

**UNTERSUCHUNG ZU TATSÄCHLICH
BEOBACHTETEN NACHTEILIGEN EFFEKTEN VON
FREISETZUNGEN GENTECHNISCH VERÄNDERTER
ORGANISMEN**

**Beatrix Tappeser
Claudia Eckelkamp
Barbara Weber**

**MONOGRAPHIEN
Band 129
M-129**

Wien, 2000

Projektleitung

Helmut Gaugitsch (Umweltbundesamt)

Autoren

Beatrix Tappeser (Öko – Institut e.V. Freiburg, Deutschland)
Claudia Eckelkamp (Öko – Institut e.V. Freiburg, Deutschland)
Barbara Weber (Öko – Institut e.V. Freiburg, Deutschland)

Unter Mitarbeit von

Monika Riegel (Öko – Institut e.V. Freiburg, Deutschland)
Eric Doye (Öko – Institut e.V. Freiburg, Deutschland)

Satz/Layout

Anne Moser

Titelphoto

Osterluzeifalter auf Osterluzeipflanze (Kurt Farasin)

Impressum

Medieninhaber und Herausgeber: Umweltbundesamt GmbH (Federal Environment Agency Ltd)
Spittelauer Lände 5, A-1090 Wien (Vienna), Austria

Druck: Riegelnik

© Umweltbundesamt GmbH, Wien 2000
Alle Rechte vorbehalten (all rights reserved)
ISBN 3-85457-559-9

Vorwort

Bisher beobachtete tatsächliche nachteilige Effekte von Freisetzungen gentechnisch veränderter Organismen wurden in der internationalen Diskussion bisher nicht systematisch erfasst und auch aus diesem Grund sehr unterschiedlich bewertet. Für das Umweltbundesamt ist im Rahmen der Aufgaben der Risikoabschätzung unter dem Blickwinkel des vorsorgenden Umweltschutzes und der Umweltkontrolle die wissenschaftliche Erfassung und Bewertung von bisher tatsächlich aufgetretenen nachteiligen Effekten eine wichtige Voraussetzung.

In der kontroversiellen Diskussion um die Gentechnologie in der Landwirtschaft und Lebensmittelproduktion spielen auch die erwarteten und dokumentierten positiven Auswirkungen von GVO (wie z. B. Reduktion des Pflanzenschutzmitteleinsatzes, Gewinnung nachwachsender Rohstoffe) eine bedeutende Rolle. Die für andere über die unmittelbare Risikoabschätzung bzw. Umweltkontrolle hinausgehenden Bewertungsinstrumente, wie z. B. Lebenszyklusanalyse (Ökobilanz) oder sozio-ökonomische Evaluierung von Produkten notwendige Dokumentation und Einschätzung von positiven Auswirkungen war nicht Gegenstand dieser Studie.

In der Studie werden zitierte Literatur und über verschiedene Recherchewege erfasste wissenschaftliche Arbeiten zu einer systematischen Dokumentation der bisher beobachteten tatsächlich nachteiligen Effekte von Freisetzungen gentechnisch veränderter Organismen verdichtet. Bisher wurden zu dieser Thematik vornehmlich Medienberichte zitiert, eine Koordination der ökologischen Begleitforschung bei Freisetzungen fand weder auf nationaler noch auf internationaler Ebene statt. Auch eine Zusammenführung und Aufbereitung der gewonnenen Daten und Ergebnisse erfolgte bisher nur in Ansätzen. Die Studie versucht, diese Lücke teilweise zu schließen und zeigt Handlungsbedarf für eine Verbesserung der systematischen Erfassung von für die Risikoabschätzung und das Monitoring notwendigen Daten auf.

Neben der fachlichen Kompetenz und Expertise wurde das Öko-Institut Freiburg (Deutschland) auch aufgrund seiner bekannt kritischen Arbeiten zum Themenbereich Risikoabschätzung und Auswirkungen von gentechnisch veränderten Organismen auf Umwelt und menschliche Gesundheit mit der Erstellung dieser Studie beauftragt.

INHALT

1	ZUSAMMENFASSUNG	5
2	EMPFEHLUNGEN	10
3	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	14
4	EFFEKTE VON FREISETZUNGEN GENTECHNISCH VERÄNDERTER ORGANISMEN	16
4.1	Mikroorganismen	16
4.1.1	Allgemeine Recherche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte.....	16
4.1.1.1	Überlebensfähigkeit und Verbreitung der GVMO.....	17
4.1.1.2	Konkurrenzfähigkeit, Schädigung von Nichtzielorganismen und von ökosystemaren Funktionen.....	20
4.1.1.3	Persistenz und Verbreitung der Genkonstrukte	21
4.1.1.4	Sekundäreffekte der Transformation	23
4.2	Mikroorganismen, fallspezifisch	24
4.2.1	Überblick.....	24
4.2.2	Ice Minus: <i>Pseudomonas syringae</i>	25
4.2.3	<i>Klebsiella planticola</i>	26
4.2.4	Rhizobien.....	26
4.2.5	<i>Pseudomonas sp.</i>	28
4.3	Pflanzen	29
4.3.1	Allgemeine Recherche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte.....	29
4.3.1.1	Ausbreitung	29
4.3.1.2	Gentransfer	31
4.4	Beispiele für Pflanzen mit Ausbreitungs- und Hybridisierungspotential	32
4.4.1	Brassica napus (Raps).....	32
4.4.1.1	Etablierungs- und Ausbreitungsmöglichkeiten	32
4.4.1.2	Freisetzungsversuche zum Ausbreitungspotential.....	32
4.4.1.3	Hybridisierungsmöglichkeiten.....	33
4.4.2	Beta vulgaris ssp. vulgaris (Zuckerrüben)	35
4.4.2.1	Ausbreitungspotential.....	35
4.4.2.2	Hybridisierungspotential	35
4.5	Target-Effekte: Resistenzentwicklung / Virulenzsteigerung bei Schädlingen oder Pathogenen	36
4.5.1	Resistenzentwicklung von Beikräutern und Pflanzenschädlingen	36
4.5.2	Resistenzmanagement bei <i>Bt</i> -Mais.....	37
4.5.3	Herbizidresistenz	38
4.5.4	Entstehung neuer Virusvarianten	39
4.5.5	Non-target-Effekte	41
4.5.6	Effekte auf Zersetzer	43
4.5.7	Effekte auf Bodenmikroorganismen	44

4.6	Effekte veränderter Bewirtschaftungsmethoden.....	44
4.7	Pflanzen, fallspezifisch.....	45
4.7.1	Exemplarische Fallbeschreibung und Diskussion der CRAWLEY-Versuche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte	45
4.7.1.1	Vergleichbarkeit mit der Anbausituation.....	45
4.7.1.2	Eignung der ausgewählten Pflanzen hinsichtlich der untersuchten Fragestellung und der Verallgemeinerbarkeit der Ergebnisse	45
4.7.1.3	Aussagekraft von Mittelwerten	46
4.7.2	Soja47	
4.7.3	Baumwolle	47
4.7.4	Weitere Beispiele	48
4.8	Bäume.....	49
4.8.1	Beobachtete Effekte bei Freilandversuchen.....	50
4.8.1.1	Stabilität der Expression.....	50
4.8.1.2	Pleiotropie- und Positionseffekte.....	51
4.8.1.3	Mykorrhiza	51
4.8.1.4	Hybridisierung.....	51
4.8.1.5	Insektenresistenz	52
4.8.1.6	Virusresistenz	52
4.8.1.7	Ligninmodifikationen.....	53
4.8.1.8	Zusammenfassung.....	53
4.9	Tiere	53
4.9.1	Allgemeine Recherche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte.....	53
4.10	Tiere, fallspezifisch.....	54
4.10.1	Transgene Fische	54
4.10.1.1	Pleiotropieeffekte.....	55
4.10.1.2	Stabilität der Expressionen.....	56
4.10.1.3	Weitere Risikoaspekte	57
5	RECHERCHEMETHODIK.....	58
6	LITERATURVERZEICHNIS	60

1 ZUSAMMENFASSUNG

Freisetzungsversuchen wird eine zentrale Rolle bei der Feststellung von Anzeichen für (unerwünschte) Umwelteffekte transgener Organismen beigemessen. Aus diesem Grunde sollte die Erfassung, Kommunikation und Diskussion von umweltrelevanten Freisetzungsdaten von zentraler Bedeutung sein. Schon um die Erfassung solcher Daten steht es jedoch schlecht: Es wird geschätzt, dass weltweit bei weniger als 99 % der Freisetzungen von GVO überhaupt ökologische Daten erhoben werden. Eine Koordination der ökologischen Begleitforschung bei Freisetzungen findet weder auf nationaler noch auf internationaler Ebene statt. Auch eine Zusammenführung und Aufbereitung der gewonnenen Daten und Ergebnisse geschieht nur in Ansätzen. Mit dem vorliegenden Gutachten wird versucht, diese Lücke mindestens teilweise zu schließen.

Mikroorganismen

Bisher ist es nicht möglich, die Auswirkungen von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVMO) auf das Gesamtökosystem zu untersuchen. Allerdings haben die spezifischen Eigenschaften von Mikroorganismen, wie vielfach schnelle Generationszeiten, Anpassungsmöglichkeit an ungünstige Umweltbedingungen und die Fähigkeit, genetisches Material untereinander auszutauschen, dazu geführt, dass verschiedene Indikatoren entwickelt wurden, die Hinweise auf die mögliche Schädigung bei der Freisetzung von GVMO liefern können. Dazu gehören

- Überdauerungs- oder Überlebensfähigkeit,
- Verbreitung,
- Populationsdynamik,
- Konkurrenz zwischen verschiedenen Mikroorganismen,
- Effekte auf Lebensgemeinschaften in der Umwelt.

Bei Sicherheitsuntersuchungen während der Freisetzung von GVMO stehen heute Persistenz und Verbreitung der freigesetzten Mikroorganismen und der rekombinanten Genprodukte im Mittelpunkt.

Die Etablierungschancen von GVMO werden durch biotische Faktoren, wie z.B. Nahrungsangebot, Fraßfeinde, Bakteriophagendichte, konkurrierende Mikroorganismen oder Populationsdichte und durch abiotische Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffbedarf, Wasser- und Salzgehalt und Bodenbeschaffenheit beeinflusst. Einige Mikroorganismen können sehr lange Zeiträume unter schlechten Umweltbedingungen überleben, indem sie Sporen oder Zysten bilden. Andere Mikroorganismen bilden keine solche Dauerstadien, sondern können in einen Zustand übergehen, in dem sie zwar lebensfähig, nicht aber kultivierbar (VNC: viable but not culturable) sind. Das vielfach geäußerte Argument, dass GVMO aufgrund zusätzlicher Gene – eines „extra burden“ – grundsätzlich benachteiligt sind, ist durch viele Arbeiten widerlegt. In der Regel lässt sich eine mindestens transiente Überlebensfähigkeit der GVMO nachweisen. In vielen Fällen ist aber auch von einer dauerhafteren Überlebensfähigkeit auszugehen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Risikobeurteilung von GVMO ist ihre Verbreitung vom Ort der Freisetzung in andere Lebensräume. Dadurch können Mikroorganismen aus ungünstigen Umweltkompartimenten in eine Umgebung transportiert werden, in der günstigere Überlebensbedingungen herrschen. Ein solcher Transport kann über Wind, Fließ- und Regenwasser sowie an Gegenständen oder Erntegütern angeheftet stattfinden. Aber auch Organismen wie Protozoen, Insekten (z.B. Springschwänze) und andere Bodentiere, wie Regenwürmer, können als Vektoren dienen. Sowohl ein vertikaler, in tiefere Bodenschichten

hinein stattfindender als auch ein lateraler Transport konnte in Freisetzungsversuchen nachgewiesen werden.

Ein weiteres Risiko der Freisetzung von GVMO ist die Verdrängung von Arten aus der autochthonen Mikroflora. Ein Hinweis auf die Fitness von GVMO ist deren Fähigkeit zur Verdrängung des entsprechenden Wildtyp-Stammes. Versuche in Mikrokosmen und im Freiland zeigten bisher, dass GVMO fallabhängig eine verringerte, gleiche oder erhöhte Konkurrenzfähigkeit aufweisen können.

Risikoüberlegungen zur Freisetzung von GVMO müssen zusätzlich beachten, dass die freigesetzten Mikroorganismen selbst Gene von anderen Mikroorganismen erwerben und so ihre ökologischen Eigenschaften verändern können. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, dass GVMO ihre Transgene an endogene Mikroorganismenpopulationen weitergeben. Generell können Mikroorganismen genetisches Material durch Konjugation, Transduktion oder Transformation austauschen. Alle drei Transferarten wurden auch bei GVMO gefunden.

Untersuchungen zu Umweltwirkungen von GVMO in verschiedenen Umweltmedien wurden bisher nur in geringer Zahl durchgeführt.

Eine Auswertung durch verschiedene Autoren kommt zu folgender Einschätzung: GVMO können

- erfolgreich mit indigenen Mikroorganismen von gestörten Ökosystemen konkurrieren,
- ihre neuen Gene an indigene Organismen transferieren und diese können in den neuen Wirten auch exprimiert werden,
- allgemeine und spezifische Stoffwechselaktivitäten sowie den Umsatz von Biomasse beeinflussen,
- die Struktur von Lebensgemeinschaften und ihre Funktionen in unterschiedlichen Habitaten beeinflussen,
- Interaktionen zwischen Symbionten und Organismen verschiedener trophischer Ebenen verändern und
- Stoffwechselprodukte hervorbringen, die unerwartete Wirkungen auf die Umwelt ausüben.

Eine konkrete Bewertung dieser Wirkungen fällt jedoch aufgrund des immer noch mangelhaften Wissens in der mikrobiellen Ökologie schwer.

Pflanzen

Eine unkontrollierte Ausbreitung transgener Pflanzen wird in der Regel als Risiko betrachtet. Dabei stehen agronomische Überlegungen im Vordergrund. Das Ausbreitungspotential gentechnisch veränderter Pflanzen wird jedoch auch als ökologisches Risiko betrachtet, für das allerdings kein einheitlicher Bewertungsmaßstab besteht. Neben der Ausgangspflanze spielen die mit Hilfe der Gentechnik übertragenen Gene und Genkonstrukte eine zentrale Rolle bei der Vorabrisikoeinschätzung. Der Einfluss der beabsichtigten gentechnischen Eigenschaftsveränderung auf das Ausbreitungsverhalten von GVO ist allerdings weitgehend unklar. Der vertikale Gentransfer von Transgenen durch intraspezifische und interspezifische Hybridisierung in verwandte Kultur- und Wildpflanzenarten ist ein viel diskutierter Sicherheitsaspekt der Nutzung gentechnisch veränderter Pflanzen. Umfangreiche Untersuchungen zum Hybridisierungspotential und den Wahrscheinlichkeiten wurden in Europa hauptsächlich für Raps und Zuckerrübe durchgeführt. Im Rahmen von „normalen“ Freisetzungsversuchen sind in der Regel keine Erhebungen zum Hybridisierungsgeschehen durchgeführt worden. Es wurden aber spezielle Forschungsvorhaben durchgeführt, die gezielt das Hybridisierungspotential von transgenen Pflanzen zum Gegenstand hatten.

Die Vorkommen von Raps ausserhalb der Kulturlflächen in Mitteleuropa werden unterschiedlich beurteilt. In Kanada kommt Raps verbreitet als Durchwuchs auf Kulturlflächen vor (Downey, 1999).

Vorherrschend ist die Einschätzung, daß bei Raps prinzipiell mit der Möglichkeit einer Etablierung gerechnet werden muss. Da in verschiedenen Untersuchungen mit herbizidtolerantem Raps keine Unterschiede in den kompetitiven Eigenschaften zwischen transgenem und konventionellem Raps festzustellen sind, muss auch mit der Verwilderung von transgenem Raps gerechnet werden. Raps ist zudem eine in Europa einheimische Pflanze mit einer Reihe von kreuzungsfähigen Verwandten.

Die Ergebnisse von Kreuzungsexperimenten belegen, dass ein von Raps ausgehender Genfluss in Wildkrautpopulationen stattfinden kann. Potentielle Hybridisierungspartner von *Brassica napus* finden sich hierbei nicht nur in der Gattung *Brassica* sondern auch in weiteren Gattungen in der Familie der Kreuzblütler. Unter Freilandbedingungen gelang eine Hybridisierung von transgenem Raps mit Rübsen (*Brassica rapa*), Sareptasenf (*Brassica juncea*), Schwarzem Senf (*Brassica nigra*), Grausenf (*Hirschfeldia incana*, synonym *Brassica adpressa*), Hederich (*Raphanus raphanistrum*) und Ackersenf (*Sinapis arvensis*).

Zuckerrüben haben ein Potential zur Verwilderung. In mehreren europäischen Ländern und in den USA werden sie als Unkraut gefunden. Beta-Rüben besitzen innerhalb ihrer Art keinerlei Kreuzungsbarrieren. Es kommen Kreuzungen der verschiedenen Kulturformen untereinander sowie Kreuzungen zwischen Wildformen und Kulturformen vor. Dies ist auch die Schlussfolgerung aus deutschen Begleitforschungsprojekten, die an der Universität Aachen durchgeführt wurden. Es wurden keinerlei Kreuzungsbarrieren zwischen transgenen Varianten der Beta-Rüben und anderen Kultur- oder Wildformen gefunden. Eine Verbreitung der Transgene nach einer Kommerzialisierung ist nach der Einschätzung der Wissenschaftler sicher zu erwarten.

Transgene herbizidresistente Sojabohnen, bereits seit 1996 im kommerziellen Anbau, weisen eine Reihe von ungeplanten Veränderungen auf, die wahrscheinlich auf Positions- oder Pleiotropieeffekte zurückgeführt werden können. So ist der Phytohormonhaushalt der Pflanzen verändert und die Stengel weisen eine deutlich höhere Lignifizierung auf. Dies führt bei höheren Temperaturen zum Aufplatzen der Stengel und in der Folge zu Ernteverlusten.

Transgene Baumwolle hat unter kommerziellen Anbaubedingungen ebenfalls teilweise unerwartete Probleme gezeigt. In einigen Anbaugebieten traten 1997 bei einer herbizidresistenten Baumwolle Kapseldeformationen und ein frühzeitiger Abwurf der Kapseln auf. Die insektenresistente Sorte hat nach Ergebnissen der USDA (des amerikanischen Landwirtschaftsministeriums) in bestimmten Gebieten zum Befall durch sekundäre, bisher kaum in Erscheinung tretende Schädlinge geführt, die zu hohen Pestizidaufwendungen geführt haben.

Mögliche Resistenzentwicklungen der betroffenen Schädlinge durch insektenresistente Pflanzen spielen eine große Rolle im Rahmen der Risikoabschätzung. Unter Freilandbedingungen wurden bisher noch keine weitgehenden Resistenzentwicklungen festgestellt. Allerdings geben Laborversuche Anlass zur Besorgnis. Insbesondere lassen neuere Untersuchungen zum Vererbungsmuster einer *Bt*-Resistenz bei *Bt*-empfindlichen Schädlingen darauf schliessen, dass nicht allein von einem rezessivem Vererbungsweg ausgegangen werden darf. Damit müssten Resistenzmanagementpläne, die auf einer Refugienstrategie (paralleler Anbau auf benachbarten Flächen von konventionellen Sorten, die als Rückzugsgebiet für empfindliche Schädlinge dienen) basieren, überarbeitet werden. Zudem gibt es Hinweise, dass resistente Schädlinge eine längere Entwicklungszeit bis zur Geschlechtsreife brauchen. Damit wäre eine Refugienstrategie hinfällig.

Resistenzentwicklung von Ackerbegleitpflanzen durch Auskreuzung wird in Zusammenhang mit der Nutzung herbizidresistenter Pflanzen diskutiert. Erste Erfahrungen aus dem großflächigen Anbau von Raps in Kanada bestätigen bereits in Freilandversuchen erzielte Ergebnisse. Mehrfach herbizidresistente Rapspflanzen, die als Durchwuchs in Folgekulturen auftreten, wurden ebenso gefunden wie Auskreuzungen auf verwandte Wildpflanzen. Die durch resistente Beikräuter in Folge des Anbaus transgener herbizidresistenter Pflanzen verursachten Probleme könnten wegen der Möglichkeit des Gentransfers und wegen der zu erwartenden Steigerung des Einsatzes einiger weniger Komplementärherbizide (gesteigerter Selektionsdruck) die bisherige Resistenzproblematik bei Herbiziden weit übertreffen.

Im Zentrum der Risikoforschung zu virusresistenten transgenen Pflanzen steht die agronomisch motivierte Frage, ob die gentechnischen Strategien zur Vermittlung von Virusresistenz die Verbreitung und Evolution von Viren verändern kann und ob dabei Pflanzenviren oder virale Pflanzenkrankheiten und Epidemien von erhöhter Schädlichkeit hervorgebracht werden können. Drei Risikotypen sind in diesem Zusammenhang von Interesse und wurden teilweise experimentell überprüft: Rekombinationen zwischen klonierten viralen Sequenzen und infizierenden Viren, heterologe Enkapsidierungen und Synergismen zwischen kloniertem Gen resp. Genprodukt und infizierenden Viren. Unter Gewächshausbedingungen konnte die Entstehung von Virusrekombinanten in transgenen Pflanzen nachgewiesen werden. Zwei der untersuchten Rekombinanten wiesen einen erweiterten Wirtsbereich auf, in drei Fällen konnten veränderte Symptome festgestellt werden. Heterologe Enkapsidierungen treten in Hüllprotein-exprimierenden transgenen Pflanzen auf. Es wurden sowohl heterologe Enkapsidierungen zwischen Viren derselben Virusgruppe als auch zwischen Viren verschiedener Gruppen gefunden. Untersuchungen zu Synergismen liegen bisher nicht vor.

Freilandversuche, die Effekte von transgenen Pflanzen auf Nichtzielorganismen untersuchen, wurden bisher im wesentlichen von den Firmen durchgeführt, die transgene Pflanzen auf den Markt bringen wollen. Hier wurden keinerlei Effekte nachgewiesen. Allerdings wurden bei Untersuchungen im Labor bzw. Gewächshaus Hinweise auf eine mögliche direkte und indirekte Schädigung von Nützlingen durch transgene insektenresistente Pflanzen gefunden.

Effekte auf im Boden lebende Zersetzer durch insektenresistente Pflanzen wurden hauptsächlich für das klonierte *Bt*-Toxin durchgeführt. Springschwänze werden in hohen Konzentrationen geschädigt. Auch Proteinase-Inhibitoren, die zur Insektenabwehr kloniert werden, zeigen toxische Wirkungen auf diese Organismengruppe. Effekte auf Bodenmikroorganismen wurden nur in Einzelfällen untersucht.

Die Aktivitäten auf dem Gebiet transgener Bäume haben in den letzten Jahren stark zugenommen. Bis 1998 fanden offiziell weltweit 116 Freisetzungsversuche in 17 Staaten mit 24 verschiedenen Baumarten statt. Das generelle Problem transgener Organismen, die Stabilität der Expressionen, ist bei Bäumen aufgrund deren Langlebigkeit ein besonderes Problem. Bei Bäumen konnten in Freilandversuchen schon nach einem relativ kurzen Zeitraum Instabilitäten nachgewiesen werden. Auch Pleiotropie- oder Positionseffekte wurden bei Bäumen unter Freilandbedingungen relativ häufig beobachtet. Erste Untersuchungen an freigesetzten Pappeln in Schleswig-Holstein in Bezug auf deren Auswirkung auf Mykorrhiza wiesen signifikante Unterschiede zwischen der Mykorrhizierung von transgenen und nicht-transgenen Pflanzen auf. Die Hybridisierungsmöglichkeiten und damit das Risiko der ungewollten Ausbreitung von rekombinanten Gensequenzen müssen je nach Baumart unterschiedlich bewertet werden. Es sind aber gerade bei den Gattungen *Populus*, *Eukalyptus* und *Pinus* - die intensiv gentechnisch bearbeitet werden - hohe Hybridisierungspotentiale bekannt. Insektenresistente *Bt*-Toxin bildenden Pappeln in China wiesen nach 2 Jahren Fraßschäden auf, die von bis dato als unbedeutend eingestuften Insekten verursacht worden waren. Bei transgenen Pflaumenbäumen (*Prunus domestica*), welche ein virales Hüllprotein exprimieren, konnte bei einem Freilandversuch bereits nach kurzer Zeit ein Resistenzdurchbruch nachgewiesen werden.

Tiere

Nach allgemeiner Einschätzung werden Fische als erste transgene Tiere kommerziell genutzt werden. Andere transgene Nutztiere werden in absehbarer Zeit nicht für eine landwirtschaftliche Nutzung auf den Markt gebracht werden. Untersuchungen zu potentiellen ökologischen Auswirkungen liegen demnach dazu nicht vor. Bei transgenen Fischen sind die Steigerung des Wachstums durch Integration von Wachstumshormongenen und die Beeinflussung der Kältetoleranz, die durch die Übertragung von für Anti-Frost-Proteine (AFP) kodierenden Gensequenzen erreicht werden, am weitesten fortgeschritten.

Die gentechnischen Veränderungen bei Fischen gehen mit z.T. großen Pleiotropieeffekten und/oder Positionseffekten einher.

Dazu gehören:

- Tumore
- veränderte Flossen- und Wirbelformen
- Schädeldeformationen
- abnormes Kiemenwachstum
- fehlende Körpersegmente
- verkümmerte Nacken- und Schwanzformen.

Auch die Stabilität der Genexpressionen ist bei transgenen Fischen ein noch nicht gelöstes Problem. Es liegt noch keine einzige wissenschaftliche Publikation vor, die eine stabile Aufrechterhaltung der Genexpression in Bezug auf die Wachstumssteigerung in der F₁-Generation nachweisen konnte. Daneben ist Mosaizismus, d.h., dass innerhalb eines modifizierten Individuums sowohl Zellen mit als auch ohne die übertragenen Gensequenzen vorkommen, ein bei allen transgenen Fischen vorkommendes Phänomen.

Laborversuche und die versuchsweise Haltung in geschlossenen Zuchtbecken lassen einige Rückschlüsse auf ökologische Risiken zu. Die herkömmlichen Haltungsformen bei kommerziellen Fischzuchtbetrieben zeigen, dass ein Entweichen von Individuen bzw. deren Brut häufig vorkommt und sehr schwer zu verhindern ist. Bei Welsen wurde festgestellt, dass sich transgene Individuen problemlos mit nicht-transgenen Individuen kreuzen. Ähnliche Ergebnisse liegen für andere Arten vor. Ein ungewollter Transfer der modifizierten Gensequenzen in natürliche Populationen ist demnach ziemlich sicher zu erwarten.

Bei transgenen Fischen ist zudem eine Veränderung des Nahrungsspektrums in Qualität und Quantität beobachtet worden. Auch das Konkurrenzverhalten und die sexuelle Selektion werden durch die überdurchschnittlich großen, transgenen Fische verändert. Untersuchungen über mögliche Auswirkungen auf Prädatoren und andere Mitglieder der aquatischen Biozönosen liegen jedoch noch nicht vor.

2 EMPFEHLUNGEN

Die Aufarbeitung der Daten, die zu beobachteten Effekten bei Freisetzungsversuchen vorliegen, zeigt, dass diese Daten bisher sehr lückenhaft und wenig systematisch erhoben wurden. Darüber hinaus sind sie teilweise schwer zugänglich oder gar nicht zu erhalten. Firmendaten werden in der Regel nicht öffentlich zur Verfügung gestellt oder wenn, nur in einer zusammenfassenden Darstellung, die eine Bewertung des Versuchsdesigns, seiner Aussagekraft und einen Vergleich mit anderen Untersuchungen meist nicht zulässt. Insgesamt ist die Recherche sehr aufwendig und es muss davon ausgegangen werden, dass nur ein Teil der vorliegenden Daten erfasst wird.

Um eine bessere und schnellere Übersicht über bereits erfolgte ökologische Erhebungen im Rahmen von Freisetzungsversuchen zu erhalten, die einerseits für Zulassungsverfahren genutzt werden und andererseits wichtige Grundlagen für ein Monitoring darstellen, wie es bei der Änderung der Richtlinie 90/220/EWG (Freisetzungsrichtlinie) vorgesehen ist, wäre es wünschenswert, eine zuverlässige Veröffentlichung aller erhobenen Daten sowie eine Bündelung, Systematisierung und zentrale Erfassung dieser Freisetzungsdaten anzustreben. Darüber hinaus erfordert die Implementierung des Biosafety-Protokolls, das im Januar 2000 in Montreal verabschiedet wurde, eine Bereitstellung von Daten für das nationale „Risk Assessment“ in importierenden Staaten u.a. über den sogenannten „Biosafety Clearing-House-Mechanism“. Auch dazu bedarf es einer Systematisierung und Bündelung von Ergebnissen aus Freisetzungsversuchen und Erfahrungen mit dem kommerziellen Anbau.

Die Information der Öffentlichkeit zu Anträgen auf Freisetzung bzw. Inverkehrbringen und über wissenschaftliche Stellungnahmen dazu wird in den einzelnen Ländern sehr unterschiedlich gehandhabt. Eine Nachvollziehbarkeit der Entscheidungen lässt sich aber nur durch entsprechende Transparenz erreichen.

Hier besteht großer Bedarf nach einer Harmonisierung auf hohem Niveau.

Daraus ergeben sich folgende Empfehlungen für gentechnisch veränderte Pflanzen:

- gemeinsame Entwicklung von validierten Verfahren zur ökologischen Begleitforschung initiiert auf OECD oder/und EU-Ebene, um eine relative Vergleichbarkeit erhobener Daten in verschiedenen Anbauregionen zu erreichen
- EU-weite Festlegung von Basisdaten, die bei jedem Freisetzungsversuch durch die Antragsteller erhoben werden sollten. Dazu sollten u.a. stichprobenartige Bodenuntersuchungen zum Nachweis der rekombinanten Genkonstrukte (z.B. Nullwert, zeitlicher Verlauf von Degradation, Persistenz und mögliche Anreicherung vor allem bei mehrjährigen Freisetzungen auf gleichen oder benachbarten Parzellen) sowie ein Monitoring des Pollenflugs durch Aufstellen von Pollenfallen gehören
- EU-weite Festlegung von Daten, die in Abhängigkeit von spezifischen Eigenschaftsänderungen und Pflanzen zu erheben sind (z.B. Dokumentation zum Verbleib von Samen/vegetativen Vermehrungseinheiten und möglichen Durchwuchsproblemen bei frostharten oder frosttoleranten Nutzpflanzen, Untersuchungen zu Wirkungen auf ausgewählte Bodenorganismen und herbivore Insekten sowie deren Prädatoren)

Verbesserung der (wissenschaftlichen) Kommunikation über beobachtete Effekte durch

- Gründung einer wissenschaftlichen Zeitung, die Veröffentlichungen bündelt, und die online sowie in gedruckter Form zu beziehen ist.

Hier wäre es insbesondere wünschenswert, dass im Rahmen der Umsetzung der Änderung der Richtlinie 90/220/EWG darauf hingewirkt wird, dass für die Vermarktungsgenehmigung wichtige, erhobene ökologische Daten hauptsächlich als „peer-review“ geprüfte Veröffentlichungen Eingang in die Unterlagen finden und damit auch einer interessierten Öffentlichkeit und für ein unabhängiges „Risk Assessment“ zur Verfügung stehen.

- Aufbau einer allgemein zugänglichen Datenbank, die organismen- und regionsspezifisch für die EU eine Systematisierung vornimmt. Diese Datenbank könnte bei der DG Umwelt der EU-Kommission geführt werden und auch eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Implementierung des Biosafety-Protokolls übernehmen. Dabei kann auf internationale Erfahrungen z.B. mit der OECD Biotrack Datenbank aufgebaut werden. Diese Datenbank sollte sowohl diejenigen Pflanzen erfassen, die in Europa in Feldversuchen getestet werden, als auch deren Eigenschaftsveränderungen sowie die Begleitforschung und deren Ergebnisse beinhalten. Die Regionen des landwirtschaftlichen Anbaus und der Freisetzung sollten angegeben werden. Darüber hinaus sollten Kreuzungspartner und deren regionale Verteilung erfasst werden. In Zusammenhang mit insektenresistenten Pflanzen könnte das regionale Vorkommen und die Bedeutung von Zielorganismen als landwirtschaftliche Schädlinge miteinbezogen werden, ebenso wie das Vorkommen von Nichtzielorganismen, die durch die gentechnisch vermittelten Eigenschaften beeinträchtigt werden könnten. Längerfristig könnte eine solche Datenbank auch eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit dem geplanten Monitoring erhalten, da damit auch eine ständige Aktualisierung des Wissensstandes und eine rasche Verknüpfung mit während des Monitorings beobachteten Phänomenen und Hinweisen aus der Begleitforschung ermöglicht würde.
- Sicherstellung, dass bei der Umsetzung der Änderung der Richtlinie 90/220/EWG darauf hingewirkt wird, dass sämtliche nationalen und europaweiten Stellungnahmen von wissenschaftlichen Beratungsgremien öffentlich zugänglich sind. Diese Praxis wird u.a. bereits durch die Kommission selbst und auch vom Vereinigten Königreich gepflegt.

Darüber hinaus sollte eine europaweite Koordination ökologischer Begleitforschung angestrebt werden. Dazu sollten offene Fragen im Rahmen der ökologischen Begleitforschung auf EU-Ebene identifiziert und in Verbundprojekten zwischen u.a. Ökologen, Mikrobiologen, Populationsbiologen, Agrarwissenschaftlern, Naturschutzfachleuten und Molekularbiologen länderübergreifend bearbeitet werden. Sozio-ökonomische Aspekte sollten Teil der jeweiligen Projekte sein.

So sollten in Zusammenhang mit der konzeptionellen und methodischen Erarbeitung von Resistenzmanagementplänen auch deren Umsetzung und Kosten ermittelt werden bzw. welche Veränderungen in der landwirtschaftlichen Praxis die Implementierung solcher Managementpläne zur Folge hätte und welche strukturellen Veränderungen daraus erwachsen könnten. Vergleichende Analysen unterschiedlicher landwirtschaftlicher Anbauformen mit Hilfe ökobilanzieller Methoden können wertvolle Hinweise auch für eine sozio-ökonomische Einschätzung liefern (siehe auch KLÖPFFER et al., 1999) und sollten verstärkt gefördert werden.

Resistenzmanagementansätze werden in Zukunft zunehmende Bedeutung erlangen, nicht nur in Zusammenhang mit insektenresistenten - und hier vor allem den Bt-Endotoxin exprimierenden - sondern auch bei herbizidresistenten Pflanzen (siehe auch KORELL et al., 1997). Aufgrund der Befürchtung, dass über den Anbau verschiedener Nutzpflanzenarten mit dem gleichen Herbizidresistenzgen ein hoher Selektionsdruck hin zur Entwicklung resistenter Unkräuter aufgebaut wird, sind Vorschläge entwickelt worden, die ein regionales Anbaumanagement über mehrere Vegetationsperioden erwägen, um einer schnellen Resistenzentwicklung der relevanten Unkräuter entgegenzuwirken. Ähnliches gilt für Sorten von Nutzpflanzen mit kreuzungsfähigen Verwandten, die mit unterschiedlichen Resistenzgenen ausgestattet sind und eng benachbart angebaut werden. Hier könnten die verwandten Wildarten möglicherweise verschiedene Resistenzen erhalten, die zu neuen agronomischen Problemen führen könnten. (KORELL et al., 1997). Falls unter diesen Gesichtspunkten in Zukunft Resistenzmanagementmaßnahmen als ein Teil eines Risikomanagements implementiert werden sollten, erfordert dies Planungs- und Kontrollaufwand mit möglicherweise erheblichen Kosten. Diese sozio-ökonomischen Folgen eines breiten Anbaus sollten bereits frühzeitig modelliert und in die Entscheidungsfindung miteinfließen.

Bearbeitung und Ergebnisse der Begleitforschung sollten laufend durch einen Begleitkreis evaluiert werden, der heterogen aus Wissenschaft, Industrie, Umweltorganisationen und öffentlicher Hand besetzt ist. Der Kreis sollte nicht mehr als 10 – 15 ExpertInnen umfassen, die aus unterschiedlichen EU-Mitgliedsstaaten stammen und jeweils ein zeitlich befristetes Mandat haben.

In diesem Begleitkreis sollten auch übergeordnete Fragestellungen angesprochen und Stellungnahmen dazu abgegeben werden können bzw. auf offene Fragen hingewiesen werden. Dazu könnten z.B. Fragen nach kumulativen Phänomenen oder auch möglichen synergistischen Wirkungen verschiedener gentechnischer Veränderungen gehören, die weder durch einzelne Antragsteller noch im Rahmen der Begleitforschung bisher bearbeitet wurden. Die Evaluationen des Begleitkreises sollten mit in die Entscheidungsfindung und Genehmigungspraxis zum Inverkehrbringen und zur Weiterentwicklung der Forschungs- und Industriepolitik auf der Ebene der Gemeinschaft und der Mitgliedsstaaten einfließen.

Um eine unabhängige Finanzierung dieses Begleitkreises zu ermöglichen, könnte z.B. eine Fondslösung gewählt werden, in die die Industrie und die öffentliche Hand einzahlte.

In Zusammenhang mit der geplanten zeitlich befristeten Genehmigung nach der Änderung der Freisetzungsrichtlinie sollten möglicherweise noch weitere Überlegungen dahin gehen, inwieweit nachträgliche Auflagen auf der Basis neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse ermöglicht werden können. Auch eine Aufhebung einer Zulassung innerhalb des genehmigten Zeitrahmens sollte prinzipiell ermöglicht werden.

2.1 Detailvorschläge

Informationen, die in Anmeldungen für die Freisetzungen genetisch veränderter Organismen enthalten sein müssen (betrifft Anhang III A und III B des Gemeinsamen Standpunktes zur Änderung der EU Richtlinie 90/220/EWG vom Dezember 2000)

Ergänzend zu den Informationen, die nach Anhang III A und III B der Richtlinie in Zukunft vorgelegt werden sollen, sollten folgende Punkte in die Listen mit aufgenommen werden:

- Eine vollständige Liste aller vom Antragsteller durchgeführten Labor-, Mikrokosmos-, Mesokosmos- und Gewächshausversuche einschließlich der gewählten Methodik, des Versuchsdesigns, der Originaldaten und der vorgenommenen Bewertung, um Kenntnis darüber zu erlangen, wie das Step-by-Step Prinzip umgesetzt wurde.
- Angaben zu Sequenzhomologien zwischen natürlichen Vektoren/Plasmiden und den zur Veränderung konstruierten Vektoren, um eine Abschätzung der möglichen Integration nach einem etwaigen horizontalen Gentransfer über homologe Rekombination zu ermöglichen
- Angaben zu möglichen Sequenzhomologien zwischen Vektor/Genkonstrukt und der DNA von Mikroorganismen in den verschiedenen Habitaten, mit denen der GVO in Wechselwirkung tritt/treten kann

Diese zusätzlichen Angaben könnten in Form von zukünftigen Leitlinien festgelegt werden. Sie könnten eine Risikoabschätzung wesentlich erleichtern, da dadurch eine schnelle Übersicht über durchgeführte aber auch fehlende Sicherheitsuntersuchungen möglich würde und die Vergleichbarkeit mit Daten und Ergebnissen anderer Antragsteller aber auch aus der Begleitforschung besser gewährleistet wird.

Zusätzliche Informationen (betrifft Anhang IV)

Weitere Informationen, die bei einem Antrag auf Inverkehrbringen zur Verfügung gestellt werden sollten:

- Daten, die zu agronomischen und ökologischen Parametern während Freisetzungsversuchen erhoben wurden, die dabei verwendete Methodik und die vorgenommene Auswertung
- Angaben dazu, inwieweit bei den vorausgegangenen Freisetzungen phänotypische Unterschiede oder Unterschiede in der genetischen Stabilität bei den GVOs aufgetreten sind, die im Gewächshaus nicht beobachtet wurden.

Wissenschaftliche Kommissionen

Die wissenschaftlichen Bewertungen vieler beobachtbarer Phänomene gehen oft auseinander. Um diesem dynamischen Prozess in der wissenschaftlichen Diskussion besser darzustellen, sollte die Möglichkeit geschaffen werden, dass Minderheitenvoten in den wissenschaftlichen Komitees eingebracht werden können und diese auch veröffentlicht werden. Darüber hinaus sollte bei der Veröffentlichung der Stellungnahmen der wissenschaftlichen Komitees darauf geachtet werden, dass die Daten und Arbeiten, auf denen sich die Argumentation abstützt, entsprechend zitiert werden, um eine bessere Nachvollziehbarkeit zu gewährleisten.

Um eine größtmögliche Transparenz und Unabhängigkeit der Mitglieder der wissenschaftlichen Kommissionen sicherzustellen, sollten Listen mit Namen und Tätigkeiten der Mitglieder öffentlich zugänglich sein.

3 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Im Zusammenhang mit den angenommenen ökologischen Wirkungen gentechnisch veränderter Organismen (GVO) und den damit verbundenen Risiken wird Freisetzungsversuchen eine wichtige Rolle zugeschrieben. Dies geschieht vor dem Hintergrund, dass in bezug auf viele ökologische Wirkungen von Organismen eine Extrapolation von Labor- und Gewächshausdaten auf das Freiland nicht möglich scheint. In der Tat schlagen Prognoseversuche über das Umweltverhalten von transgenen wie nichttransgenen Organismen nicht selten fehl (Schütte et al., 2000; Rat von Sachverständigen für Umweltfragen, 1998; Bartsch et al., 1993).

Dafür sind teils ungelöste methodische Probleme verantwortlich, teils sprechen jedoch prinzipielle Überlegungen dafür, dass manche Phänomene einer Untersuchung im Labor oder Gewächshaus nicht zugänglich sind. Schließlich werden im Labor oder Gewächshaus gewonnene Daten vor dem Hintergrund des Wissens über dort erfassbare Eigenschaften und deren Zusammenhang mit Umwelteffekten der Organismen interpretiert. Gescheiterte Korrelationsversuche von Labor- und Gewächshausdaten mit Freilandeffekten verweisen daher auch auf Wissenslücken über ökologische und ökosystemare Prozesse. Diese Prozesse gelten allgemein als sicheren Prognosen nicht zugänglich, da sie von zu vielen, in ihrer Variation nicht vorhersagbaren Parametern abhängen, wie dem Wetter, Mutationen und nicht zuletzt anthropogenen Veränderungen. So fallen Erklärungen ökologischer Phänomene oft selbst im Nachhinein schwer (Schütte et al., 2000; Sentker et al., 1994).

Diese – große – Problematik soll im Zusammenhang mit der beabsichtigten Freisetzung und Inverkehrbringung von GVO möglichst verantwortlich im Sinne einer Risikovorsorge gehandhabt werden, wie in der nationalen und internationalen Gesetzgebung festgelegt. Vor dem Hintergrund, dass Prognosen unmöglich sind, geht es dennoch darum, Methoden zu entwickeln, die das Potential haben, den Grad der Unsicherheit abzusenken, um dem Ziel der Schadensvermeidung nahe zu kommen. Dazu sind Freisetzungen von GVO mit ökologischer Begleitforschung nur ein Instrument. Untersuchungen im Labor, in Mesokosmen und Gewächshäusern und nicht zuletzt die Erforschung des Umweltverhaltens nichttransgener Lebewesen und ihrer Lebensgemeinschaften sind weitere Bausteine. Schließlich soll – das methodisch und konzeptionell allerdings noch völlig unausgereifte – Nachzulassungsmonitoring wieder Rückschlüsse und Korrekturen bei den vorgelagerten Schritten erlauben.

Zentral erscheint eine laufende Integration des Wissens, das in diesen verschiedenen Bereichen gewonnen wird und ausserdem die Einhaltung der Schrittfolge bei der sog. *step by step*-Vorgehensweise. D. h. um Risiken zu vermeiden oder zumindest zu vermindern, soll erst auf der Grundlage möglichst vieler im geschlossenen System ermittelbaren Informationen über den ersten Schritt zur Lockerung des *containments* – Versuche im Gewächshaus – entschieden werden und so fort. Nicht zuletzt ist in jede Entscheidung über eine Fortsetzung des *step by step*-Vorgehens der aktuelle Stand des Wissens – über die Ökologie der betreffenden nichttransgenen Elternorganismen, der land- oder forstwirtschaftlichen Praxis etc. – einzubeziehen.

Von diesem Ideal ist man in der Praxis relativ weit entfernt. Um bei der Thematik des vorliegenden Gutachtens zu beginnen: Wenn Freisetzungsversuchen eine zentrale Rolle bei der Feststellung von Anzeichen für (unerwünschte) Umwelteffekte transgener Organismen zukommt, dann sollte die Erfassung, Kommunikation und Diskussion von umweltrelevanten Freisetzungsdaten von zentraler Bedeutung sein.

Schon um die Erfassung solcher Daten steht es jedoch schlecht: Es wird geschätzt, dass weltweit bei weniger als 1 % der Freisetzungen von GVO überhaupt ökologische Daten erhoben werden. In der Bundesrepublik Deutschland soll es bei ca. 15 % der Freilandversuche eine ökologische Begleitforschung geben (SUKOPP & SUKOPP, 1997). Im übrigen dienen Freisetzungsversuche überwiegend dazu, agronomisch interessante Daten im Hinblick auf

die beabsichtigte Vermarktung der GVO zu sammeln. Eine nationale Koordination der ökologischen Begleitforschung bei Freisetzungen findet in der BRD nicht statt (BRANDT, 1998). In den USA und auf EU-Ebene gibt es Forschungsprogramme zum Risiko transgener Organismen, die Schwerpunkte setzen und damit eine gewisse Koordination leisten. Sie umfassen jedoch nur einen Teil der Aktivitäten auf diesem Gebiet und zudem auch Projekte mit nichttransgenen Organismen (SCHÜTTE et al., 1998a).

Die wissenschaftliche Kommunikation von Umwelteffekten transgener Organismen, die bei Freisetzungen beobachtet wurden, ist nicht in bestimmten Zeitschriften gebündelt, sondern findet sich verstreut in den verschiedensten Publikationsorganen. Oft sind die Daten lange Zeit oder auch gar nicht allgemein zugänglich, da sich die Forschungsprojekte häufig über mehrere Jahre erstrecken und die Ergebnisse in erster Linie für die Zulassungsbehörden gedacht sind. Es gibt auch keine Datenbanken, die speziell die bei Freisetzungen beobachteten Effekte erfassen.

Zur Bündelung der Information auf internationaler Ebene gibt es lediglich seit 1990 Symposien zum Thema „The biosafety results of field releases of genetically modified plants and microorganisms“, die alle zwei Jahre stattfinden. Hier geht der Focus über die beobachteten Umwelteffekte von GVO bei Freisetzungen im engeren Sinne hinaus und es werden auch noch nicht abgeschlossene Projekte und freisetzungorientierte Forschung im Labor und Gewächshaus präsentiert. Allerdings werden mit diesen Veranstaltungen längst nicht alle relevanten Arbeiten erfasst. Ausserdem gab das letzte Symposium 1998 in Braunschweig der Darstellung agronomischer Daten zur Vermarktung von GVO zentralen Raum, während die Biosicherheitsthematik an den Rand gedrängt wurde. Auf nationaler Ebene finden in der BRD vereinzelt Tagungen statt, die den Begleitforschungsprojekten bei Freisetzungen von Pflanzen und Mikroorganismen gewidmet sind (Fachgespräch „Stand der Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen“, 16.12.1997, Hannover; BMBF-Workshop „Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen“, 25./26.5.1998, Braunschweig). Ende 1998 fasste eine Publikation des deutschen Bundesgesundheitsministeriums den Stand dieser Begleitforschungsprojekte zusammen (BUNDESGESUNDHEITSBLATT 1998).

Entsprechende verstreute Aktivitäten zur Kommunikation von beobachteten Umwelteffekten bei Freisetzungen transgener Organismen gibt es auch in anderen Ländern und im Rahmen internationaler Tagungen (z. B. PAN-EUROPEAN CONFERENCE 1993). Dabei liegt der Focus jedoch nicht exakt und ausschließlich auf der Thematik der Umwelteffekte bei Freisetzungsversuchen.

Diese Lücke versucht das vorliegende Gutachten zu schließen. Dazu werden im Rahmen des vorgesehenen Gutachtenumfanges weltweit möglichst viele relevante Projekte ermittelt und Daten gesammelt. An ausgewählten Beispielen aus dem Bereich der Mikroorganismen, der Pflanzen und der Tiere erfolgt eine ausführliche Fallbeschreibung und Diskussion vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte. Unter Einbeziehung der auf anderem Wege, d. h. ausser durch Freisetzungen ermittelbaren Informationen zum Umweltverhalten von GVO, werden Rückschlüsse und Vorschläge zur Berücksichtigung bei der Risikoabschätzung abgeleitet. Schließlich werden die Recherchewege und -methoden dokumentiert und bewertet, damit eine Fortführung der Erfassung und Bewertung von Umwelteffekten, die bei der Freisetzung transgener Organismen beobachtet werden können, in Zukunft erleichtert wird.

4 EFFEKTE VON FREISETZUNGEN GENTECHNISCH VERÄNDERTER ORGANISMEN

4.1 Mikroorganismen

4.1.1 Allgemeine Recherche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte

Die Verwendung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVMO) wird in zunehmendem Maße als Möglichkeit zur Lösung vielfältiger Probleme diskutiert. Z.B. werden schon heute in großem Umfang Enzyme mit Hilfe von GVMO produziert. Obwohl diese Produktion in Fermentern stattfindet, kommt es dabei unvermeidbar immer wieder zu unbeabsichtigten Freisetzungen von gentechnisch veränderten Produktionsorganismen in die Umwelt (DE VOS, 1998). Daneben gibt es aber auch beabsichtigte Freisetzungen von GVMO, die z.B. speziell für den Schadstoffabbau in Boden und Grundwasser, als biologische Schädlingsbekämpfungsmittel in der Landwirtschaft oder als Lebendimpfstoffe in der Medizin konstruiert wurden.

Obwohl in den letzten Jahren ein überwältigender Wissenszuwachs über die mikrobielle Ökologie gewonnen wurde, kann das Verhalten von GVMO in der Umwelt bisher nicht vorhergesagt werden. Für die Abschätzung, welche ökologischen Folgen eine Freisetzung von GVMO haben kann, ist einerseits eine Definition charakteristischer Ökosystemstrukturen und -funktionen notwendig. Andererseits ist die ökologische Funktion von Mikroorganismen im natürlichen Habitat eine zentrale Voraussetzung für die Prognose ökologischer Effekte (FÖRSTER, 1998). Bisher existieren für die Abschätzung des Umweltrisikos bei Freisetzungen von GVMO keine allgemein anerkannten Ökosystemendpunkte. Es wurden zwar bereits zahlreiche Methoden und Parameter vorgeschlagen und auch angewendet, um die ökologischen Auswirkungen der Einführung von GVMO zu erfassen. Viele dieser Methoden sind aber so wenig sensibel, dass nur „katastrophale“ Änderungen im Ökosystem damit angezeigt werden können (FÖRSTER, 1998).

Bisher ist es unmöglich, die Auswirkungen von GVMO auf das Gesamtökosystem zu untersuchen. Allerdings haben die spezifischen Eigenschaften von Mikroorganismen, wie vielfach schnelle Generationszeiten, Anpassungsmöglichkeit an ungünstige Umweltbedingungen und die Fähigkeit, genetisches Material untereinander auszutauschen, dazu geführt, dass verschiedene Indikatoren entwickelt wurden, die Hinweise auf die mögliche Schädigung oder zumindest die mögliche Eingriffstiefe bei der Freisetzung von GVMO liefern können. Nach KLUEPFEL (1992) gibt es fünf ökologische Parameter, die für die biologische Sicherheit von GVMO und rekombinanter DNA relevant sind:

- Überdauerungs- oder Überlebensfähigkeit,
- Verbreitung,
- Populationsdynamik,
- Konkurrenz zwischen verschiedenen Mikroorganismen,
- Effekt auf Lebensgemeinschaften in der Umwelt.

Bei Sicherheitsuntersuchungen während der Freisetzung von gentechnisch veränderten Mikroorganismen (GVMO) stehen heute Persistenz und Verbreitung der freigesetzten Mikroorganismen und der rekombinanten Genprodukte im Mittelpunkt. Die Risikoüberlegungen sind dabei nicht nur für Mikroorganismen gültig, die ausdrücklich für landwirtschaftliche Anwendungen oder Bodensanierungsexperimente freigesetzt werden, sondern auch für Mikroorganismen, die in Fermenteranlagen genutzt werden, da davon auszugehen ist, dass mit den industriellen Abwässern aus solchen Anlagen auch lebende GVMO freigesetzt werden (DE VOS, 1998). Im folgenden wird daher zunächst ein Überblick über die Überlebensfähigkeit

von GVMO und die Persistenz von isoliert vorliegender DNA in verschiedenen Umweltmedien gegeben, um darauf aufbauend die heutigen Kenntnisse zu Möglichkeiten bzw. Grenzen des natürlichen Gentransfer und der Verbreitung von Transgenen zusammenzufassen.

4.1.1.1 Überlebensfähigkeit und Verbreitung der GVMO

Das vielfach geäußerte Argument, dass GVMO aufgrund zusätzlicher Gene – eines „extra burden“ – grundsätzlich benachteiligt sind, ist durch viele Arbeiten widerlegt (siehe u.a. AWONG et al., 1990; BARCINA et al., 1992; BOUMA & LENSKI, 1988; CHAO & FENG, 1990; GOLDSCHMIDT et al., 1994; KOZDROJ & PIOTROWSKA-SEGET, 1995; KOZDROJ, 1996a; LENSKI et al., 1994; REGAL, 1988 und 1994; SOBECKY et al., 1992; VAN ELSAS, 1992). Inwieweit GVMO Effekte auf die Umwelt ausüben, ist wesentlich von der Dauer des Überlebens bzw. einer möglichen Etablierung, Vermehrung und Verbreitung abhängig. In einer Reihe von Untersuchungen zum Überleben von transgenen Mikroorganismen wurde festgestellt, dass diese über einen längeren Zeitraum in verschiedenen Umweltmedien, z.B. Kläranlagen, aquatischen Systemen, Boden oder Verdauungstrakt überleben können (zusammenfassend dargestellt in ECKELKAMP et al., 1998a; TAPPESER et al., 1999).

4.1.1.1.1 Überleben

In der Umwelt hängt das Überleben rekombinanter Mikroorganismen und die Überdauerung ihrer Gene von verschiedenen Faktoren ab, die wiederum untereinander in Wechselwirkung treten. So werden die Etablierungschancen von GVMO durch biotische Faktoren, wie z.B. Nahrungsangebot, Fraßfeinde, Bakteriophagendichte, konkurrierende Mikroorganismen oder Populationsdichte und durch abiotische Faktoren, wie Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffbedarf, Wasser- und Salzgehalt und Bodenbeschaffenheit beeinflusst (SMALLA et al., 1989; VAN ELSAS, 1992; DOYLE et al., 1995). Für das Überleben sind ausserdem auch die speziellen arteigenen, genetisch fixierten Fähigkeiten des GVMO (z.B. die Bildung von Dauerstadien, Sporen) und die direkt oder indirekt durch die Transgene vermittelten neuen Eigenschaften wichtig. Einige Mikroorganismen können sehr lange Zeiträume unter schlechten Umweltbedingungen überleben, indem sie Sporen oder Zysten bilden. Andere Mikroorganismen bilden keine solche Dauerstadien, sondern können in einen Zustand übergehen, in dem sie zwar lebensfähig, nicht aber kultivierbar (VNC: viable but not culturable) sind (ECKELKAMP et al., 1998a; FÖRSTER, 1998; TAPPESER et al., 1999).

Diese Auflistung macht deutlich, wie schwierig ein Monitoring und damit auch Aussagen zur Überlebensfähigkeit von GVMO in der Umwelt sind. Valide Aussagen über Überlebens- oder Ausbreitungsfähigkeiten von Mikroorganismen hängen entscheidend von der Wahl des Nachweisverfahrens bzw. der Möglichkeit zur Erfassung unterschiedlicher Lebensräume und -stadien ab. Die Beispiele von Freisetzungen gentechnisch veränderter *Pseudomonas fluorescens* illustrieren die Schwierigkeiten sehr anschaulich. 1993 und 1994 haben Thompson et al. Zuckerrübensamen mit gentechnisch modifizierten *P. fluorescens* inokuliert und freigesetzt (THOMPSON et al., 1995). Die GVMO konnten Wurzeln und Blätter der Zuckerrüben erfolgreich besiedeln und waren während der gesamten Vegetationsperiode (270 Tage) nachweisbar. Die Populationsdynamik der GVMO auf den Blättern der Zuckerrüben schwankte deutlich in den verschiedenen Untersuchungsjahren. 1993 bildeten die GVMO mit einem Anteil von weniger als sechs Prozent einen kleinen Anteil an der Gesamt-Pseudomonadenpopulation. Obwohl die gentechnisch veränderten *P. fluorescens* nach der ersten Vegetationsperiode weder im Boden, noch auf den überwinternden Pflanzen nachweisbar waren, stieg ihr Anteil im darauffolgenden Jahr sogar auf 81 %. Ähnliche Effekte fanden DE LEIJ et al. nach der Freisetzung von Weizenkörnern mit inokulierten transgenen *P. fluorescens* (DE LEIJ et al., 1995a). Dabei nahm die GVMO-Zellzahl nach 319 Tagen bis zur Detektionsgrenze ab. Nach der Ernte auskeimende und neu eingesäte Weizenkörner

wurden dennoch erfolgreich durch den GVMO besiedelt. Auch LILLEY & BAILEY (1997a) fanden im Gewächshaus und im Freiland Populationsschwankungen von transgenen *P. fluorescens*-Stämmen, die von der Pflanzenentwicklung abhingen. Die GVMO zeigten nach der Inokulation auf den Blättern und Wurzeloberflächen junger Zuckerrübenpflanzen zunächst eine verringerte Fitness. Mit zunehmendem Alter der inokulierten Pflanzen kehrte sich dieser Effekt um: im Freiland waren die GVMO auf Blättern und Wurzeln älterer Pflanzen konkurrenzstärker als der Wildtyp, im Gewächshaus nur auf den Wurzeln.

Mikroorganismen können also, auch wenn sie eine Zeitlang nicht mehr nachweisbar sind, später wieder in Erscheinung treten und erfolgreich Habitate besiedeln. Veränderte physiologische Eigenschaften, die Fähigkeit zur Adaptation und variierende physiologische Ausgangssituationen und Umweltparameter erschweren eine Abschätzung der Überlebensfähigkeit unter natürlichen Umweltbedingungen.¹ Adaptationen entwickeln sich z.B. häufig erst nach einem längeren Zeitraum. Daher müssen Sicherheitsuntersuchungen, um überhaupt zu aussagefähigen Ergebnissen zu kommen, langfristig angelegt sein. Bisher werden die meisten Untersuchungen schon nach einigen Wochen abgebrochen. Häufig wird dann festgestellt, dass die Zellzahl der freigesetzten GVMO schnell abnimmt und nur ein geringer Anteil der freigesetzten GVMO überdauern kann. Die daraus meist abgeleitete Schlussfolgerung, dass sich die GVMO in der getesteten Umweltsituation letztlich nicht etablieren können, muss daher kritisch betrachtet werden: Es gibt zahlreiche Beispiele dafür, dass nach einer anfänglichen Reduktion der Zellzahl auf sehr geringe Werte, die sogar unterhalb der Nachweisgrenze liegen können, unter veränderten Umweltparametern wieder Vermehrung und damit ein Anstieg der Zellzahlen erfolgen kann (CLEGG et al., 1995; GILLESPIE et al., 1995; KLUEPFEL et al., 1994; RAMOS et al., 1994; SJORGEN, 1995; THOMPSON et al., 1995). Insgesamt weist die in den letzten Jahren publizierte Literatur darauf hin, dass die Überlebensmöglichkeiten von GVMO vielfach deutlich unterschätzt wurden. Diese Feststellung gilt sowohl für GVMO, die explizit für das Freiland konstruiert wurden, als auch für solche, die für eine Nutzung im geschlossenen System vorgesehen sind (beide Punkte ausführlich dargestellt in JÄGER & TAPPESER, 1996; ECKELKAMP et al., 1998a; TAPPESER et al., 1999).

Um die Überlebensrate von GVMO im Freiland zu kontrollieren, wurden zusätzliche biologische Sicherheitskonzepte mit dem Ziel entwickelt, in die Umwelt ausgebrachte Bakterien nach einiger Zeit durch Selbstelimination auszuschalten. Bisher arbeiten diese sogenannten „Suizid“-Systeme jedoch nicht 100 % effektiv und es muss stets mit einem gewissen Anteil überlebender Mutanten gerechnet werden (RAMOS et al., 1995)². Bei Freilandversuchen in Deutschland wurden beispielsweise *SinoRhizobium meliloti* gentechnisch so verändert, dass sie eine verminderte Lebensdauer aufweisen sollten. Durch die Integration eines Luciferasegens in das chromosomale *recA*-Gen, das u.a. Rekombination vermittelt, sollte ein „biologisches Containment“ erzielt werden (SELBITSCHKA et al., 1994). Allerdings zeigten auch diese Bakterien nur in Modellökosystemen eingeschränkte Überlebensfähigkeit. Unter realen Freisetzungsbedingungen trat dieses Merkmal im Vergleich zum unveränderten Ausgangsstamm nicht hervor (DRESING et al., 1995) (s. auch Kapitel 4.2.4).

¹ Häufig wird angenommen, dass GVMO, die für bestimmte Zwecke, wie z.B. Schadstoffabbau in die Umwelt entlassen werden, unter veränderten Umweltbedingungen wieder aus der Umwelt verschwinden. Allerdings wird dabei vergessen, dass auch GVMO die Fähigkeit zur Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen haben. Velicer konnte z.B. zeigen, dass GVMO, die mit einem Transgen für den 2,4-D-Abbau ausgestattet waren, bei An- und Abwesenheit von 2,4-D gleich gute Überlebenschancen haben (VELICER, 1999). Der Autor schließt aus seinen Versuchen, dass GVMO sich an veränderte Umweltbedingungen adaptieren und in der Umwelt persistieren können.

² Entsprechende biologische „Containment“-Systeme wurden auch zur Reduktion der Wahrscheinlichkeit um vier Größenordnungen (unter 10^{-7}) für Transfers chromosomal integrierter Gene entwickelt (MUNTHALI et al., 1996).

4.1.1.1.2 Verbreitung von GVMO

Ein wichtiger Aspekt bei der Risikobeurteilung von GVMO ist ihre Verbreitung vom Ort der Freisetzung in andere Lebensräume. Dadurch können Mikroorganismen aus ungünstigen Umweltkompartimenten in eine Umgebung transportiert werden, in der günstigere Überlebensbedingungen herrschen. Ein solcher Transport kann über Wind, Fließ- und Regenwasser sowie an Gegenständen oder Erntegütern angeheftet stattfinden. Aber auch Organismen wie Protozoen, Insekten (z.B. Springschwänze) und andere Bodentiere, wie Regenwürmer, können als Vektoren dienen (SCHMIDT, 1991; CLEGG et al., 1995; HEIJNEN & MARINISEN, 1995; WEISKEL et al., 1996). Diese können sich aktiv fortbewegen und verfügen über eine eigene Darmflora, die mit den aufgenommenen Mikroorganismen interagieren kann (BYZOV et al., 1993). Dies gilt ebenso für größere Tiere, Säuger und Vögel, die zur Verbreitung der Mikroorganismen beitragen, indem diese im Verdauungstrakt oder an Körperoberflächen (z.B. im Fell, an Federn) haftend auch über weitere Entfernungen transportiert werden können. In Regenwürmern konnte ein nicht-gentechnisch veränderter *P. fluorescens* Stamm 50 Tage lang im Kot nachgewiesen (HENSCHKE & SCHMIDT, 1989). In Regenwürmern, die einen Tag lang in Mikrokosmen mit gentechnisch veränderten *P. fluorescens* gehalten wurden, wurden die GVMO 15 Tage lang nachgewiesen (CLEGG et al., 1995). LILLEY et al. haben festgestellt, dass blattkolonisierende *P. fluorescens* durch Raupen der Gattung Eulenfalter (*Mamestra brassicae*) von infizierten auf nicht-infizierte Zuckerrübenpflanzen übertragen werden können (LILLEY et al., 1997). Durch Insekten können nicht nur GVMO, die Blätter besiedeln, weiterverbreitet werden, sondern auch solche, die im Wurzelbereich leben. Diese können z.B. durch Wunden im Wurzelbereich ins Pflanzeninnere gelangen und in die oberirdischen Pflanzenteile transportiert werden (KLUEPFEL et al., 1994). Von dort aus können sie auch von pflanzenfressenden Insekten aufgenommen werden. Bei Insekten (Southern Corn Worm), die mit transgenen *P. aureofaciens* besiedelte Maispflanzen fraßen, konnten die GVMO 12,5 Tage lang nachgewiesen werden. Sie konnten den GVMO auch auf nicht-infizierte Pflanzen übertragen (KLUEPFEL et al., 1994). Auch Grashüpfer (red legged grasshoppers, *Melanoplus femurrubrum*) besaßen im Freiland und im Mikrokosmos die Fähigkeit, Rhizosphäre-besiedelnde GVMO aus den oberirdischen Pflanzenteilen von Mais aufzunehmen, über einen Zeitraum von ca. einer Woche im Magen/Darmtrakt zu halten und an nicht-infizierte Maispflanzen weiterzugeben. Im Freiland stieg die Wahrscheinlichkeit der Übertragung mit zeitlichem Abstand zur GVMO-Aufnahme, obwohl die absolute GVMO-Zellzahl in den Insekten abnahm (SNYDER et al., 1999). Kluepfel und Snyder (KLUEPFEL et al., 1994 und SNYDER et al., 1999) ziehen aus ihren Ergebnissen den Schluss, dass blattfressende Insekten die Fähigkeit zur Aufnahme und Weitergabe von Bakterien haben, die ursprünglich zur Rhizosphäre gehören. Da dabei auch klassische Pflanzenpathogene durch Insekten über weite Distanzen verbreitet werden können, ist davon auszugehen, dass über einen solchen Weg auch freigesetzte Rhizosphären-GVMO auf neue Wirtspflanzen und in neue Habitate transportiert werden.

Der vertikale Transport im Boden birgt ebenfalls Risiken. Es kann dadurch zu Kontaminationen des Grundwassers mit GVMO kommen, die mögliche Gesundheitsrisiken bergen oder GVMO können in Habitate, in denen sie bessere Überlebenschancen haben, transportiert werden (NATSCH et al., 1996). Aus Labor- und Mikrokosmosstudien wurde geschlossen, dass GVMO nach der Freisetzung von der Bodenmatrix festgehalten werden und damit am Freisetzungsort bleiben. Es ist jedoch in Frage zu stellen, ob diese Schlussfolgerung gerechtfertigt ist. SMITH et al. (1985) haben z.B. gezeigt, dass Bakterien unter bestimmten Bedingungen auch im Boden schnell vertikal mit dem Makroporenstrom transportiert werden. Bei Untersuchungen mit GVMO wurden ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse erzielt. In Mikrokosmen fanden DE LEIJ et al. (1994) nach Beimpfung von Weizenkörnern mit transgenen *P. aureofaciens*, dass die meisten GVMO in den oberen 15 cm der Rhizosphäre von Weizenpflanzen verblieben, ein kleiner Teil aber auch noch aus 60 cm Tiefe isoliert werden konnte. Auch im Freiland verbleiben die freigesetzten GVMO meist in den obersten Bodenschichten. Den bisher durchgeführten Untersuchungen zufolge wurden sie mit geringen

Zellzahlen 15 bis 75 cm tief transportiert (HEIDENREICH, 1998). Allerdings könnten GVMO durchaus auch in tiefere Bodenschichten gelangen. TROXLER et al. (1997a) untersuchten z.B. 2,5m lange Feldlysimetersäulen nach Inokulation von *Pseudomonas fluorescens* CHA0 und fanden, dass der vertikale Transport von Bakterien in tiefere Bodenschichten von der Stärke der Regenfälle abhängig ist. Bei normalem Regenfall erfolgte der Transport sehr langsam und erst nach einem Regensturm nach 200 Tagen wurde der inokulierte *Pseudomonas*-Stamm CHA0 durch das Lysimeter transportiert. Wird allerdings direkt nach der Inokulation ein starker Regenfall simuliert, werden die Bakterien sehr viel schneller in tiefere Bodenschichten transportiert (NATSCH et al., 1996). Die AutorInnen ziehen daraus den Schluss, dass unter natürlichen Bedingungen, besonders nach heftigen Regenfällen, ein vertikaler Austrag von *Pseudomonas* ins Grundwasser nicht auszuschließen ist (NATSCH et al., 1998a).

Neben dem vertikalen Austrag können GVMO auch lateral transportiert werden. In einigen Untersuchungen zur lateralen Verbreitung wurde festgestellt, dass die GVMO am Freisetzungsort verblieben oder nur bis zu 40 cm weit verbreitet wurden (z.B. AMARGER & DELGUTTE, 1990; COOK et al., 1990; KLUEPFEL et al., 1991; THOMPSON et al., 1995). DE LEIJ et al. (1995a) konnten mit Weizenkörnern freigesetzte transgene *P. fluorescens* in einer Distanz von bis zu zwei Meter vom Freisetzungsort nachweisen. DANE & SHAW (1996) fanden freigesetzte transgene *Xanthomonas campestris* sogar in einer Entfernung von bis zu acht Meter von den inokulierten Kohlpflanzen.

4.1.1.2 Konkurrenzfähigkeit, Schädigung von Nichtzielorganismen und von ökosystemaren Funktionen

Ein potentielles Risiko der Freisetzung von GVMO ist die Verdrängung von Arten aus der autochthonen Mikroflora. Ein Hinweis auf die Fitness von GVMO ist deren Fähigkeit zur Verdrängung des entsprechenden Wildtyp-Stammes. Die Verdrängung könnte dabei durch die direkte Konkurrenz um die gleiche „ökologische Nische“ oder indirekt durch die Produktion sekundärer Metaboliten erfolgen.

Versuche in Mikrokosmen und im Freiland zeigten bisher, dass GVMO fallabhängig eine verringerte, gleiche oder erhöhte Konkurrenzfähigkeit aufweisen können (HEIDENREICH, 1998). Z.B. fanden KOZDROJ (1996b), dass rekombinante Tn5-Mutanten von *P. fluorescens* während eines Untersuchungszeitraums von 14 Tagen im Boden und in der Rhizosphäre weniger konkurrenzfähig waren als der entsprechende nicht-transgene Ausgangsstamm und ein Naldixinsäure-resistenter *P. fluorescens*-Stamm. RAAIJMAKERS et al. (1995) stellten dagegen fest, dass ein transgener *P. fluorescens* Stamm mit nicht transgenen *Pseudomonas*-Stämmen in der Rettich-Rhizosphäre konkurrieren kann. Von CIRVILLERI & CALDERA (1998) untersuchte Lux-markierte *P. fluorescens* konnten sich auf Bohnenblättern genau so gut etablieren wie die entsprechenden Wildtypstämme. DE LEIJ et al. (1995 a,b) beobachteten, dass auf Sommerweizen inokulierte nicht-transgene und transgene LacZY/Kan^r-markierte *P. fluorescens* zu einer transienten Störung der kultivierbaren autochthonen Mikroflora führen. Ähnliche transiente Populationsschwankungen nach Freisetzungen von GVMO wurden auch von CAROLL et al. (1995) und NATSCH et al. (1998 b) festgestellt. Allerdings führte in beiden Fällen auch die Freisetzung entsprechender nicht-transgener Bakterienstämme zu deutlichen Populationsschwankungen in den untersuchten Bodenproben. Schnell wachsende Mikroorganismen wie fluoreszierende Pseudomonaden oder Hefen waren dabei besonders betroffen. Ein zu Pflanzenschutz Zwecken entwickelter transgener *P. putida*-Stamm, welcher die antifungale Substanz PCA (Phenazine-1-Carboxylic Acid) produziert, veränderte wie auch ein freigesetzter nicht-transgener Bakterienstamm transient die Pilzpopulationen im Boden (GLANDORF, 1998). Allerdings war der Effekt der GVMO langanhaltender: Die Reduktion der Pilzpopulationen war nach der Freisetzung nicht-transgener Stämme nach 27 Tagen verschwunden, blieb bei den GVMO aber bis zu 90 Tagen bestehen.

Die Konkurrenzfähigkeit hängt stark von den Umgebungsbedingungen ab. KLUEPFEL et al (1994) entdeckten, dass die Konkurrenz zwischen transgenen lacZY markierten *P. aureofaciens* von der inokulierten Wirtspflanzenart und der Bodenfeuchte abhing. Wurden Maiswurzeln inokuliert, unterschieden sich beide Stämme hinsichtlich ihrer Konkurrenzfähigkeit nicht. Wurden ähnliche Konkurrenzexperimente hingegen mit Weizenpflanzen vorgenommen, war die Konkurrenzfähigkeit von der Bodenfeuchte abhängig: Bei einer Bodenfeuchte unter zwölf Prozent war der transgene Stamm in der Lage, den nicht-transgenen Ausgangsstamm zu verdrängen (KLUEPFEL et al., 1994). Der Selektionsdruck kann einen entscheidenden Einfluss auf die Konkurrenzfähigkeit von GVMO ausüben. Ein von FEDI et al. (1996) hergestellter transgener *P. fluorescens*-Stamm mit einem Lactosemarkergen hatte bei Abwesenheit von Lactose in der Rhizosphäre von Zuckerrüben die gleiche Konkurrenzkraft wie der gleichzeitig inokulierte nicht-transgene Ausgangsstamm. Nach Zusatz von Lactose nahm die Population des GVMO im Vergleich zum Elternstamm deutlich zu, um sich nach 27 Tagen wieder auf gleichem Niveau zu stabilisieren (FEDI et al., 1996). Auch DOYLE et al. (1991) beobachteten, dass sich die Mikroflora in nährstoffarmen Böden als Folge einer GVMO-Beimpfung ändern kann. Transgene, für den Abbau des Herbizids 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) konstruierte *P. putida* konnten die Populationen sporenbildender und chitinnutzender Bakterien transient verringern. Diese Populationsschwankungen waren unabhängig von der Anwendung des entsprechenden Herbizids. Die Gesamtzahl der Bodenpilze wurde durch die Freisetzung der GVMO dauerhaft verringert. Die Geschwindigkeit dieser Abnahme nahm durch die Anwesenheit des Herbizids stark zu. Ohne 2,4-D war der Effekt nach 53 Tagen sichtbar, in 2,4-D angereichertem Boden schon nach 18 Tagen. Der Abbau des Herbizids führte zur Anreicherung eines toxischen Zwischenprodukts (2,4-Dichlorphenol) im Boden (DOYLE et al., 1991).

Durch die Freisetzung von GVMO können neben der Mikroflora auch höhere Organismen beeinflusst werden. So könnte die Freisetzung von Rhizobien mit verbesserter Stickstofffixierung über eine Erhöhung des Stickstoffgehaltes im Boden die Pflanzenpopulation verändern und z.B. zur Ansiedlung neuer Unkräuter führen (GIDDINGS, 1998).

4.1.1.3 Persistenz und Verbreitung der Genkonstrukte

Mikroorganismen sind generell in der Lage, genetisches Material innerhalb einer Art aber auch zwischen verschiedenen Arten zu transferieren. Solche Gentransferereignisse sind Teil der natürlichen Evolution und haben z.B. dazu geführt, dass heute verschiedene Bakterienarten gleiche oder ähnliche Antibiotikaresistenzgene enthalten (ECKELKAMP et al., 1998b). Bei Risikoüberlegungen zur Freisetzung von GVMO ist also zu beachten, dass die freigesetzten Mikroorganismen selbst Gene von anderen Mikroorganismen erwerben und so ihre ökologischen Eigenschaften verändern können. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, dass GVMO ihre Transgene an endogene Mikroorganismenpopulationen weitergeben.

4.1.1.3.1 Persistenz

Die Wahrscheinlichkeit, dass Gentransferprozesse stattfinden können, hängt in hohem Maße von der Menge und vor allem von der Stabilität isoliert vorliegender DNA ab. Der aktuelle Stand der wissenschaftlichen Diskussion zur DNA-Stabilität in verschiedenen Umweltmedien ist bei ECKELKAMP et al. (1998a) und TAPPESER et al. (1999) zusammengefasst. In Kläranlagen erfolgt die Degradation von isolierten Nukleinsäuren in der Regel schnell und vollständig. Unter bestimmten Bedingungen kann aber auch dort intakte DNA über einen längeren Zeitraum nachgewiesen werden. Insbesondere die Bindung an Klärschlammflocken ermöglicht eine längere Persistenz isoliert vorliegender DNA (AARDEMA et al., 1983; GROSS et al., 1994). Auch in aquatischen Medien wird „nackte“ DNA vor dem Abbau weitgehend geschützt, wenn sie an Partikel assoziiert ist. In partikelarmen Gewässern wird freie DNA

hingegen im allgemeinen rasch abgebaut (AARDEMA et al., 1983; ALVAREZ et al., 1996; MIESCHENDAHL & DANNEBERG, 1994; ROMANOWSKI et al., 1993a). Im Boden können Nukleinsäuren in Abhängigkeit vom Bodentyp, insbesondere dem Mineraliengehalt, sehr persistent sein. Dass in Böden häufig über lange Zeit eine intakte DNA-Struktur gewahrt bzw. DNA-Abschnitte mit kompletten Genen erhalten bleiben, zeigen zahlreiche Transformationsexperimente (KHANNA & STOTZKY, 1992; LORENZ & WACKERNAGEL, 1987; LORENZ et al., 1988; LORENZ & WACKERNAGEL, 1992; 1994; PAGET et al., 1992). Auch im Verdauungstrakt werden Nukleinsäuren entgegen früheren Annahmen nicht vollständig fragmentiert, sondern können über das Darmepithel auch ins Blut gelangen und in Leukozyten oder Zellen von Körperorganen aufgenommen werden (SCHUBBERT et al., 1997).

4.1.1.3.2 Verbreitung

Generell können Mikroorganismen genetisches Material durch Konjugation, Transduktion oder Transformation austauschen. Alle drei Transferarten wurden auch bei GVMO gefunden. Der Gen-Transfer von GVMO auf andere Organismen ist unter bestimmten Umweltbedingungen begünstigt. Totes organisches Material unter Kulturpflanzen, nährstoffreiche Komposte, Biofilme auf Blättern, Steine in Gewässern oder an Wurzeln wirken häufig förderlich auf Gentransferprozesse (ECKELKAMP et al., 1998a). Durch eine Übertragung von GVMO auf autochthone Mikroorganismen persistiert das Transgen möglicherweise länger in der Umwelt als der GVMO selbst. Ist das Transgen in einen anderen, u.U. unbekanntem Mikroorganismus transferiert worden, können die Folgen eines solchen Transfers nicht vorhergesagt werden.

- Die Konjugation ist in der Natur wahrscheinlich der effektivste Gentransfermechanismus. Er setzt jedoch physiologisch aktive, lebende Zellen voraus. Es werden meist Plasmide übertragen, seltener auch chromosomale Gene. Aus Sicherheitsgründen fehlen Plasmiden, die im Labor verwendet werden, in der Regel essentielle Strukturmerkmale für eine autonome Konjugation (nicht selbst-transmissible $\text{tra}^-/\text{mob}^-$ oder mob^+ -Plasmide). Allerdings können die in der autochthonen Organismen vorkommenden selbsttransmissiblen Plasmide bei einer Freisetzung von GVMO für eine konjugative Übertragung von nicht selbst-transmissiblen Plasmiden aus GVMO sorgen. Die Übertragung eines konjugativen Plasmids aus der autochthonen Mikroflora auf einen auf Zuckerrüben inokulierten gentechnisch veränderten *P. fluorescens* Stamm wurde von LILLEY & BAILEY (1997b) nachgewiesen. Somit kann die Wahrscheinlichkeit eines Transfers von Plasmiden aus GVMO zwar abgesenkt, aber nicht vollständig verhindert werden. Vor allem unter Selektionsdruck, z.B. durch das Vorhandensein von Antibiotika und Herbiziden, wird die Wahrscheinlichkeit der Übertragung nicht selbst-transmissibler Plasmide gesteigert (NATSCH et al., 1998a). Die aufgenommenen Plasmide stammten aus fünf genetisch verschiedenen Gruppen von großen konjugativen Quecksilberresistenz-Plasmiden.
- Werden konjugative Plasmide aus der autochthonen Mikroflora in GVMO aufgenommen, können auch Transgene, die auf dem bakteriellen Chromosom lokalisiert sind, mobilisiert werden. TROXLER et al. (1997a) konnten z.B. zeigen, dass chromosomal lokalisierte Markergene bei Anwesenheit konjugativer Plasmide aus *Pseudomonas aeruginosa* übertragen werden können.
- Demnach kann die Lokalisation der rekombinanten Gene auf dem Chromosom einen horizontalen Gentransfer nicht vollständig verhindern. Für eine Mobilisierung chromosomaler Gene ist es Voraussetzung, dass der GVMO entweder selbst ein konjugatives Plasmid besitzt oder aus der Umgebung aufnimmt. Die Frequenz, mit der konjugative Plasmide aufgenommen werden, ist unbekannt. Eine wichtige Einflussgröße auf die Übertragungsfrequenz ist der Selektionsdruck (NATSCH, 1998).

- Transduktion ist ein bakteriophagen-vermittelter DNA-Transfer zwischen Bakterien. Sie wurde unter natürlichen Bedingungen in Süß- und Salzwasser, auf Blattoberflächen von Pflanzen und in Starterkulturen von Joghurt nachgewiesen (RIPP & MILLER, 1995; CHIURA, 1997; KIDAMBI et al., 1994; HELLER et al., 1996). Bakteriophagen infizieren häufig mehr als eine Bakterienart. Vor allem in Umweltbereichen mit hohen Phagentitern und hohen Wirtskonzentrationen, wie sie u.a. beispielsweise auf Partikeln als Mikroumwelten gegeben sind, kann Transduktion zu Gentransferprozessen beitragen. Durch Transduktion können Gene und sogar Plasmide zwischen verschiedenen bakteriellen Wirten vollständig übertragen werden (ECKELKAMP et al., 1998a).
- Persistiert rekombinante DNA über einen längeren Zeitraum in der Umwelt, kann sie u.U. über Transformationsprozesse in Zellen der autochthonen Mikroflora aufgenommen werden. Eine Voraussetzung dafür ist, dass einzelne Arten der autochthonen Mikroflora, natürlicherweise kompetent werden. Welche Mikroorganismenarten diese Fähigkeit haben, ist bisher nur unvollständig bekannt. Auch die Umgebungsbedingungen, die zur Kompetenzentwicklung führen, sind nur in wenigen Fällen bekannt. Eine weitere Voraussetzung für eine erfolgreiche Transformation ist die Überwindung des Restriktionssystems der Empfängerbakterien (ECKELKAMP et al., 1998a). Jedoch ist nicht nur die DNA-Aufnahme, sondern auch ihre Integration in ein Replikon Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung rekombinanter DNA in der natürlichen Mikroflora. Für die Integration ins Bakteriengenom scheint der Grad der Sequenzübereinstimmung ausschlaggebend. In vielen Fällen wird dadurch die erfolgreiche Transformation mit artfremder DNA verhindert. Dieser Mechanismus stellt aber keine absolute Barriere dar, da z.B. auch in heterologen Nukleinsäuremolekülen Regionen mit Sequenzübereinstimmung vorliegen können. Ausserdem können durch transposable Elemente homologe Bereiche hergestellt werden.
Die erfolgreiche Transformation mit Plasmiden benötigt keine Sequenzübereinstimmungen. Entscheidend ist hier das Vorhandensein passender Replikationsursprünge und entsprechender Promotoren. Die aufgenommene DNA kann sowohl über die Expression ihrer kodierenden Abschnitte als auch über den Ort ihrer möglichen Integration Einfluss auf die transformierten Bakterien und deren Überleben haben (ECKELKAMP et al., 1998a).
- Bei Untersuchungen von Klärschlammproben aus einem bayerischen Klärwerk konnten Vektorsequenzen in Klärschlammorganismen nachgewiesen werden, die mit Sequenzen aus Klonierungsvektoren identisch sind und die Vermutung nahelegen, dass diese Sequenzen über Transformationsereignisse von autochthonen Mikroorganismen aufgenommen wurden (LFU BAYERN, 1994).

4.1.1.4 Sekundäreffekte der Transformation

Vielfach ist es bei gentechnischen Veränderungen unmöglich, die transferierten Gene im Empfänger genom gezielt zu plazieren. Daher können Transgene am Integrationsort Gene zerstören oder die Wechselwirkung zwischen den Genen verändern und neue Wechselbeziehungen knüpfen (JÄGER, 1994). Auch die Funktion der neu eingebrachten Gene kann durch die neue Umgebung beeinflusst werden, da der Informationsgehalt der Gene nicht nur durch die Abfolge der Molekülbausteine, sondern auch durch die Umgebung im Genom geprägt wird. Pleiotrope und Positionseffekte³ sind bisher nicht vorhersehbar. Denn während die Abfolge der DNA-Bausteine heute leicht entschlüsselt werden kann, steht man bei der

³ POSITIONSEFFEKT: Effekte, die darauf beruhen, dass ein Gen je nach seiner Lage im Genom eines bestimmten Organismus verschiedene Wirkungen haben kann. PLEIOTROPIE: Die phänotypische Wirkung eines Gens auf mehr als ein Merkmal.

Analyse dieser komplexen übergeordneten Kontextabhängigkeit der genetischen Information erst am Anfang. Durch solche Effekte könnten ökologisch wichtige Eigenschaften von GVMO verändert werden. Von vielen Autoren wird angenommen, dass Sekundäreffekte der Transformation die Fitness der betroffenen GVMO herabsetzen und daher das Risiko eher verkleinern als vergrößern (REGAL, 1988; WILLIAMSON & FITTER, 1996). Allerdings ist diese Annahme in einigen Fällen bereits widerlegt worden. Z.B. hat die Transformation eines Rhizobien-Stammes mit einem *Bt*-Toxingen durch Giddings (GIDDINGS et al., 1997) dazu geführt, dass der transgene GVMO Erbsen-Knöllchen besser besiedeln konnte als der nicht-transgene Elternstamm. Diese Eigenschaft des GVMO war eine Nebenwirkung der Transformation und nicht auf die klonierte *Bt*-Sequenz zurückzuführen, die lediglich eine erhöhte Schädlingsresistenz vermitteln sollte. Die Eigenschaft des GVMO blieb zudem über drei Jahre lang stabil erhalten.

4.2 Mikroorganismen, fallspezifisch

4.2.1 Überblick

Doyle et al. haben 1995 einen ersten Review-Artikel geschrieben, der den Kenntnisstand zu Effekten von GVMO in verschiedenen Umweltmedien zusammenfasst (DOYLE et al., 1995). Obwohl mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen verschiedenster Größenordnungen vom Labor bis zur kommerziellen Anlage mittlerweile auf tagtäglich Basis umgegangen wird und dies auch bereits 1995 der Fall war, waren bis zu diesem Zeitpunkt nur ca. 15 bis 20 GVMO auf mögliche Umweltwirkungen hin untersucht (siehe Tabelle 1).

In ihrer Auswertung kommen die Autoren zu folgender Einschätzung: GVMO können

- erfolgreich mit indigenen Mikroorganismen von gestörten Ökosystemen konkurrieren,
- ihre neuen Gene an indigene Organismen transferieren und diese können in den neuen Wirten auch experimentiert werden,
- allgemeine und spezifische Stoffwechselaktivitäten sowie den Umsatz von Biomasse beeinflussen,
- die Struktur von Lebensgemeinschaften und ihre Funktionen in unterschiedlichen Habitaten beeinflussen,
- Interaktionen zwischen Symbionten und Organismen verschiedener trophischer Ebenen verändern und
- Stoffwechselprodukte hervorbringen, die unerwartete Wirkungen auf die Umwelt ausüben.

Bezogen auf die konzeptionelle Ausgestaltung solcher Untersuchungen betonen die Autoren, dass eine größere Anzahl unterschiedlicher Tests notwendig ist, um mögliche Umweltwirkungen wirklich erfassen und bewerten zu können.

Tab. 1: Übersicht über mit Mikroorganismen durchgeführte Freisetzungsversuche mit ökologischen Fragestellungen (Stand 1995)

Organism	Medium tested	Source
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	aquatic	SCANFERLATO et al., 1989; SCANFERLATO et al., 1990
<i>Pseudomonas sp. B13FR1</i>	aquatic	WAGNER-DÖBLER et al., 1992
<i>Alcaligenes sp.</i>	aquatic	FULTHORPE and WYNDHAM, 1989, 1991, 1992
<i>Pseudomonas putida</i>	activated sludge	McCLURE et al., 1991a,b
<i>Erwinia carotovora subsp. carotovora</i>	soil	ORVOS et al., 1990
<i>Streptomyces lividans</i>	soil	WANG et al., 1989; WANG et al., 1990
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	soil	AUSTIN et al., 1990 WILLIAMSON and HARTEL, 1991
<i>Azospirillum lipoferum</i>	soil	BENTGEN et al., 1989; BOLTON et al., 1991a,b; FREDRICKSON et al., 1989, 1990
<i>Pseudomonas cepacia</i>	soil	BEG et al., 1991
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	soil	TREVORS 1991
<i>E.coli (two strains)</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pseudomonas putida (two strains)</i>	soil	DOYLE and STOTZKY, 1993; STOTZKY et al., 1992
<i>Pseudomonas syringae</i>	plants	LINDOW and PANOPOULOS, 1988
<i>Lactobacillus plantarum</i>	plants	SHARP et al., 1992
<i>Clavibacter xyli subsp. Cyrodontis</i>	plants	FESTER, 1992
<i>Pseudomonas aureofaciens</i>	Plants	ENGLAND et al., 1993
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	Plants	NAMBIAR et al., 1990
<i>Rhizobium leguminosarum bv viciae</i> <i>R. leguminosarum bv trifolii</i>	Plants	SKOT et al., 1990

Quelle: DOYLE et al. (1995)

Ein Teil der zitierten Arbeiten wurde in Mikrokosmen und Gewächshäusern durchgeführt, einige wenige wurden als Freisetzungsexperimente konzipiert wie z.B. die Versuche mit dem sogenannten ice-minus Bakterium *P.syringae*.

4.2.2 Ice Minus: *Pseudomonas syringae*

Eine der ersten und bekanntesten Freisetzungen von GVMO erfolgte mit dem „Ice-Minus“ Stamm eines gentechnisch veränderten *Pseudomonas syringae* (Frostban), durch den Frostschäden von Pflanzen verringert werden sollten (LINDOW, 1987). Der GVMO enthielt eine Deletion im sogenannten iceC Gen. Das durch dieses Gen gebildete Protein dient als Kristallisationskeim beim Gefrieren von Wasser. Diese Eigenschaft führt in der Landwirtschaft zu Frostschäden, da das Bakterium die Eisbildung auch schon knapp unter 0°C fördert. Durch die Deletion des IceC-Gens sollte die Eiskristallbildung verhindert werden. Im Labor waren die Ice-Minus GVMO in der Lage, erfolgreich mit den Ausgangsstämmen zu konkurrieren und konnten die Frostschäden verringern. Die Arbeitsgruppe Lindow et al. ha-

ben die GVMO auch im Freiland auf Erdbeer- und Kartoffelfeldern gesprüht und die Populationsdynamik der Bakterien auf den Pflanzen studiert (LINDOW & PANOPOULUS, 1988). Die GVMO zeigten im Boden keine hohe Überlebensfähigkeit. Im Freiland konnten die Ice-Minus Bakterien 30m vom Freisetzungsort entfernt nicht mehr detektiert werden. Die Bakterien waren auch nicht in der umgebenden Vegetation oder im Oberflächenwasser nachzuweisen. In der Nachbarschaft wachsender Weizen war jedoch schon vor Beginn der Sprühversuche mit hohen Konzentrationen autochthoner Ice-Plus *P. syringae*-Stämmen besiedelt worden, was eine Besiedlung durch GVMO verhindert haben könnte. Die GVMO wurden allerdings mit Selektivmedien und spezifischen DNA-Sonden nachgewiesen. Die Detektionsgrenze für diese Methode wurde von den Autoren nicht angegeben. Die Angaben zur Überlebensfähigkeit sind damit mit Unsicherheiten behaftet (VON SCHELL, 1992).

4.2.3 *Klebsiella planticola*

Mit einem Versuchsdesign, das Lebensraum und Nährstoffverhältnisse möglichst genau nachahmt, hat eine Arbeitsgruppe um die Bodenökologin INGHAM die Überlebensfähigkeit und Auswirkungen von gentechnisch veränderten Klebsiellen in verschiedenen Bodentypen getestet. *Klebsiella planticola* ist ein harmloses Bodenbakterium, der Sicherheitsstufe eins zugeordnet, das mit einem zusätzlichen Gen zur Alkoholproduktion (dem Pyruvat-Decarboxylase-Gen aus *Zymomonas mobilis*) ausgestattet wurde. Zur Überprüfung ihrer Überlebens- und Konkurrenzfähigkeit wurden die gentechnisch veränderten Klebsiellen in Bodensäulen eingebracht, die unterschiedliche Ackerböden enthielten. Zwei Ergebnisse der umfangreichen Experimente sollen hier kurz vorgestellt werden.

1. Die gentechnisch veränderten Klebsiellen überlebten in allen getesteten Bodentypen, auch wenn die Alkoholproduktion nicht in allen Bodentypen stattfand. Die Anwesenheit von wachsenden Pflanzen wirkte sich positiv auf das Überleben der gentechnisch veränderten Klebsiellen aus und veränderte die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Organismen der Bodenflora und -fauna.
2. Die untersuchten gentechnisch veränderten *Klebsiella planticola* verursachten in bestimmten Böden, dass darauf wachsende Pflanzen abstarben. Dieser Effekt scheint auf einer Wirkungskaskade zu beruhen. Nach Inokulation des transgenen Stammes nehmen diejenigen Nematoden im Boden signifikant zu, die sich von Bakterien und Bodenpilzen ernähren. Besonders die pilzfressenden Nematoden scheinen über einen nicht geklärten Wirkungszusammenhang am Absterben der Pflanzen beteiligt zu sein.

Daraus lässt sich schließen, dass die Wirkungen eines gentechnisch veränderten Organismus nicht nur auf direktem Weg, also in der unmittelbaren Wirkung auf einen spezifischen Zielorganismus zu erwarten sind, sondern dass über Wirkungsketten und Verschiebungen in der Populationsdichte und Populationszusammensetzung anderer Organismengruppen Effekte ausgelöst werden können (HOLMES, 1995; HOLMES et al., 1998)

4.2.4 Rhizobien

In einem Verbundprojekt, an dem fünf Arbeitsgruppen beteiligt waren, wurden in der Bundesrepublik Deutschland transgene *SinoRhizobium meliloti* freigesetzt. 1994 fanden die Freisetzungen in Bodensäulen statt, 1995 dann auf freiem Boden (KELLER et al., 1997). Bei den transgenen Bakterien handelte es sich um zwei Modellstämme. Beide wurden mit dem konstitutiv exprimierten *luc*-Gen aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) transformiert. Beim Stamm L1 war das Fremdgen in das endogene *RecA*-Gen inseriert, wodurch diese Bakterien *recA*-defizient sind. Beim *luc*-transgenen *S. meliloti* Stamm L33 war die *recA*-Funktion dagegen intakt (SELBITSCHKA et al., 1994).

Unter Laborbedingungen in Flüssigkulturen und Mikrokosmen zeigte der RecA⁻-Stamm erwartungsgemäß eine erhöhte Empfindlichkeit gegen DNA-schädigende Agenzien und eine geringere Überlebensfähigkeit sowie Nodulierungskompetitivität im Vergleich zum RecA⁺-Stamm, der als Wildtyp betrachtet wurde. Die Freisetzungsversuche dienten dazu, den Gebrauch des RecA⁻-Stammes als Sicherheitsstamm zu testen (KELLER et al., 1997).

Im Experiment mit Bodensäulen im Freiland schienen sich die Erwartungen insoweit zu erfüllen, als nur der RecA⁺-Stamm nach einer Zellzahlabnahme zu Beginn des Versuchs (von 10⁶ auf 10⁴ CFU/ g Boden in sechs Monaten) wieder etwas Wachstum zeigte (10⁵ CFU/ g Boden nach zwölf Monaten). Der RecA⁻-Stamm dagegen blieb nach der anfänglichen Zellzahlabnahme sechs Monate konstant auf dem Niveau von 10⁴ CFU/ g Boden.

Bei der Freisetzung auf freiem Boden nahm die Zellzahl des Rec A⁻-Stammes in den ersten drei Monaten etwas stärker ab, auf 3 × 10³ CFU/ g Boden, während es beim RecA⁺- Stamm 3 × 10⁴ CFU/ g Boden blieben. Nach sieben Monaten erreichten jedoch beide Stämme 10⁴ CFU/ g Boden. Diese Besiedlungsdichte blieb über mehrere Jahre erhalten. Es konnten insgesamt keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen im Freiland nachgewiesen werden (MIETHLING et al., 1999). In einem Fall wirkte sich Hitzestress allerdings nachteiliger auf den Rec A⁻ als auf den RecA⁺-Stamm aus (DRESING et al., 1998). Ausserdem wurden transgene Bakterien auch ausserhalb der Flächen gefunden, auf denen sie appliziert worden waren. Dafür soll vor allem Aerosolbildung bei der Ausbringung verantwortlich gewesen sein (KELLER et al., 1997; LOTZ et al., 1999). Allerdings können Bakterien auch, wahrscheinlich durch Auswaschung, in zwei bis vier Jahren über Distanzen von über 100 m verbreitet werden (SIEBER et al., 1994). Auf den nicht mit transgenen Bakterien inokulierten Flächen wurden sie mit 10² CFU/ g Boden gefunden und in der Rhizosphäre von Luzerne und einer Nichtwirtspflanze in 10⁵ CFU/ g Wurzelnassgewicht.

In den Faeces von Insekten auf den inokulierten Flächen wurden einige GVMO nachgewiesen (KELLER et al., 1997).

1995 und 1996 fanden ebenfalls Rhizobienfreisetzungsversuche in Italien statt. Auch diese Rhizobien trugen nur ein Markergen (lacZ). Die Nodulierungsfähigkeit der gentechnisch veränderten Rhizobien war teilweise herabgesetzt, die Überlebensfähigkeit der getesteten Stämme dagegen gut. Nach einem Jahr konnten in allen beimpften Parzellen noch 10²-10⁴ cfu/g Boden nachgewiesen werden (NUTI et al., 1997).

Im Rahmen des Projektes wurden auch Methoden entwickelt, die einen Einfluss der gentechnisch veränderten Rhizobien auf endogene Populationen kultivierbarer Rhizosphärenbakterien zu erfassen in der Lage sind. Aussagekräftige Ergebnisse konnten allerdings noch nicht erzielt werden (TICHY & SIMON, 1999).

Insgesamt ist das dargestellte Projekt zur Methodenentwicklung und Überprüfung sehr geeignet. Allerdings dürfte es wenige Hinweise für das Verhalten der entsprechenden Bakterien beinhalten, da die kommerziell interessanten Eingriffe und Veränderungen, die auf eine Beeinflussung der Nodulationsmöglichkeiten und Stickstofffixierleistung abzielen unter Etablierungs-, Verbreitungs- und Konkurrenzaspekten sicher andere Umweltwirkungen aufweisen.

In einem Report, der von nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Environmental Protection Agency in den USA stammt, wird auf einige Inkonsistenzen und Probleme im Rahmen der Zulassung eines Rhizobienstammes hingewiesen. Hier geht es weniger um beobachtete Auswirkungen als um nicht durchgeführte oder weiter validierte Sicherheitsuntersuchungen. Dazu zählen die AutorInnen u.a.:

- Gentransferuntersuchungen zu nah verwandten Bakterien wie Agrobakterien und Phylobakterien aber auch zu tierpathogenen Verwandten wie Bartonella u.a.;
- aussagekräftige Besiedlungsversuche mit anderen Leguminosen, insbesondere auch solchen, die Unkrautprobleme verursachen (PEER, White Paper, 1995).

Insgesamt wurde eine Besiedlungsfähigkeit anderer Leguminosen durch den zur Kommerzialisierung anstehenden RMBPC-2 Stamm festgestellt (COMMERCIALISATION REQUEST, Dec. 1994).

4.2.5 *Pseudomonas sp.*

RAMOS et al. (1997) testeten schadstoffabbauende transgene *Pseudomonas putida*, die in zwei Feldversuchen in Töpfen ausgebracht wurden. Die Versuche sollten die Funktionstüchtigkeit eines biologischen Sicherheitssystems zeigen, das diese Bakterien enthalten. Dieses *suicide*-System ist mit der gentechnisch vermittelten Fähigkeit der Bakterien, 3-Methylbenzoesäure (3MB) abzubauen, gekoppelt: Sowie das Substrat 3MB fehlt, soll das aus *Escherichia coli* in die Pseudomonaden transferierte *gef*-Gen angeschaltet werden. Das Gef-Protein, das in die Zellmembran eingebaut wird, führt zum Zelltod, indem es den Zusammenbruch des Membranpotentials verursacht.

Im einzelnen steht dahinter eine komplizierte gentechnische Konstruktion: Das *gef*-Gen wurde mit dem *P_{lac}*-Promotor gekoppelt. Der *P_m*-Promotor, der die Gene des 3MB-abbauenden Operons steuert, wurde mit dem *lacI*-Gen fusioniert, das für den LacI-Repressor kodiert. Wenn der Substrat-abhängige *P_m*-Promotor aktiv ist, soll das *gef*-Gen über den LacI-Repressor inaktiviert sein. Ist der *P_m*-Promotor dagegen aufgrund von Substratmangel inaktiv, wird kein LacI-Repressor gebildet und Gef-Protein synthetisiert.

Soweit die Theorie. Sie wurde in Laborversuchen mit zwei transgenen *P. putida* Stämmen bestätigt.⁴ GVMO mit dem schadstoffabbauenden Operon ohne *suicide*-System gediehen mit und ohne 3MB gleich gut. Die transgenen Stämme mit dem Selbstmordgen wuchsen dagegen nur bei Zugabe von 3MB. Diese Ergebnisse wurden sowohl in flüssigen Minimalmedien als auch in terrestrischen und aquatischen Mesokosmen erzielt.

Bei den 1995-1996 in Spanien durchgeführten Freisetzungsversuchen mit diesen Bakterien wurden Varianten mit und ohne 3MB sowie mit und ohne Pflanzenbewuchs (*Zea mays*) gewählt. Die Versuche dauerten 112 Tage, und es wurde keine Verbreitung von GVMO außerhalb der Töpfe gefunden. Überraschenderweise konnten beide „Sicherheitsstämme“ mit dem Selbstmordsystem die Wurzeln der Pflanzen besiedeln, unabhängig davon, ob der Boden 3MB enthielt oder nicht.

Dies lässt sich möglicherweise als eine evolutive Anpassung interpretieren wie sie VELICER (1999) in Freilandversuchen mit natürlichen Isolaten der Gattung Burkholderia feststellen konnte. Zwei Stämme, die die Fähigkeit erworben hatten, das Herbizid 2,4-D abzubauen, wurden daraufhin geprüft, inwieweit sie über die Zeit auch die Fähigkeit aufbauen, alternative C-Quellen besser zu nutzen und damit einen Fitnessgewinn erzielen. Von zwanzig getesteten Linien zeigten fünf einen deutlichen Fitnesszuwachs. Velicer interpretiert seine Ergebnisse so, dass die Adaptation an anthropogene Substrate die Konkurrenzfähigkeit insofern erhöhen kann, dass parallel aufgrund pleiotroper Effekte der Adaptation eine bessere Nutzung natürlicher Substrate ermöglicht wird. Dies steigert nach seiner Einschätzung die Wahrscheinlichkeit, dass gentechnisch veränderte Mikroorganismen in der Umwelt persistieren werden, auch wenn ihnen das anthropogene Substrat entzogen wird (resp. es abgebaut ist).

Eine phänotypische Anpassung über die Zeit fanden auch GERMIDA et al. (1998) bei Freisetzungsversuchen von gentechnisch veränderten *Pseudomonas aureofaciens* mit *lacZY* als Markergen. Allerdings war diese nicht sehr ausgeprägt. Die Persistenz des Stammes unter Freilandbedingungen war im Bodenlysimeter allerdings sehr hoch.

⁴ Der eine Stamm (*P. putida* EEZ30) trägt das Selbstmordgen im Chromosom und das Kontrollelement auf einem *mob⁺tra⁻*-Plasmid. Beim anderen Stamm (*P. putida* CMC4) sind beide Elemente ins Chromosom integriert.

In Versuchen mit *Pseudomonas fluorescens*, die bei Abbau von Naphthalen fluoreszieren, wurde in Oake Ridge die Überlebensfähigkeit dieser Bakterien in Aerosolen überprüft. Die beste Überlebensfähigkeit und damit Verbreitungsmöglichkeit zeigten diese Bakterien bei geringer relativer Luftfeuchtigkeit und wenig Wind. Einmal im Boden etabliert, wiesen sie eine hohe Persistenz auf (FORD et al., 1999)⁵.

Interessante Ergebnisse erzielten auch TCHELET et al., (1999). *Pseudomonas sp* Stamm P 51, der in der Lage ist 1, 2, 4'-Trichlorbenzol (TCB) abzubauen, wurde einmal in Mikrokosmen getestet, die mit Klärschlamm einer Abwasseranlage mit und ohne TCB gefüllt wurden. Das andere Testsystem bestand aus einer wassergesättigten nichtsterilen Bodensäule. In der Bodensäule konnten sich die Bakterien vollständig verteilen, wuchsen auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen im Boden an und bauten TCB kontinuierlich ab. In den Klärschlammssäulen mit TCB sank der Bakterientiter direkt nach Inokulation um zwei Zehnerpotenzen ab. Nach mehr als zwei Tagen sank die Zellzahl unter die Nachweisgrenze. Ein Abbau von TCB fand kaum statt. In der Klärschlammssäule ohne TCB-Zugabe hielt sich der Zelltitel über acht Tage auf 10^5 Zellen/ml (Animpfkonzentration 10^7), sank dann allerdings auch unter die Nachweisgrenze. Diese Experimente zeigen, wie groß der Umgebungseinfluss auf das Überleben einzelner Stämme ist und dass abhängig von der Umgebung unterschiedliche Wirkungen oder enzymatische Leistungen vollzogen werden.

4.3 Pflanzen

4.3.1 Allgemeine Recherche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte

4.3.1.1 Ausbreitung

Die (unerwünschte) Ausbreitung transgener Pflanzen wird in der Regel als Risiko betrachtet. Dabei stehen agronomische Überlegungen im Vordergrund: Es wird ein erhöhter Aufwand für die Bekämpfung transgenen Durchwuchses oder transgener Unkräuter und -gräser befürchtet. Das Ausbreitungspotential gentechnisch veränderter Pflanzen wird jedoch auch als ökologisches Risiko betrachtet, für das allerdings kein einheitlicher Bewertungsmaßstab besteht. Die Verdrängung anderer tierischer oder pflanzlicher Arten wird i. a. als Schaden angesehen. Es ist jedoch umstritten, inwieweit die Steigerung einzelner Fitnessparameter (Überlebensfähigkeit, Samenproduktion u. a.) oder des Potentials zur Verdrängung einzelner Populationen von Organismen über das Niveau der nichttransgenen Vergleichspflanzen hinaus als Indikator zukünftiger, längerfristig zu erwartender Verdrängungsprozesse zu bewerten ist.

SUKOPP & SUKOPP (1993) haben für die Etablierung exotischer Pflanzen mittlere Zeithorizonte von 32, 68 bzw. 147 Jahren für ein- oder zweijährige Arten, ausdauernde Stauden bzw. Gehölzarten ermittelt. Vor dem Hintergrund dieser, experimentell schwerlich zu durchmessenden Zeiträume erscheint es unabdingbar, Indikatoren für spätere Verdrängungsprozesse in die Risikoabschätzung einzubeziehen.

Ob schließlich das Einbringen von Genen und Gensequenzen in gänzlich neue, evolutionär vor langer Zeit voneinander getrennte genetische Zusammenhänge ein ökologisches Risiko bedeutet, ist offen und wird zumeist verneint. Es ist aber nicht geklärt, welche Wirkung die Konfrontation von Rhizosphärenorganismen mit Pflanzenwurzeln, die das Enterobakterientypische Kanamycin-Resistenzgen *npt II* exprimieren, auf deren Populationsdynamik und -genetik hat – unabhängig von der Möglichkeit eines horizontalen Transfers dieses Gens. Wenn diese Betrachtungsweise ernstgenommen wird, wird der Bezugspunkt der nichttransgenen Kontrollpflanzen, mit denen die transgenen Pflanzen bei Risikoabschätzungen ver-

⁵ Der getestete Zeitraum wird nicht angegeben. Die Formulierung lautet „over long periods“.

glichen werden sollten, relativiert – wobei auch dieser Vergleich mit Kontrollpflanzen oft unterbleibt und zudem methodisch uneinheitlich gehandhabt wird (PURRINGTON & BERGELSON, 1995; BERGELSON et al., 1996). Dann wäre nicht mehr allein die Frage ausschlaggebend, ob die transgene Pflanze die nichttransgene Vergleichspflanze in ihrem Ausbreitungspotential übertrifft, sondern die Einführung von bisher evolutionär getrennten DNA- und Proteinsequenzen in neue ökologische Zusammenhänge als solche würde als Novum, das einer Folgenabschätzung bedarf, betrachtet.

In die Vorababschätzung des Ausbreitungspotentials transgener Pflanzen gehen i. a. die bekannten Eigenschaften der nichttransgenen Elternpflanzen und die beabsichtigten, durch das/die Transgen/e vermittelten neuen Eigenschaften ein. Als „Risikokandidaten“ unter den Pflanzen gelten jene, die bereits ein gewisses Unkraut- oder Verwilderungspotential besitzen. Problematisch ist, dass diese Einschätzung zwischen Ländern und Regionen stark differieren kann und dass sie eine eingehende Kenntnis und aktuelle Erfassung der Flora im Gebiet der intendierten Freisetzung bzw. Vermarktung voraussetzt. Zudem spielen – zumindest in manchen Fällen – Unterschiede in den Eigenschaften der Ausgangsvarietäten eine Rolle. Beispielsweise wird auf solche Unterschiede eine große Variabilität der Überdauerungsfähigkeit von Rapssamen zurückgeführt (SCHLINK, 1994). Schließlich beeinflussen Bewirtschaftungsmethoden die Überdauerung und Verbreitung von Kulturpflanzen. So können Rapssamen in tieferen Bodenschichten eine sekundäre Dormanz entwickeln (DIETZ-PFEILSTETTER et al., 1999) und wird ein unbekannter, aber erheblicher Anteil verwilderter Kulturpflanzenpopulationen auf die unbeabsichtigte anthropogene Verbreitung von Diasporen zurückgeführt (SNOW et al., 1998).

Neben der Ausgangspflanze spielen die mit Hilfe der Gentechnik übertragenen Gene und Genkonstrukte eine zentrale Rolle bei der Vorabrisikoeinschätzung. Der Einfluss der beabsichtigten gentechnischen Eigenschaftsveränderung auf das Ausbreitungsverhalten von GVO ist allerdings weitgehend unklar. Es gibt wenig Untersuchungen zum Thema und sowohl die Erwartungen hinsichtlich des Ausbreitungspotentials von GVO als auch die Interpretation der Daten differieren zwischen verschiedenen ExpertInnen. Es gibt eine umfangreiche Diskussion über die Frage, ob die Expression eines Transgens an sich den Energiehaushalt der transgenen Pflanzen soweit beeinflusst, dass sie in ihrer Ausbreitungsfähigkeit gegenüber der nichttransgenen Vergleichspflanzen benachteiligt wird (*genetic load-* oder *excess baggage-*Theorie). Auch wenn diese Frage wissenschaftlich nicht abschließend geklärt sein sollte, so ist sie doch hinsichtlich ihrer Relevanz für Risikoabschätzungen geklärt: Die Einführung von Transgenen **kann** zumindest ohne negativen Einfluss auf den Energiehaushalt der betreffenden Pflanze bleiben – unabhängig vom evtl. Fitness-beeinflussenden Potential der spezifischen gentechnisch vermittelten Eigenschaft (z. B. BERGELSON et al., 1996; HAILS et al., 1997). Für Risikoabschätzungen muss daher davon ausgegangen werden, dass gentechnische Veränderungen nicht *per se* das Ausbreitungspotential der Pflanzen mindern und dass in der Regel über den Züchtungsprozess solche Linien selektiert werden, die keine Fitnessseinbußen gegenüber den Elternlinien aufweisen.

Schließlich haben viele gentechnische Veränderungen das erklärte Ziel, die Pflanzen widerstandsfähiger gegen Schädlinge, Krankheiten und abiotischen Stress zu machen, mithin gegen Faktoren, die zur Begrenzung des Ausbreitungspotentials beitragen können. Allerdings gibt es hierzu erstaunlich wenig ökologisches Basiswissen. Der Einfluss von Schädlings-, Krankheits- oder Stressresistenz auf die Ausbreitungsfähigkeit von Pflanzen ist wenig untersucht - unabhängig davon, ob es sich um gentechnisch vermittelte Eigenschaften handelt oder nicht (z. B. RAYBOULD et al., 1998; SNOW et al., 1998). Vor diesem Hintergrund ist es nicht überraschend, dass die Einschätzungen des Ausbreitungspotentials von Pflanzen differieren.

Beispiele für Transgene, die das Ausbreitungspotential von Pflanzen wahrscheinlich steigern, sind

- Insekten-, Pilz-, Virus-, Krankheitsresistenz
- Hitze-, Kälte-, Salz-, Stressresistenz
- Veränderte Samenlipide (LINDER & SCHMITT, 1995)
- Herbizidresistenz (ECKELKAMP et al., 1997a; SNOW et al., 1998)

„**Nebenwirkungen**“ der gentechnischen Veränderung sind einer Vorabeeschätzung des Einflusses auf das Ausbreitungspotential transgener Pflanzen nur schwer zugänglich. Sie machen sich dadurch bemerkbar, dass transgene Pflanzen oft nicht einfach als Summe aus den Eigenschaften der nichttransgenen Elternpflanzen und der absichtsvoll gentechnisch vermittelten Eigenschaften erscheinen. Ursachen können der nichtsteuerbare Integrationsort der Transgenkonstrukte, ihre höchstens im Nachhinein selektierbare Anzahl, und daher Integrationsmutagenese sowie Positionseffekte sein. Pleiotrope Effekte sowie – bei Pflanzen, die aus Zellkulturen regeneriert werden – somaklonale Variation kommen hinzu.

Vorabeeschätzungen des Ausbreitungspotentials auf der Grundlage der bekannten Eigenschaften der Ausgangspflanzen und Transgenkonstrukte müssen daher durch die Untersuchung der GVO selbst ergänzt werden. Hierzu sollen u. a. Freisetzungsversuche dienen. Vorgelagerte Labor- und Gewächshausversuche erscheinen allerdings sowohl aus Sicherheitsgründen als auch in Anbetracht des geringeren experimentellen Aufwands unerlässlich. Auch haben Labor- und Gewächshausversuche den Vorteil, dass sich hier beobachtete Effekte eher reproduzierbar mit bestimmten Faktoren korrelieren lassen.

4.3.1.2 Gentransfer

Der vertikale Gentransfer von Transgenen durch intraspezifische und interspezifische Hybridisierung in verwandte Kultur- und Wildpflanzenarten ist ein weiterer, viel diskutierter Sicherheitsaspekt der Nutzung gentechnisch veränderter Pflanzen (ELLSTRAND & HOFFMANN, 1990; RAYBOULD & GRAY 1993, 1994; SNOW & MORAN-PALMA, 1997). Umfangreiche Untersuchungen zum Hybridisierungspotential und den Wahrscheinlichkeiten wurden in Europa hauptsächlich für Raps und Zuckerrübe durchgeführt, da es sich hier um einheimische Pflanzen handelt. Die Möglichkeiten des Genflusses von Kulturpflanzen in nicht kultivierte Wildformen der gleichen Art oder in verwandte Arten stellen sich in den verschiedenen Weltregionen jeweils anders dar, da neben der Frage, ob die Freisetzung in einem „center of origin“ oder „center of diversity“ stattfindet, auch bezogen auf die gleiche Art in der Regel eine unterschiedliche Ackerbegleitflora und damit unterschiedliche Hybridisierungspartner in eine Risikoabschätzung einbezogen werden müssen. Besondere Besorgnis ruft die Möglichkeit hervor, dass wichtige landwirtschaftliche Unkräuter, die mit den entsprechenden Nutzpflanzen verwandt sind, über Auskreuzungen fitness-steigernde Eigenschaften erwerben können (DANIELS & SHEAIL, 1999). Im Rahmen von „normalen“ Freisetzungsversuchen sind in der Regel keine Erhebungen zum Hybridisierungsgeschehen gemacht worden. Hierzu wurden aber extra auf diese Fragestellung ausgerichtete Forschungsprojekte durchgeführt.

4.4 Beispiele für Pflanzen mit Ausbreitungs- und Hybridisierungspotential

4.4.1 Brassica napus (Raps)

4.4.1.1 Etablierungs- und Ausbreitungsmöglichkeiten

Die Vorkommen von Raps ausserhalb der Kulturlächen in Mitteleuropa werden unterschiedlich beurteilt. Oft wird von einem ephemeren Charakter der Population ausgegangen, und beständigere Populationen – etwa entlang von Straßen oder Eisenbahnlinien – werden durch eine stete Zufuhr an Samen aus Transportverlusten und/oder Störungen des Habitats erklärt (CRAWLEY et al., 1993). ADOLPHI (1995) schließt dies jedoch für Populationen im Rheinland aus, die sich dort etabliert haben. Raps kommt in Kanada verbreitet ausserhalb von Kulturlächen vor (WARWICK, 1997).

Rapssamen sind bis -20°C winterfest. Sie sind lange keimfähig, was sich auch darin zeigt, dass der Durchwuchs (Ausfallraps) in der Folgekultur beseitigt werden muss (TORGERSEN, 1996).⁶ Raps ähnelt mit seinem hohen Reproduktionspotential, seinem Wachstumsverhalten und seiner Keimungsökologie deutlich einem Ackerunkraut (SCHLINK, 1994).

Seit einigen Jahren wird ein verstärktes Auftreten von Raps ausserhalb von Äckern festgestellt. Auf Ruderalstandorten, an Ackerrändern und auch an Verkehrswegen sind häufig Rapspopulationen zu beobachten (SEBALD et al., 1990; TORGERSEN, 1996). TOMIUK et al. (1996b) folgern aus den neueren Entwicklungen, dass bei Raps „prinzipiell mit der Möglichkeit seiner Etablierung gerechnet werden“ muss. Da in verschiedenen Untersuchungen mit Herbizid-tolerantem Raps keine Unterschiede in den kompetitiven Eigenschaften zwischen transgenem und konventionellem Raps festzustellen sind, muss auch mit der Verwildерung von transgenem Raps gerechnet werden (AGREVO, 1996, S. 23; FREDSHAVN et al., 1995).

4.4.1.2 Freisetzungsversuche zum Ausbreitungspotential

CRAWLEY et al. (1993) haben in sehr umfangreichen Freisetzungsversuchen zwei transgene Rapslinien – die eine mit Resistenz gegen das Antibiotikum Kanamycin und das Herbizid Glufosinat, die andere nur mit Kanamycinresistenz – im Vergleich mit einer nichttransgenen Kontrolllinie sowie der wilden Rapsverwandten *Sinapis arvensis* L. untersucht. Die Versuche fanden an je vier verschiedenen Standorten in drei klimatisch unterschiedlichen Regionen Englands statt.

CRAWLEY et al. (1993) interpretieren diese Versuche so, dass die transgenen Pflanzen den nichttransgenen in ihrem Ausbreitungspotential nicht überlegen sind. HAILS et al. (1997) beschreiben im Detail die Ergebnisse dieser Freisetzungsversuche zur Überlebensfähigkeit der in zwei verschiedenen Tiefen in den Boden eingearbeiteten Samen. Sie kommen zum Ergebnis, dass die Überlebensfähigkeit der Samen der transgenen Pflanzen geringer sei als die der nichttransgenen Kontrolllinie. Dieses Ergebnis war nach zwei Untersuchungsjahren allerdings in nur fünf von zwölf Habitaten signifikant.

LINDER & SCHMITT (1995) untersuchten am Beispiel von Raps den Einfluss gentechnisch veränderter Samenlipide auf das Ausbreitungspotential der Pflanzen. Die Überlebensfähigkeit vergrabener transgener Rapssamen mit einem erhöhten Stearinsäuregehalt übertraf in Freilandversuchen an einem Standort in Georgia die Überlebensfähigkeit der Samen nichttransgener Kontrollen (Nullsegreganten und Elternlinien). An einem anderen Standort in

⁶ SCHLINK (1994) fand, dass nach 1,5 Jahren noch bis zu 70% und nach fünf Jahren bis zu 58% der Rapssamen im Boden keimfähig waren. So hohe Überdauerungsraten werden ansonsten nur von Unkrautsamen erreicht (MAYER et al., 1995).

Kalifornien wurde dagegen kein Unterschied zwischen den transgenen und nichttransgenen Samen gefunden. In Gewächshausversuchen hatte sich die Möglichkeit eines erhöhten Ausbreitungspotentials der transgenen Pflanzen nicht abgezeichnet. Hier übertraf zwar die Keimungsrate der vergrabenen transgenen Samen die der nichttransgenen Elternpflanzen, die transgenen Keimlinge blieben jedoch in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit und Biomasseentwicklung hinter den Kontrollen zurück.

Die Samen einer anderen transgenen Rapslinie mit erhöhtem Laurinsäuregehalt unterschieden sich im Gewächshaus nur hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Wachstumsgeschwindigkeit von den Elternpflanzen: Ein Entwicklungsrückstand der Keimlinge in den ersten beiden Wochen wurde in den folgenden zwei Wochen aufgeholt.

Dagegen glichen Hybride aus der transgenen Pflanze mit erhöhtem Laurinsäuregehalt und Rübsen in Gewächshausversuchen den wilden Eltern und übertrafen nichttransgene hybride Kontrollpflanzen hinsichtlich der Keimungs- und Wachstumsgeschwindigkeit. (LINDER & SCHMITT, 1995).

STEWART et al. (1997) beanspruchen für sich die erste Publikation über Freisetzungsversuche mit transgenen Pflanzen, in denen ein die Ausbreitungsfähigkeit steigernder Effekt des Transgens untersucht und gefunden wurde (siehe aber Kap. 4.4.2.2, BARTSCH et al., 1995). In diesen Versuchen wurden auf kultivierten Parzellen transgene insektenresistente Rapspflanzen mit einem *Bt*-Gen (je eine Linie mit starker bzw. schwacher Transgenexpression) mit den nichttransgenen kommerziellen Elternlinien (OSCAR und WESTAR) in Winteraussaat verglichen. Schädlingsbefall wurde in durch Zelte abgetrennten Parzellen simuliert. Die transgenen Pflanzen überlebten starken Schädlingsbefall besser als die Kontrollpflanzen. Bei schwachem Befall wurden keine signifikanten Unterschiede in der Überlebensfähigkeit festgestellt. Allerdings produzierten die transgenen Pflanzen im Durchschnitt sowohl bei mäßigem und als auch starkem Schädlingsbefall mehr Samen. Auf nichtkultivierten Flächen überlebten nur zwei transgene Pflanzen den Winter.

4.4.1.3 Hybridisierungsmöglichkeiten

Raps ist eine in Europa einheimische Pflanze mit einer Reihe von kreuzungsfähigen Verwandten. Lange Zeit wurde auch die Auskreuzung von Raps auf benachbarte Rapsfelder deutlich unterschätzt. Mögliche Ursachen hierfür sind, dass Hybridisierungen in Zusammenhang mit der spezifischen Erbausstattung und den Umweltparametern variieren. Auch das Versuchsdesign kann zu unterschiedlichen Einschätzungen der Hybridisierungsrate führen. So sind in der Literatur völlig unterschiedliche Daten zur Fremdbefruchtungsrate bei Raps angegeben (SCHEFFLER et al., 1993; FELDMANN, 1997; TIMMONS et al., 1995a). Versuche der oben genannten Arbeitsgruppen machen deutlich, dass die ermittelten Auskreuzungsraten in hohem Maße vom Versuchsdesign abhängig sind: Insgesamt gilt, dass mit wachsender Feldgröße die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die Transgene auch über größere Entfernungen verbreitet werden.

Ausserdem belegen die Ergebnisse von Kreuzungsexperimenten, dass ein von Raps ausgehender Genfluss in Wildkrautpopulationen stattfinden kann. Potentielle Hybridisierungspartner von *Brassica napus* finden sich hierbei nicht nur in der Gattung *Brassica* sondern auch in der weiteren Familie der Kreuzblütler (SCHEFFLER & DALE, 1994). Die potentiellen Hybridisierungspartner von Raps sind Wildkräuter, die wahrscheinlich alle in hohem Maße fremdbefruchtet werden. Diese hohe Fremdbefruchtungsrate erleichtert nach DARMENCY (1994) die Verbreitung von Transgenen aus Raps in die verwandten Beikräuter.

Genfluss von Raps zu Raps

Das National Institute of Agricultural Botany (NIAB) Cambridge, England hat begleitende Untersuchungen zum Genfluss zwischen transgenen und konventionellen Rapsorten in Sortenversuchen für die nationale Sortenliste durchgeführt. Es wurden zwei Glufosinat-resistente Winterraps-Sorten und eine Glyphosat-resistente Winterrapssorte getestet. Parallel dazu waren fünf nicht-transgene, kommerzielle Sorten in den Versuch integriert. Die Begleituntersuchungen wurden an vier verschiedenen Orten durchgeführt. Genfluss von transgenen zu nicht-transgenen Sorten wurde an drei Versuchsarten dokumentiert. Die Häufigkeit der Einkreuzung nahm allgemein mit der Entfernung ab, zeigte aber große Variabilität bezogen auf die nicht-transgenen Sorten. Vor allem die Sorte Synergy war auch in größerer Entfernung noch sehr „empfänglich“ für Fremdpollen. Doppelt tolerante Hybride gegen Glufosinat und Glyphosat wurden an allen Standorten gefunden (SIMPSON et al., 1999). Doppelt resistente Hybride wurden auch in Kanada unter kommerziellen Anbaubedingungen gefunden (DOWNEY 1999). Anfang 2000 wurde sogar der Fund von dreifach resistenten Rapspflanzen aus Alta im Bundesstaat Alberta/Kanada gemeldet (Western Producer, Saskatchewan, Canada vom 10. Februar 2000).

Versuche mit männlich sterilen Fangpflanzen in einer Entfernung von 400 m von den Versuchsfeldern verdeutlichten, dass Rapspollen über weite Entfernungen vom Wind getragen werden können und auch unter diesen Bedingungen bestäubungsfähig bleiben (SIMPSON et al., 1999). In weiteren Versuchen des Scottish Crop Research Institute wurde die regionale Verteilung von Rapspollen in benachbarte Felder unter möglichst realistischen landwirtschaftlichen Bedingungen getestet. In einem Bereich von 70 km² wurden an 52 Stellen männlich-sterile Fangpflanzenkolonien während der Blütezeit aufgestellt. Diese befanden sich in einem Abstand zwischen null und 4000 Meter von transgenen Anpflanzungen. Insgesamt wurde eine Region ausgewählt, in der ein großer Teil der landwirtschaftlichen Fläche mit konventionellem Raps bebaut wird.

Bei allen Fangpflanzen konnte eine Einkreuzung von transgenen Pollen festgestellt werden, deren Häufigkeit mit der Entfernung abnahm.

Allerdings wurde teilweise auch noch in größeren Entfernungen eine große Variabilität in der Einkreuzungshäufigkeit festgestellt (z.B. zwischen 13 % und 57,9 % in einer Entfernung von 500 m). Die Autoren schlussfolgern aus diesen Ergebnissen, dass es ein kontinuierliches Netzwerk von Kreuzhybridisierungen zwischen Rapspflanzen in jeder Anbauregion gibt.

Dieser ausgeprägte Genfluss wird nach ihrer Meinung zu Ausfallraps und ausgewilderten Populationen führen, die als Genpool für neu eingeführte Gene dienen werden, unabhängig davon, ob der Anbau in näherer oder weiterer Entfernung stattfindet (THOMPSON et al., 1999).

Hybridisierung mit kreuzungsfähigen Verwandten

Unter Freilandbedingungen gelang eine Hybridisierung von transgenem Raps mit Rübsen (*Brassica rapa*), Sareptasenf (*Brassica juncea*), Schwarzem Senf (*Brassica nigra*), Grausenf (*Hirschfeldia incana*, synonym *Brassica adpressa*), Hederich (*Raphanus raphanistrum*) und Ackersenf (*Sinapis arvensis*) (ausführlich dargestellt in ECKELKAMP et al., 1997a sowie CHÉVRE et al., 1999).

MIKKELSEN et al. (1996) fanden, dass herbizidtoleranter Raps unter Freilandbedingungen spontan mit Rübsen (*Brassica campestris*) hybridisieren kann. In nur zwei Generationen führte diese Auskreuzung zu fertilen, transgenen, herbizidtoleranten Nachkommen mit Wildpflanzeigenschaften. Bei einem landwirtschaftlichen Anbau ist damit von einer deutlichen Hybridisierung von transgenem Raps mit Rübsen auszugehen. Diese Ergebnisse wurden in weiteren Versuchen bestätigt (SNOW & JØRGENSEN, 1999).

Hybridisierungen von Raps mit Hederich (*Raphanus raphanistrum*), der in Österreich vorkommt, sind ebenfalls möglich (EBER et al., 1994; DARMENCY et al., 1995; LEFOL et al., 1996). In einem Versuchsansatz führte die Auskreuzung nach vier Generationen zu fertilen, transgenen, herbizidtoleranten Nachkommen mit Wildpflanzeigenschaften (CHÈVRE et al., 1997). Auch unter australischen Bedingungen konnte eine interspezifische Hybridisierung zwischen *Brassica napus* und *Raphanus raphanistrum* nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zum Hybridisierungspotential mit den in Australien wichtigen landwirtschaftlichen Unkräutern *Brassica tournefortii* und *Diptotaxis muralis* sind geplant.

Hybridisierungen zwischen transgenen Ausfall- und Ruderalrapspopulationen mit Sareptasenf (*Brassica juncea*), der wild vorkommt, aber häufig auch als Zwischenfrucht angebaut wird, sind ebenfalls möglich (SCHEFFLER & DALE, 1994).

Die Wahrscheinlichkeit eines Genflusses von Raps in Salattrauke (*Eruca sativa*) wird in der Schweiz für hoch gehalten (JACOT, 1994).

Aus Hybridisierungen von Raps mit Ackersenf (*Sinapis alba*) können ebenfalls lebensfähige Hybride hervorgehen (JACOT, 1994; SUKOPP & SUKOPP, 1994; FISCHBECK, 1995). In weiteren Versuchen in England und Frankreich wurde die prinzipielle Möglichkeit der Hybridisierung zwischen *Brassica napus* und *Sinapis arvensis* erneut bestätigt, allerdings konnten hier nur Hybride erzielt werden, wenn *Brassica napus* den weiblichen Part spielte (MOYES et al., 1999)

Hybridisierungen zwischen sterilen Rapspflanzen und Grausenf (*Hirschfeldia incana*) ergaben unter Freilandbedingungen lebensfähige Hybride (DARMENCY, 1994). Ein Genfluss von transgenem Raps auf Grausenf wird vor allem für den mediterranen Raum prognostiziert, in dem Grausenf sehr häufig vorkommt (LEFOL, 1996).

In Kanada wird die mögliche Einkreuzung der Transgene in Hundssenf (*Erucastrum gallicum*) mit besonderer Aufmerksamkeit untersucht. Hybridbildung mit Raps als weiblichem Teil führte im Gewächshaus zu starken, sehr fruchtbaren Pflanzen, die aller Voraussicht nach im Feld gute Überlebensmöglichkeit haben. Untersuchungen zu weiteren Rückkreuzungsgenerationen sind bisher noch nicht abgeschlossen (DOWNEY, 1999).

4.4.2 Beta vulgaris ssp. vulgaris (Zuckerrüben)

4.4.2.1 Ausbreitungspotential

Zuckerrüben haben ein Potential zur Verwilderung. In mehreren europäischen Ländern und in den USA werden sie als Unkraut gefunden. Hornsey und Arnold berichten über ihr Vorkommen an Straßenrändern und Mittelstreifen sowie Brachland (HORNSEY & ARNOLD, 1979, S. 279). Der Aufbau von Unkrautrübenpopulationen auf Kulturland erfolgt u.a. über Schosserbildung in den zweijährigen Kulturformen. BARTSCH et al. (1999) berichten über den Aufbau einer mehr als 80.000 Pflanzen/ha umfassenden Unkrautrübenpopulation, nach nur zwölf Jahren Zuckerrübenanbau in Fruchtfolge mit Weizen und Mais in der Nähe der belgischen Grenze bei Aachen.

4.4.2.2 Hybridisierungspotential

Beta-Rüben besitzen innerhalb ihrer Art keinerlei Kreuzungsbarrieren. Es kommen Kreuzungen der verschiedenen Kulturformen untereinander sowie Kreuzungen zwischen Wildformen und Kulturformen vor (u.a. DE VRIES 1992). Dies ist auch die Schlussfolgerung aus deutschen Begleitforschungsprojekten, die an der Universität Aachen durchgeführt wurden. Es wurden keinerlei Kreuzungsbarrieren zwischen transgenen Varianten und anderen Kultur-

oder Wildformen gefunden. Eine Verbreitung der Transgene nach einer Kommerzialisierung ist nach der Einschätzung der Autoren sicher zu erwarten (POHL-ORF et al., 1999).

BARTSCH et al. (1995) waren anscheinend die ersten, die Begleituntersuchungen mit gentechnisch veränderten Pflanzen durchführten, welche durch das Transgen gegen natürliche Feinde geschützt werden sollten. Sie verglichen transgene Zuckerrüben mit Resistenz gegen das Rizomaniavirus BNYVV (beet necrotic yellow vein virus)⁷ mit nichttransgenen Pflanzen derselben Zuchtlinie sowie mit einer konventionell gezüchteten rizomaniatoleranten Zuckerrübensorte. In ersten Freisetzungsversuchen schnitten die transgenen Pflanzen auch unter Virusbefall schlechter ab als die nichttransgenen. Dafür war anscheinend Inzuchtdepression bei den gentechnisch veränderten Zuckerrüben verantwortlich. In weiteren Freisetzungsversuchen waren jedenfalls transgene Zuckerrübenhybride unter Virenbefall den virusanfälligen Kontrollpflanzen überlegen. Am durchsetzungsfähigsten waren jedoch die konventionell gezüchteten virustoleranten Zuckerrüben in allen Konkurrenzversuchen in zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungsjahren (PARKER & BARTSCH, 1996).

4.5 Target-Effekte: Resistenzentwicklung / Virulenzsteigerung bei Schädlingen oder Pathogenen

Gentechnisch veränderte Pflanzen werden u.a. entwickelt, um möglichst spezifisch bestimmte Zielorganismen zu bekämpfen, die im landwirtschaftlichen Anbau Probleme verursachen. Im vorliegenden Gutachten sollen unter „target-Effekten“ Auswirkungen von transgenen Pflanzen auf die Viren, Bakterien, Pilze, Insekten und Beikräuter verstanden werden, zu deren Bekämpfung sie entwickelt worden sind. Bisher konzentrieren sich die Risiko-untersuchungen zu den Umweltauswirkungen von gentechnisch veränderten Pflanzen auf Zielorganismen vor allem auf zwei Aspekte:

4.5.1 Resistenzentwicklung von Beikräutern und Pflanzenschädlingen

Bei insekten-, virus-, bakterien- oder pilz-resistenten bzw. herbizid-resistenten Pflanzen wird befürchtet, dass die zu bekämpfenden Schadorganismen die gentechnisch vermittelten Resistenzmechanismen durch eine Anpassung oder Resistenzbildung schnell überwinden könnten. Unter Resistenz versteht man im allgemeinen die Fähigkeit eines Organismus, ob Pflanze, Bakterium, Pilz oder Tier, im Gegensatz zu anderen Organismen derselben Art einen bestimmten äusseren Einfluss zu tolerieren. Generell kann davon ausgegangen werden, dass alle Schaderreger das Potential zur Ausbildung von Resistenzen besitzen. Wichtige Parameter für die Entstehung von Resistenzen sind der Genotyp des entsprechenden Organismus und die Stärke des vorhandenen Selektionsdrucks. Im landwirtschaftlichen Anbau haben sich schon bei einer Vielzahl von Schaderregern und Beikräutern Probleme aufgrund von Resistenzüberwindungen ergeben. So sind inzwischen bei einer Vielzahl von Schädlingen Resistenzen gegen bestimmte Insektizide bekannt (GEORGHIOU, 1990). Die Entwicklung von Resistenzen gegen *Bacillus thuringiensis* Toxine wurde als eines der größten agronomischen Risiken von *Bt*-transgenen Pflanzen identifiziert. Allerdings scheinen die Resistenzentwicklungen unterschiedlich wahrscheinlich und rasch zu verlaufen. Um sie zu verzögern, wurden z.B. in den USA der Anbau von *Bt*-Mais und *Bt*-Baumwolle mit Resistenzmanagementauflagen verbunden (MELLON & RISSLER, 1998; NATIONAL CORN GROWER REPORT, 1999).

⁷ Die transgenen Pflanzen enthielten ausserdem das Glufosinatresistenzgen *bar* und das Kanamycinresistenzgen *npt II*.

4.5.2 Resistenzmanagement bei *Bt*-Mais

Generell kann davon ausgegangen werden, dass alle Insekten das Potential haben, Resistenzen zu entwickeln. Wie schnell und ob sie sich bei *Bt*-Pflanzen entwickeln, ist von folgenden Faktoren abhängig (GOULD et al., 1998; RAPS et al., 1998):

- dem Resistenzmechanismus
- dem Vererbungsmuster der Resistenz
- der Biologie und Populationsdynamik der betroffenen Schaderreger
- dem Selektionsdruck, der durch den Anbau von *Bt*-Pflanzen ausgeübt wird.

Das Vererbungsmuster der Resistenz ist ein entscheidender Faktor für die Resistenzentwicklung von Schaderregern. Wichtige Parameter dabei sind der Vererbungsmechanismus (dominant, intermediär, rezessiv) und die initiale Frequenz der Resistenzallele. Für Maiszünsler gibt es bisher keine experimentellen Daten zum Vererbungsmuster und den Resistenz-Allelfrequenzen im Feld. Es wird daher für die Entwicklung des Resistenzmanagements von theoretischen Modellen ausgegangen. Die Risikoabschätzung geht bisher davon aus, dass eine mögliche *Bt*-Resistenz im Maiszünsler rezessiv vererbt wird und dass sie mit niedriger Allelfrequenz in der Population vorkommt (s. dazu a. KLÖPFFER et al., 1999).

Neue Laboruntersuchungen von HUANG et al. (1999) weisen allerdings darauf hin, dass es Maiszünslerpopulationen gibt, die ihre Resistenz teildominant weitervererben. Auch von niedrigen initialen Allelfrequenzen kann nicht immer ausgegangen werden. Experimentelle Arbeiten mit einer anderen Schmetterlingsart zeigen, dass die Frequenz weitaus höher sein könnte, als ursprünglich angenommen. Die Selektion von resistenten *Heliothis virescens*, ein Schädling der Baumwolle, ergab eine um bis zu 1000-fach höhere Allelfrequenz, nämlich $1,5 \times 10^{-3}$, als in den Modellen bisher häufig angenommen wurde (GOULD et al., 1997; KLÖPFFER et al., 1999).

Die Biologie und die Mobilität des Schaderregers determinieren ebenfalls die Verbreitung von Resistenzgenen in einer Schädlingspopulation. Adulte *Ostrinia nubilalis*-Falter weisen eine relativ hohe Mobilität auf. Wird die Resistenz rezessiv vererbt, werden durch den Anbau von nichttransgenen Maisrefugien theoretisch gute Voraussetzungen geschaffen, die Resistenzbildung eine Zeitlang zu verzögern. Dies gilt jedoch nur, wenn die Entwicklung von Maiszünslerlarven auf transgenem und nicht-transgenem Mais synchron verläuft (RAPS et al., 1998). Im Labor wurde für den Baumwollschädling *Pectinophora gossypiella* („Pink Bollworm“) jedoch schon gezeigt, dass die Entwicklung von resistenten Populationen um fünf bis sechs Tage verzögert abläuft (LIU et al., 1999). Es muss noch untersucht werden, welche Relevanz diese Ergebnisse für das Freiland haben. Falls die resistenten und nicht-resistenten Populationen jedoch zu unterschiedlichen Zeiten geschlechtsreif werden, werden sie sich nicht paaren und die Verbreitung von Resistenzgenen in einer Population würde beschleunigt.

Der Selektionsdruck, den transgene Pflanzen ausüben, ist abhängig vom *Bt*-Expressionsniveau und -muster in den transgenen Pflanzen und von der Größe der Anbaufläche (ANDOW & HUTCHINSON, 1998; RAPS et al., 1998). Die Höhe der *Bt*-Konzentration in den Pflanzen ist entscheidend für das Überleben der Maiszünslerlarven. Damit möglichst wenige heterozygot resistente Raupen überleben, sollte eine gewisse (hohe) Toxinmenge nicht unterschritten werden. Dadurch soll gewährleistet werden, dass möglichst wenige teilresistente Zünslerindividuen überleben. Haben diese dann die Möglichkeit sich mit nicht-resistenten Individuen in den Refugien zu paaren, wird die Resistenzentwicklung verzögert.

Bisher sind bei den mit *Bt*-Spritzpräparaten behandelten Insekten kaum Resistenzen aufgetreten, weil die *Bt*-Präparate mehrere Protoxinvarianten enthalten, die zudem aufgrund ihrer UV-Labilität relativ kurzlebig sind. Im Unterschied dazu wird das *Bt*-Toxin in den transgenen

Bt-Pflanzen in einer aktiven Form und über einen langen Zeitraum exprimiert. Der Selektionsdruck ist unter diesen Umständen sehr viel höher als bei den *Bt*-Sporenpräparaten (BERNHARDT et al., 1991). Die US-amerikanische EPA (Environmental Protection Agency) hat aus diesem Grund beschlossen, Resistenzmanagementpläne vorzuschreiben. Die oben beschriebenen Parameter haben zum konkreten Design der Pläne beigetragen, die sich im wesentlichen durch eine „hohe Toxinexpression“ bei gleichzeitigem Anbau von „Refugien“ auszeichnen (MELLON & RISSLER, 1998).

Als erfolgreiche Strategie in der Anfangsphase, d.h. wenn der Anteil an *Bt*-Mais im Vergleich zu konventionellem Mais gering ist, wird die „refuge/high-dose“-Strategie empfohlen (ANDOW und HUTCHINSON, 1998). Allerdings werden auch Maissorten der Firmen Novartis, Mycogen und DeKalb (jetzt Monsanto) angebaut, deren Expressionsniveau schon relativ früh in der Vegetationsperiode abfällt. Problematisch ist dies vor allem vor dem Hintergrund der oben dargestellten Ergebnisse von HUANG et al. (1999). Ein „moderates“ Expressionsniveau könnte nicht ausreichen, um teilresistente Maiszünsler abzutöten.

Die Empfehlungen für die Mindestgröße der unbehandelten Refugien reichen von 4 % bis zu 50 % (4 % vorgeschlagen von Environmental Protection Agency, nach GOULD et al., 1997; STEIN and LOTSTEIN, 1996). ANDOW und HUTCHINSON, (1998) geben als minimale Größe 25 % an. Der Anteil an *Bt*-Mais in einer Region darf dabei aber nur dort 50 % überschreiten, wo der Maiszünsler auch alternative Wirtspflanzen befallen kann und damit „alternative“ Refugien zur Verfügung stehen (KLÖPFER et al., 1999).

Der Novartis BT-176 Mais kann nur in den Gebieten nach der refuge/high-dose-Strategie angebaut werden, in denen sich nur eine Zünlsgeneration entwickelt. Gegen die zweite Zünlsgeneration bietet dieser Mais nur geringen Schutz, weil das Expressionsniveau von CryIA(b) im Laufe der Vegetationsperiode stark abfällt und das Toxin in den Kolben nicht gebildet wird. In Gebieten mit mehreren Zünlsgenerationen wird von ANDOW und HUTCHINSON (1998) daher für den *Bt*-176 Mais eine Refugiengröße von 50 % Refugien ohne Insektizidbehandlung als notwendig erachtet.

Konkret hat die EPA 1999 beschlossen, für drei verschiedene Maislinien Vorschriften zu erlassen, wonach eine gewisse Fläche von der Gesamtanbaufläche nicht mit *Bt*-Mais bepflanzt werden darf. Die Größe der *Bt*-Mais freien Fläche hängt davon ab, ob diese Flächen mit Pflanzenschutzmitteln behandelt werden oder nicht. Im einzelnen wurde für den *Bt*-Mais von Monsanto 20 % behandelt oder 10 % unbehandelt, für Novartis (Popcorn) 40 % behandelt, 20-30 % unbehandelt und für AgrEvo (PGS) 40 % gespritzt, 25 % ungespritzt vorgeschrieben. Es muss jedoch auch aufgrund der o.g. neueren Ergebnisse bezweifelt werden, ob diese Maßnahmen ausreichend sind, um eine schnelle Resistenzentwicklung zu verhindern.

Die gesamte Refugienstrategie ist in Frage zu stellen, wenn die Ergebnisse von LIU et al. (1999) auch für Maiszünsler im Freiland zutreffen und die Entwicklung von resistenten und nicht-resistenten Maiszünslern nicht synchron verlaufen sollte.

4.5.3 Herbizidresistenz

Ob die Herbizidresistenzstrategie praxistauglich ist, wird davon abhängen, ob Beikräuter Resistenzen gegen diese Herbizide entwickeln. Im konventionellen Anbau hat sich gezeigt, dass Beikräuter das Potential haben, resistent gegen Herbizide zu werden (ECKELKAMP et al., 1997a). Es wurden bereits eine Vielzahl von Pflanzenkulturen mit gentechnischen Methoden gegen die Herbizide Liberty, Roundup, Bromoxinyl und Sulfonylharnstoff unempfindlich gemacht. Sollten sich gentechnisch veränderte Pflanzen in der landwirtschaftlichen Praxis durchsetzen, werden diese Herbizide in Zukunft auf großen Flächen eingesetzt. Bei jedem Herbizid, das in großem Umfang eingesetzt wird, ist zu erwarten, dass Beikräuter unter

diesem hohen Selektionsdruck Resistenzen gegen diese Herbizide entwickeln. 1996 wurde erstmalig berichtet, dass ein glyphosatresistentes Gras (*Lolium rigidum*) in Australien durch Roundup nicht mehr beseitigt werden konnte. Dieser Fall hat deshalb Aufsehen erregt, weil eine Resistenzbildung gegen Glyphosat bis dahin für sehr unwahrscheinlich gehalten wurde (WEBER, 1997). Im Fall von transgenen Pflanzen können Beikräuter aber nicht nur auf klassischem Wege Resistenzen entwickeln. Gentechnisch veränderte herbizidresistente Pflanzen können ihre Transgene auch auf verwandte Kultur- oder Wildpflanzen/Unkräuter übertragen, die so ebenfalls resistent gegen die betreffenden Herbizide werden. Diese Pflanzen können, wenn sie sich ausbreiten, als Unkräuter in verschiedensten landwirtschaftlichen Kulturen, die mit den entsprechenden Komplementärherbiziden behandelt werden, Probleme verursachen (siehe auch Kapitel 4.4). Die durch resistente Beikräuter in Folge des Anbaus transgener herbizidresistenter Pflanzen verursachten Probleme können wegen der Möglichkeit des Gentransfers und wegen der zu erwartenden Steigerung des Einsatzes einiger weniger Komplementärherbizide (gesteigerter Selektionsdruck) die bisherige Resistenzproblematik bei Herbiziden weit übertreffen (siehe auch Kap. 4.4.1.3).

4.5.4 Entstehung neuer Virusvarianten

Bei virusresistenten Pflanzen wird die Entstehung neuer Virusvarianten und/oder neuer Infektionsverläufe als Risiko diskutiert. Auch hier stehen im allgemeinen die Wirkungen auf die Kulturpflanzen im Vordergrund, jedoch werden auch Wildpflanzen von Viren befallen. Ihr Einfluss auf die Populationsdynamik von Pflanzen ist aber noch wenig geklärt (RAYBOULD et al., 1998).

Es gibt eine Reihe unterschiedlicher Strategien, um Pflanzen mit Hilfe der Gentechnik virusresistent zu machen. In den meisten Fällen werden die Pflanzen mit viralen Genomabschnitten transformiert. 94 % der Pflanzenviren sind RNA-Viren, von denen man komplementäre DNA-Sequenzen (cDNA) kloniert (MATTHEWS, 1991). Zumeist handelt es sich um Gene, die für virale Hüllproteine kodieren. Aber auch virale Replikations- und Transportproteingene sowie Satellitensequenzen werden ins Pflanzengenom integriert.⁸ Ausserdem werden proteinkodierende virale Sequenzen in Antisense-Orientierung kloniert.⁹ Noch relativ neu sind Forschungen zu den Einsatzmöglichkeiten von Proteasen, Proteaseinhibitoren und Ribozymen.¹⁰ Ebenfalls einen neueren Ansatz stellt die Transformation mit nichtviralen Nukleinsäuresequenzen dar, die für tierische Antikörper, Interferone oder 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase kodieren (JÄGER & WEBER, 1993, HENRY et al., 1995; ECKELKAMP et al., 1997b; WEBER et al., 1998).

Im Zentrum der Risikoforschung zu virusresistenten transgenen Pflanzen steht die agronomisch motivierte Frage, ob die gentechnischen Strategien zur Vermittlung von Virusresistenz die Verbreitung und Evolution von Viren verändern kann und ob dabei Pflanzenviren oder virale Pflanzenkrankheiten und Epidemien von erhöhter Schädlichkeit hervorgebracht werden können. In Sicherheitsuntersuchungen muss untersucht werden, ob die Prozesse, von denen ein Risiko ausgeht, in transgenen Pflanzen überhaupt stattfinden und wenn ja, ob sie in höherer Frequenz auftreten als in der Natur, oder ob neue Kombinationen möglich sind, die es in der Natur bisher nicht gibt.

⁸ Satelliten-RNAs kommen bei manchen RNA-Viren zusätzlich zum Virusgenom vor. Sie kodieren für keine, für das jeweilige Virus essentiellen Funktionen, können jedoch die Schwere und Symptomatik des Infektionsverlaufs beeinflussen. Satelliten-RNAs benötigen ihrerseits für ihre Replikation, Verpackung und Transmission ein Helfervirus, mit dem jedoch keine signifikanten Sequenzübereinstimmungen bestehen.

⁹ Antisense-Klonierungen führen dazu, dass die Proteinbiosynthese im umgekehrter Richtung verläuft, vom Ende der kodierenden Sequenz zu ihrem Anfang. Dadurch kann die gleichzeitige Synthese des betreffenden Proteins in der normalen Orientierung (Sense-Orientierung) gehemmt werden.

¹⁰ Ribozyme sind RNA-Moleküle mit RNA-spaltender enzymatischer Aktivität.

Allgemein werden vor allem drei Risiken im Zusammenhang mit transgenen Pflanzen, die mit viralen Nukleinsäuresequenzen transformiert wurden, diskutiert:

- 1) Zwischen der in Pflanzen klonierten viralen genetischen Information und infizierenden Viren können **Rekombinationen** stattfinden. RNA-Rekombinationen sind prinzipiell möglich und treten auch in Mischinfektionen verschiedener Viren auf. Sie können zu Viren mit genetisch verankerter erhöhter Fitness und Pathogenität sowie verändertem Wirtsspektrum führen.

Es ist noch weitgehend ungeklärt, wie häufig Rekombinationen bei Pflanzenviren stattfinden (GIBBS et al., 1997). Anscheinend unterscheiden sich verschiedene Virusgruppen, aber auch verschiedene Viren einer Gruppe hinsichtlich der Rate intraspezifischer Rekombination (REVERS et al., 1996, CANDRESSE et al., 1997). Möglicherweise spiegeln die unterschiedlichen bisher ermittelten Rekombinationshäufigkeiten tatsächliche Unterschiede im erreichten evolutionären Gleichgewicht der Viren wider. In vielen Fällen dürften sie jedoch durch den Effekt fehlender systematischer Erhebungen überlagert sein.

LOMMEL & XIONG (1991) zeigten als erste, dass RNA-Pflanzenviren mit der mRNA von in Pflanzen klonierten viralen Sequenzen rekombinieren können. Sie führten mit Red clover necrotic mosaic Dianthovirus (RCNMV) ähnliche Versuche durch wie später GREENE & ALLISON (1994). In beiden Fällen wurden die transgenen Pflanzen mit defekten Viren infiziert, die erst durch Rekombination mit der klonierten Wildtypsequenz zu einer systemischen Infektion der Pflanzen befähigt wurden. Versuchsanordnungen mit ebenfalls einem deutlichen Selektionsdruck ermöglichten den Nachweis von Rekombinationen des DNA-Virus Blumenkohlmosaikvirus (Cauliflower mosaic Caulimovirus, CaMV) mit in Pflanzen klonierten Genomabschnitten dieses Virus (GAL et al., 1992; SCHOELZ & WINTERMANTEL, 1993). MAISS et al. (1997) wiesen Rekombination von Potyviren mit transgen exprimierten potyviralen Sequenzen in Pflanzen unter Selektionsdruck nach.

WINTERMANTEL & SCHOELZ (1996) zeigten jedoch, dass auch bei nur mäßigem oder schwachem Selektionsdruck Virusrekombinanten in transgenen Pflanzen gebildet werden können. Sie arbeiteten mit *Nicotiana bigelovii* Pflanzen, die mit dem Gen VI eines CaMV-Stammes transformiert worden waren, das CaMV die systemische Infektion dieser und anderer Wirtspflanzen erlaubt. Die transgenen Pflanzen wurden mit einem anderen CaMV-Stamm infiziert, der ebenfalls zu ihrer systemischen Infektion befähigt ist. Insofern lag kein ersichtlicher Selektionsdruck vor, der Rekombinationen oder Rekombinanten begünstigen würde. Dennoch wurden in 13 % der untersuchten Pflanzen Virusrekombinanten gefunden, die zudem virulenter waren als das Wildtypvirus, von dem sie abstammen. Eine ähnlich hohe Rekombinationsfrequenz zeigte ein chimäres CaMV, das die transgenen Pflanzen systemisch infizieren kann, weil es durch das rekombinante Genprodukt komplementiert wird. In dieser Versuchsanordnung liegt nur ein mäßiger Selektionsdruck vor.

Zwei der von SCHOELZ & WINTERMANTEL (1993) isolierten Rekombinanten hatten einen im Vergleich zum Ausgangsstamm erweiterten Wirtsbereich. Eine der Rekombinanten rief bei Rübsen abgeschwächte Symptome hervor. Die Autoren halten jedoch prinzipiell für möglich, dass rekombinierte Viren schlimmere Symptome hervorrufen als die Viren, die ursprünglich die transgenen Pflanzen infizierten. Mutanten des Cowpea chlorotic mottle Bromovirus (CCMV) mit einer Deletion im Hüllproteingen konnten durch Rekombination in transgenen *Nicotiana benthamiana* Pflanzen, die das CCMV-Hüllproteingen exprimierten, diese Pflanzen wieder systemisch infizieren. Drei von sieben Rekombinanten verursachten aber im Vergleich zum Wildtyp veränderte Symptome auf Kuhbohnenpflanzen (ALLISON, 1997).

Wenn es sich um Hüllprotein-transgene Pflanzen handelt, sind durch Rekombination infizierender Viren mit den klonierten Sequenzen genetisch verankerte Veränderungen des Infektionsverlaufs, des Vektoren- und Wirtspflanzenspektrums möglich. Ausserdem kön-

nen durch Rekombinationen in Pflanzen, die virale Sequenzen exprimieren, Viren mit gesteigerter Fitness entstehen.

- 2) Des Weiteren können in Pflanzen, die mit einem viralen Hüllprotein transformiert wurden, **heterologe Enkapsidierungen** auftreten. Dabei wird die Nukleinsäure eines Virus, dessen Vermehrung durch das klonierte Hüllprotein zumindest nicht vollständig unterbunden wird, teilweise oder ganz durch rekombinantes CP verpackt. Heterologe Enkapsidierungen treten auch in Mischinfektionen verschiedener Viren auf. Sie können virale Eigenschaften, die durch das Hüllprotein determiniert oder beeinflusst werden, verändern, wie den Vektor- und Wirtsbereich und den Krankheitsverlauf.

Heterologe Enkapsidierungen wurden häufiger zwischen Viren derselben Virusgruppe als zwischen Viren aus verschiedenen Virusgruppen festgestellt. Sie treten aber auch zwischen nicht verwandten Viren auf. Heterologe Enkapsidierungen scheinen bei verschiedenen Virusgruppen unterschiedlich verbreitet zu sein und unterschiedlich spezifisch zu verlaufen. Bei Potyviren kommt es z.B. relativ leicht zu heterologen Enkapsidierungen zwischen Viren dieser Gruppe. Luteo- und Nepoviren zeigen dagegen besonders geringe Spezifität bezüglich der verpackten RNA (COOPER et al., 1994, MAISS et al., 1994). Diese Befunde sind jedoch durch die unterschiedlich intensive Erforschung verschiedener Viren(gruppen) beeinflusst.

Heterologe Enkapsidierungen wurden auch in CP-transgenen Pflanzen gefunden, und zwar zwischen RNA und Hüllproteinen von Viren derselben Virusgruppe im Fall der Potyviren (FARINELLI et al., 1992, LECOQ et al., 1993, MAISS et al., 1994) wie auch zwischen Viren verschiedener Gruppen. So wird das Gurkenmosaikvirus (Cucumber mosaic Cucumovirus, CMV) in Tabakpflanzen durch transgen exprimiertes CP des Luzernemosaikvirus (AMV) verpackt.

Die heterologe Enkapsidierung kann einem transmissionsdefizienten Virus zur Übertragung durch Vektoren verhelfen.¹¹ BOURDIN & LECOQ (1991) nehmen an, dass heterologe Enkapsidierungen z.B. die Übertragung und Aufrechterhaltung nichttransmissibler Virusisolate in der Umwelt erklären könnten. Von größerer ökologischer Bedeutung ist diesen Autoren zufolge aber wahrscheinlich der Vektorwechsel, durch den einem Virus ein anderer Wirtsbereich erschlossen werden kann. Die Effekte sind auf eine Vegetationsperiode beschränkt, weil sie nicht genetisch verankert werden.

- 3) Es können **Synergismen** zwischen dem klonierten Gen bzw. Genprodukt und infizierenden Viren auftreten. Pflanzen, in deren Genom virale genetische Information integriert wurde, sind meist gegen das Virus, von dem die klonierte Sequenz stammt, und mit diesem verwandte Viren resistent, nicht jedoch gegen nicht verwandte Viren. Bisher ist kaum untersucht worden, in welchem Maße die Pflanzen Synergismen mit heterologen Viren zeigen (PALUKAITIS & KAPLAN, 1997). In manchen Fällen wurden solche Effekte bei der Transformation mit intakten viralen Replikase- und Transportproteingenen beobachtet (TASCHNER et al., 1991, COOPER et al., 1995). Virale Synergismen sind auch von Mischinfektionen nichttransgener Pflanzen bekannt. Treten sie in transgenen Pflanzen auf, sind die Effekte im Gegensatz zur Rekombination nicht genetisch verankert.

4.5.5 Non-target-Effekte

Der Anbau transgener Pflanzen kann neben der Schädigung von Zielorganismen auch direkt oder indirekt Organismen betreffen, die ursprünglich nicht Ziel der Bekämpfung waren. Unter „non-target“ Effekten werden in diesem Gutachten Effekte verstanden, die transgene Pflanzen auf Organismen ausüben, die durch sie nicht direkt bekämpft werden sollen. Es werden

¹¹ Transmission: Vektorübertragung

dabei auch Effekte berücksichtigt, die als Nebenwirkungen der Transformation auftreten und nicht auf das rekombinante Genprodukt zurückzuführen sind (siehe auch S. 27). Auswirkungen auf Nichtzielorganismen, die auf einer veränderten Bewirtschaftungsmethode beruhen, werden in Kapitel 4.6 diskutiert.

Nach RAPS et al. (1998) sind als Nichtzieleffekte vor allem folgende Punkte zu berücksichtigen:

- **Effekte auf Nichtzielschaderreger**

Nichtzielschaderreger könnten durch transgene Pflanzen sublethal geschädigt und damit kurzfristig zurückgedrängt werden. Wenn die betroffenen Organismen in der Folgezeit Resistenzen ausbilden und sich plötzlich vermehren, können sie schwere Schäden in den betroffenen Pflanzenkulturen anrichten.

- **Effekte auf Nützlinge und natürliche Gegenspieler von Schaderregern**

Ein wesentliches Element der integrierten bzw. ökologischen Landwirtschaft ist die Erhaltung und Förderung des Gleichgewichts zwischen Schaderregern und deren Gegenspielern bzw. Nützlingen. Daher ist es wichtig, die Auswirkungen des Anbaus transgener Pflanzen auf diese Organismen zu untersuchen. Der Anbau transgener Pflanzen kann aber auch indirekt durch Veränderungen der bisher vorhandenen Flora und Fauna zu Änderungen der vergesellschaftet lebenden Insektenfauna führen.

Freilandversuche, die Effekte von transgenen Pflanzen auf Nichtzielorganismen untersuchen, wurden bisher im wesentlichen von den Firmen durchgeführt, die transgene Pflanzen auf den Markt bringen wollen (z.B. CIBA-ANTRAG, 1994). Unsere bisherige Recherche ergab, dass dabei keine Effekte von transgenen Pflanzen auf „non-target“ Organismen gefunden wurden. Dies wird auch durch eine persönliche Mitteilung von Angelika Hilbeck (FAL Zürich, 1999), die auf diesem Gebiet experimentell forscht, bestätigt.

Allerdings wurden bei Untersuchungen im Labor bzw. Gewächshaus Hinweise auf eine mögliche direkte und indirekte Schädigung von Nützlingen durch transgene insektenresistente Pflanzen gefunden:

PHAM-DELEGUE (1997) fand, dass die Fütterung von Zuckerlösungen mit gereinigten Proteinaseinhibitor (PI)- Proteinen die Lebensdauer von Bienen verkürzen und deren Lernverhalten beeinträchtigen kann. PICARD-NIZOU et al. (1995, 1997) untersuchten die mögliche Schädigung von Bienen durch transgene Rapspflanzen, die jeweils Chitinase (aus Bohne), β -1,3 Glucanase (aus Tomate) oder einen Proteinaseinhibitor (CpTI: Cowpea Trypsin-Inhibitor) exprimierten. Untersucht wurde der Effekt der isolierten rekombinanten Proteine. Bei diesen Versuchen wurde keine akute toxische Wirkung der drei Proteine festgestellt. Auch das Verhalten der Bienen während der Nahrungssuche blieb unbeeinflusst. Allerdings hatten β -1,3-Glucanase und CpTI aus transgenen Rapspflanzen negative Effekte auf das Lernverhalten adulter Bienen (PICARD-NIZOU et al., 1997).

BIRCH et al. (1997) fanden eine Schädigung von Lektin-exprimierenden Kartoffeln auf Marienkäfer (*Adalia bipunctata*). Die Lektin-Expression bewirkte eine 50 %ige Dezimierung der Blattlauspopulation. Marienkäfer, die sich von den auf Lektin-Kartoffeln überlebenden Blattläusen ernährten, wiesen eine verringerte Fruchtbarkeit auf. Die Lebensdauer von weiblichen Tieren war halb so lang wie die der Kontrolltiere, die Blattläuse von nicht-transgenen Kartoffeln gefressen hatten.

Auch bei Laboruntersuchungen mit transgenem *Bt*-Mais wurde ein schädlicher Effekt auf eine nützliche Insektenart festgestellt. Florfliegenlarven (*Chrysoperla carnea*) starben nach der Verfütterung von Maiszünslern, die durch den Genuss von *Bt*-Mais abgetötet worden waren, mit erhöhter Rate im Vergleich zu den Kontrollen ab. Besonders überraschend war, dass die Florfliegenlarven auch nach Fütterung des afrikanischen Baumwollwurms starben, wenn dieser zuvor *Bt*-Mais gefressen hatte, obwohl der Baumwollwurm selbst durch das *Bt*-Toxin

nicht angegriffen wird (HILBECK et al., 1998a). In weiteren Versuchen konnten HILBECK et al. (1998b) nachweisen, dass Florfliegenlarven auch bei der direkten Verfütterung von synthetischer Nahrung, die *Bt*-Toxine enthält, absterben. *Bt*-Toxine können also direkt toxisch auf Florfliegen wirken. Bei der Ausbringung von klassischen *Bt*-Sporenpräparaten wurden jedoch bisher nur geringe Auswirkungen von *Bt*-Toxinen auf Nützlinge gefunden.

Das in *Bt*-Mais exprimierte *Bt*-Toxin (CryIAb) ist spezifisch für Lepidopteren (Schmetterlinge). Es wirkt damit nicht nur spezifisch gegen den Maiszünsler, sondern auch gegen weitere Schmetterlingsraupen. Da Maiskulturen nur durch den Maiszünsler befallen werden, wurde lange Zeit angenommen, dass *Bt*-Mais in der Praxis keine weiteren Schmetterlinge schädigen wird. Kürzlich in der Fachzeitschrift „Nature“ publizierte Ergebnisse weisen allerdings darauf hin, dass *Bt*-Mais auch für Schmetterlinge in der Nähe von *Bt*-Maisfeldern gefährlich werden könnte. Werden *Bt*-Toxin-haltige Maispollen durch den Wind auf benachbarte Schwalbenwurzpflanzen („Milkweed“) geweht, könnten sie für dort lebende Larven des Monarchfalters eine ernsthafte Bedrohung darstellen. Bei den in den USA im Labor durchgeführten Fütterungsexperimenten überlebten nur knapp die Hälfte der Schmetterlingsraupen, wenn die Blätter ihrer Nahrungspflanze von *Bt*-Maispollen bedeckt waren (HANSEN & OBRICKI, 1999; LOSEY et al., 1999). Ähnliche Ergebnisse erzielten Forscher der Iowa State University, die für ihre Fütterungsversuche pollenbestäubte Schwalbenwurzblätter in *Bt*-Maisfeldern gesammelt hatten. In der Natur ist das Schwalbenwurzgewächs die einzige Nahrungsquelle für Raupen des Monarchfalters. Es ist in den USA häufig in der Umgebung von Maisfeldern zu finden. *Bt*-haltige Maispollen, die durch den Wind verbreitet werden, könnten daher Monarch-Raupen schädigen, die auf Schwalbenwurzgewächsen in der Nachbarschaft von *Bt*-Maisfeldern fressen. Dieser Befund war insofern überraschend, als bisher angenommen worden war, dass nur Schmetterlingslarven geschädigt werden können, die wie der Maiszünsler direkt an den transgenen *Bt*-Maispflanzen fressen.

Die Ergebnisse von BIRCH et al. (1997) und HILBECK et al. (1998 a, b) sind Hinweise darauf, dass nicht nur mit direkten Auswirkungen der *Bt*-Maispflanzen gerechnet werden muss, sondern auch mit Effekten, die einzelne Glieder der Nahrungskette überspringen. RAPS et al. (1998) stellen fest, dass die Studien von HILBECK et al. (1998 a,b) verdeutlichen, dass „durch eine veränderte Ausbringung von Pestiziden Nebeneffekte auftreten können und dass bei transgenen Pflanzen die Umweltsicherheit von Stoffen, auch von altbekannten, neu untersucht werden muss“.

4.5.6 Effekte auf Zersetzer

Die Aktivität der im Boden lebenden Zersetzer wird als wichtiger Parameter für die Einschätzung der Bodenqualität angesehen (RAPS et al., 1998). In Sicherheitsuntersuchungen zur Freisetzung transgener Pflanzen werden daher deren Auswirkungen auf diese Organismengruppe erfasst. Um den Effekt von *Bt*-Mais auf die Gruppe der Regenwürmer zu prüfen, wurden Laborversuche mit dem Kompostwurm *Eisenia foetida* durchgeführt. Dabei wurde keine akute Toxizität von *Bt*-Mais festgestellt (CIBA-ANTRAG, 1994). Bei Laboruntersuchungen wurde jedoch ein Effekt auf Springschwänze festgestellt, die für die Streuzersetzung eine erhebliche Rolle spielen. Das *Bt*-Mais δ -Endotoxin wirkte in hoher Konzentration (LD₅₀ 250 mg Blattprotein/kg Boden) toxisch auf die Springschwanzart *Folsomia candida*. Die EPA (1995) nimmt allerdings an, dass die durch *Bt*-176-Mais eingetragenen δ -Endotoxinmengen nicht ausreichen, um diese Toxinkonzentrationen im Boden anzureichern. Langzeituntersuchungen auf eine sublethale Wirkung des *Bt*-Toxins wurden nicht durchgeführt (EPA, *Bt*-Fact-Sheet 1995).

Im Dezember 1999 veröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Stotzky (SAXENA et al. 1999) lassen an dieser Einschätzung Zweifel aufkommen. Erstens stellten die Wissen-

schaftler fest, dass mit dem Wurzelexsudat *Bt*-Toxin kontinuierlich in den Boden abgegeben wird und dass zweitens dieses Toxin an Bodenpartikel gebunden wird und damit über lange Zeit stabil bleibt. Im vorliegenden Versuch konnte das Toxin über 243 Tage im Boden nachgewiesen werden und behielt auch sein toxisches Potential. Zusammen mit freigesetzten Toxinmolekülen aus verrottendem Pflanzenmaterial könnten damit durchaus bedeutende Toxinkonzentration im Boden aufgebaut werden.

DONEGAN et al. (1997) fanden bei Labor-Verrottungsversuchen ebenfalls eine Beeinträchtigung von Springschwänzen durch transgene Proteinase-Inhibitor-exprimierende Tabakpflanzen. Die Menge an Springschwänzen war deutlich verringert im Vergleich zur Kontrolle, die Nematodendichte hingegen war signifikant erhöht.

4.5.7 Effekte auf Bodenmikroorganismen

Mikroorganismen sind maßgeblich an bio-geochemischen Stoffzyklen beteiligt und ebenso für die Fruchtbarkeit der Böden mitverantwortlich. Es ist jedoch wenig darüber bekannt, welche Mikroorganismenpopulationen wie zusammenwirken, um diese Effekte hervorzurufen. Es wird geschätzt, dass nur ein Prozent der in Böden vorkommenden Mikroorganismen bekannt sind (TORSVIK et al., 1990). Daher ist auch nicht abzuschätzen, wie Veränderungen von Populationszusammensetzungen sich z.B. auf die Bodenfruchtbarkeit auswirken.

Trotz, bzw. gerade wegen dieser Wissensdefizite ist es essentiell, die Auswirkungen von transgenen Pflanzen auf das mikrobielle Bodenleben zu untersuchen. Untersuchungen von DONEGAN et al. (1995) zeigen, dass es dabei nicht ausreichend ist, allein die Wirkung der rekombinanten Genprodukte zu untersuchen. Sie zeigten, dass in den Boden eingearbeitete *Bt*-Baumwollblätter die Zusammensetzung von Bodenmikroorganismenpopulationen verändern. Der Effekt konnte nicht auf das Delta-Endotoxin selbst, sondern auf eine Nebenwirkung der gentechnischen Veränderung zurückgeführt werden (DONEGAN et al., 1995). Die Transformation von Pflanzen kann also unvorhersehbare Änderungen des pflanzlichen Stoffwechsels bewirken, die ebenfalls Folgen für das Bodenleben haben können.

4.6 Effekte veränderter Bewirtschaftungsmethoden

Überlegungen zu Wirkungen, die durch veränderte Bewirtschaftungsmethoden verursacht werden könnten, lassen folgende Möglichkeiten denkbar erscheinen:

Die bisher angewendeten breitwirksamen Pestizide könnten als „Nebenwirkung“ in manchen Kulturen sekundäre Erreger mitbekämpft haben. Entfällt diese Kontrolle durch den Einsatz gentechnischer Methoden, sind die Voraussetzungen günstig, dass sich diese Erreger ausbreiten können.

Durch die selektive Bekämpfung eines bisher dominanten Schaderregers wird in der jeweiligen Pflanzenkultur eine Nische frei, die von anderen Pathogenen genutzt werden kann.

Durch den Herbizideinsatz kann sich die Beikrautflora und die damit vergesellschaftete Insektenflora ändern. Dies gilt insbesondere für Totalherbizide.

Einige Daten, wie z.B. der Befall durch einen bis dato unbekanntem Schädling bei der Freisetzung transgener insektenresistenter Bäume, lassen darauf schließen, dass die oben angeführten Überlegungen ernsthaft in Betracht gezogen werden müssen (s. Kap. 4.8.1.5.) Dafür sprechen auch die beobachteten erhöhten Befallsraten unter bestimmten Bedingungen und die damit verbundenen erhöhten Pestizidaufwendungen in bestimmten Regionen, wie sie für Baumwolle berichtet wurden (s. Kap. 4.7.4).

4.7 Pflanzen, fallspezifisch

4.7.1 Exemplarische Fallbeschreibung und Diskussion der CRAWLEY-Versuche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte

Die Durchführung und Interpretation der Versuche von CRAWLEY et al. (1993) und HAILS et al. (1997) lassen viele Fragen zum Ausbreitungsverhalten von Raps offen bzw. beantworten diese zumindest nicht abschließend.

4.7.1.1 Vergleichbarkeit mit der Anbausituation

Ein grundlegender Mangel der von CRAWLEY et al. (1993) gewählten Versuchsanordnung ist, dass kein der Anbausituation vergleichbarer Selektionsdruck auf die transgenen Pflanzen einwirkte. Weil die Versuche ohne Herbizid- oder Kanamycinapplikation durchgeführt wurden, zielen sie auf die Feststellung unbeabsichtigter und unvorhersehbarer Steigerungen der Fitness, die aufgrund von Nebenwirkungen der gentechnischen Veränderung auftreten können. Beim Anbau herbizidresistenter Pflanzen würden die transgenen Pflanzen jedoch durch die Anwendung des komplementären Totalherbizids einen Selektionsvorteil erhalten, der ihr Ausbreitungspotential wesentlich erhöhen könnte (WEBER, 1995; PARKER & BARTSCH, 1996).

4.7.1.2 Eignung der ausgewählten Pflanzen hinsichtlich der untersuchten Fragestellung und der Verallgemeinerbarkeit der Ergebnisse

Es wurden Sommerrapslinien in Frühjahrsaussaat untersucht, obwohl in Europa im allgemeinen Winterraps angebaut wird (DIETZ-PFEILSTETTER et al., 1999). Es ist deshalb fraglich, inwieweit die Ergebnisse auf Winterraps übertragen werden können. Es wurde Saatgut mit einem hohen Inzuchtgrad verwendet. Zudem war das Saatgut der transgenen Linien nur zum Teil wirklich transgen und bezüglich der Zygotie des Transgens uneinheitlich.¹² Es ist daher fraglich, ob die untersuchten Linien mit Sorten vergleichbar sind, die für den Anbau eingesetzt werden sollen. Hier wird Inzucht wegen der Inzuchtdepression vermieden. Ausserdem wird eine hohe Reinheit des Saatguts und die möglichst 100 %ige Expression des transgenen Merkmals angestrebt. In Hinblick auf den Untersuchungsgegenstand – Einfluss der Transformation auf das Ausbreitungsverhalten – erscheinen ingezüchtete und hinsichtlich der Zygotie des Transgens uneinheitliche Linien ungeeignet. Dieses Problem wird durch den Vergleich mit der nichttransgenen Rapskontrolle nur zum Teil gelöst, denn im Vergleich mit *Sinapis arvensis* L. würden nicht ingezüchtete Pflanzen vermutlich „besser“ abschneiden, d.h. hinsichtlich ihrer Fitness der Wildpflanze näher kommen.¹³

¹² CRAWLEY et al. (1993) zufolge war die Kanamycin- und Glufosinat-resistente Linie zu 65 % homozygot transgen, zu 27 % heterozygot transgen und zu 8 % nicht transgen. HAILS et al. (1997) geben für dieselben Pflanzen an, sie seien nur zu 65 % transgen (62 % homozygote und 3 % heterozygote) gewesen und zitieren hierzu die gleichlautenden Angaben von SCHEFFLER et al. (1993). HAILS et al. (1997) halten es ausserdem für wahrscheinlich, dass sich die von ihnen untersuchten transgenen Linien hinsichtlich der Zygotie der Transgene unterscheiden und dass dies die Fitness der Pflanzen beeinflussen könne.

¹³ Zudem werden die Kontrollpflanzen in den Veröffentlichungen von CRAWLEY et al. (1993) und HAILS et al. (1997) nicht näher beschrieben. BERGELSON et al. (1996) zufolge müssen mit der Ausgangslinie zweimal rückgekreuzte Nullsegreganten als Kontrollpflanzen eingesetzt werden, um zu klären, ob evtl. Fitnessverluste auf pleiotropen Effekten von Resistenzgenen beruhen. Bis 1996 seien solche Kontrollpflanzen in Freisetzungsversuchen zur Prüfung der Fitness transgener Pflanzen nicht eingesetzt worden. Demnach ist anzunehmen, dass auch CRAWLEY et al. (1993) andere Pflanzen als Vergleichspflanzen einsetzen.

CRAWLEY et al. (1993) und HAILS et al. (1997) diskutieren nicht, warum in ihren Versuchen bei den tiefer vergrabenen Samen keine sekundäre Dormanz auftritt, ein Phänomen, das bei Rapsamen beobachtet wurde (DIETZ-PFLEILSTETTER et al., 1999). Möglicherweise ist es bei verschiedenen Sorten unterschiedlich ausgeprägt und waren die untersuchten Linien nicht repräsentativ für Sorten, die sekundäre Dormanz entwickeln können.

4.7.1.3 Aussagekraft von Mittelwerten

Des Weiteren ist fraglich, inwieweit es angemessen ist, die Abschätzung der Umweltwirkungen von Lebewesen nur auf Mittelwerte abzustützen. CRAWLEY et al. (1993) finden auf kultivierten Flächen in zwei von drei Jahren bei allen untersuchten Rapslinien ein Populationswachstum im Jahr der Aussaat.¹⁴ Auf nicht kultivierten Flächen ist dagegen in allen drei Jahren und bei allen Rapslinien eine Populationsabnahme im Jahr der Aussaat zu verzeichnen. Daraus schließen die Autoren auf fehlende Invasivität. An ungestörten Standorten wachsen jedoch einige wenige Rapspflanzen sehr kräftig und produzieren erhebliche Samenmengen. Demnach scheinen Rapsindividuen der untersuchten Linien spontan eine erhöhte Durchsetzungsfähigkeit entwickeln zu können, oder die Linien verfügen über eine entsprechende Varianz der Durchsetzungsfähigkeit. Für die Auslösung ökologischer Effekte könnten diese überdurchschnittlich vitalen Individuen ausschlaggebend sein als die Tatsache, dass die untersuchten Linien **im Mittel** auf nicht kultivierten Standorten innerhalb von einem Jahr kein Populationswachstum zeigen. Von einzelnen Pflanzen mit erhöhter Fitness könnten längerfristig Gründereffekte ausgehen (s.a. WEBER, 1995).

Ausserdem erscheint die Bildung von Mittelwerten in manchen Fällen unzulässig. So fassen CRAWLEY et al. (1993) die nach zwei Versuchsjahren ermittelten Überlebensraten der Samen der beiden transgenen Linien zu einem Wert zusammen. Dieses Verfahren wird der Situation im kommerziellen Anbau, die mit Hilfe dieser Versuche eingeschätzt werden soll, nicht gerecht. Erst HAILS et al. (1997) diskutieren diese Ergebnisse für beide Linien getrennt. Dabei bilden sie jedoch aus den Überlebensraten im ersten und zweiten Jahr einen Mittelwert. Da hier die beiden Einzelwerte auf die Anzahl der zu Beginn des ersten Versuchsjahrs vergrabenen Samen bezogen werden, erscheint diese Mittelwertbildung nicht zulässig: Der für den Zeitraum von zwei Jahren ermittelte Einzelwert schließt ja den Rückgang der Lebensfähigkeit im ersten Jahr bereits mit ein.

Unberücksichtigt bleibt auch der folgende Aspekt: Nach zwei Jahren sind zwar bei den beiden transgenen Linien weniger bzw. keine vergrabenen Samen keimfähig (0,1 % bei der kanamycinresistenten Linie) als bei der Kontrolllinie (0,5 %). Die Überlebensrate liegt jedoch im zweiten Jahr sowohl bei der Kontrolllinie als auch der kanamycinresistenten transgenen Linie höher als im ersten Jahr, und dieser Effekt ist bei der transgenen Linie stärker ausgeprägt.¹⁵ Hier wäre zumindest eine Fortsetzung der Versuche nötig, um zu klären, inwieweit in späteren Jahren und unter eventuell besseren Umweltbedingungen auch absolut mehr Samen dieser transgenen Linie überleben könnten als Samen der Kontrolllinie. Auch diesem Phänomen liegen vermutlich einzelne Samen zugrunde, deren Überdauerungsfähigkeit vom Mittelwert abweicht.

¹⁴ Im zweiten Jahr unterliegen die Rapspflanzen der Konkurrenz, wenn die Felder nicht weiter bewirtschaftet werden und verunkrauten.

¹⁵ Die Überlebensrate beschreibt hier den Anteil lebensfähiger Samen am Jahresende bezogen auf die lebensfähigen Samen zu Beginn des Jahres.

4.7.2 Soja

Seit 1996 werden in den USA und mittlerweile auch in Argentinien große Flächen mit Roundup® Ready Sojabohnen bepflanzt. Das Gen, welches in die DNS der Sojapflanzen integriert wurde, codiert für das Enzym EPSPS (= 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat Synthase) und macht die Pflanze resistent gegenüber Roundup® Ready, einem Herbizid mit dem Wirkstoff Glyphosat. Eine vergleichende Untersuchung der stofflichen Zusammensetzung von transgenen Sojabohnen, im Rahmen des US-Genehmigungsverfahrens vorgelegt, zeigte einen veränderten Fett- und Kohlenhydratgehalt und einen erhöhten Fettsäureanteil (PADGETTE et al., 1996). Die Unterschiede sind signifikant. Dies weist auf Pleiotropie- oder Positionseffekte hin. Fütterungsversuche an Kühen, einerseits mit transgenem, andererseits mit konventionellem Soja, zogen bei denen mit transgenen Sojalinien gefütterten Kühen einen veränderten Milchfettgehalt nach sich (HAMMOND et al., 1996). Die angesprochene Arbeit enthält einige weitere Hinweise auf ungeklärte Sachverhalte. So war die Versuchsgruppe denkbar klein (nur 5-6 Kühe pro Versuchsgruppe!), was an der statistischen Aussagefähigkeit der Ergebnisse erhebliche Zweifel aufkommen lässt, zum anderen lassen Daten aus dem Ergebnisteil noch einige Fragen offen, da sich im Vergleich der einzelnen transgenen Linien mit konventionellem Soja z.T. erhebliche Unterschiede feststellen lassen, die offensichtlich unberücksichtigt blieben. Es sei angemerkt, dass die bei den Versuchen verglichenen bzw. verfütterten Pflanzen der transgenen Linien nicht mit Roundup® Ready behandelt worden waren. Glyphosat, der Hauptbestandteil des Herbizids, hat jedoch auch in sublethalen Dosen nachweislich erhebliche gesundheitliche Folgen für Säugetiere, z.B. geringere Gewichtszunahme, verringerte Libido und ein geringeres Ejakulatvolumen (YOUSEF et al., 1995; COX, 1995), neueste Untersuchungen legen cancerogene Effekte auch bei Menschen nahe (HARDELL & ERIKSSON 1999). Bei transgenen Sojapflanzen konnte darüber hinaus noch ein veränderter Phytohormonhaushalt festgestellt werden. Dabei stellten LAPPE et al. (1999) fest, dass der Gehalt von diversen Phytohormonen im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollgruppen um bis zu 14 % verringert war. PADGETTE et al. (1996) wiesen schon Unterschiede im Fasergehalt zwischen transgenen und nicht-transgenen Sojapflanzen nach, ein Signifikanztest blieb allerdings aus. Neuere Untersuchungen ergaben, dass transgene Sojabohnen bei bodennahen Temperaturen ab 45 °C schlechter wachsen und geringere Erträge aufweisen als Kontrollgruppen. Zudem platzten die Pflanzen auf, was zu Ernteauffällen von bis zu 40% führte und mit einem um bis zu 20% erhöhten Ligningehalt in transgenen Pflanzen erklärt wird (COGHLAN, 1999). Auch hier lassen sich Pleiotropie- oder Positionseffekte vermuten.

4.7.3 Baumwolle

Transgene Baumwolle wird in zwei transgenen Varianten angebaut. Die eine Variante zielt auf Insektenresistenz durch die Expression von für *Bt*-Toxine codierende Gensequenzen, die andere, analog zu Soja (s.o.), auf eine Resistenz gegenüber Roundup® Ready. Der kommerzielle Anbau der veränderten Pflanzen hat teilweise zu größeren Problemen geführt. So kam es 1997 im amerikanischen Bundesstaat Mississippi zu Kapseldeformationen und -abwürfen bei transgener, glyphosatresistenter Baumwolle, was bei ca. 200 Farmern zu großen wirtschaftlichen Verlusten führte (HAGEDORN, 1997). Der Anbau von *Bt*-Baumwolle erwies sich ebenfalls als nur bedingt erfolgreich. So traten bei Zielorganismen Resistenzen auf und Teilresistenzen führen Anfälligkeiten von bis dato als unproblematisch eingeschätzten Insekten nach sich (SADRAS, 1998). Die Befürchtung, dass durch den Anbau transgener *Bt*-Baumwolle die Resistenzentwicklung bei Zielorganismen gefördert wird, scheint sich offensichtlich zu bewahrheiten (PRAKASH, 1997). Die Hoffnung, den Pestizideinsatz durch den Anbau transgener Baumwolle zu senken, ist neuesten Berichten zufolge nicht realistisch. Die Zahlen weisen eher darauf hin, dass beim Anbau dieser Organismen sogar höhere Mengen von Pestiziden zum Einsatz kommen (USDA, 1999). So wurden im

Jahre 1997 in den Anbaugebieten Mississippi Portal und Southern Seaboard zwar bzgl. der *Bt*-Zielorganismen erwartungsgemäß weniger Insektizide eingesetzt als beim Anbau von konventioneller Baumwolle, diese Einsparungen wurden aber durch den Einsatz anderer Insektizide überkompensiert, die gegenüber *Bt* unempfindlichen Schädlingen wirken.

4.7.4 Weitere Beispiele

In Canada fanden schon 1992 Freisetzungsversuche mit transgenen Pflanzen statt, die eine gentechnisch vermittelte Resistenz gegen abiotischen Stress aufweisen sollen (MCKERSIE et al., 1996). Alfalfapflanzen (*Medicago sativa* L.) waren mit einem Mangan-Superoxiddismutasegen aus *Nicotiana plumbiginifolia* transformiert worden, um sie winterhärter zu machen¹⁶. Die Freisetzungsversuche fanden mit je zwei transgenen Linien statt, bei denen das rekombinante Protein entweder zu den Chloroplasten oder den Mitochondrien geschleust wird. Alle transgenen Pflanzen überstanden zwei aufeinanderfolgende Winter besser als die nichttransgenen Kontrollen. Die erhöhte Überlebensrate führte auch zu besseren Erträgen. Die transgenen Pflanzen waren zudem bereits in der Saison vor dem ersten Winter ertragreicher. Eine solche Fitnesssteigerung, ohne dass ein Winterstress vorlag, war in Vorversuchen unter kontrollierten Bedingungen nicht gefunden worden. Möglicherweise sind die transgenen Pflanzen auch gegen Umsetzen und Wassermangel resistenter, da Superoxiddismutase allgemein die Widerstandsfähigkeit gegen „oxidativen Stress“ erhöhen soll. Dieser wird sowohl durch Frost als auch durch Sauerstoffmangel und Austrocknung hervorgerufen (MCKERSIE et al., 1997).

BERGELSON et al. (1996) untersuchten an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Acker-schmalwand) den Effekt eines Herbizidresistenzgens auf die Fitness. Als Fitnessindikator diente die Samenproduktion der Pflanzen im Freiland. Die AutorInnen verglichen transgene Pflanzen mit dem *Csr-1* Gen, das Resistenz gegen das Herbizid Chlorsulfuron vermittelt mit *Arabidopsis*-Pflanzen, die dieses Gen aufgrund einer Mutation tragen, sowie mit Nullsegreganten, die zweimal mit der herbizidempfindlichen Ausgangspflanze rückgekreuzt worden waren. Auf diese Weise konnte ein starker Rückgang der Fitness (um 34 bis 40 %) eindeutig pleiotropen Effekten des spezifischen *Csr-1* Gens zugeschrieben werden. Der Fitnessverlust tritt ohne Herbizidapplikation auf und ist nicht auf die Addition des zusätzlichen Gens **an sich** zurückzuführen. D. h. diese Versuche zeigen, dass Transgene keine „genetische Bürde“ bedeuten müssen.

Freilandversuche mit nichttransgenen Pflanzen verdeutlichen allerdings, dass die Samenproduktion nur einer von mehreren Faktoren ist, die über den Ausbreitungserfolg von Pflanzen entscheiden (BERGELSON, 1994). In diesen Experimenten waren die Pflanzen interspezifischer Konkurrenz ausgesetzt. Hier schnitten die – nichttransgenen – *Arabidopsis*-pflanzen mit dem *Csr-1* Gen ebensogut ab wie Kontrollpflanzen ohne dieses Gen, obwohl letztere sehr viel mehr Samen bilden. Begrenzender Faktor war in diesen Versuchen der Raum, der den Pflanzen bzw. Keimlingen zur Verfügung stand, und nicht die Samenmenge.

¹⁶ Winterhärte ist Widerstandskraft gegen eine Kombination von Einflüssen wie Frost, Vereisung, Austrocknung, Überschwemmung und Krankheiten (MCKERSIE et al., 1997).

4.8 Bäume

Die Aktivitäten auf dem Gebiet transgener Bäume haben in den letzten Jahren stark zugenommen. Bis 1998 fanden offiziell weltweit 116 Freisetzungsversuche in 17 Staaten mit 24 verschiedenen Baumarten statt (s. Tab. 1). Neuere Zahlen sind nicht bekannt, da die Liste der OECD seit 1998 nicht mehr aktualisiert wurde (OWUSU, 1999). Das zunehmende Problembewusstsein bzgl. transgener Organismen auf dem Nahrungsmittel-Sektor hat offensichtlich eine Intensivierung der Aktivitäten seitens der Wirtschaft und Forschung in anderen Bereich hervorgerufen. Hiervon sind auch Bäume betroffen. Die Effekte, die man bei Bäumen mit den Manipulationen erreichen will, sind u.a.:

- Lignin-Modifikation zwecks besserer Weiterverarbeitung für die Papierindustrie
- Verbesserung des Wachstums
- Herbizidtoleranz
- Schädlingsresistenz
- Produktvereinheitlichung
- Sterilität

Tab. 2: Freisetzungsversuche mit transgenen Bäumen (Tab. aus OWUSU, 1999)

Baumart	Jahr der ersten Freisetzung
Zitterpappel, Aspe (<i>Populus tremula</i>)	1988
Schwarznuß (<i>Juglans nigra</i>)	1989
Pappel (<i>Populus spec.</i>)	1989
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	1991
Apfel (<i>Malus domestica</i>)	1991
Edelkastanie (<i>Castanea sativa</i>)	1992
Pflaume (<i>Prunus domestica</i>)	1992
Red river gum (<i>Eucalyptus camaldulensis</i>)	1993
Schwarz-Fichte (<i>Picea mariana</i>)	1993
Amberbaum (<i>Liquidambar styraciflua</i>)	1994
Schwarzpappel (<i>Populus nigra</i>)	1995
Sand- Hängebirke (<i>Betula pendula</i>)	1996
Amerikanische Kastanie (<i>Castanea dentata</i>)	1996
Orange (<i>Citrus spp.</i>)	1996
Blaugummibaum (<i>Eucalyptus globulus</i>)	1996
Fichte (<i>Picea abies</i>)	1996
Kiefer (<i>Pinus spp.</i>)	1996
Gemeine Kiefer (<i>Pinus sylvestris</i>)	1996
Acacia mangium (<i>A. mangium</i>)	1997
Monterey-Kiefer (<i>Pinus radiata</i>)	1997
Teak (<i>Tectona grandis</i>)	1997
Flooded gum (<i>Eucalyptus grandis</i>)	1998
Olive (<i>Olea europea</i>)	1998
Rosenkranzpappel (<i>Populus deltoides</i>)	1998
Quaking aspen (<i>Populus tremuloides</i>)	1998
Kirsche (<i>Prunus avium</i>)	1998

4.8.1 Beobachtete Effekte bei Freilandversuchen

4.8.1.1 Stabilität der Expression

Das generelle Problem bei transgenen Organismen, die Stabilität der Expression, ist bei Bäumen aufgrund deren Langlebigkeit ein besonderes Problem. Bei Bäumen konnten in Freilandversuchen schon nach einem relativ kurzen Zeitraum Instabilitäten nachgewiesen werden. Dies war bereits aus Gewächshausversuchen bekannt (z.B. FLADUNG et al., 1997a; FLADUNG, 1999). Welche Auswirkungen solche Effekte haben werden, ist durch die Tatsache, dass Bäume mehrere hundert Jahre alt werden können, eine besonders heikle Frage. Teilweise sind solche Reversionen auf den Verlust der entsprechenden Sequenzen, zum anderen aber auch auf fehlende Expression trotz vorhandener Sequenz zurückzuführen (FLADUNG & KUMAR, 1999). Derartige Phänomene sind auch in Freilandversuchen festgestellt worden. FLADUNG & MUHS (1999) wiesen nach, dass bei einem Freilandversuch mit

Populus zwei Reversionen mit eindeutig verschiedenen Ursachen auftraten. Die Gründe hierfür werden noch untersucht. Die Unsicherheiten bezüglich der Stabilität der Expressionen (vor allem über einen längeren Zeitraum) weisen darauf hin, dass alle Konzepte, die über eine transgen vermittelte Sterilität der Pflanzen die Ausbreitung verhindern wollen, sehr fragwürdig sind (s.u.).

4.8.1.2 Pleiotropie- und Positionseffekte

Auch Pleiotropie- oder Positionseffekte wurden bei Bäumen unter Freilandbedingungen relativ häufig beobachtet. Durch Gewächshausexperimente war bereits bekannt, dass mit einem 35S-rolC Promoter versehene Pappeln früher blühen können als nicht-transgene Kontrollgruppen (FLADUNG et al., 1999a). Dies könnte mit einem signifikant veränderten Phytohormonlevel zusammenhängen, der bei diesen transgenen Pappeln beobachtet wurde (FLADUNG et al., 1997b) und welcher allgemein eng mit dem Blühverhalten von Pflanzen verknüpft ist. Auf dieses Risiko wurden die Genehmigungsbehörden vor einem Freisetzungsvorhaben in Schleswig-Holstein mit transgenen Pappeln hingewiesen (FLADUNG, pers. Mit.). Bei einem 1996 begonnenen Freisetzungsvorhaben wurden dann auch nach 3 Jahren an einer Pflanze weibliche Blütenknospen entdeckt. Natürlicherweise blühen Pappeln erst nach ca. 8 Jahren. Die Blüten wurden entfernt und vernichtet, nachdem sie bei einer Routineuntersuchung entdeckt worden waren. Das Risiko von Ausbreitungsmöglichkeiten bei transgenen Bäumen, das sich bei einem männlichen Blütenstand ergeben würde, ist aufgrund der Hybridisierungsmöglichkeiten bei Pappeln (s.u.) immens. Auf weitere Pleiotropieeffekte wird auch noch im Kapitel Resistenzen (s.u.) hingewiesen.

4.8.1.3 Mykorrhiza

Mykorrhiza, d.h. die mutualistische Beziehung zwischen Pflanzenwurzel und Pilz, hat eine große Bedeutung für das Leben von Pflanzen, insbesondere auch für Bäume. Die Vorteile, die sich durch diese Beziehung für den Baum ergeben, sind unter anderem eine Verbesserung der Nährstoffaufnahme durch Oberflächenvergrößerung im Wurzelbereich, verbesserte Wasserversorgung und eine größere Schwermetalltoleranz. Der Pilz wird im Gegenzug vom Wirtsorganismus mit diversen Assimilaten versorgt. Inwieweit es hierbei zu horizontalen Gentransfers (hGT) kommen kann, ist noch Forschungsgegenstand, konnte aber z.B. durch HOFMANN et al. (1994) bei *Aspergillus niger* nachgewiesen werden. Bei diesem Gewächshausversuch wurden transgene, hygromycinresistente Pflanzen (u.a. *Brassica napus*, *B. nigra*, *Datura innoxia*) mit dem Mykorrhizapartner *A. niger* kultiviert, wobei ein hGT bezüglich des Resistenzgens, aber auch anderer DNA-Sequenzen nachgewiesen werden konnte. Ähnliche Effekte fanden BRYNGELSSON et al. (1988) bei dem parasitischen Pilz *Plasmodiophora brassicae*, wobei noch auf die Möglichkeit einer Ausbreitung durch diverse Hybridisierungsmöglichkeiten bei Pilzen hingewiesen wurde. Erste Untersuchungen an freigesetzten Pappeln in Schleswig-Holstein in Bezug auf deren Auswirkung auf Mykorrhiza wiesen signifikante Unterschiede zwischen der Mykorrhizierung von transgenen und nicht-transgenen Pflanzen auf (FLADUNG et al., 1999b), Ergebnisse über einen eventuellen hGT liegen noch nicht vor, werden aber aktuell untersucht.

4.8.1.4 Hybridisierung

Die Hybridisierungsmöglichkeiten und damit das Risiko der ungewollten Ausbreitung von technisch veränderten Gensequenzen, müssen je nach Baumart unterschiedlich bewertet werden. Es sind aber gerade bei den Gattungen *Populus*, Eukalyptus und *Pinus* - Gattungen also, die intensiv gentechnisch bearbeitet werden - hohe Hybridisierungspotentiale bekannt. Bei *Populus* beispielsweise sind in den nördlichen, gemäßigten Zonen ca. 30 Arten mit zahl-

reichen Hybriden bekannt. Für Eukalyptus gilt dies in Australien bzw. Südostasien entsprechend, wobei die Arten- und Hybridisierungszahl diejenigen von *Populus* noch bei weitem übertreffen. Das Risiko einer Auskreuzung scheint entsprechend hoch. Bei einem Modellversuch in den USA konnten in der Nähe von 2 industriellen *Populus trichocarpa* X *P. deltoides* Hybridplantagen (nicht transgen!) Auskreuzungen nachgewiesen werden. 3,8% der in der Nähe aufwachsenden Wildlinge waren Kreuzungen zwischen Mutter/Wild und Vater/Hybrid mit gleicher Wuchs- und Etablierungsrate wie reinerbige Wildlinge (DIFAZIO et al., 1999). Ähnliches könnte sich bei Eukalyptus ergeben, pflanzen sich diese doch, genau wie *Populus* und *Pinus*, auch mit Pollen und somit über entsprechend große Distanzen hin fort (SOUTHERTON et al., 1999). Einer transgen vermittelten Sterilität, wie oft zur Vermeidung dieses Phänomens vorgeschlagen, ist aufgrund der schon oben erwähnten Unsicherheit im Bezug auf die Stabilität der transgenen Expressionen mit Skepsis zu begegnen.

4.8.1.5 Insektenresistenz

In China werden Klone von *Populus nigra* in einem Freilandversuch auf ihre transgen herbeigeführte Insektenresistenz und andere Effekte hin untersucht. Nach erfolgter Transformation konnten im Gewächshaus die Bäume in 3 verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

- Keine Resistenz gegenüber Zielorganismen trotz erfolgreichem Gentransfer, Habitus und Wuchsverhalten unverändert.
- Resistent, veränderter Blatthabitus, Störung der Chlorophyllbiosynthese (gelbliche Blätter), geringes Wachstum.
- Resistent gegenüber Zielorganismen, besseres Wuchsverhalten als nicht-transgene Kontrollgruppen.

Bäume dieser dritten Gruppe wurden im Freiland getestet. Bemerkenswerterweise konnten nach 2 Jahren an diesen Pflanzen Fraßschäden ausgemacht werden, die von bis dato als unbedeutend eingestuften Insekten verursacht worden waren. Die Resistenz gegenüber den Zielorganismen hat also offensichtlich eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber anderen Phytophagen zufolge oder Möglichkeiten für sekundäre Schädlinge eröffnet. Desweiteren konnten an den Bäumen vergrößerte Blätter und veränderte Rindenstrukturen beobachtet werden. Dies zeigt deutlich, dass eine Reihe weiterer Merkmale durch den gentechnischen Eingriff verändert werden können, die vorher nicht absehbar waren. (EWALD & HAN, 1999). Auch bei einer früheren Untersuchung aus China an insektenresistenten *Populus nigra* im Freiland wurde festgestellt, dass sich der gentechnische Eingriff auch auf die Blattmorphologie ausgewirkt hatte, ohne dass die Ursachen hierfür eindeutig geklärt werden konnten (WANG et al., 1996).

4.8.1.6 Virusresistenz

Bei transgenen Pflaumenbäumen (*Prunus domestica*), welche ein virales Hüllprotein exprimieren, konnte durch MALINOWSKI et al. (1998) bei einem Freilandversuch ein Resistenzdurchbruch von PPV-S Viren nachgewiesen werden. Die generellen Risiken der Hüllproteinstrategie (s.a. Kap. 4.5) scheinen bei Bäumen aufgrund deren Langlebigkeit ein besonderes Risiko darzustellen.

Zur Schädlingsresistenz allgemein bleibt noch anzumerken, dass eine Vergleichbarkeit selbst innerhalb derselben Art oftmals nicht gegeben ist, da sich durch die Ausbildung von Ökotypen seitens der Wirtsorganismen als auch der Schädlingspopulationen mit großer genetischer Variabilität Unterschiede in vielerlei Hinsicht ergeben können (PERRY et al., 1996; HE, 1998; KELLEY et al., 1999). Dies muss sowohl beim „traditionellen“ Waldbau, aber auch beim Anbau transgener Bäume berücksichtigt werden, insbesondere wenn diese zusätzlich geklont und somit genetisch weitestgehend identisch sind.

4.8.1.7 Ligninmodifikationen

Freisetzungsversuche mit Bäumen, die hinsichtlich ihrer Ligninsynthese gentechnisch modifiziert worden sind, finden seit kurzem in China und in Frankreich statt. Ergebnisse über eventuelle Auswirkungen liegen noch nicht vor, trotzdem sei hier kurz auf dieses Verfahren eingegangen. Die Delignifizierung von Holz erfolgt durch die Papierindustrie mittels Sulfid- bzw. Sulfatverfahren und erfordert einen großen wirtschaftlichen Aufwand mit teilweise erheblichen Umweltbelastungen. So wird nun nach Möglichkeiten gesucht, mittels gentechnischen Veränderungen Bäume zu produzieren, welche schon im Holzaufbau derart verändert sind, dass die Weiterverarbeitung für die Papierindustrie entsprechend erleichtert wird. Die Manipulationen befinden sich noch im experimentellen Stadium. Es wird an der Veränderung diverser Syntheseschritte gearbeitet, deren Stoffwechselweg hochkomplex und teilweise noch nicht aufgeklärt ist (BOUDET et al., 1998). Lignin spielt eine wichtige Rolle für die Pathogenabwehr von Bäumen und auch hier sind noch viele Fragen ungeklärt (FINK, 1999), Veränderungen der Ligninsynthese hin zu einer Delignifizierung könnten mit einer erhöhten Pathogenanfälligkeit korreliert sein. Über Veränderungen des Ligninstoffwechsels werden auch weitere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie z.B. der Gehalt einzelner Pflanzenhormone oder phenolischer Komponenten beeinflusst (BOUDET et al., 1998). Dann lässt sich nicht ausschließen, daß z.B. auch das Wuchsverhalten und die Blütenbildung verändert werden.

4.8.1.8 Zusammenfassung

Durch die Mehrjährigkeit von Bäumen ergeben sich große Unsicherheiten hinsichtlich der ökologischen Risikoanalyse. Bäume zeichnen sich zudem durch eine hohe Plastizität hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit den jeweiligen Umweltbedingungen aus. Das bedeutet, dass Bäume mit identischer genetischer Ausstattung (z.B. Klone) sich je nach Standort hochsignifikant in ihrem Phänotyp unterscheiden können. Somit lassen sich beobachtete Effekte nur sehr bedingt auf andere Standorte übertragen. Dies gilt sowohl für biotische als auch für abiotische Umweltfaktoren. Die oben aufgewiesenen Unsicherheiten der Expressionen, ein hohes Hybridisierungspotential bei den gentechnisch veränderten Baumarten und noch erhebliche Wissensdefizite bzgl. des natürlichen Gentransfers weisen auf einen erheblichen Forschungsbedarf hin. Beim Vergleich mit historischen Analysen, die sich auf Risikopotentiale von Neophyten beziehen, ergibt sich durch die Tatsache, dass zwischen Ausbringung und spontaner Ausbreitung von derartigen Organismen und gerade auch bei Bäumen Zeiträume von Jahrzehnten bis Jahrhunderten liegen können, ein zusätzlicher Unsicherheitsfaktor (KOWARIK 1999).

4.9 Tiere

4.9.1 Allgemeine Recherche vor dem Hintergrund der erwarteten Effekte

Zur Zeit wird intensiv daran gearbeitet, Tiere gentechnisch zu verändern. Bei der gentechnischen Veränderung werden je nach Tierart verschiedene Ziele verfolgt. Landwirtschaftliche Nutztiere sollen mit Hilfe der Gentechnik so verändert werden, dass sie selber krankheitsresistent sind, Medikamente in der Milch produzieren bzw. um für die Xenotransplantation Organe bereitzustellen. Diese Forschungen stehen jedoch noch am Anfang. Einer kommerziellen Nutzung wesentlich näher (s. z.B. IDEL 1998) sind transgene Fische, die vor allem mit den Zielen, das Wachstum zu beschleunigen, das Endgewicht zu erhöhen oder die Frostresistenz zu steigern, gentechnisch verändert werden. Weltweit wurden schon verschiedene Fischarten, wie Lachse, Forellen, Karpfen, Welse, Medaka, Zebrafische, Schmerlen, Hechte, Schwertträger und Goldfische gentechnisch verändert (HANKELN & SCHMIDT, 1997). Ein weiteres wichtiges Feld im Bereich Gentechnik bei Tieren ist die Herstellung von transgenen Insekten, vor allem Moskitos, die Krankheiten, wie z.B. Malaria

oder Denguefieber auf den Menschen übertragen können (BAYMANN & TAPPESE, 1996). Es gibt aber auch Bestrebungen, Nützlinge (Insekten und andere Arthropoden) mit Genen auszustatten, die Toleranz gegen häufig verwendete Pestizide verleihen, um so Nichtziel-Effekte der chemischen Schädlingsbekämpfung zu verringern (HANKELN & SCHMIDT, 1997).

Bei Tieren hat es im Gegensatz zu Pflanzen bisher nur wenige Freisetzungen gegeben. Analog der in Kapitel 4.3 schon weiter ausgeführten Methodik wird in diesem Kapitel der aktuelle Stand des Wissens über mögliche Auswirkungen der Freisetzungen von transgenen Tieren zusammengefasst. Vor diesem Hintergrund werden nur Freisetzungsversuche ausgewertet, die auf mögliche Umweltschäden bei zukünftigen Freisetzungen hinweisen.

4.10 Tiere, fallspezifisch

Da für landwirtschaftliche Nutztiere eine unkontrollierte Ausbreitung zum jetzigen Zeitpunkt wenig wahrscheinlich ist, wird bei den Fallbeispielen hauptsächlich auf Freisetzungsversuche mit transgenen Fischen eingegangen.

4.10.1 Transgene Fische

Die andauernden Überfischungen der Weltmeere und die Sorge um die zukünftige Versorgung der Erdbevölkerung mit Nahrung hat in den letzten Jahren zu einer Intensivierung der Forschung und Entwicklung von transgenen Fischen geführt. In diesem Zusammenhang wird auch von der „blauen Revolution“ gesprochen (MARTINEZ, 1997). Neben Fischen werden hierbei auch Krustentiere, Muscheln, Seeigel und Algen modifiziert. An dieser Stelle soll aber nur auf Fische eingegangen werden, da bei diesen die Entwicklung bzgl. gentechnischer Eingriffe am weitesten fortgeschritten ist. Zudem werden Fische für die ersten gentechnisch modifizierten Tiere gehalten, die für den menschlichen Verzehr in Verkehr gebracht werden könnten (HEW & FLETCHER, 1997). Die Eigenschaften, die bei Fischen durch gentechnische Eingriffe erreicht werden sollen, sind u.a.:

- Erhöhung und Verbesserung des Wachstums
- erhöhte Kältetoleranz
- Sterilität
- Schadstofftoleranz
- Krankheitsresistenz
- Verbesserte Fleischqualität (z.B. Färbung, Fettanteil, Geschmack).

Am weitesten fortgeschritten sind die Modifikationen in Bezug auf Wachstumssteigerung durch Integration von Wachstumshormongenen und die Beeinflussung der Kältetoleranz, die z.B. durch die Übertragung von für Anti-Frost-Proteine (AFP) codierenden Gensequenzen erreicht wird. Darüber hinaus werden Erkenntnisgewinne über genetische Regulationsmechanismen allgemein erwartet. Die Fischarten, die gentechnisch verändert werden, sind in folgender Tabelle aufgeführt (in teilweiser Anlehnung an PIKER et al., 1998).

Tab 3: Übersicht transgener Fischarten

deutscher Name:	Wissenschaftl. Name:	Natürliche Herkunft:	Haltung. Region:
Atlantischer Lachs	<i>Salmo salar</i>	Nordatlantik	Nordeuropa, Chile, Nordamerika
Regenbogenforelle	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (<i>Salmo gaidneri</i>)	östl. Nordpazifik	weltweit
Pazifischer Lachs	<i>Onchorynchus spp.</i>	Nordpazifik	
Hecht	<i>Esox lucius</i>	Eurasien, Nord-amerika	Süßwasser weltweit
Zebrafisch	<i>Brachydanio rerio</i>	östl. Vorderindien	Weltweit
Karpfen, inkl. Zuchtformen	<i>Cyprinus carpio</i>	Eurasien	Weltweit
Goldfisch	<i>Carassius auratus</i>	Ostasien	Weltweit
Graskarpfen	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	China	Eurasien
europäischer Schlammpeitzger	<i>Misgurnus fossilis</i>	Europa	Europa
getüpfelter Gabelwels	<i>Ictalurus punctatus</i>	Nordamerika	Nord- und Mittel-amerika
Raubwels	<i>Clarias gariepinus</i>	Afrika	Afrika
Alaska-Pollack, Mintai	<i>Theragra chalcogramma</i>	Nordpazifik	
Medaka, Reisfisch	<i>Oryzias latipes</i>	Japan	
Schwertkärpfling	<i>Xiphophorus spp.</i>	Mittelamerika, Mexiko	in Aquarien weltweit
Goldbrasse	<i>Sparus aurata</i>	Mittelmeer, Rotes Meer	Mittelmeer, Rotes Meer
Weißer Stumpfnase	<i>Rhabdosargus globiceps</i>	Südafrika	
Roter Tai, Akadei	<i>Chrysophris (Pagrus) major</i>	Japan	Israel
<i>Tilapia</i>	<i>Oreochromis sp.</i>	Afrika, Vorderasien	Weltweit
Zebrabuntbarsch	<i>Cichlasoma nigrofasciatum</i>	Guatemala	Weltweit

Über die Auswirkungen einer kommerziellen Nutzung und Freisetzung, d.h. Einbringung in Zuchtteiche oder Netzkäfigfarmen (sog. Aquafarming) von transgenen Vertretern dieser Arten liegen noch keine Veröffentlichungen vor, doch lassen Laborversuche und die versuchsweise Haltung in geschlossenen Zuchtbecken einige Rückschlüsse auf ökologische Risiken zu.

4.10.1.1 Pleiotropieeffekte

Die diversen gentechnischen Veränderungen bei Fischen gehen mit z.T. großen Pleiotropieeffekten einher. Große Wachstumssteigerungen bei transgenen Lachsen und Schlammpeitzgern hatten u.a. extreme Kopf- und andere Körperdeformationen sowie veränderte Fettablagerungen zur Folge. Der Wachstumshormonhaushalt wird durch den gentechnischen Eingriff generell verändert (DUNHAM, 1999). Vergrößerte Kiemenoberflächen gehen mit einer erhöhten Sauerstoffaufnahme einher (STEVEN & SUTTERLIN, 1999). Hierbei

wurde festgestellt, dass bei einer Vergrößerung der Kiemenoberfläche um den Faktor 1,24 bei transgenen Lachsen die Sauerstoffaufnahme bei diesen um den Faktor 1,6 höher lag als bei Kontrollgruppen. Versuche bei *Tilapia*, ebenfalls bzgl. Wachstumshormone modifiziert, zeigten dass bei diesen im Vergleich zu Kontrollgruppen eine veränderte Aminosäure- und Cholesterinzusammensetzung auftrat (MARTINEZ et al., 1999). Transgene Karpfen wiesen gegenüber Kontrollgruppen einen erhöhten Proteingehalt, einen reduzierten Fett- sowie Wassergehalt im Fleisch, eine signifikant veränderte Aminosäurezusammensetzung (CHATAKONDI et al., 1995) und eine veränderte Nahrungsverwertung auf (FU et al., 1998). Ähnliche Effekte ergaben sich bei transgenen Welsen (DUNHAM, 1996a).

Eine Übersicht über aufgetretene, körperliche Deformationen bei transgenen Fischen bietet PANDIAN et al. (1999). Demnach traten auf:

- Tumore
- veränderte Flossen- und Wirbelformen
- Schädeldeformationen
- abnormes Kiemenwachstum
- fehlende Körpersegmente
- verkümmerte Nacken- und Schwanzformen.

FARRELL et al. (1997) beschreiben eine starke Verschlechterung der Schwimffähigkeit bei transgenen Lachsen. Durch Modifikationen im Bezug auf Wachstumshormone scheinen sich in der gesamten Ontogenese der Fische generell unvorhergesehene Auswirkungen zu ergeben (OSTENDFELD et al., 1998). GUILLEN et al. (1999) wiesen bei transgenen *Tilapia* im Vergleich zu Wildformen derselben Art ein verändertes Fraß- und Sozialverhalten nach. Auch bei transgenen Regenbogenforellen konnten veränderte Verhaltensweisen festgestellt werden. So wurde nach simulierten Reiherangriffen festgestellt, dass transgene Forellen schneller wieder in obere Gewässerzonen eindringen, früher mit Fressen beginnen und generell mehr Nahrung zu sich nehmen (JÖNSSON et al., 1996). DEVLIN et al. (1994, 1995) erreichten bei atlantischen Lachsen, die ein artfremdes Wachstumshormongen exprimierten, in der ersten Generation eine Wachstumssteigerung von 100 bis 600%. Die Genexpression wurde bei deren Nachkommen nur noch bei 2,2 bis 18,9% der Tiere aufrecht erhalten. Diese zeigten eine abnorme, grüne Verfärbung und im weiteren Verlauf des ersten Lebensjahres diverse körperliche Deformationen. Nach einem Jahr verstärkten sich die Deformationen und die Tiere starben. Über Pleiotropieeffekte hinaus ergeben sich also offensichtlich auch Probleme mit der Stabilität der Expressionen (s.u.).

4.10.1.2 Stabilität der Expressionen

Die Stabilität der Genexpressionen ist bei transgenen Fischen ein noch bei weitem nicht gelöstes Problem. Laut PANDIAN et al. (1999) liegt bis dato noch keine einzige wissenschaftliche Publikation vor, die eine stabile Aufrechterhaltung der Genexpression in Bezug auf Wachstumssteigerung in der F₁-Generation nachweisen könnte. Sogar der Nachweis der Genexpression an sich ist z.T. noch ungelöst. Versuche, bei denen Wachstumssteigerungen nachgewiesen werden konnten, gehen oftmals mit geringer Überlebensrate, einer hohen Deformationsfrequenz und verringerter Vermehrungsrate einher (s.o.). Daneben ist Mosaikismus, d.h., dass innerhalb eines modifizierten Individuums sowohl Zellen mit als auch ohne die übertragenen Gensequenzen vorkommen, ein bei allen transgenen Fischen vorkommendes Phänomen. Dabei variiert die Anzahl der Zielensequenzen von Zelle zu Zelle, Organ zu Organ und von Individuum zu Individuum. Gerade bei übertragenen Wachstumshormongen gibt es hierfür einige Beispiele, u. a. konnte dieses Phänomen bei Welsen, Zebrafischen und Karpfen festgestellt werden.

4.10.1.3 Weitere Risikoaspekte

Die für die potentiellen ökologischen Auswirkungen von transgenen Fischen entwickelten Szenarien reichen von äußerst optimistischen, sowohl der bedrohten aquatischen Tierwelt als auch der Weltbevölkerung nützenden Vorstellungen (SUTTERLIN et al., 1996) bis hin zu Computermodellen, die zu dem Schluss gelangen, dass ein einziger transgener Fisch zur Ausrottung einer kompletten Fischpopulation führen kann (MUIR & HOWARD, 1999). Fest steht, dass durch die herkömmlichen Haltungsformen bei kommerziellen Fischzuchtbetrieben ein Entweichen von Individuen bzw. deren Brut häufig vorkommt und sehr schwer zu verhindern ist. Dies hat bereits zu Beeinträchtigungen wild lebender Populationen geführt und kann sowohl deren Bestände gefährden (HINDAR et al., 1991) als auch negative Auswirkungen auf die aquatischen Biozöten generell haben (HINDAR, 1993). Bei transgenen Fischen ist durch die oben aufgezeigten Effekte einerseits eine Veränderung des Nahrungsspektrums in Qualität und Quantität zu erwarten, da die extrem wachsenden Individuen ein verändertes Fraßverhalten an den Tag legen, andererseits besteht durch die Modifikation bzgl. der Frostresistenz die Möglichkeit einer Erweiterung der potentiell nutzbaren Habitate und eine daraus folgende Beeinträchtigung der natürlicherweise an kalte Gewässer angepassten Arten. Auch das Konkurrenzverhalten und die sexuelle Selektion werden durch die häufig überdurchschnittlich großen, transgenen Fische verändert. Untersuchungen über mögliche Auswirkungen auf Prädatoren und andere Mitglieder der aquatischen Biozöten liegen noch nicht vor. Dem Verfahren einer transgen herbeigeführten Sterilität, um die Möglichkeit einer Auskreuzung zu verhindern, ist auch bei Fischen mit Skepsis zu begegnen. So ist bis heute weder durch „traditionelle“ noch durch gentechnische Methoden eine 100% Sterilität erreicht worden. Bei Welsen wurde festgestellt, dass sich transgene Individuen problemlos mit nicht-transgenen Individuen kreuzten (DUNHAM, 1996b). Ein ungewollter Transfer der modifizierten Gensequenzen in natürliche Populationen wäre demnach nicht auszuschließen. Eine ausführliche Zusammenfassung potentieller Risiken bei der Freisetzung aquatischer Organismen findet sich anschaulich bei PIKER et al. (1998).

5 RECHERCHEMETHODIK

Zur Bearbeitung der im Gutachten zu bearbeitenden Themenstellung wurden folgende Recherchewege genutzt:

- Auswertung der auf nationalen und internationalen Tagungen vorgestellten und in Tagungsbänden publizierten Begleitforschungsprojekte zu Freisetzungen von transgenen Organismen [z.B. die Tagungen „The Biosafety Results Of Field Releases Of Transgenic Organisms“ (CASPAR & LANDSMANN, 1992; JONES, 1994; MATSUI, 1997), das 1997 in Hannover abgehaltene Fachgespräch „Stand der Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter Pflanzen“ (BUNDESGESUNDHEITSBLATT 41, 1998) oder der BMBF-Workshop „Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen“ (BRAUNSCHWEIG, 1999)]. Wurden Forschungsergebnisse publiziert, die auf einen Umwelteffekt von GVO hinweisen, wurde gezielt versucht, den weiteren Fortgang der Untersuchungen zu ermitteln. Dazu wurden teils direkt die betreffenden Forschergruppen befragt, teils wurde in Datenbanken und dem Internet mit den AutorInnenamen und geeigneten Stichworten recherchiert.
- Auswertung von Publikationen, in denen der neueste Stand des Wissen zu Freisetzungen von transgenen Pflanzen zusammengefasst wird (z.B. FÖRSTER, 1998; SCHÜTTE et al., 1998a,b).
- Recherche in Datenbanken (Current Contents, Medline, Biosys) und im Internet mit geeigneten Stichworten und AutorInnenamen
- Anfragen bei den Konzernen Monsanto, Novartis und AgrEvo, um herauszufinden, welche Forschungsprojekte dort zur Thematik des Gutachtens bisher durchgeführt wurden bzw. aktuell laufen und welche Ergebnisse bisher erzielt wurden.
- Befragung von europäischen Forschungsinstituten wie z.B. BBA/Deutschland, INRA/Frankreich, John Innes Institute/Großbritannien, CCRO/Niederlande.¹⁷
- Direkte Befragung von Forschungsgruppen, die im Rahmen des US-amerikanischen Forschungsprogramms „USDA’s Biotechnology Risk Assessment Research“ Forschungsprojekte durchgeführt haben. (Dokumentiert unter: <http://nbiap.biochem.vt.edu/brag/cris.html>).
- Anfragen bei der Union of Concerned Scientists (USA)
- Anfragen an Forschungsinstitute /oder -institutionen in den Ländern des Südens, z.B. CSIRO, CIMMYT, IRRI, ISAAA.¹⁸

¹⁷ CCRO: Coordination Commission Risk Assessment Research; BBA: Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Braunschweig, Deutschland; INRA: Institut National de la Recherche Agronomique, Frankreich

¹⁸ CSIRO: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation; CIMMYT: International Maize And Wheat Improvement Center, Mexiko; IRRI: International Rice Research Institute., Manila, Philippinen; ISAAA: International Service for the Aquisition of Agri-Biotech Applications

Erfolgreiche Recherchewege:

- Datenbanken mit geeigneten Stichworten
- Auswertung von Tagungsbänden
- Mailinglisten (aufwendig)
- E-mail-Kontakte bei konkreten Anfragen zu einem durchgeführten Freisetzungsvorhaben. Unveröffentlichte Ergebnisse sind in der Regel nicht zu bekommen!
- Anfragen bei Behörden und Firmen blieben meist ohne Erfolg!

6 LITERATURVERZEICHNIS

- AARDEMA, B.W.; LORENZ, M.G. & KRUMBEIN, W.E. (1983): Protection of sediment-adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation. *Applied and Environmental Microbiology*, 46: 417–420.
- ADOLPHI, K. (1995): Neophytische Kultur- und Anbaupflanzen als Kulturflüchtlinge des Rheinlandes. NARDUS Band 2, Martina Galunder-Verlag, Wiehl.
- AGREVO USA COMPANY (1996): Effective weed control with Liberty TM herbicide and the Liberty Link TM system.
- ALLISON, R. (1997): OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract.
- ALVAREZ, A.J.; YUMET, G.M.; SANTIAGO, C.L. & TORANZOS, G.A. (1996): Stability of manipulated plasmid DNA in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 11: 129–135.
- AMARGER, N. & DELGUTTE, D (1990): Monitoring Genetically *Manipulated Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* Released in the Field. In: MACKENZIE, D.R. & HENRY, S.C. (eds): Proceedings of the 1st International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Kiawah Island, Bethesda: 221-228.
- AMMANN, K.; JACOT, Y. & RUFENER AL MAZYAD, P. (1996): Field release of transgenic crops in Switzerland – An ecological risk assessment of vertical gene flow. In: SCHULTE, E. & KÄPPEL, O.(Hrsg.): Gentechnisch veränderte krankheits- und schädlingsresistente Nutzpflanzen. Eine Publikation des Schwerpunktprogrammes Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds, Bern, 1: 101–157.
- ANDOW, D.A. & HUTCHINSON, W.D. (1998): *Bt*-corn resistance management. In: MELLON, M. & RISSLER, J. (eds.): Now or Never. Union of Concerned Scientists, Cambridge.
- AUSTIN et al. (1990): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- AWONG, J.; BITTON, G. & CHAUDHRY, G.R. (1990): Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments. *Applied & Environmental Microbiology*, 56: 977-983.
- BARCINA, I.; ARANA, I.; FERNANDEZ-ASTORGA, A.; IRIBERRI, J. & EGEEA, L. (1992): Survival strategies of plasmid-carrier and plasmidless *Escherichia coli* strains under illuminated and non-illuminated conditions, in a fresh water ecosystem. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 229-236.
- BARTSCH, D.; LEHNEN, M.; CLEGG, J.; POHL-ORF, M.; SCHUPHAN, I. & ELLSTRAND, N.C. (1999): Impact of gene flow from cultivated beet on genetic diversity of wild sea beet populations. *Molecular Ecology*.
- BARTSCH, D.; POHL-ORF, M.; SCHMIDT, M. & SCHUPHAN, I. (1995): Naturalization of transgenic (BNYV-Virus resistant) sugar beet in agricultural and non-agricultural areas. In: Proceedings of the 3rd International Symposium on the Biosafety Results of Field Test of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Monterey, California, Conference Proceedings: 353–361.
- BAYMANN, F. & TAPPESEER, B. (1996): Transgene Insekten. *GID* 111, April 1996.
- BEG et al. (1991): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- BENTGEN et al. (1989): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- BERGELSON, J. (1994): Changes in fecundity do not predict invasiveness: a model study of transgenic plants. *Ecology*, 75: 249–252.
- BERGELSON, J.; PURRINGTON, C.B. ; PALM, C.J. & LOPEZ-GUTIERREZ, J.-C.(1996): Costs of resistance: a test using transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 263: 1659–1663.
- BERNHARDT, M.; THOMAS, F. & TAPPESEER, B. (1991): Gentechnik und biologischer Pflanzenschutz, Analyse und Bewertung gentechnischer Ansätze in der biologischen Schädlingsbekämpfung. Öko-Institut e.V., Werkstattreihe 73, Freiburg i. Br.

- BIRCH, A.N.E.; GEOGHEGAN, I.E.; MAJERUS, M.E.N.; HACKET, C. & ALLEN, J. (1997): Interactions between plant resistance genes, pest aphid populations and beneficial aphid predators. In: Annual Report of the Scottish Crop Research Institute, 1996/1997: 68–72.
- BOLTON et al. (1991a): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- BOLTON et al. (1991b): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- BOUDET, A.-M.; GOFFNER, D.; MARQUE, C.; TEULIERES, C. & GRIMA-PETTENATI, J. (1998): Genetic manipulation of lignin profiles: a realistic challenge towards the qualitative improvement of plant biomass. *AgBiotech News and Information*, 10: 295N–304N.
- BOUMA, J.E. & LENSKI, R.E. (1988): Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature*, 335: 351-352.
- BOURDIN, D. & LECOQ, H. (1991): Evidence that heteroencapsidation between two potyviruses is involved in aphid transmission of a non-aphid-transmissible isolate from mixed infections. *Phytopathology*, 81: 1459–1464.
- BRANDT, P. (1998): Begleitforschung zu Freisetzungsexperimenten mit gentechnisch veränderten Pflanzen: „nice to know“ oder „need to know“?. *Bundesgesundheitsblatt*: 530–536.
- BRAUNSCHWEIG (1999): Proceedings zum BMBF-Workshop 25.–26. Mai 1998, BBA Braunschweig. In: SCHIEMANN, J. (Hrsg.): Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. BBA, Braunschweig 1999.
- BRYNGELSSON, T.; GUSTAFSSON, M.; GRÉEN, B. & LIND, C. (1988): Uptake of host DNA by the parasitic fungus *Plasmodiophora brassicae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33: 163–171.
- BUNDESGESUNDHEITSBLATT (1998): Nummer 12, Dezember.
- BYZOV, B. A.; NGUGEN, T. & BABJEVA, I. P. (1993): Yeasts associated with soil invertebrates. *Biology and Fertility of Soils*, 16: 183-187.
- CANDRESSE, T.; REVERS, F.; LE GALL, O. & KOFALVI, S. (1997): OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract.
- CARROLL, H.; MOENNE-LOCCOZ, Y.; DOWLING, D.N. & O’GARA, F. (1995): Mutational Disruption of the Biosynthesis Genes Coding for the Antifungal Metabolite 2,4-Diacetylphloroglucinol Does Not Influence the Ecological Fitness of *Pseudomonas fluorescens* F113 in the Rhizosphere of Sugarbeets. *Applied Environmental Microbiology*, 61(8): 3002-3007.
- CASPAR, R. & LANDSMANN, J. (eds.) (1992): The 2nd International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft, Braunschweig, Germany.
- CHAO, W.L. & FENG, R.L. (1990): Survival of genetically engineered *Escherichia coli* in natural soil and river water. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 319-325.
- CHATAKONDI, N.; LOVELL, R.; DUNCAN, P.; HAYAT, M.; CHEN, T.; POWERS, D.; WEETE, T.; CUMMINS, K. & DUNHAM, A. (1995): Body composition of transgenic common carp, *Cyprinus carpio*, containing rainbow trout growth hormone gene. *Aquaculture*, 138(1–4): 99–109.
- CHÈVRE, A.-M.; EBER, F.; BARANGER, A. & RENARD, M. (1997): Gene flow from transgenic crops. *Nature*, 389: 924.
- CHÈVRE, A.M.; EBER, F.; RENARD, M. & DARMENCY, H. (1999): Gene flow from oilseed rape to weeds. In: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): Symposium Proceedings no. 72: Gene Flow and Agriculture – Relevance for Transgenic Crops.
- CHIURA, I.I.X. (1997): Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, 13: 75-83.
- CIBA-ANTRAG (1994): Application for placing on the market a genetically modified plant (maize protecting itself against corn borers). submitted by Ciba-Geigy Limited, Schweiz.
- CIRVILLERI, G & CALDERA, G (1998): Use of Lux-Marker to Monitor Survival of Antagonistic *Pseudomonas fluorescens* in the Phylloplane. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 105: 441-451.

- CLEGG, C.D.; ANDERSON, J.M.; LAPPINSCOTT, H.M.; VAN ELSAS, J.D. & JOLLY, J.M. (1995): Interaction of a genetically modified *Pseudomonas fluorescens* with the soil-feeding earthworm *Ocrotolasion cyaneum* (Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry*, 27: 1423–1429.
- COGHLAN, A. (1999): Splitting Headache. *New Scientist*, 20 Nov. 1999.
- COMMERCIALISATION REQUEST (1994): Risk Assessment: Commercialization Request for P-92-403 *Rhizobium meliloti* RMBPC-2.
- COOK, R.J.; WELLER, D.M.; KOVACEVICH, P.; DRAHOS, D.; HEMMING, B.; BARNES, G. & PIERSON, E.L. (1990): Establishment, Monitoring, and Termination of Field Tests with Genetically Altered Bacteria Applied to Wheat for Biological Control of Take-All. In: MACKENZIE, D.R. & HENRY, S.C. (eds): Proceedings of the 1st International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Kiawah Island, Bethesda: 221-228.
- COOPER, B.; LAPIDOT, M.; HEICK, J.A.; DODDS, J.A. & BEACHY, R.N. (1995): A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology*, 206: 307–313.
- COOPER, J. I.; EDWARDS, M.L.; ROSENWASSER, O. & SCOTT N.W. (1994): Transgenic resistance genes from nepoviruses: efficacy and other properties. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22: 129–137.
- COX, C. (1995): Glyphosate, Part 1: Toxicology. *Journal of Pesticide Reform*, 15(3): 14–20.
- CRAWLEY, M. J.; HAILS, R.S.; REES, M. ; KOHN, D. & BUXTON, J. (1993): Ecology of transgenic oilseed rape in natural habitats. *Nature*, 363: 620–623.
- DANE, F. & SHAW, J.J. (1996): Survival and Persistence of Bioluminescent *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* on Host and Non-Host Plants in the Field Environment. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 73-80.
- DANIELS, R.E. & SHEAIL, J. (1999): Genetic pollution: concepts, concerns and transgenic crops. In: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): Symposium Proceedings no. 72: Gene Flow and Agriculture – Relevance for Transgenic Crops.
- DARMENCY, H.; FLEURY, A. & LEFOL, E. (1995): Effect of transgenic release on weed biodiversity; oilseed rape and wild radish. In: THE BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference – Weeds. Farnham: 433-438.
- DARMENCY, H. (1994): The impact of hybrids between genetically modified crop plants and their related species: introgression and weediness. *Molecular Ecology*, 3: 37–40.
- DE LEIJ, F.A.A.M.; SUTTON, E.J.; WHIPPS, J.M. & LYNCH, J.M. (1994): Effect of a genetically modified *Pseudomonas aureofaciens* on indigenous microbial populations of wheat. *FEMS Microbiology Ecology*, 13: 249-258.
- DE LEIJ, F.A.A.M.; SUTTON, E.J.; WHIPPS, J.M.; FENLON, J.S. & LYNCH, J.M. (1995a): Impact of field release of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* on indigenous microbial populations of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 3443-3453.
- DE LEIJ, F.A.A.M.; SUTTON, E.J.; WHIPPS, J.M.; FENLON, J.S. & LYNCH, J.M. (1995b): Field Release of a Genetically Modified *Pseudomonas fluorescens* on Wheat: Establishment, Survival and Dissemination. *Bio/Technology*, 13: 1488-1492.
- DE VOS, W.M. (1998): Introduction to risk assessment when employing GMM's: coping with uncertainties. In: DE VRIES, G. (ed.): Past, Present and Future Considerations in Risk Assessment when using GMO's. Commission Genetic Modification, Bilthoven, the Netherlands.
- DE VRIES, F.T.; VAN DER MEIJDEN, R. & BRANDENBURG, W.A. (1992): Botanical files - A study of the real chances for spontaneous gene flow from cultivated plants to the wild flora of the Netherlands. The Netherlands Ministry of Housing, Physical Planning and Environment, Directorate General for the Environment (ed.).
- DEML, R. & DETTNER, K. (1998): Wirkungen *Bacillus thuringiensis*-toxin-produzierender Pflanzen auf Ziel- und Nichtzielorganismen – eine Standortbestimmung. In: UMWELTBUNDESAMT (ed.): Texte 36/98.

- DER RAT VON SACHVERSTÄNDIGEN FÜR UMWELTFRAGEN (1998): Umweltgutachten 1998. Umweltschutz: Erreichtes sichern – Neue Wege gehen. Metzler-Poeschel, Stuttgart.
- DEVLIN, R.H.; YESAKI, T.Y.; BLAGI, C.A.; DONALDSON, E.M.; SWANSON, P. & CHEN, W.K. (1994): Extraordinary salmon growth. *Nature*, 371: 209–210.
- DEVLIN, R.H.; YESAKI, T.Y.; DONALDSON, E.M.; DU, S.J. & HEW, C.L. (1995): Production of germ-line transgenic Pacific salmon with dramatically increased growth performance. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 1376–1384.
- DIETZ-PFEILSTETTER, A.; GLAND-ZWERGER, A. & GARBE, V. (1999): Potential und Bewertung von Auskreuzungen aus gentechnisch verändertem Raps. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 51: 14–19.
- DIFAZIO, S.P.; LEONARDI, S.; CHENG, S. & STRAUSS, S.H. (1999): Gene flow and agriculture; relevance for transgenic crops. Proceedings of a symposium held at Keele, UK on 12–14 April 1999; BCPC Symposium Proceedings No.72: 171–176.
- DONEGAN, K.K.; PALM, C.J.; FIELAND, V. J.; PORTEOUS, L.A.; GANIO, L.M.; SCHALLER, D.L.; BUCAO, L. Q. & SEIDLER, R. J. (1995): Changes in levels, species and DNA fingerprints of soil microorganisms associated with cotton expressing the *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki endotoxin. *Applied Soil Ecology*, 2: 111–124.
- DONEGAN, K.K.; SEIDLER, R.J.; FIELAND, V.J.; SCHALLER, D.L.; PALM, C.J.; GANIO, L.M.; CARDWELL, D.M. & STEINBERGER, Y. (1997): Decomposition of genetically engineered tobacco under field conditions: persistence of the proteinase inhibitor I product and effects on soil microbial respiration and protozoa, nematode and microarthropod populations. *Journal of Applied Ecology*, 34: 767–777.
- DOWNEY, R.K. (1999): Gene flow and rape – the Canadian experience. In: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): Symposium Proceedings no. 72: Gene Flow and Agriculture – Relevance for Transgenic Crops.
- DOYLE, J. D. & STOTZKY, G. (1993): Methods for the detection of changes in the microbial ecology of soil caused by the introduction of microorganisms. *Microbial Releases*, 2: 63–72.
- DOYLE, J.D.; STOTZKY, G.; MCCLUNG, G. & HENDRICKS, C.W. (1995): Effects of genetically engineered microorganisms on microbial populations and processes in natural habitats. *Advances in Applied Microbiology*, 40: 237–287.
- DOYLE, J.D.; SHORT, K.A.; STOTZKY, G.; KING, R.J.; SEIDLER, R.J. & OLSEN, R.H. (1991): Ecologically significant effects of *Pseudomonas putida* PPO301(pRO103), genetically engineered to degrade 2,4-dichlorophenoxyacetate, on microbial populations and processes in soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 37(9): 682–691.
- DRESING, U.; DAMMAN-KALINOWSKI, T.; KELLER, M.; SELBITSCHKA, W.; PÜHLER, A.; TEBBE, C.; SCHWIEGER, F. & MUNCH, J.C. (1995): Persistence of two bioluminescent *Rhizobium meliloti* strains in model ecosystems and in field release experiments. In: KALINOWSKI, J.; PÜHLER, A. & SCHÄFER, A. (Hrsg.): Abstracts of the annual meeting of the genetic society 1995 in Bielefeld. Gesellschaft für Genetik Köln: 18.
- DRESING, U.; HAGEN, M.; SELBITSCHKA, W.; PÜHLER, A. & KELLER, M. (1998): Reduced survival of a RecA-deficient *SinoRhizobium meliloti* strain in sterile and non-sterile soil during heat stress. *FEMS Microbiology Ecology*, 27: 327–338.
- DUNHAM, R.A. (1996a): Contribution of genetically improved aquatic organisms to global food security. International Conference of Sustainable Contribution of Fisheries to Food Security, Government of Japan and FAO, Rome, Italy.
- DUNHAM, R.A. (1996b): Results of early pond-based studies of risk assessment regarding aquatic GMO's. 126th Annual meeting of the American Fisheries Society, Derborn, MI, August 26–29, 1996, Abstract 381.
- DUNHAM, R.A. (1999): Utilization of transgenic fish in developing countries: Potential benefits and risks. *Journal of the World Aquatic Society*, 30(1).

- EBER, F.; CHÈVRE, A. M.; BARANGER, A.; VALLÉE, P.; TANGUY, X. & RENARD, M. (1994): Spontaneous hybridization between a male-sterile oilseed rape and two weeds. *Theoretical & Applied Genetics*, 88: 362-368.
- ECKELKAMP, C.; MAYER, M. & WEBER, B. (1997a): BASTA-resistenter Raps. Vertikaler und horizontaler Gentransfer unter besonderer Berücksichtigung des Standortes Wölfersheim-Melbach. Werkstattreihe, 100, Öko-Institut e.V.
- ECKELKAMP, C.; JÄGER, M. & WEBER, B. (1997b): Risikoüberlegungen zu transgenen virusresistenten Pflanzen. UMWELTBUNDESAMT (Hrsg.): UBA-Texte 59/97.
- ECKELKAMP, C.; JÄGER, M. & TAPPESER, B. (1998a): Verbreitung und Etablierung rekombinanter Desoxyribonukleinsäure (DNS) in der Umwelt. UBA-Texte 51/98, Umweltbundesamt, Berlin.
- ECKELKAMP, C.; JÄGER, M. & WEBER, B. (1998b): Antibiotikaresistenzgene in transgenen Pflanzen, insbesondere Ampicillin-Resistenz in *Bt*-Mais. Freiburg.
- ELLSTRAND, N.C. & HOFFMANN, C.A. (1990): Hybridization as an Avenue of Escape for Engineered Genes. *BioScience*, 40: 438-442.
- ENGLAND, L. S.; LEE, H. & TREVORS, J. T. (1993): Recombinant and wild-type *Pseudomonas aureofaciens* strains in Soil: survival, respiratory activity and effects on nodulation of whitebean *Phaseolus vulgaris* L. by Rhizobium species. *Molecular Ecology*, 2: 303-313.
- EPA (1995): Pesticide Fact Sheet. CryIA(b): *Bacillus thuringiensis* cry IA (b): delta-endotoxin and the genetic material necessary for its production (plasmid vector pCIB4431): in corn. US EPA, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 10.8.1995.
- EWALD, D. & HAN, Y. (1999): Freisetzungsversuche mit transgenen Pappeln in China. UBA-Fachgespräch „Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven“ 20. & 21. Sept., Humboldt-Universität zu Berlin.
- FARINELLI, L.; MALNOË, P. & COLLET, G.F. (1992): Heterologous encapsidation of potato virus Y strain O (PVYO): with the transgenic coat protein of PVY strain (PVYN): in *Solanum tuberosum* cv. bintje. *Bio/Technology*, 10: 1020-1025.
- FARRELL, A.P.; BENNETT, W. & DEVLIN, R.H. (1997): Growth-enhanced transgenic salmon can be inferior swimmers. *Canadian Journal of Zoology*, 75: 335-337.
- FEDI, S.; BRAZIL, D.; DOWLING, D.N. & OGARA, F. (1996): Construction of a modified mini-Tn5 lacZY non-antibiotic marker cassette - ecological evaluation of a lacZY marked *Pseudomonas* strain in the sugarbeet rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters*, 135: 251-257.
- FELDMANN, R.C.; HANKELN, T. & SCHMIDT, E.R. (1997): Gene Transfer by Cross-Pollination and Persistence of DNA in the Soil of Test Fields with Transgenic Oilseed Rape. In: MATSUI, S. ET AL. (eds.): *The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*. Japan International Research Center for Agricultural Sciences.
- FESTER (1992): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- FINK, S. (1999): Pathological and Regenerative Plant Anatomy. In: ZIMMERMANN, W, BRAUN, H., J. (eds.): *Encyclopedia of plant anatomy*. Bd. 14(6), Gebrüder Borntraeger, Berlin, Stuttgart.
- FISCHBECK (1995): Sachstandbericht FORBIOSICH Projekt. Forschungsantrag Versuch Weihenstephan.
- FLADUNG, M. & KUMAR, S. (1999): Methylation pattern and flanking DNA sequences in transgenic aspen (*Populus*) lines in relation to stable or unstable transgene expression. Online: http://users.ox.ac.uk/~dops0022/conference/forest_biotech99_home.html, Seminar 11, 3.12.1999.
- FLADUNG, M. & MUHS, H.J. (1999): Freisetzungsbegleitende Sicherheitsforschung mit gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen. In: SCHIEMANN, J. (Hrsg.): *Proceedings zum BMBF-Workshop 25.-26. Mai 1998, Scheinfeld Germany*, Meyer: 91-100.
- FLADUNG, M. (1999): Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). 1. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Molecular and General Genetics*, Germany, 260: 574-581.
- FLADUNG, M.; AHUJA, M.R. & MUHS, H.J. (1997a): Wie stabil sind fremde Gene in Forstbäumen? In: *Forschungsreport: Ernährung – Landwirtschaft – Forsten*, 1/1997, Heft 15.

- FLADUNG, M.; GROßMANN, K. & AHUJA, M.R. (1997b): Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus*. *Journal of Plant Physiology*, Germany, 150: 420–427.
- FLADUNG, M.; KALDORF, M.; MUHS, H.-J. & BUSCOT, F. (1999b): Mycorrhizal status of transgenic populus in a field trial, Online: http://users.ox.ac.uk/~dops0022/conference/forest_biotech99_home.html, Poster 47, 3.12.1999.
- FLADUNG, M.; NOWITZKI, O.; EBBINGHAUS, D.; SCHELLHORN, A.; BENTIEN, G.; AHUJA, M.R. & MUHS, H.-J. (1999a): Field release of ROLC-transgenic Aspen-*Populus*. Online: http://users.ox.ac.uk/~dops0022/conference/forest_biotech99_home.html, Poster 46, 3.12.1999.
- FORD, C.Z.; SAYLER, G.S. & BURLAGE, R.S. (1999): Containment of a genetically engineered microorganism during a field bioremediation application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 397–400.
- FÖRSTER, B. (1998): Studie zur Ökologie ausgewählter Mikroorganismen. In: UMWELTBUNDESAMT (Hrsg.): Forschungsbericht 295 67 005, UBA-FB 98-076, UBA-Texte 64/98.
- FREDRICKSON et al. (1989): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- FREDRICKSON et al. (1990): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- FREDSHAVN, J.R.; POULSEN, G.S.; HUYBRECHTS, I. & RUDELSHEIM, P. (1995): Competitiveness of Transgenic Oilseed Rape. *Transgenic Research*, 4: 142–148.
- FU, C.; CUI, Y.; HUNG, S.S.O. & ZHU, Z. (1998): Growth and feed utilization by F4 human growth hormone transgenic carp fed diets with different protein levels. *Journal of Fish Biology*, 53: 115–129.
- FUCHS, M. & GONSALVES, D. (1998): Risk assessment of gene flow from virus-resistant transgenic squash into a wild relative. In: *Ecological risks and prospects of transgenic plants, where do we go from here? A dialogue between biotech industry and science*. 28.–31. January 1998, University of Bern: 21.
- FUJII, T.; OGAWA, N. & MIYASHITA, K. (1997): Biologically contained recombinant bacteria that degrade chlorobenzoate. In: MATSUI, S.; MIYAZAKI, S. & KASAMO, K. (eds): *The 4th International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. The 3rd JIRCAS International Symposium*, Japan International Research Center for Agricultural Sciences: 311–313.
- FULTHORPE & WINDHAM (1989): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- FULTHORPE & WINDHAM (1991): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- FULTHORPE & WINDHAM (1992): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O.
- GAL, S.; PISAN, B.; HOHN, T.; GRIMSLEY, N. & HOHN, B. (1992): Agroinfection of transgenic plants leads to viable cauliflower mosaic virus by intermolecular recombination. *Virology*, 187: 525–533.
- GEORGHIOU, G. P. (1990): Overview of insecticide resistance. In: *Managing resistance to agrochemicals. From fundamental research to practical strategies*. American Chemical Society, Washington DC: 18–41.
- GERMIDA, J.J.; SICILIANO, S.D. & SEIB, A.M. (1998): Phenotypic plasticity of *Pseudomonas aureofaciens* (lacZY) introduced into and recovered from field and laboratory microcosm soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 27: 133–139.
- GIBBS, M. J.; WEILLER, G.F. & GIBBS, A.J. (1997): OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract.
- GIDDINGS, G. (1998): Tansley Review No. 99: The release of genetically engineered micro-organisms and viruses into the environment. *New Phytologist*, 140: 173–184.
- GIDDINGS, G.; MYTTON, L.; GRIFFITHS, M.; MCCARTHY, A.; MORGAN, C. & SKØT, L. (1997): A secondary effect of transformation in *Rhizobium leguminosarum* transgenic for *Bacillus thuringiensis subsp. tenebrionis* δ -endotoxin (cryIIIA) genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 1062–1068.
- GILLESPIE, K.M.; ANGLE, J.S. & HILL, R.L. (1995): Runoff losses of *Pseudomonas aureofaciens* (lacZY) from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 17: 239–245.

- GLANDORF, D.C.M. (1998): Field release of genetically modified *Pseudomonas putida* wcs358r to study effects on the indigenous soil microflora. In: DE VRIES, G. (ed.): Past, Present and Future Considerations in Risk Assessment when using GMO's. Commission Genetic Modification, Bilthoven, the Netherlands.
- GOLDSCHMIDT, J.; KASSEL, K.; TALEGHANI, K.M.; MEHLING, A.; RÖSSLER, C.; SCHMIDT, E.; WEHMEIER, U. & PIEPERSBERG, W. (1994): Ökologische und analytische Studien an gentechnisch veränderten industriellen Produktionsorganismen und Abbaustämmen in Klärfloren. In: BMFT (Hrsg.): Biologische Sicherheit/Forschung Biotechnologie Band 3: 691-724.
- GOULD, F.; ANDERSON, A.; JONES, A.; SUMERFORD, D.; HECKEL, D. G.; LOPEZ, J.; MICINSKI, S.; LEONARD, R. & LASTER, M. (1997): Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 94: 3519-3523.
- GOULD, F.; TABASHNIK, B.; HUTCHINSON, W.; FERRO, D.; ANDOW, D. & WHALON, M. (1998): Recommendations for developing and implementing resistance management plans for *Bt*-toxin-producing crops. In: MELLON, M. & RISSLER, J. (eds.): Now or Never. Union of Concerned Scientists, Cambridge.
- GREENE, A.E. & ALLISON, R.F. (1994): Recombination between viral RNA and transgenic plant transcripts. Science, 263: 1423-1425.
- GROß, A.; WURZ, A. & WILLMUND, R. (1994): Nachweis rekombinanter Plasmid-DNA in komplexen Umweltmedien. BIOforum, 7-8: 294.
- GUILLEN, I.; BERLANGA, J.; VALENZUELA, C.M.; MORALES, A.; TOLEDO, J.; ESTRADA, M.P.; PUENTES, P.; HAYES, O. & DELAFUENTE, J. (1999): Safety evaluation of transgenic *Tilapia* with accelerated growth. Marine Biotechnology, 1(1): 2-14.
- HAGEDORN, C. (1997): Boll Drop Problems in Roundup-Resistant Cotton. Crop and Soil Environmental News, 12/1997.
- HAILS, R.S.; REES, M.; KOHN, D.D. & CRAWLEY, M.J. (1997): Burial and seed survival in *Brassica napus* ssp. *oleifera* and *Sinapis arvensis* including a comparison of transgenic and non-transgenic lines of the crop. Proceedings of the Royal Society of London, B, 264: 1-7.
- HAMMOND, B.G.; VICINI, J.L.; HARTNELL, G.F.; NAYLOR, M.W.; KNIGHT, C.D.; ROBINSON, E.H.; FUCHS, R.L. & PADGETTE, S.R. (1996): The feeding value of soybeans fed to rats, chickens, catfish and dairy cattle is not altered by genetic incorporation of glyphosate tolerance. Journal of Nutrition, 126: 717-727.
- HANKELN, T. & SCHMIDT, E.R. (1997): Transgene Tiere in Forschung, Medizin und Landwirtschaft. In: BRANDT (Hrsg.): Zukunft der Gentechnik, Birkhäuser Verlag, Basel: 93-120.
- HANSEN, L. & OBRYCKI, J. (1999): Non-target effect of *Bt* pollen on the Monarch butterfly (Lepidoptera: Danaidae). <http://www.ent.iastate.edu/entsoc/ncb99/prog/abs/D81.html>.
- HARDELL, L. & ERIKSSON, M. (1999): A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. Cancer, 85/6: 1353-1360.
- HE, W.M. (1998): Dynamics of secondary metabolic products in *Gynostemma pentaphyllum* populations and their ecological significance. Acta Botanica Yunnanica, 20: 434-438.
- HEIDENREICH, B. (1998): Invasivität transgener Mikroorganismen. In: SCHÜTTE, G.; HEIDENREICH, B. & BEUSMANN, V. (Hrsg.): Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA - Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit - Band 2. i.A. des Umweltbundesamtes.
- HEIJNEN, C.E. & MARINISSEN, J.C.Y. (1995): Survival of bacteria introduced into soil by means of transport by *Lumbricus rubellus*. Biology and Fertility of Soils, 20: 63-69.
- HELLER, K.J.; GEIS, A. & NEVE, H. (1996): Behaviour of genetically modified microorganisms in yogurt. Systematic and Applied Microbiology, 18: 504-509.
- HENRY, C.M.; BARKER, I.; PRATT, M.; PEMBERTON, A.W.; FARMER, M.J.; COTTEN, J.; EBBELS, D.; COATES, D. & STRATFORD, R. (1995): Risks associated with the use of genetically modified virus tolerant plants. MAFF, London.

- HENSCHKE, R.B. & SCHMIDT, F.R.J. (1989): Survival, distribution, and gene transfer of bacteria in a compact soil microcosm system. *Biology and Fertility of Soils*, 8: 19–24.
- HEW, C.L. & FLETCHER, G. (1997): Transgenic fish for aquaculture. *Chemistry & Industry Features*, April 1997.
- HILBECK, A.; BAUMGARTNER, M.; FRIED, P.M. & BIGLER, F. (1998a): Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis*-corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperia carnea* (*Neuroptera: Chrysopidae*). *Environmental Entomology*, 27: 480–487.
- HILBECK, A.; MOAR, W.J.; PUZTAI-CAREY, M.; FILIPPINI, A. & BIGLER, F. (1998b): Toxicity of the *Bacillus thuringiensis* CryIAb Toxin on the predator *Chrysoperia carnea* (*Neuroptera: Chrysopidae*) using diet incorporated bioassays. *Environmental Entomology*, 27: 1255–1263.
- HINDAR, K. (1993): Proceedings of the Pan-European Conference on Potential Long-Term Ecological Impacts of the Release of Genetically Modified Organisms, Strasbourg, France, 24–26 November 1993.
- HINDAR, K.; RYMAN, N. & UTTER, F. (1991): Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48: 945–957.
- HOFMANN, T.; GOLZ, C. & SCHIEDER, O. (1994): Foreign DNA sequences are received by a wild-type strain of *Aspergillus niger* after co-culture with transgenic higher plants. *Current Genetics*, 27: 70–76.
- HOLMES, M.T.; INGHAM, E.R.; DOYLE, J.D. & HENDRICKS, C.W. (1998): Effects of *Klebsiella planticola* SDF20 on soil biota and wheat growth in sandy soil. *Applied Soil Ecology*, 326: 1-12.
- HOLMES, M.T. (1995): Ecological assessment after the addition of genetically engineered *Klebsiella planticola* SDF20 into soil. Doctoral Thesis, Oregon State University, USA.
- HORNSEY, K.G. & ARNOLD, M.H. (1979): The origins of weed beet. *Annals of Applied Biology*, 92: 279–285.
- HUANG, F.; BUSCHMAN, L.L.; HIGGINS, R.A. & MCGAUGHEY, W.H. (1999): Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxin (Dipel ES) in the European Corn Borer. *Science*, 284: 965.
- IDEL, A. (1998): Gen-manipulierte Tiere – Kritik des gentechnischen Ansatzes. *Tierärztliche Umschau*, 53: 83–87.
- JACOT, Y. (1994): A bibliographical study of gene flow between crops and wild relatives in Switzerland. In: FEDERAL OFFICE OF ENVIRONMENT, FORESTS AND LANDSCAPE (ed.): Gene transfer: Are Wild Species in danger? Environmental Documentation No. 12.
- JÄGER, M. & TAPPESE, B. (1996): Politics and Science in Risk Assessment. In: VAN DOMMELEN, A. (ed.): Coping with Deliberate Release - The Limits of Risk Assessment. 63-72.
- JÄGER, M. (1994): Novel Food - Gentechnische Nahrung. Vortrag bei der International Society of Doctors for the Environment (ISDE) Konferenz 16.9.1994, Koblenz.
- JÄGER, M. & WEBER, B.E.G. (1993): Risikoaspekte gentechnisch erzeugter Virusresistenzen. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 22: 407–412.
- JONES, D. (ed.) (1994): The 3rd International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. The University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland, California, USA.
- JÖNSSON, E.; JOHNSON, J.I. & BJÖRNSSON, B.T. (1996): Growth hormone increases predation exposure of rainbow trout. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 263(1370): 647–651.
- KELLER, M.; DAMMANN-KALINOWSKI, T.; DRESING, U.; SELBITSCHKA, W.; PÜHLER, A.; TICHY, H. V.; SIMON, R.; SCHÄFFER, D.; LOTZ, W.; LABES, G.; LENTZSCH, P.; SCHWIEGER, F. & TEBBE, C.C. (1997): Field release experiments with two genetically modified *SinoRhizobium meliloti* strains. In: MATSUI, S.; MIYAZAKI, S. & KASAMO, K. (eds): The 4th International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. The 3rd JIRCAS International Symposium, Japan International Research Center for Agricultural Sciences: 371–372.

- KELLEY, S.T.; MITTON, J.B. & PAINE, T.D. (1999): Strong differentiation in mitochondrial DNA of *Dendroctonus brevicornis* (Coleoptera) on different subspecies of ponderosa pine. *Annals of the Entomological Society of America*, 92: 193–197.
- KHANNA, M. & STOTZKY, G. (1992): Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1930–1939.
- KIDAMBI, S.P.; RIPP, S. & MILLER, R.V. (1994): Evidence of phage-mediated gene transfer among *Pseudomonas aeruginosa* strains on the phylloplane. *Applied & Environmental Microbiology*, 60: 496–500.
- KLÖPFER, W.; RENNER, I.; ECKELKAMP, C.; TAPPESER, B. & DIETRICH, R. (1999): Life Cycle Assessment gentechnisch veränderter Produkte als Basis für eine umfassende Beurteilung möglicher Umweltauswirkungen. Umweltbundesamt Wien, in press.
- KLUEPFEL, D.A. (1992): The Behaviour of Nonengineered Bacteria in the Environment: What Can We Learn from Them? In: CASPAR, R. & LANDSMANN, J. (Hrsg.): Proceedings of the 2nd International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms, Braunschweig. 37–42.
- KLUEPFEL, D.A.; KLINE, E.L.; SKIPPER, H.D.; HUGHES, T.A.; GOODEN, D.T.; DRAHOS, D.J.; BARRY, G.F.; HEMMING, B.C. & BRANDT, E.J. (1991): The Release and Tracking of Genetically Engineered Bacteria in the Environment. *Phytopathology*, 81(3): 348–352.
- KLUEPFEL, D.A.; LAMB, T.G.; SNYDER, W.E. & TONKYN, D.W. (1994): Six Years of Field Testing a lacZY Modified Fluorescent Pseudomonad. In: JONES, D.D. (Hrsg.): Proceedings of the 3rd International Symposium on the Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. Monterey, Oakland: 169–176.
- KORELL, M.; SCHITTENHEIM, S & WEIGEL, H-J (1997): Aufstellen von Kriterien für die nachhaltig umweltgerechte Nutzung gentechnisch veränderter Kulturpflanzensorten. UMWELTBUNDESAMT (Hrsg.): UBA-Texte 88/97.
- KOWARIK, I. (1999): Ökologische Aspekte der Freisetzung transgener Gehölze vor dem Hintergrund der Erfahrung mit Neophyten und anderen gebietsfremden Pflanzen. UBA-Fachgespräch „Freisetzung transgener Gehölze – Stand, Probleme, Perspektiven“ 20. & 21. Sept., Humboldt-Universität zu Berlin.
- KOZDROJ, J. & PIOTROWSKA-SEGET, Z. (1995): Indigenous microflora and bean responses to introduction of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* strains into soil contaminated with copper. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 30: 2133–2158.
- KOZDROJ, J. (1996a): Survival of lux-marked bacteria introduced into soil and the rhizosphere of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12: 261–265.
- KOZDROJ, J. (1996b): Competition Between Different Mutants of *Pseudomonas fluorescens* Introduced into Soil. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 31: 1111–1125.
- LAPPE, M.A.; BAILEY, E.B.; CHILDRESS, C. & SETCHELL, K.D.R. (1999): Alterations in Clinically Important Phytoestrogens in Genetically Modified, Herbicide-Tolerant Soybeans. *Journal of Medicinal Food*, 1(4).
- LECOQ, H.; RAVELONANDRO, M.; WIPF-SCHEIBEL, C.; MONSION, M.; RACCAH, B. & DUNEZ, J. (1993): Aphid transmission of a non-aphid-transmissible strain of zucchini yellow mosaic potyvirus from transgenic plants expressing the capsid protein of plum pox potyvirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6: 403–406.
- LEFOL, E.; FLEURY, A. & DARMENCY, H. (1996): Gene dispersal from transgenic crops. II. hybridization between oilseed rape and the wild hoary mustard. *Sexual Plant Reproduction*, 9(4): 189–196.
- LENSKI, R.E.; SOUZA, V.; DUONG, L.P.; PHAN, Q.G.; NGUYEN, T.N.M. & BERTRAND, K.P. (1994): Epistatic effects of promoter and repressor functions of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli*. *Molecular Ecology*, 3: 127–135.
- LFU, BAYERISCHES STAATSMINISTERIUM FÜR LANDESENTWICKLUNG UND UMWELTFRAGEN (1994): Vollzug des Gentechnikgesetzes; Untersuchung von Klärschlammproben auf das Vorkommen von gentechnisch veränderten Mikroorganismen.

- LILLEY, A.K. & BAILEY, M.J. (1997a): Impact of Plasmid pQBR103 Acquisition and Carriage on the Phytosphere Fitness of *Pseudomonas fluorescens* SBW25: Burden and Benefit. *Applied Environmental Microbiology*, 63(4): 1584-1587.
- LILLEY, A.K. & BAILEY, M.J. (1997b): The acquisition of indigenous plasmids by a genetically marked pseudomonad population colonizing the sugar beet phytosphere is related to local environmental conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1577-1583.
- LILLEY, A.K.; HAILS, R.S.; CORY, J.S. & BAILEY, M.J. (1997): The Dispersal and Establishment of Pseudomonad Populations in the Phyllosphere of Sugar Beet by Phytophagous Caterpillars. *FEMS Microbiology Ecology*, 24(2): 151-157.
- LILLEY, A.K.; FRY, J.C.; DAY, M.J. & BAILEY, M.J. (1994): In situ transfer of an exogenously isolated plasmid between *Pseudomonas* spp. in sugar beet rhizosphere. *Microbiology*, 140: 27-33.
- LINDER, C.R. & SCHMITT, J. (1995): Potential persistence of escaped transgenes: performance of transgenic, oil-modified Brassica seeds and seedlings. *Ecological Applications*, 5: 1056-1068.
- LINDOW, S.E. (1987): Competitive Exclusion of Epiphytic Bacteria by Ice⁻ *Pseudomonas syringae* Mutants. *Applied Environmental Microbiology*, 53(10): 2520-2527.
- LINDOW, S.E. & PANOPOULOS, N.J. (1988): Field test of recombinant ice⁻ *Pseudomonas syringae* for biological frost control in potatoe. In: SUSSMAN, M. ET AL. (eds.): The release of genetically-engineered micro-organisms. Academic Press, London.
- LIU, Y.-B.; TABASHNIK, B.E.; DENNEHY, T.J.; PATIN, A.L. & BARTLETT, A.C. (1999): Development time and resistance to *Bt* crops. *Nature*, 400: 519.
- LOMMEL, A. & XIONG, Z. (1991): Reconstitution of a functional red clover necrotic mosaic virus by recombinational rescue of the cell-to-cell movement gene expressed in a transgenic plant. *Journal of Cellular Biochemistry*, 15A (suppl.): 151.
- LORENZ, M.G. & WACKERNAGEL, W. (1987): Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 2948-2952.
- LORENZ, M.G. & WACKERNAGEL, W. (1992): Stimulation of natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in extracts of various soils by nitrogen or phosphorus limitation and influence of temperature and pH. *Microbial Releases*: 173-176.
- LORENZ, M.G. & WACKERNAGEL, W. (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological Reviews*, 58: 563-602.
- LORENZ, M.G.; AARDEMA, B.W. & WACKERNAGEL, W. (1988): Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *Journal of General Microbiology*, 134: 107-112.
- LOSEY, J.E.; RAYOR, L.S. & CARTER, M.E. (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature*, 399: 214.
- LOTZ, W.; SCHMIDT, M. & SCHÄFFER, D. (1999): Biologische Sicherheitsforschung zur Freisetzung gentechnisch veränderter *SinoRhizobium meliloti*-Stämme: Vergleichende Analyse der Verbreitung und Persistenz isogener RecA+/RecA- *SinoRhizobium meliloti*-Stämme im Boden und in der Rhizosphäre von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen (Luzerne und Roggen). In: SCHIEMANN, J. (Hrsg.): Proceedings zum BMBF-Workshop 25.-26. Mai 1998, Scheinfeld Germany, Meyer: 167-174.
- MAISS, E.; KOENIG, R. & LESEMANN, D.E. (1994): Heterologous encapsidation of viruses in transgenic plants and in mixed infections. In: Jones, D. D.(ed): Proceedings of the 3rd international symposium on the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms. Oakland, California: 129-139.
- MAISS, E.; VARRELMANN, M.; DIFONZO, C. & RACCAH, B. (1997): OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24-26. April 1997, abstract.
- MALINOWSKI, T.; ZAWADZKA, B.; RAVELONANDRO, M. & SCORZA, R. (1998): Preliminary report on the apparent breaking of resistance of a transgenic plum by chip bud inoculation of plum pox virus PPV-S. *Acta Virologica*, 42 (4): 241-243.
- MARTINEZ, R. (1997): Engineering the blue revolution. *Seedling*, 14(4): 20-30.

- MARTINEZ, R.; ARENAL, A.; ESTRADA, M.P.; HERRERA, F., HUERTA, V.; VAZQUEZ, J.; SANCHEZ, T. & DE LA FUENTE, J. (1999): Mendelian transmission, transgene dosage and phenotype in transgenic *Tilapia (Oreochromis hornorum)* showing ectopic expression of homologous growth hormone. *Aquaculture*, 173: 271–283.
- MATSUI, S.; MIYAZAKI, S. & KASAMO, K. (eds) (1997): The 4th International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. The 3rd JIRCAS International Symposium, Japan International Research Center for Agricultural Sciences.
- MATTHEWS, R.E.F. (1991): *Plant Virology*. 3rd ed. Academic Press, Inc., San Diego, California.
- MCCLURE, N. C.; FREY, J. C. & WEIGHTMAN, A. J. (1991): Survival and catabolic activity of natural and genetically engineered bacteria in a laboratory-scale activated-sludge unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 366-373.
- MCCLURE et al. (1991a): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- MCCLURE et al. (1991b): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- MCKERSIE, B.D.; BOWLEY, S.R.; HARJANTO, E. & LEPRINCE, O. (1996): Water deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology*, 111: 1177–1181.
- MCKERSIE, B.D.; MURNAGHAM, J. & BOWLEY, S.R. (1997): Manipulating freezing tolerance in transgenic plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 19: 485–495.
- MELLON, M. & RISSLER, J. (eds) (1998): *Now or Never. Serious new plans to save a natural pest control*. Union of Concerned Scientists Cambridge, Massachusetts.
- MIESCHENDAHL, M. & DANNEBERG, G. (1994): Untersuchungen zur in-vivo-Transformation von Mikroorganismen in Oberflächengewässern. In: BMBF (ed.): *Biologische Sicherheit/Forschung Biotechnologie*, 3: 901–916.
- MIETHLING, R.; SCHIEGER, F. & TEBBE, C.C. (1999): Überlebens- und Verbreitungsstrategien gentechnisch veränderter, biolumineszenter *Sinorhizobium melitoli*-Stämme im Freiland. In: SCHIEMANN, J. (Hrsg.): *Proceedings zum BMBF-Workshop 25.–26. Mai 1998, Scheinfeld Germany*, Meyer: 147-158.
- MIKKELSEN, T.R.; ANDERSEN, B. & JORGENSEN, R.B. (1996): The risk of crop transgene spread. *Nature*, 380: 31.
- MOYES, C.L.; LILLEY, J.; CASAIS, C. & DALE, P.J. (1999): Gene flow from oilseed rape to *Sinapis arvensis*: variation at the population level. In: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): *Symposium Proceedings no. 72: Gene Flow and Agriculture – Relevance for Transgenic Crops*.
- MUIR, W.M. & HOWARD, R.D. (1999): Possible ecological risks of transgenic organism release when transgenes affect mating success: Sexual selection and the Trojan gene hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, Nov. 23: 13853–13856.
- MUNTHALI, M. T.; TIMMIS, K. N. & DIAZ, E. (1996): Restricting the dispersal of recombinant DNA: Design of a contained biological catalyst. *Bio/Technology*, 14(2): 189-191.
- NAMBIAR et al. (1990): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- NATIONAL CORN GROWERS (1999): Corn growers announce agreement on key elements of corn IRM program for 2000. http://www.ncga.com/01hot_off_the_cob/reports/012899.html.
- NATSCH, A.; KEEL, C.; HEBECKER, N.; LAASIK, E. & DÉFAGO, G. (1998b): Impact of *Pseudomonas fluorescens* Strain CHA0 and a derivative with improved biocontrol activity on the culturable resident bacterial community on cucumber roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(4): 365–380.
- NATSCH, A.; KEEL, C.; TROXLER, J.; ZALA, M.; VON ALBERTINI, N. & DÉFAGO, G. (1996): Importance of Preferential Flow and Soil Management in Vertical Transport of a Biocontrol Strain of *Pseudomonas fluorescens* in Structured Field Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(1): 33–40.
- NATSCH, A.; TROXLER, J. & DÉFAGO, G. (1998a): Baselines for regulation which may be derived from a detailed case study on the biosafety of genetically improved bacteria for biological control. In: DE VRIES, G. (ed.): *Past, Present and Future Considerations in Risk Assessment when using GMO's*. Communion Genetic Modification, Bilthoven, the Netherlands.

- NUTI, M.P.; BASAGLIA, M.; BONFANTE, P.; CASELLA, S.; CORICH, V.; DAL MAISTRO, L.; GIACOMINI, A.; MARTINI, I.; PERUCH, U.; POGGIOLINI, S.; SQUARTINI, A. & VIAN, P. (1997): Field Release of Genetically Modified Biofertilizers and Phytostimulators. In: MATSUI, S.; MIYAZAKI, S. & KASAMO, K. (eds): The 4th International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. The 3rd JIRCAS International Symposium, Japan International Research Center for Agricultural Sciences: 101-112.
- ORVOS et al. (1990): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- OSTENFELD, T.H.; McLEAN, E. & DEVLIN, R.H. (1998): Transgenesis changes body and head shape in Pacific salmon. *Journal of Fish Biology*, 52: 850–854.
- OWUSU, R.A. (1999): GM technology in the forest sector, a scoping study for the WWF. Online: <http://www.panda.org/resources/publications/forest/gm-overview.html> , 1.12.1999.
- PADGETTE, S.R.; TAYLOR, N.B.; NIDA, D.L.; BAILEY, M.R.; McDONALDS, J.; HOLDEN, L.R. & FUCHS, R.L. (1996): Composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *Journal of Nutrition*, 126: 702–716.
- PAGET, E.; MONROZIER, L.J. & SIMONET, P. (1992): Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiology Letters*, 97: 31–39.
- PALUKAITIS, P. & KAPLAN, I.B. (1997): OECD workshop: Potential ecological impact of transgenic plants expressing viral sequences, 24–26. April 1997, abstract.
- PAN EUROPEAN CONFERENCE (1993): Pan European Conference on the potential long-term impacts of the release of genetically modified organisms, 24-26.11.1993, Straßburg
- PANDIAN, T.J.; VENUGOPAL, T. & KOTEESWARAN, R. (1999): Problems and prospects of hormone, chromosome and gene manipulation in fish. *Current Science*, 76(3): 369–386.
- PARKER, I. M. & BARTSCH, D. (1996): Recent advances in ecological biosafety research on the risks of transgenic plants: A trans-continental perspective. – In: TOMIUK, J.; WÖHRMANN, K. & SENTKER, A (eds): *Transgenic Organisms – Biological and Social Implications*. Birkhäuser Verlag, Basel: 147–161.
- PEER, WHITE PAPER (1995): Genetic Genie – The Premature Commercial Release of Genetically Engineered Bacteria. Public Employees for Environmental Responsibility; Wahington D.C., USA.
- PERRY, N.B.; FOSTER, L.M. & LORIMER, S.D. (1996): Intraspecific variation of insecticidal sesquiterpenen dialdehydes in *Pseudowintera colorata*. *Phytochemistry*, 43: 1201–1203.
- PHAM-DELÈGUE, M.H. (1997): Risk assessment of transgenic oilseed rape on the honeybee. INRA, Laboratoire de neurobiologie comparée des invertébrés: 1–3.
- PICARD-NIZOU, A.L.; GRISON, R.; OLSON, L.; PIOCHE, C. & ARNOLD, G. (1997): Impact of proteins used in plant genetic engineering. toxicity and behavioral study in honeybee. *Plant Resistance*, 90: 1710–1716.
- PICARD-NIZOU, A.L.; PHAM-DELÈGUE, M.H.; KERGUELEN, V.; DOUALT, P.; MARILLEAU, R.; OLSON, L.; GRISON, R.; TOPPAN, A. & MASSON, C. (1995): Foraging behaviour of honey bees (*Apis mellifera* L.) on transgenic oilseed rape (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). *Transgenic Research*, 4: 270–276.
- PIKER, L.; KROST, P.; HEISE, S. & HIEGEL, C. (1998): Kompendium der für Freisetzungen relevanten aquatischen Organismen. Umweltbundesamt, Berlin.
- POHL-ORF, M.; BRAND, U.; SCHUPHAN, I. & BARTSCH, D. (1999): Der Einfluß gentechnisch erzeugter Rhizomania-Resistenz auf das ökologische Verhalten von Hybriden aus Kultur- und Wildrüben. In: SCHIEMANN, J. (Hrsg.): *Proceedings zum BMBF-Workshop 25.–26. Mai 1998*, Scheinfeld Germany, Meyer: 101-110.
- PRAKASH, C.S. (1997): Boom and bust of insect resistant *Bt*-cotton?. ISB NewsReport, July 1997.
- PURRINGTON, C.B. & BERGELSON, J. (1995): Assessing weediness of transgenic crops: industry plays plant ecologist. *Tree*, 10: 340–342.

- RAAIJMAKERS, J. M.; VANDERSLUIJ, I.; VANDENHOUT, M.; BAKKER, P. A. H. M. & SCHIPPERS, B. (1995): Dispersal of wild-type and genetically-modified *Pseudomonas spp* from treated seeds or soil to aerial parts of radish plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(11): 1473-1478.
- RAMOS, J.L.; DIAZ, E.; DOWLING, D.; DELORENZO, V.; MOLIN, S.; O'GARA, F.; RAMOS, C. & TIMMIS, K.N. (1994): The behavior of bacteria designed for biodegradation. *Bio/Technology*, 12: 1349-1356.
- RAMOS, J.L.; ANDERSSON, P.; JENSEN, L.B.; RAMOS, C.; RONCHEL, M.C.; DIAZ, E.; TIMMIS, K.N. & MOLIN, S. (1995): Suicide microbes on the loose. *Bio/Technology*, 13: 35-37.
- RAMOS, C.; MOLINA, L.; RONCHEL, M. C.; MOHN, S. & RAMOS, J.L. (1997): Field release of biologically contained soil bacteria for environmental applications in bioremediation. In: MATSUI, S.; MIYAZAKI, S. & KASAMO, K. (eds): The 4th International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms. The 3rd JIRCAS International Symposium, Japan International Research Center for Agricultural Sciences: 21–29.
- RAPS, A.; HILBECK, A.; BIGLER, F.; FRIED, P.M. & MESSMER, M. (1998): Konzept und praktische Lösungsansätze zur anbaubegleitenden Forschung beim Einsatz transgener Kulturarten. Publikation der Fachstelle Biosicherheitsforschung und Abschätzung von Technikfolgen des Schwerpunktprogrammes Biotechnologie des Schweizerischen Nationalfonds, Basel, TA-Projekt Nachhaltige Landwirtschaft, 1997–1999, Band 2/6.
- RAYBOULD, A.F. & GRAY, A.J. (1993): Genetically modified crops and hybridization with wild relatives: a UK perspective. *Journal of Applied Ecology*, 30: 199–219.
- RAYBOULD, A. F. & GRAY, A. J. (1994): Will hybrids of genetically modified crops invade natural communities? *Tree*, 9(3): 85-89.
- RAYBOULD, A.F.; MOYES, C.L.; MASKELL, L.C.; MOGG, R.J.; WARDLAW, J.C.; ELMES, G.W.; EDWARDS, M.L.; COOPER, J.I.; CLARCE, R.T. & GRAY, A.J. (1998): Predicting the ecological impacts of transgenes for insect and virus resistance in natural and feral populations of *Brassica* species. – In: UNIVERSITÄT BERN (eds): Ecological risks and prospects of transgenic plants, where do we go from here? A dialogue between biotech industry and science, 28.–31. January 1998, Universität Bern: 5.
- REGAL, P.J. (1988): The adaptive potential of genetically engineered organisms in nature. In: HODGSON, J. & SUGDEN, A.M. (eds.): Planned Release of Genetically Engineered Organisms Trends in Biotechnology/Trends in Ecology and Evolution. Special Publication. Elsevier Publications Cambridge: 36-38.
- REGAL, P.J. (1994): Scientific principles for ecologically based risk assessment of transgenic organisms. *Molecular Ecology*, 3: 5-13.
- REVERS, F.; LE GALL, O.; CANDRESSE, T.; LE ROMANCER, M. & DUNEZ, J. (1996): Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, 77: 1953–1965.
- RIPP, S. & MILLER, R.V. (1995): Effect of suspended particulates on the frequency of transduction among *Pseudomonas aeruginosa* in a freshwater environment. *Applied & Environmental Microbiology*, 61: 1214-1219.
- ROMANOWSKI, G.; LORENZ, M.G. & WACKERNAGEL, W. (1993a): Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm-adsorption, DNase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Molecular Ecology*, 2: 171–181.
- SADRAS, V. (1998): Herbivory tolerance of cotton expressing insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*: response to damage caused by *Helicoverpa spp.* and to manual bud removal. *Field Crops Research*, 56: 287–299.
- SANDERMANN, H. & WELLMANN, E. (1988): Risikobewertung der künstlichen Herbizidresistenz. In: BUNDESMINISTERIUM FÜR FORSCHUNG UND TECHNOLOGIE (Hrsg.): Biologische Sicherheit – Forschung Biotechnologie: 285–292.
- SAXENA, D.; FLORES, S. & STOTZKY, G. (1999): Insecticidal toxin in root exudates from *Bt* corn. *Nature*, 402: 480.
- SCANFERLATO et al. (1989): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- SCANFERLATO et al. (1990): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..

- SCHEFFLER, J.A. & DALE, P.J. (1994): Opportunities for gene transfer from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) to related species. *Transgenic Research*, 3: 263–278.
- SCHEFFLER, J.A.; PARKINSON, R. & DALE, P.J. (1993): Frequency and distance of pollen dispersal from transgenic oilseed rape (*Brassica napus*). *Transgenic Research*, 2: 356–364.
- SCHLINK, S. (1994): Ökologie der Keimung und Dormanz von Körnerraps (*Brassica napus* L.) und ihre Bedeutung für eine Überdauerung der Samen im Boden. *Dissertationes Botanicae*, Bd. 222.
- SCHMIDT, F.R.J. (1991): Die Bewertung von Daten zu den Risiken bei der Freisetzung von gentechnisch veränderten Bodenmikroorganismen. *BIOforum*, 9: 312–316.
- SCHOELZ, J.E. & WINTERMANTEL, W.M. (1993): Expansion of viral host range through complementation and recombination in transgenic plants. *The Plant Cell*, 5: 1669–1679.
- SCHUBBERT, R.; RENZ, D.; SCHMITZ, B. & DOERFLER, W. (1997): Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(3): 961–966.
- SCHÜTTE, G.; HEIDENREICH, B. & BEUSMANN, V. (1998a): Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA – Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit. UMWELTBUNDESAMT (Hrsg.): *Texte 47/98*, Bd. 1.
- SCHÜTTE, G.; HEIDENREICH, B. & BEUSMANN, V. (1998b): Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA – Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit. UMWELTBUNDESAMT (Hrsg.): *Texte 47/98*, Bd. 2.
- SEBALD, O.; SEYBOLD, S. & PHILIPPI, G. (1990): Die Farn- und Blütenpflanzen Baden-Württembergs. Bd. 2., Ulmer Verlag.
- SELBITSCHKA, W.; HAGEN, M.; NIEMANN, S. & PÜHLER, A. (1994): Risikoanalysen zur Freisetzung gentechnologisch veränderter Rhizobien: Analyse der Wechselwirkung zwischen gentechnisch verändertem Organismus und Modell-Ökosystemen. In: PROJEKTTRÄGER BIOLOGIE, ENERGIE, ÖKOLOGIE (Hrsg.): *Biologische Sicherheit. Forschung Biotechnologie*, Bd. 3: 137–156.
- SHARP, R.; O'DONNELL, A. G.; GILBERT, H. G. & HAZLEWOOD, G. P. (1992): Growth and survival of genetically manipulated *Lactobacillus plantarum* in silage. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2517–2522.
- SIEBER, P.; STRÖHLEIN, S.; FUCHS, D. & LOTZ, W. (1994): Entwicklung und praxisorientierte Erprobung genetischer Sonden zum Nachweis (Monitoring) von Rhizobium-Stämmen: Pilotprojekt Modellfreisetzungen. In: PROJEKTTRÄGER BIOLOGIE, ENERGIE, ÖKOLOGIE (Hrsg.): *Biologische Sicherheit. Forschung Biotechnologie*, Bd. 3: 157–187.
- SIMPSON, E.C.; NORRIS, C.E.; LAW, J.R.; THOMAS, J.E. & SWEET, J.B. (1999): Gene flow in genetically modified herbicide tolerant oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. In: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): *Symposium Proceedings no. 72: Gene Flow and Agriculture – Relevance for Transgenic Crops*.
- SIN, F.Y.T. (1997): Transgenic fish. *Reviews in fish biology and fisheries*, 7(4): 417–441.
- SJORGEN, R.E. (1995): Thirteen-year survival study of an environmental *Escherichia coli* in field. *Water, Air and Soil Pollution*, 81: 315–335.
- SKOT et al. (1990): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- SMALLA, K.; ISEMANN, M.; LEVY, R. & THRIENE, B. (1989): Risikoabschätzung der industriellen Nutzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen. *Z. gesamte Hyg.*, 35: 475–477.
- SMITH, M.S.; THOMAS, G.W.; WITHE, R.E. & RITONGA, D. (1985): Transport of *Escherichia coli* through intact and disturbed soil columns. *Journal of Environmental Quality*, 14: 87–91.
- SNOW, A.A. & JØRGENSEN, R.B. (1999): Fitness costs associated with transgenic glufosinate tolerance introgressed from *Brassica napus* ssp *oleifera* (oilseed rape) into weedy *Brassica napa*. In: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): *Symposium Proceedings no. 72: Gene Flow and Agriculture – Relevance for Transgenic Crops*.
- SNOW, A.A. & MORAN-PALMA, P. (1997): Commercialization of transgenic plants: Potential ecological risks. *BioScience*, 47: 86–96.

- SNOW, A.A.; RIESEBERG, L.H.; ALEXANDER, H.M.; CUMMINGS, C. & PILSON, D. (1998): Assessment of gene flow and potential effects of genetically engineered sunflowers on wild relatives. In: 5th International Symposium: the biosafety results of field tests of genetically modified plants and microorganisms, 6.–10. september, Braunschweig, Germany.
- SNYDER, W.E.; TONKYN, D.W. & KLUEPFEL, D.A. (1999): Transmission of a Genetically Engineered Rhizobacterium by Grasshoppers in the Laboratory and Field. *Ecological Applications*, 9(1): 245–253.
- SOBECKY, P.A.; SCHELL, M.A.; MORAN, M.A. & HODSON, R.E. (1992): Adaption of model genetically engineered microorganisms to lake water: growth rate enhancements and plasmid loss. *Applied & Environmental Microbiology*, 58: 3630-3637.
- SOUTHERTON, S.G.; BIRT, P. & FORD, H.A. (1999): Eucalyptus plantations and the significance of long distance pollinators. Online: http://users.ox.ac.uk/~dops0022/conference/forest_biotech99_home.html, Poster 49, 3.12.1999.
- STEIN, J. & LOTSTEIN (1996): Resistance management strategy for CIBA seeds' transgenic *Bt* corn. NBIAP NewsReport, December 1996.
- STEVEN, E.D. & SUTTERLIN, A. (1999): Gill morphometrie in growth hormone transgenic Atlantic salmon. *Environmental Biology of Fishes*, 54(4): 405–411.
- STEWART J.R., ALL, J.N.; RAYMER, P.L. & RAMACHANDRAN, S. (1997): Transgenic insecticidal oilseed rape on the loose. In: MCLEAN, G.D.; WATERHOUSE, P.M.; EVANS, G. & GIBBS, M.J. (eds): Commercialisation of transgenic crops. Risk, benefit and trade considerations. Proceedings of a workshop, Canberra, 11.–13. March 1997. Cooperative research centre for plant science and bureau of resource sciences, Canberra: 137–143.
- STOTZKY et al. (1992): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- SUKOPP, U. & SUKOPP, H. (1994): Ökologische Langzeit-Effekte der Verwilderung von Kulturpflanzen - FS II 94-804. Verfahren zur Technikfolgenabschätzung des Anbaus von Kulturpflanzen mit gentechnisch erzeugter Herbizidresistenz, Heft 4.
- SUKOPP, U. & SUKOPP, H. (1993): Das Modell der Einführung und Einbürgerung nicht einheimischer Arten. *GAIA*, 2: 267–288.
- SUKOPP, U. & SUKOPP, H. (1997): Ökologische Dauerbeobachtung gentechnisch veränderter Kulturpflanzen. *Berichte des Landesamtes für Umweltschutz Sachsen-Anhalt, Sonderheft 3*: 53–70.
- SUTTERLIN, A.; FLETCHER, G.; HEW, C. & BENFEY, T. (1996): Environmental risks in using GH transgenic salmon and rainbow trout for commercial marine production in Canada. Online: <http://www.nbiap.vt.edu/brarg/brasym96/sutterlin96.htm>, 5.1.2000.
- TAPPESEER, B.; JÄGER, M. & ECKELKAMP, C. (1999): Survival, Persistence, Transfer – An update on current knowledge on GMOs and the fate of their recombinant DNA. *TWN Biotechnology & Biosafety Series 3*; Third World Network, Penang, Malaysia.
- TASCHNER, P.E.M.; VAN DER KUYL, A.C.; NEELEMAN, L. & BOL, J.F. (1991): Replication of an alfalfa mosaic virus genome in plants transformed with viral replicase genes. *Virology*, 181: 445–450.
- TICHELET, R.; MECKENSTOCK, R.; STEINLE, P. & VAN DER MEER, J.R. (1999): Population dynamics of an introduced bacterium degrading chlorinated benzenes in a soil column and in sewage sludge. *Biodegradation*, 10(2): 113-125.
- THOMPSON, I.P.; LILLEY, A.K.; ELLIS, R.J.; BRAMWELL, P.A. & BAILEY, M.J. (1995): Survival, colonization and dispersal of genetically modified *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in the phytosphere of field grown sugar beet. *Bio/Technology*, 13: 1493-1497.
- THOMPSON, C.E.; SQUIRE, G.; MACKAY, G.R.; BRADSHAW, J.E; CRAWFORD, J. & RAMSAY, G. (1999): Regional patterns of gene flow and its consequence for GM oilseed rape. In: BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (ed.): Symposium Proceedings no. 72: Gene Flow and Agriculture – Relevance for Transgenic Crops.
- TICHY, H.-V. & SIMON, R. (1999): Monitoring der Zusammensetzung endogener Populationen kultivierbarer Rhizosphärenbakterien unter dem Einfluß der freigesetzten, gentechnisch veränderten *Sinorhizobium meliloti*-Stämme. In: SCHIEMANN, J. (Hrsg.): Proceedings zum BMBF-Workshop 25.–26. Mai 1998, Scheinfeld Germany, Meyer: 159-166.

- TIMMONS, A.M.; O'BRIEN, E.T.; CHARTERS, Y.M.; DUBBELS, S.J. & WILKINSON, M.J. (1995): Assessing the risks of wind pollination from fields of genetically modified *Brassica napus ssp. oleifera*. *Euphytica*, 85: 417–423.
- TOMIUK, J.; SENTKER, A. & WÖHRMANN, K. (1996): Das Schicksal von gentechnisch modifizierten Genen in Pflanzenpopulationen. *Biologie in unserer Zeit*, 26: 89–95.
- TORGERSEN, H. (1996): Ökologische Effekte von Nutzpflanzen – Grundlagen für die Beurteilung transgener Pflanzen? Umweltbundesamt Wien, Monographien Band 74.
- TORSVIK, V.; GOSOYR, J. & DAAL, F.L. (1990): High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 603–619.
- TREVORS (1991): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- TROXLER, J.; AZELVANDRE, P.; ZALA, M.; DÉFAGO, G. & HAAS, D. (1997a): Conjugative transfer of chromosomal genes between fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 213–219.
- TROXLER, J.; ZALA, M.; NATSCH, A.; MOENNE-LOCCOZ, Y. & DÉFAGO, G. (1997b): Autoecology of the biological strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in the rhizosphere and inside roots at later stages of plant development. *FEMS Microbiology Ecology*, 23: 119–130.
- USDA (1999): Genetically Engineered Crops for Pest Management. Online: <http://www.econ.ag.gov/whatsnew/issues/biotech/#new>, 25.1.2000.
- VAN ELSAS, J.D. (1992): Environmental pressure imposed on GEMMOS in soil. In: STEWART-TULL, D.E.S. & SUSSMAN, M. (eds.): *The release of Genetically Modified Microorganisms*. Plenum Press, New York: 1–14.
- VELICER, G.J. (1999): Pleiotropic Effects of Adaptation to a Single Carbon Source for Growth on Alternative Substrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1): 264–269.
- VON SCHELL, T. (1992): Die Diskussion um die Freisetzung gentechnisch veränderter Mikroorganismen als Beispiel einer interdisziplinären Urteilsbildung. Dissertation an der Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen.
- WAGNER-DÖBLER, I. PIPKE, R.; TIMMIS, K. N. & DWYER, D. F. (1992): Evaluation of aquatic sediment microcosms and their use in assessing possible effects of introduced microorganisms on ecosystem parameters. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1249–1258.
- WANG et al. (1989): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- WANG et al. (1990): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- WANG, G.; CASTIGLIONE, S.; CHEN, Y.; LI, L.; HAN, Y.; TIAN, Y.; GABRIEL, D.W.; HAN, Y.; MANG, K. & SALA, F. (1996): Poplar (*Populus nigra* L.) plants transformed with a *Bacillus thuringiensis* toxin gene: insecticidal activity and genome analysis. *Transgenic research*, 5: 289–301.
- WARWICK, S.I. (1997): Use of biosystematic data, including molecular phylogenies, for biosafety evaluation. In: MATSUI, S.; MIYAZAKI, S. & KASAMO, K. (eds): *The 4th International Symposium on The Biosafety Results of Field Tests of Genetically Modified Plants and Microorganisms*. The 3rd JIRCAS International Symposium, Japan International Research Center for Agricultural Sciences: 53–65.
- WEBER, B.E.G. (1995): Überlegungen zur Aussagekraft von Risikoforschung zur Freisetzung transgener Pflanzen. In: ALBRECHT, S. & BEUSMANN, V. (Hrsg.): *Ökologie transgener Nutzpflanzen*. Campus Verlag, Frankfurt/ New York: 111–129.
- WEBER, B.E.G. (1997): Glyphosatresistentes *Lolium rigidum*. PAN Pestizid-Brief 3/97: 1–2.
- WEBER, B.E.G. (1998): Werden transgene Pflanzen vermehrt Allergien verursachen?. *Soziale Medizin*, 25: 38–41.
- WEBER, B.E.G.; JÄGER, M. & ECKELKAMP, C. (1998): Ökologische Risiken gentechnisch veränderter virusresistenter Pflanzen. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, 28: 345–354.

- WEISKEL, P.K.; HOWES, B.L. & HEUFELDER, G.R. (1996): Coliform contamination of a coastal embayment: Sources and transport pathways. *Environmental Science and Technology*, 30: 1872-1881.
- WESTERN PRODUCER (2000): Saskatchewan, Canada vom 10. Februar 2000.
- WILLIAMSON, M. & FITTER, A. (1996): The Varying Success of Invaders. *Ecology*, 77(6): 1661-1666.
- WILLIAMSON & HARTEL (1991): zitiert nach DOYLE et al. (1995), a.a.O..
- WINTERMANTEL, W.M. & SCHOELZ, J.E. (1996): Isolation of recombinant viruses between cauliflower mosaic virus and a viral gene in transgenic plants under conditions of moderate selection pressure. *Virology*, 223: 156–164.
- YOUSEF, M.I.; SALEM, M.H.; IBRAHIM, H.Z.; HELMI, S.; SEEHY, M.A. & BERTHEUSSEN, K. (1995): Toxic effects of carbofuran and glyphosate on semen characteristics in rabbits. *J. Environ. Sci. Health*, B30(49), 513–534.