren. Die Analysebedingungen wurden so abgestimmt, dass eine Hydrolyse des Substrats (MUTC) durch pflanzliche Chitinasen unter dem Detektionsminimum lag. Die Elternpflanze Golden Promise diente bei den Messungen als Kontrolle. Die Linie pYW210-9-(4001-4360) basiert letztendlich auf einer T₂ Pflanze (direkter Nachkomme der T₀ Pflanze pYW210-9). In allen 20, aus dieser Pflanze hervorgegangen, (T₃) Samen konnte mittels der Enzymaktivitätsmessung die rekombinante Endochitinase nachgewiesen werden und folglich wurde diese Pflanze als homozygot bewertet (unpublizierte Resultate).

Protokoll

1. 50 mg gemahlene Körner in 500 μ l 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5; enthält 100 μ g/ml BSA) überführen.
2. Probe vortexen und für vier Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
3. Probe vortexen und für 10 Minuten bei 13.000 UPM zentrifugieren.
4. Ein Aliquot des Überstandes mit 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5; enthält 100 μ g/ml BSA) 1:25 verdünnen.
5. 5 μ l der Verdünnung zu 45 μ l 50 mM Na-Acetatpuffer (pH 5,5; enthält 100 μ g/ml BSA und 0,5 μ g 4-Methylumbelliferyl- β -D-N, N', N''-triacetylchitotrioside [Sigma, Cat. 5639]) geben und gut mischen. Die Reaktion sollte in einer schwarzen 96 Well Mikrotiterplatte stattfinden.
6. Für 10 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit inkubieren.
7. 50 μ l 0,3 M Glycin/NaOH-Puffer (pH 10,6) zufügen, um die Reaktion zu stoppen.
8. Proben bei einer Wellenlänge von 360/455 nm (Anregung/Emission) fotometrisch quantifizieren.

Anhang V

Abbildung 7: Southern Blot Analyse des *nptIII*-Gens

- 1 – 1 kb ladder
- 2 – Golden Promise
- 3 – Baronesse
- 4 – pYW210-9-(4001-4360)
- 5 – pYW210-9-(4001-4360)
- 6 – pYW210-9-(4001-4360)
- 7 – pYW210-9-(4001-4360)
- 8 – pJH271-Beta-Glu-307
- 9 – pJH271-Beta-Glu-307
- 10 – pJH271-Beta-Glu-307
- 11 – pJH271-Beta-Glu-307
- 12 – pJH271-Beta-Glu-307
- 13 – pYW210 – 1 Kopie
- 14 – pYW210 – 10 Kopien
- 15 – pJH271 – 1 Kopie
- 16 – pJH271 – 10 Kopien

Die genomische DNA ausgewählter Pflanzen wurde mit *HindIII* (Proben 2, 4, 5, 6, 7) oder *EcoRI* (Proben 3, 8-12) verdaut und auf einem 0,8%igen TAE-Gel aufgetrennt. Die Plasmide wurden mit *HindIII* (pYW210; Proben 13, 14) oder *NotI* (pJH271; Proben 15, 16) linearisiert (A). Die verdaut DNA wurde auf eine Nylonmembran geblottet und mit einer *nptIII*-spezifischen Sonde hybridisiert (B). Zur Sondensynthese verwendete Primer (5'-GGCATTCTTGGC ATAGTGGT-3', 5'-ACTTGATGCGGAAGAAGTCG-3') liegen außerhalb der *nptIII*-Sequenzen und amplifizierten die gesamten *nptIII*-Region (inkl. des inkorporierten *transposable element IS1*-Elements). Als „Template“ diente das Plasmid pYW210, welches auf pBIN19 basiert. Die Sonde wurde nach radioaktiver Markierung des *nptIII*-Amplikons mit dem Blot hybridisiert.