

Gentech-Pflanzen gehören nicht aufs Feld

Stellungnahme zu Freisetzungsgesuchen ein

Zürich.

Greenpeace Schweiz sowie die 13 Organisationen VKMB Kleinbauern-Vereinigung, Pro Natura, Stiftung für Konsumentenschutz SKS, Schweizer Tierschutz STS, WWF Schweiz, Bio Suisse, Blauen-Institut, **Forum GenAu**, Public Eye on Science, Basler Appell gegen Gentechnologie, Ärztinnen und Ärzte für Umweltschutz, StopOGM und IP Suisse haben heute zu den geplanten Freiland-Experimenten der Universität Zürich und der ETH mit Gentech-Pflanzen Stellung genommen. Die Frist für Stellungnahmen zuhanden der Bewilligungsbehörde BAFU läuft heute ab. Hauptkritikpunkt ist, dass das Gentechnikgesetz nicht eingehalten wird. Es fehlen relevante Resultate zur Einschätzung möglicher negativer Auswirkungen auf andere Lebewesen in geschlossenen Systemen. Das BAFU ist aufgefordert, alle drei Bewilligungsgesuche abzulehnen.

Die Universität Zürich und die ETH wollen von 2008 bis 2010 verschiedene Freiland-Experimente mit pilzresistenten Gentech-Weizensorten sowie einer Kreuzung von Gentech-Weizen und einem Wildgras durchführen. Greenpeace und die obgenannten Organisationen haben die Gesuche gründlich geprüft und dem BAFU eine Liste von offenen Fragen zukommen lassen. Nach dem Gentechnikgesetz (GTG Art.6, Absatz 2) darf nur eine Bewilligung für eine Freisetzung von Gentech-Pflanzen zu Forschungszwecken erteilt werden, *wenn die angestrebten Erkenntnisse nicht durch Versuche in geschlossenen Systemen gewonnen werden können*. Die vorliegenden Freisetzung-Projekte erfüllen diese Forderung klar nicht. Die Hauptkritikpunkte:

- Es ist nicht bekannt wo sich die eingeschleusten Pilzresistenz-Gene im Weizen-Genom genau befinden. Das ist aber eine wichtige Voraussetzung, um abschätzen zu können wie die neu konstruierte Pflanze mit der Umwelt interagiert.
- Ob und wie stark die Pilzresistenz im Gentech-Weizen nachweisbar ist, wurde nur anhand von Blattstücken abgeklärt, jedoch nicht aufgrund von aussagekräftigen Tests.
- Zwei eingeschleuste Resistenzgene töten nicht nur den Mehлтаupilz ab, sondern womöglich auch nützliche Bodenpilzsysteme oder –lebewesen. Dies gleich im Freiland zu testen, ist unzulässig.
- Resultate zu möglichen negativen Auswirkungen auf andere Lebewesen fehlen.
- Die Gesuchssteller wollen eine Bewilligung für Gentech-Weizenlinien, die sie noch am Testen und Vermehren sind. Diese Linien können von den Behörden zum jetzigen Zeitpunkt folglich noch gar nicht beurteilt werden.
- in einer der Gentech-Weizenlinien wird ein Grippevirus-Bestandteil aus einem gegenwärtig zirkulierenden Influenza-Typ verwendet. Weizen mit gefährlichen Viren-Teilen zu bestücken ist verwerflich. Und das Risiko für die Gesundheit, von dem selbst die Gesuchssteller sprechen, ist untragbar.

«Nur weil der Grossteil der Nationalfonds-Gelder in diese Projekte fliesst, ist das kein Grund, dass solch unnütze und schlecht überprüfte Gentech-Pflanzen ausgesät werden dürfen», sagt die Gentech-Spezialistin Marianne Künzle von Greenpeace. Die Umweltorganisation fordert das BAFU auf, alle drei Gesuche zurückzuweisen.

Dem BAFU eingereichte

Stellungnahme zu den Freisetzungsvorhaben des Konsortium-Weizen.ch

Es wird entsprechend folgender Nummerierung auf die 3 Freisetzungsvorhaben verwiesen:

- ① Gesuchstellerin: Institut für Pflanzenwissenschaften, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, vertreten durch Prof. Dr. Wilhelm Gruissem, Lehrstuhlinhaber Pflanzenbiotechnologie (B07001-Freisetzungsvorhaben mit transgenen Weizenlinien im Feld).
- ② Gesuchstellerin: Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, vertreten durch Prof. Dr. Beat Keller, Geschäftsführender Direktor (B07002-Freisetzungsvorhaben mit transgenen Weizenlinien im Feld).
- ③ Gesuchstellerin: Institut für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, vertreten durch Prof. Dr. Beat Keller, Geschäftsführender Direktor (B07004-Freisetzungsvorhaben mit transgenen *Aegilops cylindrica* x *Triticum aestivum* Hybriden im Feld).

Vorbemerkung/Zusammenfassung

Es scheint bei diesen Freisetzungsvorhaben in erster Linie um die Evaluation der Funktionstüchtigkeit der transgenen Pflanzen zu gehen (Verbesserung und Effizienz der Krankheitsresistenz). Im Vordergrund steht die Grundlagenforschung (Resistenzbiologie) zur Abklärung einer möglichen züchterischen Strategie zur Bekämpfung von Mehltau (es wird auch die internationale Wettbewerbsfähigkeit angesprochen, ① S. 8). Die Biosicherheitsforschung, die zwar umfassend dargestellt ist, scheint ihrer Anlage nach eher zweitrangig zu sein. Etliche Biosicherheitsaspekte müssten zuerst im Gewächshaus durchgeführt werden, einerseits um die rechtlichen Bestimmungen zu erfüllen und andererseits um Grundlagen zu haben, welche die Sicherheit und den Design der Freisetzungsvorhaben verbessern. Ob mit Konsequenzen von vertikalem Genfluss, Einflüsse auf Nichtzielorganismen, horizontaler Gentransfer etc. gerechnet werden muss, sollten vorerst in Vegetationshallen näher untersucht werden. Einzig *agronomische Parameter wie Feldresistenz und Ertrag sind im Gewächshaus nicht feststellbar* (κ, S 6).

Greenpeace fordert das BAFU auf, aufgrund vorliegender mangelhaftem Kenntnisstand keine Bewilligungen zu erteilen und nach GTG Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe a von den Gesuchstellerinnen zu verlangen, dass sämtliche möglichen Abklärungen, die in geschlossenen Systemen durchgeführt werden können, dementsprechend ausgeführt und ausgewertet werden.

Empfängerpflanzen

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Könnte eine gentechnisch veränderte Sorte Frisal mit gentechnisch induzierter Pilzresistenz nicht wieder in den Sortenkatalog aufgenommen werden?

Die in ① verwendete Ausgangssorte Frisal ist besonders anfällig auf Mehltau und daher seit 2006 nicht mehr im Sortenkatalog erhalten (① S. 5; S. 25; S. 39; ③ S. 28). Dies wird als Argument dafür verwendet, dass eine agronomische Anwendung der transgenen Pflanzen damit ausgeschlossen sei. Ist diese Aussage logisch?

Genetische Veränderung

Insertionsstelle

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist die Bewilligungsbehörde der Meinung, dass der Einfluss der Position der Gene (Insertionsstelle) auf deren Ausprägung und Aktivität hinreichend abgeklärt wurde und die Kenntnis des Insertionsortes keine sicherheitsrelevante Information liefert (siehe dazu unten: Wilson et al. (2007))?

Die Gesuchsteller geben zu, dass *die Insertionsorte des Transgens in keiner Weise bekannt sind, da deren Bestimmung mit einem grossen Aufwand verbunden ist und die Kenntnis des Insertionsortes keine sicherheitsrelevante Information liefert* (① S. 51, ② S.73).

Während die Abfolge der DNA-Bausteine heute relativ leicht entschlüsselt werden kann, steht man bei der Erforschung und beim Verständnis der komplexen übergeordneten Zusammenhänge und Wechselwirkungen innerhalb der genetischen Information erst am Anfang des Erkenntnisgewinns. Ein und dasselbe Gen kann verschiedene Ausprägungen oder Wirkungen haben (pleiotrope Effekte). Zudem kann ein und dasselbe Gen, abhängig vom Ort seines Einbaus, durch den unterschiedlichen Einfluss der umgebenden Gene unterschiedliche Bedeutung erhalten (Positionseffekte). Das heisst, die gleichen Gene können in unterschiedlichen Organismen und verschiedenem Kontext zu unterschiedlichen Eigenschaftsveränderungen führen. Durch solche Effekte können auch ökologisch wichtige Merkmale von gentechnisch veränderten Organismen verändert werden.

Das Öko-Institut Freiburg¹ gibt eine Zusammenstellung von zahlreichen (!) Fallbeispielen zu Pleiotropen- und Positionseffekten in GVO. Die Effekte können folgenden Risiken zugeschrieben werden:

- das Einschleusen fremder Proteine/Enzyme kann zu unvorhersehbaren Stoffwechselreaktionen und somit zu neuen, möglicherweise toxischen oder allergenen Genprodukten führen;
- das Einschleusen fremder DNA-Sequenzen kann am Integrationsort vorhandene Gene beeinflussen oder zerstören und somit den Gesamtkontext des Genoms aus dem Gleichgewicht bringen oder möglicherweise sogar zu toxischen oder allergenen Metaboliten führen;
- die Organismen sind fähig, die Expression eingeführter Fremdgene zu beeinflussen oder abzuschalten, wodurch ein gleichmässiges Expressionsniveau nicht mehr gewährleistet scheint;
- Wirkungen auf sekundäre Pflanzenstoffe.

Ein neuerer Reviewartikel² zeigt, dass: *Any transformation-induced mutation which affects functional DNA sequences has the potential to result in unexpected phenotypic consequences. This is true for single base pair changes and for large deletions and rearrangements. Thus, in a commercial crop plant, every transformation-induced mutation is a potential hazard.*

(...)

As illustrated in this review, the assumption that transgenic plant breeding methods are precise is undermined by the available scientific data. Transformation-induced mutations are created both at the transgene insertion-site and elsewhere in the genome. Most transgenic plants are likely to have both types of mutations, whether transformed using Agrobacterium-mediated methods or particle bombardment.

(...)

¹ Öko-Institut Freiburg (2001). Pleiotrope und Positionseffekte - ungewollte Effekte der Gentechnik. Gentechnik-Nachrichten Spezial 6, Februar 2001.

² Wilson, A.K. et al. (2007). Transformation-induced mutations in transgenic plants: Analysis and biosafety implications. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol. 23, December 2006. pp. 209-234.

The lack of scientific data is even greater for particle bombardment. There are no large-scale studies of insertion-site mutations for any species, as only a handful of particle bombardment insertion events have been (even partially) characterised using DNA sequence analysis. Thus, to date, there are no publicly available data describing the complete characterisation of a functional transgene insertion event produced via particle bombardment.

Gentransfer durch Mikroprojekte

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Welchen Stellenwert gibt die Bewilligungsbehörde Vorabklärungen zu Einflüssen von Insertionsstellen und von epigenetischen Effekten?

Es wurden keine weiteren Vektoren im Sinne eines Organismus verwendet (z.B. Agrobakterium). Gentransfer durch Mikroprojekte ist per definitionem „Vektor-frei“ (Ⓢ S. 22).

Alle zur Freisetzung beantragten gentechnisch veränderten Weizensorten wurden durch Mikroprojektilbeschuss erzeugt. Bei Mikroprojektilbeschuss sind die Insertionsstellen grösstenteils telo- oder subtelomerisch (terminale Regionen der Chromosomen) (Jackson et al. 2001³). Die Rekombinationsfrequenz ist für terminale Regionen der Chromosomen höher, d.h. es muss mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit des Genfluss auf die Wildpflanze gerechnet werden (siehe dazu die Diskussion in Schoenenberger et al. 2005⁴). Folglich ist die Feststellung in Ⓢ S. 51, dass die Kenntnis des Insertionsortes keine sicherheitsrelevante Information liefert nicht zureichend. Der *grosse Aufwand* (Ⓢ S. 51), um genaue Insertionsstellen zu bestimmen und folglich allfällige pleiotropen Effekte besser zu verstehen, wäre unserer Meinung nach Bestandteil der Risikoforschung im Rahmen des NFP 59. Die Thematik von Einflüssen von Insertionsstellen und von epigenetischen Effekten ist deshalb von grosser Bedeutung, weil diese möglicherweise einer der grössten Unterschiede zwischen GVP und konventionellen Pflanzen ausmachen. Biosicherheitsforschung auf diesem Gebiet benötigt vorerst keine Freisetzungsversuche und müsste eigentlich prioritär sein.

Stabilität und Expression Chitinase- und Gluconase-Resistenzgene

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Erachtet die Bewilligungsbehörde den Nachweis von Stabilität und Expression der Chitinase- und Gluconase-Resistenzgene als hinreichend?

Die transgenen Chitinase- und Gluconase-Resistenzgen-Linien konnten in ihrer Stabilität bis zur zweiten bzw. dritten Generation nachgewiesen werden (Ⓢ S. 26). Die Expression der beiden Nutzgene ist „*näherungsweise*“ (Ⓢ S. 26) bestimmt worden.

35S-Promotor aus Blumenkohlvirus

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Welchen Stellenwert gibt die Bewilligungsbehörde der Uneinigkeit zwischen Experten über das Risiko des viralen Cauliflower Mosaik Virus Promotors?

In den Chitinase- und Gluconase-Resistenzgen-Linien wird das Konstrukt 35S:bar eingesetzt (Ⓢ S. 23).

Wissenschaftler aus England und den USA empfehlen, alle Produkte, die GVO mit dem viralen Cauliflower Mosaik Virus-Promotor (CaMV 35S und ähnliche) enthalten, für den Konsum und für die

³ Jackson SA, Zhang P, Chen WP, Phillips RL, Friebe B, Muthukrishnan S, Gill BS (2001) High-resolution structural analysis of biolistic transgene integration into the genome of wheat. *Theor Appl Genet* 103:56–62, <http://www.springerlink.com/content/duc22xnt15luhcwa/>.

⁴ Schoenenberger, N., F. Felber, D. Savova-Bianchi and R. Guadagnuolo, 2005 Introgression of wheat DNA markers from A, B and D genomes in early generation progeny of *Aegilops cylindrica* Host x *Triticum aestivum* L. hybrids. *Theor. Appl. Genet.* 111: 1338–1346, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16133306&dopt=Abstract.

Verwendung als Futtermittel zu verbieten.⁵ Die Autoren beschreiben das Virus im Detail - so die massgebenden Sequenzen für die Infektiosität und Pathogenität, die Rekombinationsfähigkeit und sein Wirtsspektrum. Während das Virus nur Dikotyledonen infiziert, ist sein Promotor in unterschiedlichsten Organismen funktionsfähig. Der CaMV 35S Promotor besitzt einen Rekombinations-Hotspot und erscheint deshalb als sehr geeignet, Rekombinationen einzugehen. Damit könnten ruhende Viren reaktiviert oder neuartige Viren gebildet werden.

Es wurde zudem gezeigt, dass der 35S-Promotor in menschlichen Zellen aktiv ist.⁶

Ampicillinresistenz

Frage an die Bewilligungsbehörde:

GTG Artikel 37 besagt: *Resistenzgene gegen in der Human- und Veterinärmedizin eingesetzte Antibiotika dürfen in Freisetzungsvorsuchen noch bis 31. Dezember 2008 verwendet werden. Ist es gesetzlich zulässig, dass transgenen Weizenlinien zur Freisetzung beantragt werden, bei welchen die Abwesenheit des bla-Gens (Ampicillinresistenz) noch nicht nachgewiesen ist?*

Das für die bakterielle Ampicillinresistenz kodierende bla-Gen konnte mittels Southern Blot weder in den vier Pm3b-Linien noch in deren Schwesterlinien nachgewiesen werden (Abb. 7a-d). Somit gibt es keine Hinweise für Kontaminationen mit dem Vektor-Rückgrat. Bei den transgenen Pm3a-, Pm3c-, Pm3d-, Pm3e-, Pm3f-, und Pm3g- Weizenlinien konnte diese Untersuchung noch nicht durchgeführt werden. Vor einer Freisetzung dieser Linien soll diese aber durchgeführt werden, und nur Pflanzen, welche bestimmten Kriterien entsprechen, sollen freigesetzt werden (© S. 30).

Vorversuche im geschlossenen System

Das Gentechnikgesetz fordert in Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe a: *Gentechnisch veränderte Organismen dürfen im Versuch freigesetzt werden, wenn die angestrebten Erkenntnisse nicht durch Versuche in geschlossenen Systemen gewonnen werden können.*

Beleg der Pilzresistenz

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Reichen die bestehenden Versuche in geschlossenen Systemen aus, um zu begründen, dass die Pilzresistenz nur im Freiland sauber belegt werden kann?

① führt mit den GV-Weizenpflanzen *in vitro* Tests mit Blattstücken aus, um die erhöhte Pilzresistenz gegen Mehltau zu belegen (①, S. 5; S. 26). Damit wird die Wirkung von Chitinase/Glucanase primär *in vitro* gezeigt. *In planta* Vegetationshallenversuche waren wegen der Anzahl Pflanzen in der statistischen Aussage limitiert (①, S. 27). Die Antragssteller betonen, dass sie eine gute statistische Auswertung nur mit „genügend“ Pflanzen im Freisetzungsvorsuch erreichen können (①, S. 51; ③ S. 30).

Das Argument der limitierten statistischen Aussage im Gewächshaus ist unzureichend. Clausen et al. 2000⁷ belegen eine erhöhte Stinkbrandresistenz *in planta* bei GM-Weizen mit max. 59 Individuen in einem "growth cabinet" (=Phytotron), also kleiner als ein Gewächshaus.

⁵ Ho, M.-W., Ryan, A. und Cummins, J. (2001). Cauliflower mosaic viral promotor - a recipe for disaster? *Microbial Ecology in Health and Disease*.

⁶ Myhre, M.R. et al. (2006). The 35S CaMV plant virus promoter is active in human enterocyte-like cells. *European Food Research and Technology*, Volume 222, Numbers 1-2, S. 185 – 193, <http://www.springerlink.com/media/59dam5dfcm6juk9cbeet/contributions/k/1/3/1/k1314216v854qr56.pdf>.

⁷ Clausen, M., R. Kräuter, G. Schachermayr, I. Potrykus and C. Sautter, 2000 Antifungal activity of a virally encoded gene in transgenic wheat. *Nat. Biotechnol.* 18: 446–449, http://www.nature.com/nbt/journal/v18/n4/abs/nbt0400_446.html.

Über den Mehltaubefall bei *Aegilops cylindrica* scheinen keine Angaben vorzuliegen. Ist Mehltau (die Spezies und Rassen, welche das Ziel der eingebauten Resistenzgene sind) ein Pathogen von *Ae. cylindrica*? Oder gar ein limitierender Faktor von *Ae. cylindrica* Populationen? Um die Konsequenzen des Genflusses auf die Performance von Wildpflanzen (Hybrid Fitness) abschätzen zu können, wäre dies eine wichtige Information vor einem Freisetzungsversuch.

Fitness Hybride (Ae. cylindrica x GM-Triticum aestivum)

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist die Fitness von *Ae. cylindrica* x GM-Triticum aestivum Hybriden im geschlossenen Systemen hinreichend abgeklärt worden?

Bisher wurden keine Hybriden zwischen den als Elternpflanze beschriebenen transgenen Weizenlinien und Ae. cylindrica hergestellt, und damit gibt es auch weder im Gewächshaus noch unter Feldbedingungen Testergebnisse. Bisher wurden auch nirgends Feldexperimente mit transgenen Ae. cylindrica x T. aestivum Hybriden durchgeführt (© S. 30).

Zur Fitness von *Ae. cylindrica* x GM-Triticum aestivum Hybride liegen keine Resultate in geschlossenen Systemen vor. Die genetische Komposition von F1 Hybriden ist in allen Individuen identisch (von derselben Mutter- und Vaterpflanze). BC1 und BC2 sind dagegen sehr variabel in ihrer genetischen Komposition, das heisst, dass man Versuche mit einer grossen Anzahl verschiedener Introgressionslinien (offspring von F1) durchführen müsste, um ein klares Bild zu erhalten. Wegen der starken Variation in der genetischen Komposition von BC1 und BC2 wären gerade Versuche im geschlossenen, kontrolliertem System wichtig (Vegetationshalle), damit man den Effekt des Transgens von den anderen introgressierten Triticum Genen isolieren kann. In dem Sinne wären BC1 und BC2 vegetativ zu vervielfältigen und dann unter verschiedenen Umweltbedingungen in der Vegetationshalle zu testen.

Mycorrhiza

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Sollte die Wirkung auf Mycorrhizapilze nicht bereits in der Vegetationshalle studiert werden, um GTG Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe a einzulösen?

Die Chitinase- und Gluconase-Resistenzgen-Linien haben ein sehr breites Wirkungsspektrum (① S. 24). Damit werden auch andere Pilze abgewehrt. Auch Mycorrhizapilze könnten von der Aktivität der beiden Transgenprodukte (antifungale Enzyme) betroffen sein. Die Gesuchstellerin findet dies eine interessante Fragestellung für den Freisetzungsversuch (① S. 24). Sie will direkt im Feld beobachten, ob die Transgene die nutzbringende Symbiose negativ beeinflussen (① S. 10).

Pseudomonas-Arten

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist es im Sinne von GTG Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe a solche Versuche gleichzeitig im Feld und im Sicherheitsgewächshaus durchzuführen oder müsste in der Rechtsauslegung vorerst nur der Versuch im Sicherheitsgewächshaus erfolgen?

Der Einfluss der Transgene (Allele des Pm3-Genlokus (©) und des Chitinase- und Glucanase-Gens (①)) auf nutzbringende Bodenbakterien (*Pseudomonas*-Arten), die die Wurzeln besiedeln und vor bodenbürtigen Pathogenen schützen oder sich günstig auf die Gesundheit und Ernährung der Pflanzen auswirken, sollen untersucht werden. Ziel sind neue Erkenntnisse, ob und wie sich die transgene Weizenlinien auf das Vorkommen und die Funktionalität dieser Bodenbakterien auswirken. Die Studien sollen gleichzeitig im Feld und in Gewächshauskammern durchgeführt werden (① S. 9).

Nicht-Ziel-Organismen

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist untenstehende Argumentation im Sinne von GTG Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe a haltbar (siehe dazu Unterkapitel „Allergenität Chitinase- und Gluconase-Resistenzgen-Linien“)?

Da es sich beim Transgen um Gene handelt, die natürlicherweise in Gerstensorten vorkommen, die auch kultiviert werden (Leah et al. 1991), und es sich beim Markergen um ein gut untersuchtes und bereits in mehreren Feldversuchen sowie auch in vielen kommerzialisierten Produkten eingesetztes Gen handelt, wurde auf Vorversuche im Gewächshaus zu Interaktionen mit Nicht-Zielorganismen verzichtet. Untersuchungen zur Biosicherheit stellen im geplanten Feldversuch einen wesentlichen Bestandteil dar (ⓐ S. 52).

Freisetzungen in den Jahren 2009 und 2010

Chitinase- und Gluconase-Resistenzgen-Linien

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist es für die Erteilung einer Bewilligung akzeptabel, dass von der Gesuchstellerin ein Spielraum in Anspruch genommen wird, die Versuchsmodalitäten für die Jahre 2009 und 2010 erst später festzulegen?

Versuchsmodalitäten für die Jahre 2009 und 2010 sind nicht festgelegt (ⓐ S. 4).

Kann eine Freisetzungsbewilligungsbewilligung bereits jetzt für einen Versuch beantragt werden, bei dem die ausschlaggebenden Resultate und die Samenverfügbarkeit nicht vorhanden ist: *In den Jahren 2009 und 2010 wird eine ähnliche Versuchsanordnung zum Einsatz kommen. Abhängig von den Resultaten des Jahres 2008, der Samenverfügbarkeit oder von anderen Parametern, die nicht exakt zwei Jahre im Voraus geplant werden können, wird sich die Versuchsanordnung von denjenigen im Jahr 2008 unterscheiden (ⓐ S. 41).*

Pm3-Weizenlinien

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist es für die Erteilung einer Bewilligung akzeptabel, dass die Gesuchstellerin Linien freisetzen will, die sie erst in den Jahren 2008 und 2009 vermehren wird?

Mischungsversuche mit diesen Multilinien (transgene Weizenlinie mit den Allelen Pm3a-Pm3g) sollen im Jahr 2009 und 2010 durchgeführt werden, die Vermehrung dieser Linien soll 2008 und 2009 im Feld geschehen (ⓑ S. 27).

Mit den transgenen Pm3a-, Pm3c-, Pm3d-, Pm3e-, Pm3f- und Pm3g- Weizenlinien konnten diese Untersuchungen noch nicht durchgeführt werden, da sie sich noch in Entwicklung befinden. Welchen Anforderungen diese Pflanzen genügen müssen, damit sie freigesetzt werden sollen, kann in Tabelle 1 eingesehen werden. Da es bis zur Freisetzung der oben erwähnten Linien vom Zeitpunkt des Verfassens dieses Gesuchs bis zu ihrer Vermehrung im Feld (2008) bzw. Vermehrung und Feldversuch (2009) noch 15 bzw. 27 Monate dauern wird, besteht genügend Zeit für eine detaillierte Charakterisierung. Bevor die Vermehrungen 2008 und die Versuche 2009 und 2010 durchgeführt werden, werden wir das Vorliegen dieser Kriterien wissenschaftlich belegen und schlagen vor, die entsprechende Dokumentation dem BAFU, der EFBS sowie der ev. eingesetzten Begleitgruppe vorzulegen (ⓑ S. 74).

Isolationsdistanzen

Auskreuzung

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist der landwirtschaftliche Anbau von Weizen, Roggen oder Triticale in einer Entfernung von 60 Meter zur Versuchsparzelle vor Verunreinigungen gemäss GTG Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe e mit Transgenen geschützt?

Der landwirtschaftliche Anbau von Weizen, Roggen oder Triticale erfolgt in einer Entfernung von mindestens 60 Meter zur Versuchsparzelle (① S. 17; S. 46; ② S. 102; ③ S. 13).

Spontane Auskreuzung aus Weizen auf Roggen können „über kurze Distanzen nicht ausgeschlossen werden“ (① S. 19).

In einer Publikation⁸ aus dem Jahre 2007 wurde gezeigt, dass der Pollenfluss in Weizen über mehrere hundert Meter mit einer Rate von 0.01% stattfinden kann:

*Currently, information is lacking on gene flow in common wheat (*Triticum aestivum* L.) at distances greater than 300 m based on commercial-scale fields.*

(...)

In 2002 one case of gene flow was confirmed at 190 m northeast of the pollinator at a rate of 0.01%. In 2003 nine putative hybrid seeds were confirmed to be the result of gene flow between Purendo-38 and the recipient field using gliadin fingerprinting. Consequently, gene flow was confirmed at 0.01% at 500 m northeast, 630 m southeast, and 2.75 km northwest from the pollinator. In commercial production, gene flow in wheat occurs at trace levels (0.01%) at distances up to 2.75 km.

Eine weitere Publikation⁹ aus dem Jahre 2007 zeigt, dass die Auskreuzungsdistanzen stark variieren können: *However, using records of wind direction and speed from weather stations across Europe, we predict theoretically that field-to-field windborne cross-pollination in maize, oilseed rape, sugar beet, and rice varies greatly according to the relative orientation of the GM and non-GM fields. Furthermore, at a given site and orientation from a GM field, we predict that the cross-pollination rate varies substantially from year to year. Consequently, even replicated field trials may inaccurately estimate typical levels of cross-pollination and therefore distort our perception of the separation distances required to achieve sub-threshold adventitious GM presence.*

Samenverbreitung

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist dem Risiko einer Verbreitung der Transgene durch Samen ohne Nager- und Vogelschutz Rechnung getragen?

Der Verbreitung von Samen durch Tiere kann eine grosse Bedeutung zukommen (siehe z.B. Russo et al. 2006¹⁰).

Die Gesuchsteller halten fest: *Für viele Vertebraten sind Weizenkörner eine attraktive Nahrung: Samen, welche den Tieren während des Transports verloren gehen oder Samen, die den*

⁸ Matus-Cádiz, M.A. et al. (2007). Pollen-Mediated Gene Flow in Wheat at the Commercial Scale. *Crop Sci.*, Vol. 47, S. 573-579, <http://crop.scijournal.org/cgi/content/abstract/47/2/573>.

⁹ Hoyle, M. und Cresswell, J.E. (2007). THE EFFECT OF WIND DIRECTION ON CROSS-POLLINATION IN WIND-POLLINATED GM CROPS. *Ecological Applications*, Volume 17, Issue 4 (June 2007), pp. 1234–1243, <http://www.esajournals.org/perlserv/?request=get-abstract&doi=10.1890%2F06-0569>.

¹⁰ Russo, S.E. et al. (2006). INCORPORATING ANIMAL BEHAVIOR INTO SEED DISPERSAL MODELS: IMPLICATIONS FOR SEED SHADOWS. *Ecology*, Vol. 87, No. 12, pp. 3160–3174, <http://www.esajournals.org/esaonline/?request=get-abstract&issn=0012-9658&volume=087&issue=12&page=3160>.

Verdauungstrakt unverdaut passieren, tragen zur Verbreitung der Samen bei. Diese Samen können keimen. Vorausgesetzt, dass Rehe, Schafe, Rindvieh und Pferde keinen Zugang zum Versuchsgelände haben, müssen der Mensch, Vögel und Nager als potentielle Verbreiter der Samen im Versuch berücksichtigt werden (② S. 18).

③ besagt: *Gelegentlich können Ährchen von Nagern oder Wasser weiter weg befördert werden (③ S. 14).*

Trotzdem wird kein Nager- und Vogelschutz angebracht:

Ein Nagerschutz sowie ein Vogelschutz sollen nicht angebracht werden, da dadurch die praxisübliche Bearbeitung des Versuchsfeldes mit Maschinen unmöglich wird. Dafür wird im Umkreis von 60m um das Versuchsfeld das Gelände nach Aufwuchs von Weizenpflanzen abgesucht. Allfällige vorhandene Weizenpflanzen werden ausgegraben und genetisch analysiert. Im Folgejahr wird das Feld auf Durchwuchs analysiert (② S. 102).

Wildpflanzen als Auskreuzungspartner

Aegilops cylindrica

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist das Nicht-Vorkommen von *Aegilops cylindrica* an den Freisetzungstandorten hinreichend belegt?

Aegilops cylindrica ist in Nordamerika ein grosses Problem, nicht aber in der Schweiz. Dies bestätigt der Gesuchsteller (z.B. ③ S. 1).

Der Gesuchsteller betont mehrfach (z.B. ① S. 19; S. 37): *Aegilops cylindrica ist als einzige Wildpflanze in der Schweiz mit Weizen kreuzbar, ist jedoch im Gebiet nicht belegt.*

„Nicht belegt“ wird nicht weiter ausgeführt und ist eine schwache Aussage.

Es gibt jedoch Hinweise, dass sich *Aegilops cylindrica* teilweise stark in Ausbreitung befindet. Im Wallis gibt es Standorte in Rebkulturen, wo sich die Pflanze fast invasiv verhält. In der ganzen Gattung *Aegilops*, ist *Ae. cylindrica* die Spezies, die den grössten Hang zur Invasivität besitzt. Das Problem ist in den USA akut, aber auch aus anderen Regionen der Welt bekannt (Zentral-Asien, östliche mediterrane Regionen). In der Schweiz ist *Aegilops cylindrica* eine seltene Rote Liste Art, ist aber seit einigen Jahren im Wallis in starker Ausbreitung (siehe Abbildung).



Abbildung. Invasiver Charakter von *Aegilops cylindrica* in einem Weinberg in der Nähe von Sierre im Frühling 2007 (Photo: Yann Clavien)

Schoenenberger¹¹ schreibt dazu: *Interestingly, individuals from the Californian population USA2, corresponding to population 11 in Hedge et al. (Hegde et al. 2002¹²) were genetically identical to a recently introduced population in a vineyard in Wallis (Population CH7), which had only 4 individuals in 2003 but underwent a big increase in individual number and population surface by 2005 (Yann Clavien, pers. comm.). Moreover, several new populations of *Ae. cylindrica* were discovered in Wallis by Swiss botanists during the present investigation and after it had started.*

Bevor das BAFU eine abschliessende Freisetzungsbewilligung erteilt ist es deshalb unabdingbar, dass in der Nähe der Freisetzungsstandorte ein Monitoring für das Vorkommen von *Aegilops cylindrica* durchgeführt wird.

Aegilops geniculata* und *A. biuncialis

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist das Vorkommen von *Aegilops geniculata* und *A. biuncialis* an den Freisetzungsstandorten relevant?

Die Gesuche gehen nicht auf *Aegilops geniculata* und *A. biuncialis* ein. Diese kommen aber in Europa vor.¹³

Eine Publikation¹⁴ vom Mai 2007 befasst sich mit der Hybridisierung zwischen *Aegilops geniculata* und *A. biuncialis* mit Weizen (siehe auch Cifuentes et al. 2006¹⁵):

¹¹ Schoenenberger, N. (2005). Genetic and ecological aspects of gene flow from wheat (*Triticum aestivum* L.) to *Aegilops* L. species. PhD thesis, University of Neuchâtel - Faculty of Science - Evolutionary Botany Laboratory, Neuchâtel – Switzerland, October 2005, http://doc.rero.ch/lm.php?url=1000,40,4,20061003105103-JU/these_SchoenenbergerN.pdf.

¹² Hegde, S. G., J. Valkoun, and J. G. Waines. 2002. Genetic diversity in wild and weedy *Aegilops*, *Amblyopyrum*, and *Secale* species - A preliminary survey. *Crop Science*. 42:608-614.

¹³ Zaharieva, M. und Monneveux, P. (2006). Spontaneous Hybridization between Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Its Wild Relatives in Europe. *Crop Sci*, Vol. 46, S. 512-527, <http://crop.scijournals.org/cgi/reprint/46/2/512>.

¹⁴ Loureiro, I. et al. (2007). Hybridization between wheat (*Triticum aestivum*) and the wild species *Aegilops geniculata* and *A. biuncialis* under experimental field conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 120, Issues 2-4, May 2007, Pages 384-390, http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T3Y-4MFKCXXK-

Hybridization between Aegilops geniculata, A. biuncialis and bread wheat Triticum aestivum has been evaluated during two seasons under simulated field conditions to estimate the field hybridization rate under Central Spain conditions. The mean frequencies of hybridization between A. biuncialis and A. geniculata with wheat were 0.34% and 0.31%, respectively. Data from 10 hybrid plants for each combination showed that hybrids can be partially fertile by backcrossing with wheat parent, with percent averages of 3.17 grains/spikelets for A. biuncialis × wheat hybrids and 2.87 grains/spikelets for A. geniculata × wheat hybrids. Self-pollination, although at very low rates, was also possible in hybrids. The potential risks associated with natural hybridization in the context of transgenic wheat cultivation are discussed.

Agropyron repens

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Ist das Vorkommen von Agropyron repens an den Freisetzungstandorten bekannt und ist das Risiko einer Auskreuzung relevant?

In ① (S. 17; siehe auch S. 66) wird ausgesagt, dass *Hybriden zwischen hexaploidem Weizen und sechs weiteren Grasgattungen erzeugt werden können. Von diesen sechs Grasgattungen kämen nur Agropyron sp. und Secale sp. im Gebiet des Experiments vor. Agropyron repens, die kriechende Quecke, sei ein weitverbreitetes Unkraut in dieser Gegend und könne auch in der näheren Umgebung der Versuchsfläche vorkommen. Die Fertilität von Triticum aestivum Hybriden mit diploiden Grasarten sei aufgrund der unterschiedlichen Ploidiegrade der Kreuzungspartner schlecht. Im Verlauf der vergangenen 10'000 Jahre der Co-Kultivierung von Weizen und A. repens seien keine persistenten Hybriden dieser zwei Arten gefunden worden.*

Agropyron, vor allem A. intermedium, treten in der Schweiz weit häufiger als Aegilops auf.

Allergene, toxische und immunogene Eigenschaften

HA-Epitop-Tag

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Folgt die Bewilligungsbehörde dem Kommentar von Prof. A. Gibbs (s.unten), dass das HA-Epitop-Tag bisher (wahrscheinlich) in transgenen Pflanzen nicht verwendet wurde und durch einen anderen Marker für den Proteinnachweis ersetzt werden müsste und dass die Reaktion nur auf einen Teil des HA-Virus anders ausfallen kann als in Fällen, wo Menschen mit dem ganzen Virus in Berührung kommen?

Ist die Bewilligungsbehörde der Meinung, dass es sich um eine vergleichbare Situation einer Freisetzung von Pharmacrops handelt, bei denen weltweit anerkannt ist, dass eine Nulltoleranz für Auskreuzungen auf Nahrungspflanzen gelten soll, hier aber durchaus mit Auskreuzungen in der Grössenordnung von 0.01% gerechnet werden muss (siehe Abschnitt „Isolationsdistanzen“)?

Die HA-Peptid Sequenz aus dem Influenza Virus Hämagglutinin kommt im heute zirkulierenden H3 Subtyp vor. Das Peptid ist immunogen (② S. 35; S. 90). Laut Antragsteller *kann nicht ausgeschlossen werden, dass H3N2 infizierte Personen Antikörper gegen dieses Peptid gebildet haben* und es könnte die Verwendung des HA-Epitop-Tags in Nahrungsmitteln damit theoretisch zu einer Toleranz gegen

15

2&_user=791130&_coverDate=05%2F31%2F2007&_rdoc=31&_fmt=summary&_orig=browse&_srch=doc-info(%23toc%234959%232007%23998799997%23644000%23FLA%23display%23Volume)&_cdi=4959&_sort=d&_docanchor=&view=c&_ct=49&_acct=C000043379&_version=1&_urlVersion=0&_userid=791130&md5=2741544ca858469b3d709464f3faa228.

Cifuentes, M. et al. (2006). A cytomechanical approach to assess the potential of gene transfer from a crop (*Triticum turgidum* L.) to a wild relative (*Aegilops geniculata* Roth.). TAG Theoretical and Applied Genetics, Volume 112, Number 4, February 2006, S. 657 – 664, <http://www.springerlink.com/media/pe669uqwrn2vrk3h9j5m/contributions/y/3/6/2/y362710582114717.pdf>.

dieses Epitop führen und allenfalls zu einer Schwächung der Immunabwehr gegen Influenza H3 führen (② S. 90).

Wir erhielten von Prof. Adrian Gibbs (University of Australia, Canberra, Australien) folgenden Kommentar zum Gesuch ②:

It strikes me that the crucial line in the description you translated is "This ability can be used to do a quantitative virus identification or to do the virus identification and anti-body identification". This suggests that this plan has never been tested in the lab, so what is the point of using it in a field trial? Another important line is "If the hemagglutinin had an allergenic effect, it would have to be expected that allergic reactions to influenza-A-viruses of the subtype H3 were known. What we know so far, there has never been a report of an allergic reaction" - this is wrong as people are infected with the whole virus and become exposed to the whole intact HA, whereas the proposal is to use a small part of the HA sequence, so the reaction of people is most likely to be quite different.

I know of no experiments in which 'flu HAs or bits of them have been put into plants - but I'm not an expert in that area. H3N2 is one of the strains of 'flu currently causing disease in the human population - it is a worry as makes people sick and kills some, especially the old and the sick. I would have thought the scientists who have made this application would have used some other gene as as tag just to avoid any danger/adverse publicity/etc 'cos just guessing the outcome is not an acceptable way of having 'zero tolerance' of risk.

Allergenität Chitinase- und Glucanase-Resistenzgen-Linien

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Welche Bedeutung misst die Bewilligungsbehörde der unüberprüften Annahme, dass bei Chitinase und Glucanase aus Gerste sich nach dem Gentransfer als Expressionsprodukte im Weizen toxikologisch gleich verhalten?

Ist der Verzicht auf Vorversuche gerechtfertigt vor dem Hintergrund der unerwarteten toxische Wirkungen eines Transgens aus Bohnen in Erbsen, die in Australien im Herbst 2005 lediglich durch Fütterungsversuche nachgewiesen werden konnten?

Die Transgene Chitinase und Glucanase aus Gerste sowie das bar Gen kodieren für Proteine, von denen aus wissenschaftlichen Gründen und Praxiserfahrung angenommen werden kann, dass sie weder für die Gesundheit noch für die Umwelt toxisch sind (① S. 30).

Auf Vorversuche im Gewächshaus wurde verzichtet, da es sich natürlicherweise um Gene handelt, die in Gerste vorkommen (① S. 52).

In Australien ist ein mehrjähriger Versuch mit gentechnisch veränderten Erbsen aus Sicherheitsbedenken abgebrochen worden.¹⁶ Mäuse, die mit den gegen Insekten resistenten Erbsen gefüttert wurden, hätten eine Lungenkrankheit bekommen. Australische Forscher haben deshalb das Gen, welches für das Eiweiss (alpha-Amylase-Inhibitor) verantwortlich ist, aus der Bohne auf die Erbse übertragen. Feldversuche haben nun gezeigt, dass die Erbsen bis zu 99.5% resistent gegen den Erbsenkäfer sind. Mäuse wurden gefüttert (a) mit den Bohnen, (b) mit nicht-gentechnisch-veränderten Erbsen und (c) mit gentechnisch veränderten Erbsen, die das Eiweiss aufgrund des Transgens aus den Bohnen produzieren. Im Fütterungsversuch wurden die Mäuse während vier Wochen zweimal wöchentlich mit diesen Bestandteilen gefüttert. In einem separaten Versuch wurde die Reaktion des Eiweisses (alpha-Amylase-Inhibitor) aus den genmanipulierten Erbsen im Vergleich zum natürlichen Eiweiss aus den Bohnen studiert, wenn das Eiweiss in der Mäuselunge appliziert

¹⁶ Vanessa E. Prescott, Peter M. Campbell, Andrew Moore, Joerg Mattes, Marc E. Rothenberg, Paul S. Foster, T. J. V. Higgins, and Simon P. Hogan. Transgenic Expression of Bean α -Amylase Inhibitor in Peas Results in Altered Structure and Immunogenicity. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, Volume 53, Issue 23 (November 16, 2005) pages 9023 – 9030.

wurde. Mäuse, die mit dem natürlichen Eiweiss aus Bohnen gefüttert wurden, zeigten keine Immunreaktionen. Ebenso auch die Fütterung mit nicht-gentechnisch-veränderten Erbsen. Dagegen zeigten Mäuse, die gentechnisch veränderte Erbsen erhielten, eine Immunreaktion nach zwei Wochen, welche bis zur vierten Woche der Fütterung zunahm. Die Reaktion dieser Mäuse war durch eine Entzündung der Lungen der Mäuse charakterisiert und die Antikörper im Serum wurden erhöht. Um die schädliche Reaktion an den Mäuse zu verstehen, verglich das CSIRO-Team die molekulare Struktur des Eiweisses aus den Bohnen mit dem entsprechenden Eiweiss aus den gentechnisch veränderten Erbsen. Es wurde eine geringe Abweichung in der Molmasse der Eiweisse festgestellt. Die Differenz hat höchstwahrscheinlich ihren Grund in der unterschiedlichen Ableseprozessen (Gen zu Eiweiss, inklusive Glykosylierung. (Übertragung von Zuckerresten bei der Biosynthese des Eiweisses)) in den verschiedenen Zellen der Bohne bzw. der transgenen Erbse.

Nicht-Ziel-Organismen

Chitinase- und Glucanase-Resistenzgen-Linien

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Müsste die Bewilligung nicht von der Verfügbarkeit und Qualität der angekündigten Daten einer Voruntersuchung in der Vegetationshalle zum Einfluss der Chitinase-Glucanase Weizenlinien auf Nichtzielorganismen, die Chitin oder Glucane in ihren Zellwänden haben, abhängig gemacht werden?

Da es sich bei der quantitativen Resistenz mit Chitinase und Glucanase um Enzyme handelt, die ein breites Spektrum von Organismen betreffen können, die jeweils Chitin oder Glucane in ihren Zellwänden haben (insbesondere Pilze und Insekten), ist nicht apriori auszuschliessen, dass die Chitinase-Glucanase Weizenlinien mit Nichtzielorganismen interagieren (siehe ① S. 67).

Die Gesuchsteller sagen, dass Untersuchungen möglicher Wechselwirkungen zwischen Nichtzielorganismen und den gentechnisch veränderten Pflanzen Gegenstand von Voruntersuchungen in einem Vorexperiment in der Vegetationshalle in Reckenholz während der Saison 2007 seien.

Pm3-Weizenlinien

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Überprüft die Bewilligungsbehörde, welche Voruntersuchung in der Vegetationshalle zum Einfluss der Pm3-Weizenlinien auf Nichtzielorganismen zwingend im Sinne von GTG Artikel 6 Absatz 2 Buchstabe a durchgeführt hätten werden sollen?

② beschreibt auf Seite 38 mögliche Wechselwirkungen der Pm3-Weizenlinien mit Nichtzielorganismen. Nach einigen vagen Aussagen wird festgehalten: *Interaktionen der transgenen Pm3-Linien mit Nichtzielorganismen (Mikroorganismen und Invertebraten) sind im geplanten Feldversuch von grösstem Interesse und werden in verschiedenen Teilprojekten des NFP59 untersucht (② S. 38).*

Horizontaler Gentransfer

Frage an die Bewilligungsbehörde:

Besteht durch horizontalen Gentransfer die Möglichkeit, dass die Transgene in den beantragten GVP Kreuzungsbarrieren durchbrechen und den Genpool von Mikroorganismen verändern?

Der Risikofaktor des horizontalen Gentransfers von Transgenen aus Pflanzen auf Bakterien wird heute nach wie vor unterschiedlich bewertet. Die empirische Basis aufgrund umweltrelevanter Experimente ist aber sehr schmal.

Der horizontale Gentransfer zwischen Pflanzen und Mikroorganismen hat mit hoher Wahrscheinlichkeit in der Evolution eine Rolle gespielt. Die Existenz von horizontalen Gentransferereignissen wurde unter anderem durch Sequenzvergleiche in Stammbaumanalysen abgeleitet. Falls bei verschiedenen Arten Gene gefunden werden, deren Nukleotidsequenzen hohe Ähnlichkeit aufweisen, so kommt dies einem Hinweis auf horizontale Gentransferereignisse gleich. Eine der grössten Übereinstimmung wurde beispielsweise für das Gen der Glucose-6-phosphat-Isomerase gefunden: die Gene im Bakterium *E. coli* und in der Pflanze *Clarkia unguolata* sind zu 88% identisch.¹⁷

Gentransfers zwischen Pilzen und Pflanzen sind dokumentiert. In einer Studie, bei der 9 unterschiedliche Bakterien und Pilze aus Isolaten von Feldern zusammen mit 4 Arten hygromycinresistenter Pflanzen kultiviert wurden, konnte ein DNA-Transfer vom Pilz *Aspergillus niger* auf Pflanzen beobachtet werden.¹⁸

Eine Studie zeigt auf der Basis von Marker-Genen, dass durch homologe Rekombination Gentransfers von Pflanzen auf Bakterien stattfinden. Die Abschätzung von Transfersequenzen hat sehr vorsichtig zu erfolgen, da z.B. der Selektionsdruck eine grosse Rolle spielen kann. Der Review-Artikel kommt zum Schluss, dass der horizontale Gentransfer unter folgenden Aspekten vertieft angeschaut werden muss:¹⁹

- „1. *The regulation of competence for natural transformation and its expression in natural bacterial communities, and the frequencies and significance of such gene transfer (of both genes and fragments) to bacterial adaptation.*
2. *The importance of environmental factors in the regulation of HGT under natural conditions.*
3. *The conduciveness of bacterial mutants (such as DNA repair mutants with lowered stringency for recombination) to transformation with heterologous DNA and the significance of such mutator subpopulations to the natural plasticity of bacterial communities.*
4. *The effects of strong selective pressure on horizontal transfer of genes which confer a selective advantage to the host. (present studies HGT by natural transformation have mainly been done without selective pressure during the exposure time with DNA. Studies which incorporate selective pressure during the exposure of competent bacteria with selectable DNA should be designed).“*
5. *The factors influencing selection of bacteria present in natural environments such as soil.“*

¹⁷ Smith, M. W. und Doolittle, R. F. (1992). Anomalous phylogeny involving the enzyme glucose-6-phosphate isomerase. *Journal of Molecular Evolution*, Vol. 34, S. 544.

¹⁸ Hoffmann, T., Golz, C. und Schieder, O. (1996). Preliminary findings of DNA transfer from transgenic plants to a wild-type strain of *Aspergillus niger*. In: Schmidt, E. R. und Hankeln, Th. (Hrsg.), *Transgenic organisms and biosafety. Horizontal gene transfer, stability of DNA, and expression of transgenes*, Springer, 1996, S. 77.

¹⁹ Nielsen, K. M., Bones, A. M., Smalla, K und van Elsas, J. D. (1998). Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event? *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 22, S. 79.