



Agrochef Christian Feder,
KMC Amba,
Herningvej 60,
7330 Brande
e-mail: cf@kmc.dk
CVR Nr.: 15230614

Ref.
Den 9. maj 2023

og

Forskningsleder Bent L. Petersen,
Københavns Universitet,
Thorvaldsensvej 40,
1871 Frederiksberg
e-mail: blp@plen.ku.dk
CVR Nr.: 29979812

Godkendelse af forsøgsudsætning af genetisk modificeret CRISPR/Cas kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber

Den 21. marts 2023 modtog Landbrugsstyrelsen en ansøgning fra KMC Amba og Københavns Universitet (KU) om tilladelse til forsøgsudsætning af genetisk modificeret CRISPR/Cas-kartoffel (*Solanum tuberosum*) 'Wotan' på et areal ved Arnborg i Midtjylland, jf. bilag 1.

Landbrugsstyrelsen vurderer, at ansøgningens oplysninger er i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EFⁱ, og at udsætningen kan finde stedⁱⁱ. Godkendelsen gives på baggrund af ansøgningens oplysninger om forsøgsudsætningens gennemførelse og oplysninger om den genetisk modificerede plante, ansøgers risikovurdering og med de i denne afgørelse fastsatte vilkårⁱⁱⁱ. Bemærk særligt vilkåret i punkt 1.2 om dyrkningsafstand.

Godkendelsen til forsøgsudsætningen gives for en periode fra d.d. indtil høst i 2023. Herefter følger en periode, hvor tilladelsesarealet skal overvåges, jf. de i denne afgørelse fastsatte vilkår.

Forsøgsudsætningen er omfattet af reglerne i lov om miljø og genteknologi^{iv}.

Denne afgørelse fremsendes i øvrigt til Herning Kommune, da kommunalbestyrelsen, ifølge loven, er klageberettiget^v.

Forsøgsudsætningen

Godkendelsen omfatter udsætning af CRISPR/Cas-modificerede kartofler af recipientsorten Wotan, som har fået indført en målrettet mutation, som ændrer stivlessammensætningen. Der er således ikke indført fremmed DNA, og planten indeholder ikke antibiotikaresistensmarkører.

Forsøgsudsætningen, som er registreret i Landbrugsstyrelsens fællesskema, skal foregå i bloknummer 500 207 – 20 IMK (internet markkort), som ligger ved

Arnborg, syd for Herning, jf. oversigtskort i ansøgningen. Det samlede forsøgsareal, hvor der dyrkes CRISPR/Cas-modificerede kartofler, vil under hele markforsøget ikke overstige 60 m².

Formålet med udsætningen er at teste den CRISPR/Cas-ændrede (SDN₁) kartoffels sammensætning af amylopektin og amylose (stivelseegenskaber) med henblik på at erstatte kemisk modificeret stivelse. Formålet er desuden at teste om egenskaben, de ændrede stivelseegenskaber, er konstante også når kartofflen dyrkes på friland.

Hele den forsøgmæssige udsætning er afsluttet, når overvågningsperioden og virksomhedens egenkontrol er afsluttet (jf. Egenkontrol og logbog, vilkår 1.10-1.11).

Begrundelse

Landbrugsstyrelsen har anmodet Danmarks Tekniske Universitet (DTU) og Aarhus Universitet (AU) om at vurdere ansøgningsmaterialet i forhold til den gældende lovgivnings krav, og at foretage en vurdering i forhold til påvirkninger af hhv. sundhed, natur og miljø samt af den risikovurdering, som er fremlagt af ansøger.

AU har vurderet risikoen for, om den CRISPR/Cas modificerede kartoffel kan spredes til:

- Omgivelserne (dyrkningsfladen).
- Naturen.
- Vilde slægtninge (via pollen).
- Konventionelt dyrkede kartofler.

AU har endvidere vurderet risikoen for effekter på naturen og på miljøet i øvrigt. Endelig har AU vurderet behovet for overvågning, samt om ansøgers risikohåndtering er fyldestgørende.

Udover den miljømæssige påvirkning i form af pesticidanvendelse og intensiv jordbearbejdning, som sker ved konventionel kartoffeldyrkning, har AU alene identificeret negligerbare risici for natur og miljø ved forsøgsudsætningen. AU vurderer endvidere, at de af ansøgeren foreslåede tiltag vil sikre, at der er en meget lille sandsynlighed for, at der sker spredning af materiale fra den genmodificerede kartoffel.

DTU har foretaget en sundhedsmæssig risikovurdering af den CRISPR/Cas modificerede kartoffel herunder af den genetiske ændring. DTU vurderer, at den anvendte metode kan anvendes meget præcist og mindsker eller udelukker indsættelse af "fremmed DNA" i kartoflerne. DTU vurderer, at eventuelle utilsigtede mutationer må anses for at udgøre en ubetydelig risiko set i relation til traditionel forædling. DTU vurderer, at hvis kartoflerne – mod forventning, men i et "worst case scenario"- ender med at blive konsumeret, så vil det ikke udgøre et sundhedsmæssigt problem. De forventede egenskaber er ikke forbundet med en sundhedsmæssig risiko og bevirker ikke dannelse af nye indholdsstoffer.

Universiteternes vurderinger er vedhæftet denne afgørelse, jf. bilag 2, og er desuden tilgængelige på styrelsens hjemmeside.

Styrelsen har gennemført en høring blandt Europa-Kommissionen og EU-medlemsstaterne samt myndigheder, organisationer og offentligheden i Danmark om forsøgsudsætningen^{vi}. Et notat, der sammenfatter de indkomne høringssvar med Landbrugsstyrelsens bemærkninger kan findes på Høringsportalen^{vii}. Der er ikke nogen af de indkomne høringssvar, som giver styrelsen grund til at betvivle universiteternes risikovurderinger.

Det er på grundlag af universiteternes risikovurdering samt de modtagne høringssvar styrelsens vurdering, at der ikke vil være uønskede miljø- og sundhedsmæssige konsekvenser forbundet med forsøgsudsætningen, hvis forsøgsudsætningen gennemføres som beskrevet i ansøgningen.

Landbrugsstyrelsen finder dog, at det er nødvendigt bl.a. af hensyn til styrelsens tilsyn at fastsætte yderligere vilkår for forsøgsudsætningen. Forsøgsudsætningen skal derfor udføres i overensstemmelse med de nedenfor anførte vilkår.

Vilkår

1. Vilkår for gennemførelse af forsøgsudsætningen

I dette afsnit forstås ved

Tilladelsesarealet: Arealet, som godkendelsen omfatter (markblokken).

Forsøgsarealet: Det eller de arealer indenfor tilladelsesarealet, hvor der dyrkes genetisk modificeret CRISPR/Cas-kartofler (Wotan) og konventionelle kartofler, som indgår i forsøget (brutto-arealet).

GMO-forsøgsarealet: Det eller de arealer på forsøgsarealerne, hvor der alene dyrkes genetisk modificeret kartoffel (netto-arealet).

Sikkerhedsafstand: Afstanden til andre afgrøder, målt i meter, fra ethvert punkt i forsøgsarealets afgrænsning.

Forberedelse af forsøget

1.1 Forsøgsarealer skal markeres tydeligt, f.eks. med pinde, der afgrænser hhv. tilladelsesarealet og GMO-forsøgsarealet. En tegning eller foto af dette sendes til Landbrugsstyrelsen på mail: planter&biosikkerhed@lbst.dk, senest ved lægning af kartofler. Denne markering opretholdes, indtil egenkontrollen med tilladelsesområdet er ophørt, jf. Egenkontrol og logbog, vilkår 1.10-1.11. Årsagen til markeringen er, at de to arealer (tilladelsesarealet og GMO-forsøgsarealet), af hensyn til tilsynet, skal kunne identificeres, mens GM-kartoflerne dyrkes samt i den efterfølgende overvågningsperiode.

1.2 Ansøger angiver i ansøgningen, at der vil være mindst 15 m til nærmeste kartoffelmark. Landbrugsstyrelsen pålægger imidlertid ansøger, at sikkerhedsafstanden (se definitioner) til dyrkning af læggekartofler skal være mindst 20 meter. Sikkerhedsafstanden til dyrkning af kartofler til produktion skal være mindst 10 meter. Disse sikkerhedsafstande er i overensstemmelse med sikkerhedsafstandene i bekendtgørelse om dyrkning m.v. af genetisk modificerede afgrøder (Bek. Nr. 745 af 30/05/2022) og er fastsat på baggrund af rådgivning fra eksperter fra Aarhus Universitet, jf. bestillingen fra 2015: 'Opdatering af viden og

data der ligger til grund for dyrkningsvejledninger for dyrkning af visse genetisk modificerede afgrøder'^{viii}.

Gennemførelse af forsøget

1.3 Landbrugsstyrelsen skal forud for lægningen underrettes om dato og tid for lægningen. Denne underretning skal finde sted senest kl. 12:00 dagen før lægningen. Årsagen er, at Landbrugsstyrelsen skal føre tilsyn med lægningen og skal kunne være til stede ved lægningens påbegyndelse.

1.4 Landbrugsstyrelsen skal underrettes om påbegyndt blomstring i GM-afgrøden. Denne underretning skal finde sted hurtigst muligt ved synlige blomster i GM-afgrøden. Årsagen er, at Landbrugsstyrelsen skal føre tilsyn med, at blomster afklippes for at minimere risikoen for spredning af pollen.

1.5 Landbrugsstyrelsen skal forud for høst underrettes om dato og tid for høst. Denne underretning skal finde sted senest kl. 12:00 dagen før høsten. Årsagen er, at Landbrugsstyrelsen skal føre tilsyn med høsten og derfor skal kunne være til stede ved høstens påbegyndelse.

Overvågning af tilladelsesarealet efter høst

1.6 Eventuelle fremspirende kartofler skal fjernes og testes med den i ansøgningen angivne metode. Resultatet af denne test meddeles Landbrugsstyrelsen. Årsagen til dette vilkår er, at Landbrugsstyrelsen skal føre tilsyn med de i ansøgningen godkendte oplysninger om tilsyn, overvågning og efterbehandling- og affaldshåndteringsplaner, jf. pkt. 4 i ansøgningen.

1.7 De pågældende områder, hvor forsøgsudsætningen er sket, overvåges i yderligere fire vækstsæsoner for eventuelle fremspirende kartofler. Dette krav er baseret på rådgivning fra eksperter fra Aarhus Universitet, jf. bestillingen fra 2021: 'Opdatering af det faglige bidrag vedrørende dyrkning af GM-afgrøder af raps, majs, kartofler, bederoer, hvede og byg'^{ix}.

1.8 Hvis der i overvågningsperioden fremspirer GM-kartofler på tilladelsesarealet, vil det medføre, at overvågningsperioden forlænges med fire vækstsæsoner, med mindre det kan påvises, at det ikke er en GM-kartoffel. Forlængelsen af overvågningsperioden er baseret på rådgivning fra eksperter fra Aarhus Universitet, jf. bestillingen fra 2021: 'Opdatering af det faglige bidrag vedrørende dyrkning af GM-afgrøder af raps, majs, kartofler, bederoer, hvede og byg'.

1.9 Hvis der i overvågningsperioden findes fremspirende kartofler, skal ansøger uden ugrundet ophold underrette Landbrugsstyrelsen, med mindre det kan påvises, at det ikke er en GMO-kartoffel.

Egenkontrol og logbog

1.10 Gennemførelse af egenkontrollen skal dokumenteres i en logbog. Det skal af logbogen klart fremgå:

- Hvilke forhold, der er ført egenkontrol med.
- Hvornår egenkontrolaktiviteten er gennemført.
- Hvem der har gennemført egenkontrolaktiviteten.
- Resultaterne af egenkontrolaktiviteten.

Årsagen er, at egenkontrollen indgår i den endelige vurdering af, hvornår overvågningen er afsluttet, jf. afsnittet "Afslutning af forsøget".

1.11 Logbogen skal føres af den for forsøgsudsætningen ansvarlige eller en eller flere af denne udpegede medarbejdere, og Landbrugsstyrelsen skal underrettes

om, hvem der udpeges. Årsagen er, at Landbrugsstyrelsen til hver en tid skal være bekendt med, hvem der er ansvarlige for forsøgsudsætningen.

Afslutning af forsøget

1.12 Forsøgsudsætningen og egenkontrollen er afsluttet, når ansøger har dokumenteret, at der i fire vækstsæsoner i træk ikke har været fremspirende GM-kartofler på forsøgsarealet blandt andet på grundlag af dokumentationen i logbogen, jf. Egenkontrol og logbog, vilkår 1.10-1.11.

2. Vilkår for rapportering

2.1 Hvis der sker personændringer i kredsen af ansvarlige for forsøgsudsætningen eller den daglige drift, skal dette uden ophold meddeles Landbrugsstyrelsen. Årsagen er, at Landbrugsstyrelsen til hver en tid skal være bekendt med, hvem der er ansvarlige for forsøgsudsætningen.

2.2 Ansøger skal én gang årligt afrapportere resultaterne af egenkontrollen (logbogen) til Landbrugsstyrelsen. Afrapporteringen af egenkontrollen skal være Landbrugsstyrelsen i hænde senest med udgangen af januar hvert år, frem til afslutningen af hele forsøgsudsætningen, jf. afsnittet "Afslutning af forsøget". Årsagen er, at egenkontrollen indgår i den endelige vurdering af, hvornår overvågningen er afsluttet.

2.3 Når forsøgsudsætningen er endeligt afsluttet, skal ansøger udarbejde en endelig rapport om forsøget. Slutrapporten skal bl.a. bruges til at underrette Europa-Kommissionen og de øvrige medlemsstater i EU om, at forsøgsudsætningen er afsluttet.

2.4 Til den endelige afrapportering benyttes den rapporteringsmodel, der fremgår af bilaget til Kommissionens beslutning (2003/701/EF) af 29. september 2003 om fastlæggelse i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/18/EF af en model for fremlæggelse af resultatet af udsætning i miljøet af genetisk modificerede højerestående planter i andet øjemed end markedsføring.

2.5 Slutrapporten skal være Landbrugsstyrelsen i hænde senest 30 dage efter forsøgsudsætningens endelige afslutningsdato.

Tilsyn og offentliggørelse

Landbrugsstyrelsen fører tilsyn med, at forsøgsudsætningen følger de i ansøgningen anførte foranstaltninger og med, at ovenstående vilkår overholdes^x.

Tilsynet vil blive planlagt og varslet, således at Landbrugsstyrelsen overvåger lægning af kartofler, høst og et tilsyn i løbet af blomstringsperioden^{xi}.

Tilsynet koordineres med ansøger, således at det foregår på et for planternes udvikling hensigtsmæssigt tidspunkt.

Manglende overholdelse af de i denne afgørelse fastsatte vilkår kan straffes med bøde^{xii}.

Landbrugsstyrelsen har oprettet et register på styrelsens hjemmeside, www.lbst.dk hvor følgende oplysninger om forsøgsudsætningen bliver offentliggjort^{xiii}:

- 1) Ansøgers navn og adresse, beskrivelse af den eller de genetisk modificerede organismer, formålet med udsætningen og stedet for udsætningen.
- 2) Resumé af de miljø-, natur- og sundhedsmæssige risikovurderinger.
- 3) Landbrugsstyrelsens vurdering af sagen.

4) Vilkårene for gennemførelsen af forsøgsudsætningen (pkt. 1) samt vilkår om rapportering under og efter at udsætningen er fuldført (pkt. 2).

Hvis I vil klage

Hvis I er uenig i vores afgørelse med tilhørende vilkår, kan I klage over den. I skal sende klagen inden 4 uger fra den dag, hvor I fik dette brev.

I klager via klageportalen, som I finder på Nævnenes Hus' hjemmeside. Derinde kan I læse, hvordan I skal gøre, og se status på jeres sag. I logger på klageportalen med MitID.

Jeres klage bliver automatisk sendt til os i Landbrugsstyrelsen. Hvis vi fastholder vores afgørelse, sender vi klagen videre til Miljø- og Fødevareklagenævnet via klageportalen. I får besked, hvis vi sender jeres klage videre.

Hvis I ikke sender jeres klage via klageportalen, afviser Miljø- og Fødevareklagenævnet jeres klage, medmindre I er fritaget for brug af klageportalen. I kan læse mere om fritagelse fra klageportalen på nævnets hjemmeside.

Med venlig hilsen

, Planter & Biosikkerhed

Der er vedlagt følgende bilag til denne afgørelse:

- **Bilag 1.** Ansøgning om udsætning af CRISPR/Cas-modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber, WOTAN.
- **Bilag 2.** Risikovurderinger - Wotan

ⁱ Direktiv 2001/18/EF af 9. marts 2001 om udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

ⁱⁱ § 9, stk. 1, og stk. 2 nr. 1, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

ⁱⁱⁱ Jf. § 16, stk. 1, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

^{iv} LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om miljø og genteknologi.

^v Jf. § 30, stk. 1, nr. 3 i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om miljø og genteknologi.

^{vi} § 9 i BKG nr. 37 af 19. januar 2012 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

^{vii} www.hoeringsportalen.dk

^{viii} https://pure.au.dk/portal/files/225933839/Levering_Opdatering_af_viden_og_data_der_ligger_til_grund_for_dyrkningsvejledninger_for_dyrkning_af_visse_GM_afgr_der.pdf

^{ix} https://pure.au.dk/portal/files/101255558/Opdatering_af_det_faglige_bidrag_vedr_rende_dyrkning_af_GM_afgr_der_280915.pdf

^x Jf. § 20, stk. 1, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om miljø og genteknologi.

^{xi} § 4, stk. 3, i BKG nr. 37 af 19. januar 2012 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

^{xii} Jf. § 36, stk. 1, nr. 3 og stk. 5, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017.

^{xiii} § 10, stk. 2, i BKG nr. 37 af 19. januar 2012 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber.

GUDP-projekt: "KRISPS. Kartoffler med Resistens og Innovativ Stivelse som Platform for Synergi mellem grøn og økonomisk bæredygtighed."

Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber.

GUDP-projekt: "KRISPS. Kartoffler med Resistens og Innovativ Stivelse som Platform for Synergi mellem grøn og økonomisk bæredygtighed."

A.1. Anmelderens navn og adresse

Forskningsleder Bent L. Petersen Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg

e-mail: blp@plen.ku.dk

Agrochef Christian Feder, KMC Amba, Herningvej 60, 7330 Brande

e-mail: cf@kmc.dk

A.2. De ansvarligere forskeres navne

Bent L. Petersen, lektor, PhD, Gruppeleder, > 25 års erfaring i Plante genetik med anvendelsesområder omfattende forædling af kulhydrat polymerer, herunder stivelse, resistens forædling samt kulhydrater påsat terapeutiske proteiner for mhp ny funktionalitet. Særligt fokus sidste 7 år: stivelses- og resistensforædling i kartofler ved brug af gen-saksen CRISPR-Cas.

Frida Meijer Carlsen, Cand. Scient. Biologi-Bioteknologi, nu PhD stud. med fokus på resistens forædling i kartofler, hvor hun har genereret den formodet skimmel-resistente Ydun kartoffel. MSc arbejde: CRISPR/Cas forædling af i Casava, 3 år forsknings assistent: CRISPR/Cas forædling af nye stivelses typer.

Christian Feder,

Cand.agro og Agrochef hos KMC A.m.b.a. Har arbejdet med udvikling, avl og forædling af kartofler siden 1990.

Erhvervede GMO- kørekort i 2021.

Markpersonalet er uddannede jordbrugsteknologer og har erhvervet GMO - kørekort på Bygholm Landbrugsskole i december 2021 eller marts 2023.

Forsøgsarbejdet vil blive udført i samarbejde med Ytteborg Forsøg, Hjernvej 94, 7560 Hjerm

A.3. Projektets titel

CrisprCAS kartoffel med ændrede stivelsesegenskaber.

Undertitel:

GUDP-projekt: "KRISPS. Kartoffler med Resistens og Innovativ Stivelse som Platform for Synergi mellem grøn og økonomisk bæredygtighed."

A.4. Udsætningen

A.4.a. Formålet med udsætningen

Teste den CrisprCAS ændrede kartoffels sammensætning af amylopektin og amylose med henblik på at erstatte kemisk modificeret stivelse.

Formålet er desuden at teste om egenskaben, de ændrede stivelseegenskaber, er konstante også når kartofflen dyrkes på friland.

A.4.b. Udsætningens startdato og varighed.

Udsætning sker omkring 1. maj 2023 og høst i perioden 20 - 30. september 2023.

A.4.c. Udsætningsmetode

Kartoffelknolde håndlægges i jorden og dækkes med kartoffelkamme.

A.4.d. Fremgangsmåde ved forberedelse og behandling af udsætningsstedet inden, under og efter udsætningen, herunder dyrknings- og høstpraksis:

Forår:

Marken er pløjet og harvet op inden udsætning af planterne.

Under (udsætningen)væksten:

Normal behandling mod ukrudt, skadedyr og sygdomsbekæmpelse imod kendte svampesygdomme i kartoffel.

Planterne vil løbende blive vandet efter behov.

Høst(optagning):

Håndopgravning og opsamling. Vejning vil foregå i marken.

Måling af stivelsesindhold vil ske indendørs ved hjælp af en special vægt, der kan udregne indholdet af tørstof (og heraf stivelsesindhold).

A.4.e. Omtrentlig antal planter per kvm.

3 - 6 planter per kvm.

A.5. Oplysninger om udsætningsstedet

A.5.a. Udsætningsstedets størrelse og beliggenhed

Udsætningsstedet er beliggende i *bloknummer 500 207 – 20, IMK, totalareal = 0,5 ha.*

Området der vil blive tilplantet med den CrisprCAS modificerede kartoffel, vil være 180 m² brutto/60 m² netto.

Forskel mellem brutto/netto er værn og sti.

A.5.b. Beskrivelse af udsætningsstedets økosystem, herunder klima, flora og fauna.

Udsætningsstedet er beliggende i et konventionelt dansk landbrugsareal.

A.5.c. Forekomsten af krydsningskompatible beslægtede vilde eller dyrkede plantearter.

Kartoffel krydser ikke spontant med vilde arter af kartoffel eller andre dyrkede *Solanum* arter.

Der er ingen historik for at den dyrkede kartoffel i Danmark har krydset med vilde arter i naturen.

Ved blomstringen i begyndelsen af juli vil vi, som ekstra sikkerhed, klippe blomsterne af planterne. Dette vil sikre, at der ikke vil kunne ske nogen form for krydsning.

Afklipping af blomsterne anvendes bl.a. også ved SLU (Sveriges Lantbruks Universitet).

A.5.d. Afstanden til officielt anerkendte biotoper eller beskyttede områder, som vil påvirkes.

Afstande

§3 Hede: 230 meter

§3 Overdrev: 470 meter

§3 Eng: 550 meter

Fredskov: min. 15 meter



B.1. Videnskabelige oplysninger

Taxonomi	Latinske navn
Familie	<i>Solanaceae</i>
Slægt	<i>Solanum</i>
Art	<i>Solanum tuberosum</i>
Underart	<i>Tuberosum</i>
Kultivar	Wotan
Almindeligt navn	Kartoffel (stivelse) "Wotan"

B.1.b. Udbredelse og dyrkning i Unionen

Kartofler dyrkes bredt i alle lande i Unionen og anvendes til almindeligt konsum, pommes frites, chips, dehydrerede produkter, alkohol og stivelsesproduktion.

B.1.c. Reproduktion

i)

Kartofler opformeres(reproduceres) normalt klonalt ved udplantning af læggeknolde, som producerer nye knolde.

I forsknings- og forædlingsøjemed bruges frø til at frembringe F1 generationen, som producerer den første knold. Bestøvning foregår her i drivhuse hvor pollen overføres til støvdrager med hånden, dette kan lidt populært betegnes som "kunstig befrugtning".

ii)

I naturen sker den yderst sjældent spontant krydsning mellem kultivarer (sorter) af kartofler, hvorfor risiko for krydsbestøvning anses som værende teoretisk og ubetydelig.

For at eliminere selv den mindste risiko vil vi klippe blomsterne af, når planterne begynder at blomstre – typisk primo juli.

iii)

Kartofler er 1. årige.

B.1.d. Krydsningskompatibilitet med andre dyrkede eller vilde plantearter, herunder udbredelsen i Europa af de kompatible arter.

Der kendes ikke til krydsninger mellem kartofler og andre dyrkede eller vilde arter i Europa. Krydsningskompatibiliteten må derfor anses for at være ikke eksisterende.

B.1.e. Overlevelsessevne:

i)

Evne til at danne strukturer, der fremmer overlevelse eller vækstdvale:

Ikke høstede knolde kan overleve i jorden hen over en mild vinter uden betydende frost. Almindeligt vintervejr med gentagen nat og dagsfrost vil slå eventuelle overskydende knolde i jorden ihjel, de fryser væk.

Alle kartoffelknolde i forsøget på udsætningsstedet vil blive håndopgravet, hvorfor sandsynligheden for at der skal være knolde i jorden efter høst er ubetydelig.

ii)

Ingen særlige faktorer.

B.1.f. Spredning

i)

Maskinoptagning vil i nogle tilfælde spilde små knolde, som kan give ny vækst året efter. Derfor vælger vi den manuelle håndoptagning, som er et effektivt værn imod knolde der ikke bliver høstet.

ii)

Ingen særlige faktorer

B.1.g.

Ikke relevant

B.1.h.

Kartofflen vekselvirker ikke med andre planter eller organismer, hvor den dyrkes konventionelt, og har ikke nogen kendt toksisk virkning på mennesker, dyr eller andre organismer.

2. Molekylær karakterisering.

a) oplysninger om den genetiske modifikation

Den Crispr-Cas modificerede kartoffel, Waxy Wotan, Linje K33, herefter 'Waxy Wotan (K33)', er fremstillet på Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C.

Der er ved brug af Crispr-Cas frembragt små målrettede mutationer i genet Granular Bound Starch Synthase (*StGBSS*) 1 i kartoffelsorten Wotan.

StGBSS1 genet udtrykker *GBSS1* enzymet, som danner amylosekomponenten i stivelse. I Waxy Wotan (K33) er genfunktion af *StGBSS1* genet (i alle 4 alleler) ødelagt/ikke-funktionelt, hvorved planten ikke kan producere amylose og derfor indeholder stivelse med udelukkende amylopektin.

i) beskrivelse af de metoder der er anvendt

Protoplaster blev isoleret fra 5 uger gamle vildtype *in vitro* planter ved enzymatisk fordøjelse af cellevæggen. De isolerede protoplaster blev mixet med P9P10 plasmid (se figur) og transformation udført ved hjælp af 12% polyethylene glycol (PEG). De transformerede/editerede protoplaster blev regenereret over 3-4 måneder på forskellige medier indeholdende en eller flere af følgende hormoner i varierende koncentrationer: 6-Benzylaminopurine, 1-Naphthaleneacetic acid, Gibberellic acid and Zeatin (se endv. Andreasson et al 2022).

De regenererede planter blev efterfølgende flyttet til et hormonfrit Murashige and Skoog medium. Screeningen af planterne blev udført ved IDA Analyse (IDAA) med fluorescens mærket PCR produkter, amplificeret på ekstraheret gDNA fra planterne og separeret på baggrund af størrelse (detektions opløsning +/- 1 bp) via kapillær elektroforese.

Da der kun er anvendt et enkelt gRNA/Cas9 kompleks, transient fremstillet via konstruktet P9P10 i portoplastcellen, er der ikke tale om multiplexing i transformation / editerings processen.

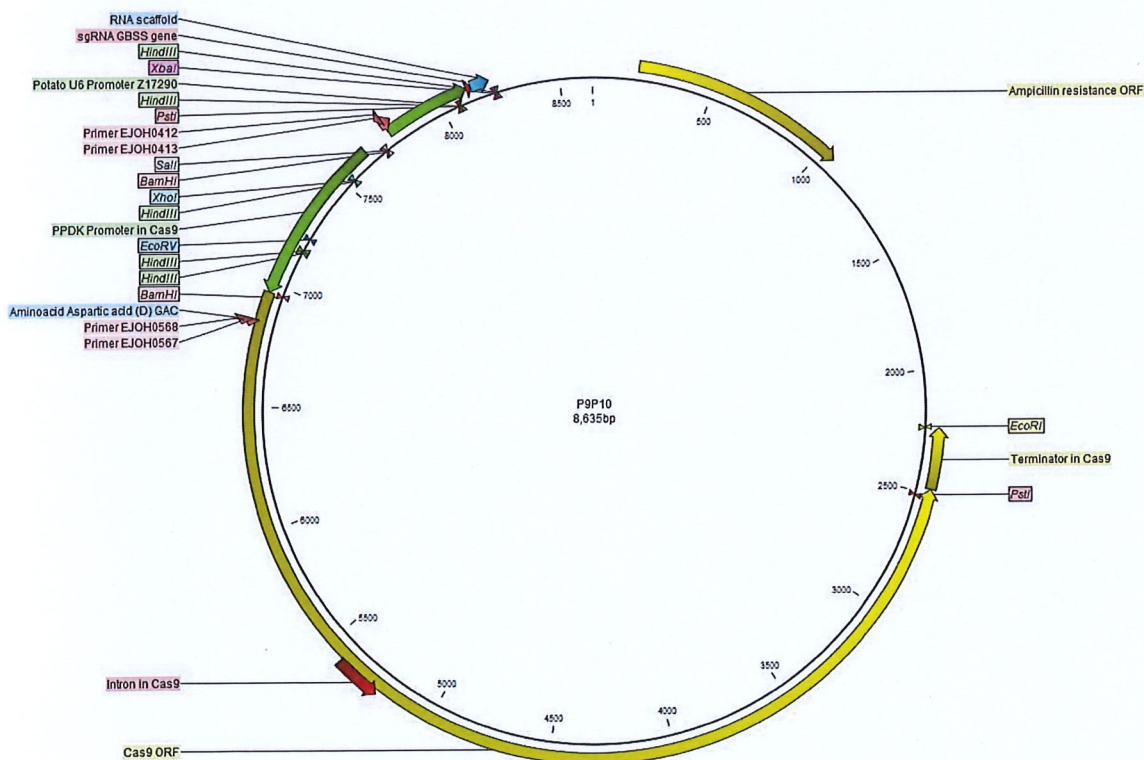
Yderligere detaljer om genereringen af Waxy Wotan kan findes i følgende:

Johansen IE, Liu Y, Jørgensen B, Nielsen KL, Andreasson E, Bennett EP, Nielsen KL, Blennow A, Petersen BL (2019) High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato (2019) *Sci Rep* **9**, 17715.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>

Andreasson E, Kieu NP, Zahid MA, Carlsen FM, Lenman M, Sandgrind S, Petersen BL, Zhu Li-Hua (2022) Schemes for in vitro shoot regeneration from tissues and protoplasts of potato and rapeseed: implications for bioengineering such as gene editing of broad leaved plants. Invited Mini-review/Research. Research topic title: Utilization of Protoplasts to Facilitate Gene-Editing in Plants. *Frontiers in Genome Editing*, doi: 10.3389/fgeed.2022.780004

ii) den anvendte vektors art og oprindelse



Guide RNA brugt: GGTCCTGGAGCAAACTGG

Det plasmid-baserede CRISPR/SpCas9 konstrukt, P9P10, er designet til at mutere Exon 1 i *StGBSS1*. P9P10 er ikke-integrativt, dvs at det ikke indeholder elementer, der fx ved Agrobacterium medieret transformation, kan foranledige integration i genomet som led i transformationen / mutagenesen.

Det skal endvidere fremhæves, at P9P10 ikke indeholder en selektions markør, der ville kunne anvendes i planter. Derfor er Waxy Wotan linjen fuldt sekventeret og screenet for alle insert relateret til P9P10 plasmidet. Denne screening viste, at der ikke er indsat plasmid elementer i genomet.

Allele specific characterization + primer design

Figuren til venstre viser sgRNA designet, de fire alleler og placeringen af sgRNA i GBSS genot (baren i toppen, exon i hvide kasser. Stjerner symbolisere allel forskelle naturligt forekommende mellem de fire alleler.



iii) Kilden til den/de til transformationen anvendte nukleinsyre(r) samt størrelse og tilsigtet funktion af hver bestanddel af den region, der skal indsættes

- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke-integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

b) Oplysning om GMHP'erne

i) Overordnet beskrivelse af de egenskaber og karakteristika, der er indført eller ændret

Der er ved brug af CrisprCAS teknologien frembragt små målrettede mutationer i genet Granular Bound Starch Synthase (*StGBSS*) 1 i kartoffel sorten Wotan, der normalt producerer GBSS1 enzymet, som danner amylose komponenten i stivelse. I Waxy Wotan (K33) er genfunktion af *StGBSS1* genet (i alle 4 alleler) ødelagt/ikke-funktionelt, hvorved planten ikke kan producere amylose og derfor indeholder stivelse med udelukkende amylopektin.

Waxy mutationen

- et begrænset antal 'waxy' mutanter, der har tab af Granular Bound Starch Synthase (GBSS) gen funktion, findes naturligt forekommende i flere arter i naturen og 'waxy' fænotypen, der giver en mere klistret stivelses tekstur, er derfor ikke en ukendt variation i naturen.
- den stærkt begrænsede forekomst af naturligt forekommende 'waxy' mutanter, gør, at den 'waxy' egenskaben ikke anses for at have en selektiv fordel i naturen.
- Der er desuden ingen rapporter om produktion af giftige forbindelser som følge af 'waxy' mutationen.

Plante resistens markør(er) indgår ikke i det anvendte CRISPR/Cas konstrukt (P9P10), der endvidere er ikke-integrativt. K33 mutationerne er INDELS og dermed af Site Directed Nuclease 1 (SDN1) typen, idet homolog integrations template ikke har indgået i transformations/editerings processen.

ii) Oplysninger om faktisk indsatte/deleterede sekvenser

- Størrelse og antal kopier af enhver/alle insert(er), de metoder der er anvendt
- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke-integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

- I tilfælde af deletion angives den eller de deleterede regioner størrelse og funktion
I K33 (*StGBSS1* exon 1) har de fire alleler følgende mutationer: I (6 bp deletion); II (5 bp deletion); III (1 bp addition); IV (4 bp deletion).
- Insertets/-ernes subcellulære placering(er) i plantecellerne (integreret i kernen, kloroplaster, mitokondrier, eller bevaret i en ikke integreret form) samt metoder til bestemmelse af den/dem
- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke- integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

iii) Dele af Planten, hvori insertet udtrykkes

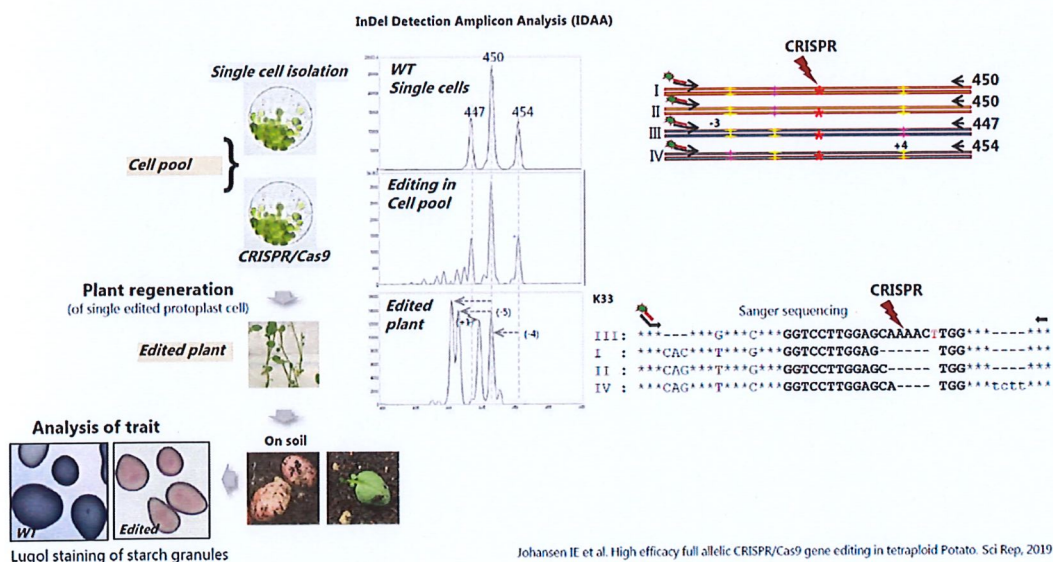
- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke- integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

iv) Insertets genetiske stabilitet og GMHP'ernes fænotypiske stabilitet

- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke- integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

c) konklusioner af den molekylære karakterisering

Herunder ses en IDAA og sekventeringsanalyse, der viser mutationer i cut sitet for K33.



PCR til IDAA er udført på UCPH-PLEN mens IDAA prøverne er analyseret af Taq Copenhagen (TAG Copenhagen A/S).

IDAA har for WT (ikke editerede) identificeret alle 4 alleler i det amplificerede område med længderne I & II (450 bp, dobbelt højde), III (347 bp), IV (454 bp). I K33 er alle positioner/toppe flyttet (I (6 bp deletion); II (5 bp deletion); III (1 bp addition); IV (4 bp deletion)). Som det ses er der fuld korrelation mellem IDAA profil

og sekventeringen (Sanger sekventering, som beskrevet i Johansen et al 2019). Mutationerne i K33 er i tråd med CRISPR/SpCas9-medierede mutationer rapporteret i kartofler og i andre planter.

Pga. det enorme molekylære overskud af plasmid kopier pr protoplastcelle, vil nogle protoplastceller, og dermed også de afledte editerede eks-planter, få indsat mindre plasmid fragmenter. Disse fragmenter er som oftest fragmenter på op til 10 basepar, i brud stedet. Dette er velkendt i litteraturen og udførligt dokumenteret også i Johansen et al 2019. K33 linjen er udvalgt, fordi den i brud-stedet (mutagenese målstedet) har brudt læseramme i alle 4 alleler (fuld allel knock out), og ikke indeholder plasmid fragment(er).

Herudover er genomet af hhv Waxy Wotan (K33) og ikke-editeret Wotan er blevet fuldt sekventeret i alle fire alleler vha. Illumina sekvenserings teknikken. K33 genomet er, ved sekvens afsøgning, undersøgt for potentielle indsatte konstrukt afledte fragmenter. Vi konkluderer, jvf. denne undersøgelse, at K33 genomet ikke indeholder plasmid-konstrukt DNA, der blev anvendt under Crispr-Cas mutagenesen.

Teamets publicerede litteratur, der ligger til grund for generering og molekylær analyse af K33

Johansen IE, Liu Y, Jørgensen B, Nielsen KL, Andreasson E, Bennett EP, Nielsen KL, Blennow A, Petersen BL (2019) High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato (2019) *Sci Rep* **9**, 17715.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>

Bennett EP, **Petersen BL**, Johansen IE, Niu Y, Yang Z, Chamberlain CA, Met Ö, Wandall HH, Frödin M (2020) INDEL detection, the 'Achilles heel' of precise genome editing: a survey of methods for accurate profiling of gene editing induced indels. *Nuc Acids Res*, 48 (21), 11958–11981, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa975>

Andreasson E, Kieu NP, Zahid MA, **Carlsen FM**, Lenman M, Sandgrind S, **Petersen BL**, Zhu Li-Hua (2022) Schemes for in vitro shoot regeneration from tissues and protoplasts of potato and rapeseed: implications for bioengineering such as gene editing of broad leaved plants. Invited Mini-review/Research. Research topic title: Utilization of Protoplasts to Facilitate Gene-Editing in Plants. *Frontiers in Genome Editing*, doi: 10.3389/fgeed.2022.780004

3. Oplysninger om specifikke risikoområder.

- a)
Der forventes ingen ændringer i hverken persistens eller invasionsevne, ej heller i evnen til at overføre genetisk materiale til beslægtede plantearter.
- b)
Der forventes ingen ændringer i evnen til at overføre genetisk materiale til mikroorganismer.
- c)
Ikke relevant. De ændrede stivelsesegenskaber forventes at reducere forbruget af kemisk modificeret stivelse.
- d)
Der forventes ingen ændringer.

e)

Ændringen af stivelsesegenskaberne forventes ikke at ville påvirke den almindelige landbrugspraksis, hvad angår dyrkningen, såsom gødsning, vanding, sprøjtning imod sygdomme, ukrudt, skadedyr osv.

De ændrede stivelsesegenskaber vil kunne forbedre produktionen af plantebaserede fødevarer og øge mængden af "Clean Label" stivelsestyper til fødevarerproduktion.

Stivelsen vil desuden erstatte en del af de i dag anvendte kemisk modificerede stivelser.

f)

Der forventes ingen påvirkninger på de abiotiske miljøer.

g)

Der forventes ingen toksisk, allergenisk eller anden skadelig påvirkning på menneskers eller dyrs sundhed. Der er ingen forventning om, at ændringerne i stivelsessyntesen og den heraf udvundne ændrede stivelse, vil have indflydelse på menneskers eller dyrs sundhed.

Der findes allerede i dag en såkaldt "waxy-kartoffelstivelse" på markedet. Denne stivelse sælges allerede kommercielt til forskellige fødevarer formål rundt om i EU og resten af Verden.

Vi har ikke modtaget meldinger om, at denne specifikke stivelse har haft skadelige påvirkninger på hverken mennesker eller dyr.

Generelt er kartoffelstivelse netop kendt for hverken at være toksisk, allergenisk eller have anden skadelig påvirkning på menneskers eller dyrs sundhed.

Kartofler er generelt ikke toksiske eller kendt for at udvikle allergier.

h)

Der forventes ingen øget risiko for miljøpåvirkning hverken på mennesker, dyr eller omkringliggende natur.

4. Oplysninger om kontrol, overvågning og efterbehandling- og affaldshåndteringsplaner

Trufne forholdsregler

- a. *Afstand fra krydsningskompatible plantearter, både beslægtede vilde plantearter og afgrøder.*

Der vil være 15 m til nærmeste kartoffelmark.

Udsætningsstedet for den CrisprCAS modificerede kartoffel vil desuden blive omgivet af et bælte af ikke-CrisprCAS modificerede kartofler.

Kartofler krydser ikke spontant med vilde arter af kartofler eller andre *Solanum* arter.

Som ekstra sikkerhed afklippes blomster, primo juli i forbindelse med blomstringen.

- b. *Forholdsregler for at mindske/undgå spredning af de modificerede planters reproduktionsorganer (F.eks. Pollen, frø, knolde).*

Udsætningsstedet for den CrisprCAS modificerede kartoffel vil blive omgivet af et 3 m bredt bælte af ikke CrisprCAS modificerede kartofler, der vil fungere som pollenfanger, og derved reducere pollenspredning.

Dette bælte vil blive høstet og alt plantemateriale vil blive destrueret ved høst, som beskrevet nedenfor.

Som ekstra sikkerhed afklippes blomster primo juli i forbindelse med blomstringen.

Spande, kurve og øvrige redskaber anvendt ved udplantningen vil blive grundigt rengjorte og eftersat for læggeknolde. Kartoffelknolde vil ved høst blive taget op med hånden for at sikre at der ikke efterlades knolde i jorden.

Alt øvrigt plantemateriale vil blive opsamlet i sække og kørt til forbrænding/deponi.

Høstede knolde vil blive opsamlet i sække og transporteret i kasser til bestemmelse af

stivelsesindhold på indendørs stivelsesvægt.

Test af stivelsen vil ske på KMCs laboratorie, som allerede er godkendte til at håndtere GMO kartofler.

For at udvinde stivelsen af knoldene skal knoldene knuses og de mister derved muligheden for at kunne spire hvorfor risikoen for spredning elimineres.

4.b. Metoder til efterbehandling af stedet efter udsætning

Efter høst vil jorden bliver harvet, for at fritlægge eventuelle knolde, som ikke er taget op.

1. harvning vil ske kort efter høst, så evt. knolde kan frilægges og fjernes. Henover vinteren vil marken blive harvet efter frostperioder eller mindst 2 gange.

Efter hver harvning vil marken blive kontrolleret for evt. fritlagte knolde, som vil blive destrueret.

Året efter udsætningen vil arealet ligge som sort brak med månedlige harvninger (april til september) og overvågning.

Arealet vil blive overvåget i min. 4 år eller til der ikke findes spildplanter mere (jf. vejledning fra Landbrugsstyrelsen "Dyrkningsbestemmelser for GM kartofler" marts 2022).

Arealet forventes udlagt med såkaldt blomsterbrak fra 2025 som kan slås og overvåges.

Det skal bemærkes, at erfaringen med håndoptagning af kartofler er at der meget sjældent efterlades knolde i jorden.

4.c. Behandlingsmetoder, efter udsætning, herunder affald.

Under dyrkningen: normal plantebeskyttelse imod ukrudt, skadedyr og sygdomme.

Høst: Håndoptagning/høst. Ved håndoptagningen(høst) er risikoen for spild meget lille. Høstede knolde vil blive opsamlet i plastiksække og transporteret i dobbelt GMO mærkede plastposer, og kørt til KMCs GMO godkendte laboratorium for forarbejdning til stivelse/kartoffelmel (se vedlagte bilag 4).

Plantematerialet vil blive opsamlet i plastiksække og brændt/destrueret.

Plantemateriale fra bæltet udenfor de CrisprCAS modificerede planter vil også blive samlet i plastiksække og brændt/deponeret.

Efter brug vil vægten og kasser blive rengjort og desinficeret og sække vil blive kørt til forbrænding/deponeret.

4.d. Overvågningsplaner og teknikker.

Udsætningsmarken vil blive observeret hver uge og væksten vil blive noteret og beskrevet.

Efter høst vil udsætningsmarken blive nøje overvåget for knolde og eventuelle planter.

Eventuelle planterester og knolde vil blive destrueret.

4.e. Beredskabsplaner

Der forventes ikke krisesituationer med mulig undtagelse af potentielle hærværksaktioner, hvilket der ikke er tradition for i Danmark.

Lokaliteten vil blive overvåget med jævne mellemrum. Der vil blive opsat skilte forskellige steder ved marken, der beskriver forsøget samt navne og telefonnumre på de ansvarlige for forsøget: Bent L.

Pedersen, Frida Meijer Carlsen og Christian Feder.

4.f. Metoder og procedurer til beskyttelse af stedet.

i)

Alt arbejde med planter, knolde i marken og efterfølgende håndtering vil ske som håndarbejde, hvorfor den mekaniske spredningsrisiko betragtes som minimal.

Al transport til og fra mark vil ske i lukkede enheder (dobbelt GMO mærkede plastposer placeret i kasser), hvorfor risiko for spredning under transport også betragtes som minimal.

ii)

Der forventes ikke at skulle gøres noget ekstra til beskyttelse af stedet mod uvedkommende personers indtrængen.

iii)

Der forventes ikke at skulle gøres noget ekstra til beskyttelse af stedet mod andre organismers indtrængen.

5. Beskrivelse af teknikker til påvisning og identifikation af GMHP erne

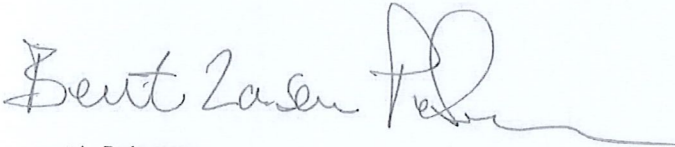
Den ovenfor beskrevne målrettede mutations analyse vil påvise, hvorvidt mutationen forefindes i det analyserede materiale.

Waxy Wotan (K33) er fuldt karakteriseret (i alle fire alleler) vha IDAA og sekvensering analyse, som beskrevet ovenfor, og vil blive anvendt til entydig mutant/line identifikation i indhentet materiale, der evt. ift. en usandsynlig spredning, kunne påtænkes analyseret.

6. Oplysninger om tidligere udsætninger af GMPH erne.

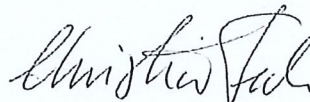
Ikke relevant.

Dato: 21. marts 2023



Bent L. Petersen

Københavns Universitet



Christian Feder

KMC

Bilag 1. Miljørisikovurdering

Bilag 2. Artikel: Johansen et al., 2019

Miljørisikovurdering

Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber.

GUDP-projekt: "KRISPS. Kartoffler med Resistens og Innovativ Stivelse som Platform for Synergi mellem grøn og økonomisk bæredygtighed."

M5 –D2.: I tilfælde af genetisk modificerede højerestående planter (GMHPer).

1. Persistens og invasionsevne hos GMHPerne, herunder genoverførsel fra plante til plante.

A)

Afklipping af blomster vil effektivt forhindre en risiko for pollenspredning. Risikoen for pollenspredning vurderes som ubetydelig, men afklippingen vil eliminere den teoretiske risiko for spredning.

Der dannes derfor heller ingen frø hvorfor både persistens og invasionsevne betragtes som ubetydelig.

B)

Håndopgravning af knolde vil sikre, at risikoen for overlevende knolde i jorden er ubetydelig. Efterfølgende frost i vinterperioden og sort jord i året efter avl vil effektivt sikre at evt. overlevende knolde fra høst vil overleve og spire året efter.

Efter høst vil jorden blive harvet for at frilægge eventuelle knolde, som ikke er taget op.

1. harvning vil ske kort efter høst således at evt. knolde kan frilægges og fjernes. Den over vinteren vil marken blive harvet efter frostperioder eller mindst 2 gange.

Efter hver harvning vil marken blive kontrolleret for evt. fritlagte knolde, som vil blive destrueret. Året efter udsætningen vil arealet ligge som sort jord med månedlige harvninger (april til september) og overvågning. Arealet vil blive overvåget i min. 4 år eller til der ikke findes spildplanter mere (jf. vejledning fra Landbrugsstyrelsen "Dyrkningsbestemmelser for GM kartofler" marts 2022).

Arealet forventes udlagt med såkaldt blomsterbrak fra 2025 som kan slås og overvåges. Det skal bemærkes, at erfaringer med håndopgravning af kartofler er at der meget sjældent efterlades knolde i jorden.

2. Genoverførsel fra plante til mikroorganismer

Vurderes som værende uden betydning og er ikke kendt i kartoffel.

3. GMHPernes vekselvirkning med målorganismer

Det vurderes ikke at de udsatte planter vil have påvirkning på målorganismer.

4. GMHPernes vekselvirkning med ikke målorganismer

Det vurderes ikke at de udsatte planter vil have påvirkning på ikke - målorganismer

5. Virkningerne af de specifikke dyrknings-, håndterings- og høstteknikker.

Det vurderes, at alt arbejde i forbindelse med lægning og optagning gøres manuelt, sikrer en meget høj grad sikkerhed for at der ikke efterlades knolde og planterester i/på jorden.

Afklipning af blomster i forbindelse med blomstringen i begyndelsen af juli vil garantere, at selv den teoretiske risiko for pollen overførsel er elimineret.

Vi ved fra svenske kollegaer på Sveriges Lantbruks Universitet (SLU) at dette er praktiseret de seneste år ved udsætninger i Skåne.

Transport til og fra mark vil foregå i dobbelt lukkede enheder. Al transport og håndtering vil foregå med de relevante personer, altså ingen eksterne transportører.

De personer som skal foretage de kritiske arbejdsopgaver, transport, lægning, høst og efterkontrol er alle uddannet med GMO - kørekort i 2021 eller 2023, hvorfor alle er opdateret med nyeste viden om emnet.

6. Virkninger på biogeokemiske processer

Den ændrede stivelsessyntese forventes ikke at være relevant eller at have indflydelse på biogeokemiske processer.

7. Virkninger på menneskers og dyrs sundhed

Det vurderes ikke at de udsatte planter vil have virkninger på hverken menneskers eller dyrs sundhed.

Den ændrede egenskab i planten er en mutation, som ville kunne forekomme under naturlige forhold, hvorfor virkningen ikke vurderes som væsentlig.

Erfaringerne fra den traditionelle forædling af kartoffel er, at *når* disse typer mutationer er sket "naturligt", har det ikke haft betydning på hverken mennesker eller dyrs sundhed.

Der findes i dag en kommerciel kartoffelsort med samme egenskaber som dyrkes i Tyskland. Mutationen er her fremkommet via bestråling.

Den kommercielle kartoffelstivelse fra denne sort sælges i hele verden, og der er ikke indmeldt virkninger på hverken mennesker eller dyr.

Langt den største andel af denne stivelse anvendes til human ernæring bl.a. vegetar vingummi, vegetar-ost mm., uden det har givet anledning til indmeldinger om det har påvirket de forbrugere, der har indtaget det.

Hvorvidt selve mutationen med CrisprCAS kan gøre noget andet ved vi ikke 100 %, men det er bl.a. et af formålene med udsætningen.

Stivelsen der udvindes fra disse CrisprCAS knolde vil udelukkende blive anvendt til forskning og udvikling. Resultaterne af dette vil herefter afdække, om der kan være risici for mennesker eller dyr.

OPEN

High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato

Ida Elisabeth Johansen¹, Ying Liu¹, Bodil Jørgensen¹, Eric Paul Bennett², Erik Andreasson³, Kåre L. Nielsen⁴, Andreas Blennow¹ & Bent Larsen Petersen^{1*}

CRISPR/Cas9 editing efficacies in tetraploid potato were highly improved through the use of endogenous potato *U6* promoters. Highly increased editing efficiencies in the Granular Bound Starch Synthase gene at the protoplast level were obtained by replacement of the Arabidopsis *U6* promoter, driving expression of the CRISPR component, with endogenous potato *U6* promoters. This translated at the ex-plant level into 35% full allelic gene editing. Indel Detection Amplicon Analysis was established as an efficient tool for fast assessment of gene editing in complex genomes, such as potato. Together, this warrants significant reduction of laborious cell culturing, ex-plant regeneration and screening procedures of plants with high complexity genomes.

Genome editing provides an efficient route of translating genetic knowledge into improved crop varieties in the field. In contrast to many breeding techniques, CRISPR-Cas genome editing minimizes introduction of undesired mutations¹, which requires backcrossing and/or extensive selection to identify vigorous offspring. This becomes important in outbreeding crops and especially in those with complex genomes, where genome editing enables breeding of desired traits in existing elite cultivars, without compromising existing good agronomic performance². Elite cultivars of tetraploid potato, *Solanum tuberosum*, are known to be extremely genetically diverse with a very high Small Nucleotide Polymorphism (SNP) frequency^{3,4}, and are thus propagated clonally to maintain agronomic traits that are the result of balancing such overwhelming genetic diversity. Many traits can be improved by loss of function alleles, for example generated through CRISPR/Cas9 induction of the Non Homologous End Joining (NHEJ) pathway⁵. The most famous example is mlo-based resistance to powdery mildew^{6,7}.

High efficient CRISPR/Cas9 editing are in many plants complicated by the presence of complex and high ploidy genomes and inefficient or poorly controlled delivery of the CRISPR/Cas9 components to cells with regenerative potential. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) of cells expressing GFP tagged CRISPR/Cas9 is regularly used for enrichment of edited cell populations in mammalian cell systems⁸ and more recently also expanded to plant protoplast cells⁹. The Indel Amplicon Analysis (IDAA)¹⁰ technique allows for fast and direct assessment of insertions/deletions (indels), with a sensitivity down to +/− 1 bp, without the need for in depth Sanger sequencing¹¹. IDAA was recently used for editing scoring of protoplast cell populations⁹, and in the present study the use of IDAA was expanded and adapted to plants with complex genomes, such as potato, where it proved an efficient and fast tool for editing assessment.

Genome editing has been applied to several gene targets in potato albeit with moderate editing frequencies in protoplasts and subsequent regenerated ex-plant shoots. In one study TALENs were targeted to the acetolactate synthase gene resulting in 7–8%, 11–13%, 10% editing at the protoplast, calli, and regenerated shoot/ex-plant levels, respectively; but full allelic edited ex-plants were not obtained¹². In another study an vacuolar invertase gene was targeted by CRISPR/Cas9. Here 18 of 600 shoots displayed editing and 5 (0.8%) had editing in all four alleles¹³. A recent study where the potato granule bound starch synthase (GBSS) gene was targeted by CRISPR/Cas9, showed that replacement of the standard *Arabidopsis thaliana U6-1 (AtU6-1)* promoter, driving expression of the guide RNA, with a endogenous potato *U6* promoter resulted in a doubling in editing frequency from ca. 5%

¹Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, DK-1871, Frederiksberg C, Denmark.

²Copenhagen Center for Glycomics, Departments of Cellular and Molecular Medicine and Odontology, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, DK-2200, Copenhagen N, Denmark. ³Resistance Biology, Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden. ⁴Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Aalborg, Denmark. *email: blp@plen.ku.dk

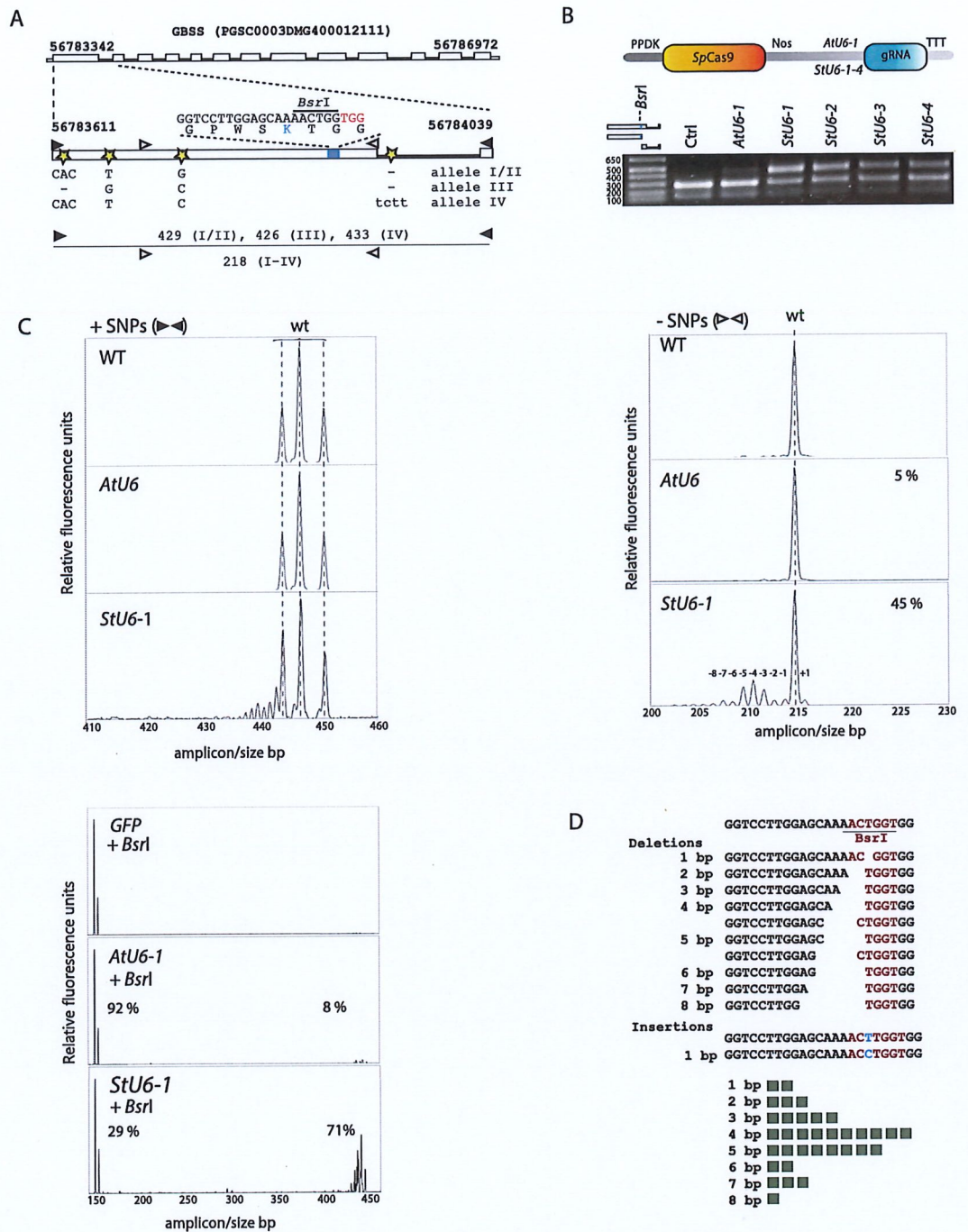


Figure 1. U6 promoter efficacy analysis at the protoplast level. *StU6* promoters were here defined as 350 nt upstream of the transcription start site (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Fig. 2D), and the 257 bp *AtU6-1* promoter of *Arabidopsis thaliana* was obtained from the vector pHBT-pcoCas9²⁷. (A) Structure of the Granular Bound Starch Synthase (GBSS) gene³ with the guide RNA (gRNA1) targeting part of the conserved motif and proposed active site KTGGL²³. gRNA1 includes a diagnostic *BsrI* restriction enzyme site spanning the *SpCas9* cleavage site²⁸, -3 bp upstream of the Photospacer Adjacent Motif (PAM) (red), which upon digestion yields the allele specific fragments: allele III (286, 140), allele I and II (289, 140) and allele IV (289, 144). The outer most primer set includes the SNPs (+SNPs) and gives rise to PCR amplicons of 426 (allele III), 429 (alleles I and II) and 433 bp (allele IV), and the innermost (-SNPs) to a PCR amplicon of 218 bp (all alleles). These length SNPs were conserved between the cultivars Desirée and Wotan. (B) Construct design and *StU6-1-4* versus *AtU6-1* promoter analysis at the cell pool (protoplast) level as evidenced by the presence of indel mediated destruction of the *BsrI* site (*BsrI* resistant band). (C) Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA) chromatograms for the + SNP and -SNP PCR amplicons of WT and *AtU6-1* and *StU6-1* derived indels. + SNP IDAA reveals allele complexity, while -SNP and *BsrI* digested + SNP amplicons permit estimation of editing efficacy. (D) Sequence analysis of 34 individual clones of the *BsrI* resistant band of *StU6-1* (B) isolated and cloned into the pJet vector, confirmed the indel distribution of the IDAA (Fig. 1C, panel: *StU6-1*, -SNP)

also peaking at -4 bp deletions. WT peak positions are indicated by dotted lines. PPK and NOS designate Pyruvate phosphate dikinase promoter and nopaline synthase terminator, respectively. All experiments were done in Desirée, except for panel C (upper right side) and D, which were done in the cultivar Wotan.

to 10% in regenerated ex-plant lines of which 2% displayed full allelic editing¹⁴. The presence of a single wild-type allele was sufficient for conferring significant amounts of the GBSS gene product amylose thus demonstrating that KO of all four alleles is necessary for producing amylopectin (waxy) potato starch devoid of amylose¹⁴. Similarly, the endogenous cotton (*Gossypium hirsutum*) *GhU6.3* promoter also resulted in increased CRISPR/Cas9 editing as compared to the *AtU6-29* promoter in a transient reporter expression system in cotton¹⁵.

In this study, we significantly improved CRISPR/Cas9 editing efficacy by applying endogenous potato *StU6* promoters for driving the CRISPR component of the CRISPR/Cas system, and demonstrate that this optimization has a dramatic effect on editing frequencies at both the protoplast and shoot/ex-plant level.

Results

Retrieval of endogenous U6 promoters and editing analysis at the protoplast level. To identify and retrieve *StU6* promoters, we used sequences described in^{16–18} to search the potato genome. Upstream 5' flanking sequences of the *StU6* promoters were retrieved and used to PCR amplify the promoter regions from the cultivars Desirée and Wotan. Four promoter sequences were identified of which two were hitherto unannotated (*StU6-2* and *StU6-3*) and one (*StU6-4*) displayed size polymorphism (*StU6-4a* and *StU6-4b*). An alignment of the retrieved *U6* promoter sequences displays an overall high heterogeneity with respect to length and composition (Supplementary Fig. 1). The four potato *StU6-1-4* promoters, defined as 350 bp upstream of the *U6* gene start, were cloned to replace the *Arabidopsis thaliana AtU6-1* promoter, thus driving expression of the target GBSS gRNA1 and gRNA2 in constructs also expressing the *SpCas9* enzyme (Fig. 1A, Supplementary Fig. 2). In our initial designs we selected gRNAs targeting exon 1 of GBSS with diagnostic restriction sites for scoring editing. Potato leaf-derived protoplasts were isolated and the CRISPR/Cas9 expressing constructs (Supplementary Fig. 2) were delivered by polyethylene glycol (PEG) transformation as earlier described¹². Indels were initially scored by PCR amplification of the targeted region from pools of protoplasts harvested 24 hrs after transformation followed by restriction enzyme digestion. This revealed a significant increase in editing for the endogenous *StU6-1-4* promoters when compared to the *AtU6-1* promoter as judged by restriction enzyme resistant band intensities (Fig. 1B). The experiment was repeated three times with overall similar results (data not shown). High resolution assessment of indel formation and distribution at the cell pool level was carried out through the use of the Indel Amplicon Analysis (IDAA) technique (Fig. 1C, Supplementary Fig. 3) and analyzed in detail by sequencing (Fig. 1D). When applied on the cultivar Wotan similar increases in editing were observed albeit at lower absolute editing frequencies (Supplementary Fig. 3). We speculate that subtle differences in chromatin structure, such as methylation status or packaging, or other factors between the two cultivars may explain these differences.

We expanded IDAA by restriction enzyme digestion of the IDAA samples, thus separating WT and indel peaks and allowing for direct assessment and quantification of only the indel derived peaks. Peak quantification revealed complete removal of the WT peaks in the Ctrl sample and a ca. 9 fold increase, from 8% to 71%, of edited alleles upon replacement of the *AtU6-1* promoter with the *StU6-1* (Fig. 1C) or *StU6-2* (data not shown) promoter in protoplasts of the cultivar Desirée. The restriction enzyme resistant band of the *StU6-1* experiment (Fig. 1B) was cloned, sequenced and the indels scored, showing a distribution of deletions peaking at -4 bp, a few 1 nt additions (Fig. 1D) as well as large insertions (data not shown). IDAA and sequence analysis were consistent. The same analysis was applied on a second target in exon 1 of GBSS, gRNA2, which also showed higher efficacy using the *StU6* promoters compared to the *AtU6-1* promoter, albeit with GBSS-gRNA2 having lower general editing efficacy (Supplementary Fig. 4). The indel distribution of these two gRNA target sites, i.e. the high prevalence of -4 and -1 deletions, respectively, is in agreement with a recent study, where Cas9 editing of a vast number of gRNAs/targets showed that each gRNA conferred individual cell-line-dependent bias toward particular Cas9 editing outcomes¹⁹. When exon 1 of GBSS was subjected to five selected *in silico* gRNA prediction servers¹⁹, the highly *in vivo* efficient GBSS-gRNA1 (Fig. 1) was ranked highest by the efficiency score in three of the predictors, but with a specificity score ranking it as #23 or #24 of 36 possible gRNAs in the two predictors that allowed off-target assessment (Supplementary Fig. 5). The non-trivial weighting of gRNA efficiency and specificity ranking when selecting gRNA targets may be augmented by unreliable or inadequate genome sequence information. While traditional breeding techniques that use mutagenic chemicals or irradiation result in mutation frequencies of $0.2-5 \times 10^{-320}$, only four off-target mutations could be attributed to CRISPR/Cas9 activity in tetraploid cotton analysed by whole genome sequencing¹. This is less than 1% of the 466 SNPs and 77 indels identified as spontaneous mutations and in agreement with the recently reported none or very low off-target mutation frequencies in mammalian cells²¹.

Ex-plant molecular and phenotypic characterization. Protoplast isolation, transformation, alginate embedment, shoot and ex-plant generation and transfer to soil for phenotypic scoring of starch composition in the tubers is outlined in Supplementary Fig. 6. Twenty three shoots/ex-plants were randomly selected and analyzed and out of these eight (35%) displayed full allelic editing, six appeared to have editing in 1–3 alleles, and nine were un-edited as evidenced by restriction enzyme analysis. Eleven out of the 23 shoots/ex-plants had plasmid derived insertions (Fig. 2B, left panel) and one displayed a dwarfed phenotype (Fig. 2B, right panel, plantlet K8). The high frequency of insertion mutants is in agreement with a recent study in potato, where CRISPR/Cas nucleoproteins were assembled *in vitro*. Here, an unexpected high frequency of insertions of both potato genomic DNA and fragments derived from the plasmid used for *in vitro* transcription of the gRNA was observed²². Molecular and phenotypic analyses of shoots/ex-plants initially selected for further analysis are outlined in Supplementary Fig. 7.

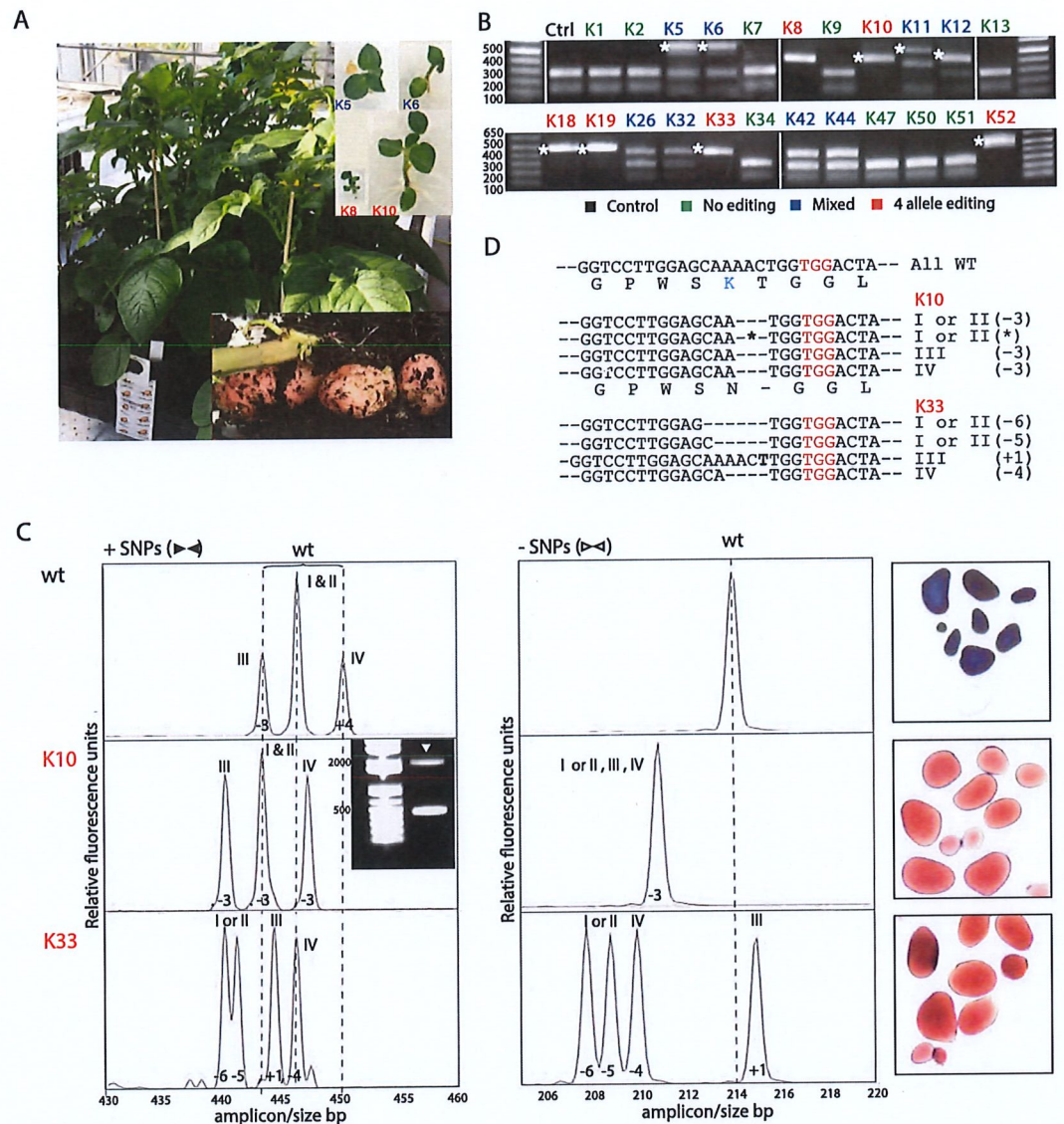


Figure 2. Amylopectin only potato: Geno- and phenotypic analysis of GBSS loss of function ex-plants. (A) Regenerated ex-plants from tissue culture with resulting potato tubers. (B) In total, 23 randomly selected shoots/ex-plants were screened to identify indels using the *BsrI* restriction enzyme digestion. K8, K10, K18, K19, K33 & K52 appeared to have editing in all four alleles (fully *BsrI* resistant), K11, K12, K26, K32 & K42 displayed a mixture of WT type and edited alleles, while K1, K2, K7, K9, K13, K34, K47, K50 & K51 appeared to be unedited. * denotes insertions. K5 and K6 appear at a first glance to be mixed, but sequence analysis revealed that the *BsrI* digestion bands were derived from plasmid insertions comprising the gRNA1 sequence, which reintroduced the *BsrI* site and that K5 and K6 in fact had full allelic editing. (C) WT and the full allelic edited ex-plants, K10 and K33, were corroborated by IDAA of the larger (+SNP) region and the inner smaller (-SNP) region without length SNPs (Fig. 1C). WT peak positions are indicated by dotted lines. Lugol staining was used to analyse tuber starch from greenhouse grown plants (Supplementary Fig. 6). The presence of amylose gives rise to the dark blue colour (WT) tubers, while amylose free/amylopectin only yields the red-brownish color. Additional shoots/ex-plants selected for IDAA analysis of which a subset was propagated to set tubers were also stained with lugol²⁹ (Supplementary Fig. 7). (D) Sequence analysis confirmed that both K10 and K33 were also full allelic edited. K10 had a 3 bp deletion in allele III, IV and in one of the alleles I or II and a 990 bp insertion (denoted ‘*’ left to the sequence, see also arrow on gel insertion (Fig. 2C)) in the other as also evident in the IDAA analysis displaying 1:1:1 ratio of the three chromatographic peaks. K33 had 6 bp and 5 bp deletions in allele I and II, a 4 bp deletion in allele IV and a 1 bp insertion in allele III.

It was previously shown that full allelic knock-out of the GBSS gene is necessary for obtaining amylose-free starch¹⁴. Interestingly, two of the plants with four allele editing and amylose free starch, K10 and K33 (Fig. 2C), displayed three or six nucleotide in frame deletions in three or one allele, respectively (Fig. 2C,D), which resulted in elimination of the K-codon of the proposed ADPG binding site in the KTGGL motif²³. The lack of amylose in K10 and K33 thus confirmed the importance of this amino acid for GBSS activity.

Noteworthy, our initial sequencing based characterization of the target region of the single copy GBSS gene having an expected maximum of four alleles, revealed a seemingly implausible complexity of up to 15 alleles. More detailed analysis, using combinations of different PCR amplifications to increase robustness of the analysis revealed that the observed hyper diversity was likely due to chimera formation caused by priming with incompletely extended PCR products from previous cycles (Supplementary Fig. 8) as has been previously observed for simultaneous amplification of highly homologous templates²⁴.

Discussion

Most agronomic traits are influenced by multiple loci and obtaining individuals harboring the desired alleles at these loci are very unlikely. In hybrid breeding crops, such as most cereals, genetic diversity at important loci is frequently fixed in inbreds that are then combined to provide homogenous and vigorous offspring thus blocking further breeding improvement. Outbreeding crops, such as tetraploid potato, harbor numerous allelic variants at important loci and agronomic performance of single individuals, propagated as clones (seed potato), is the result of a complex balance of alleles at a multitude of loci, which is perturbed by further crossing. In both instances, crop development may be accelerated by targeted genetic mutations in already existing elite varieties²⁵ using genome editing technology, such as CRISPR/Cas9. In outbreeding crops, the opportunity for altering specific traits in existing elite cultivars holds the promise of increasing performance of specific traits, without compromising good agronomic performance. Potato is tetraploid and elite germplasms are extremely genetically diverse with observed SNP frequency between two individuals of 1 per 29 bp³. Thus, genome editing is particularly attractive in potato where good agronomic performance is the result of balancing such overwhelming genetic diversity.

In the present study, we devised schemes for efficient editing and editing assessment of high ploidy complex genomes, here in potato, which are characterised by a high SNP prevalence between alleles but also between different cultivars.

We performed a survey for assessing the endogenous U6 promotor repertoire in potato and retrieved both published and hitherto unpublished potato U6 promotor sequences, and assessed their conferred editing performance in protoplasts as a first readout. Replacement of the regularly used Arabidopsis *AtU6-1* promotor with endogenous potato *StU6* promoters resulted in a dramatic increased editing efficiency of the target GBSS gene. Editing frequencies of 30–70% in protoplasts, corresponding to an up to a ca. 9 fold increased editing, were obtained as evidenced by IDAA. Theoretically 50% editing in protoplasts would translate into 6.25% (0.5⁴) ex-plants with full allelic editing. However, in agreement with earlier CRISPR/Cas editing in potato^{13,14}, we observed full allelic editing in 35% of the ex-plants/shoots analysed, thus suggesting that in transformed protoplasts there is an increased likelihood that multiple alleles will undergo editing.

Our implementation of the IDAA technique permits fast and high throughput assessment of editing in organisms with high ploidy and complex genomes, such as potato, as evidenced here where all peak positions of the WT chromatogram were shifted in full allelic knock out of explants (Fig. 2). Editing may be scored at both the protoplast and ex-plant level, without the need for comprehensive sequence analysis, which, however, is still needed for full characterization at the ex-plant level.

Somaclonal variation has been reported to be a concern in relation to ex-plant regeneration from callus/shoots, including potato²⁶. The present study did not include a comprehensive survey in regard hereto, but the regenerated first generation ex-plants displayed vigorous growth *in vitro* when scored ca 2 month after first visible shoot formation and later in pots in the greenhouse (Fig. 2A). Both the full allele GBSS edited ex-plants, such as K10 and K33, and un-edited GBSS but regenerated plants, such as K34, for example, displayed the same vigorous growth under the growth and culturing conditions applied here. One ex-plant, K8 (depicted in insert to Fig. 2A), displayed a major growth phenotype, but further genotyping of this ex-plant was not pursued. Although somaclonal/phenotypic variation was generally not encountered in the present limited explant material, additional explant lines and propagation generations are needed for proper assessment of the extent of genetic as well as non-genetic derived somaclonal/phenotypic variation.

In conclusion, this study demonstrates that *i*) use of endogenous U6 promoters has an great impact on editing efficiencies, *ii*) in complex tetraploids an exhaustive molecular characterization of WT alleles is required to avoid SNP's at gRNA targets and recombinant PCR derived erroneous allele assignment, *iii*) plasmid derived insertions were prevalent prompting for the use of purified DNA free nucleoprotein (RNP) to at least reduce the insertion prevalence, and *iv*) IDAA provides a simple qualitative and quantitative means of editing analysis at the cell pool and ex-plant level in the complex potato genome. The obtained highly improved editing efficacy may significantly reduce downstream cell culturing and ex-plant re-generation in particular where full allelic and heritable transmitted gene editing is desired.

Methods

Methods and any associated references are available in the online version of the paper. Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

Online methods. *Plant material.* Sterile *in vitro* grown plantlets of Desirée and Wotan were obtained from Vitroform (Årsløv, Denmark) and propagated in a Fitotron growth cabinet with 16/8 h, 24 °C/20 °C, 70% humidity, at 65 μE light intensity as described in¹². Regenerated plants were transferred to soil by rooting on peat under a white plastic cover. After rooting, plants were transferred to 25 cm pots and grown in the greenhouse to set tubers.

StU6 promoter sequence and cloning. *StU6* promoter sequences were retrieved by BLAST searches in the reference genome (DM1–3 516 R44)³ with the sequences Z17290, Z17292, Z17293, Z17301 from the cultivar Record¹⁸ as baits. Z17290, Z17292, Z17293 and Z17301 were mapped to the reference genome using CLC Genomics Workbench (Qiagen). 5' flanking sequences AGCAAGATGCAATGTATCAACTCA (Z17290),

ACCACTTAAACTGAGAACAGTCAA (Z17292), TTCACTTAGTTCAGTTGCATTATGTC (Z17293), GATAAATCTTAAAGTTGAGTAACC (Z17301) were used to amplify and sequence *U6* upstream regions from cultivars Desirée and Wotan of 421 bp (Z17290), 433 bp (Z17292), 372 bp (Z17293) and 374 bp, 321 bp and 318 bp (Z17301) using the common RV primer GCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG that anneals to nt 33–55 of the *U6* sequence. These sequences were used to define *StU6-1* (Z17290), *StU6-2* (Z17292), *StU6-3* (Z17293) and *StU6-4*, *StU6-4a* and *StU6-4b* (Z17301), which were cloned to drive the gRNA expression using Nebuilder assisted Gibson assembly (Supplementary Fig. 2C).

In silico prediction analysis of GBSS-gRNA1 and 2 targets. Exon 1 of GBSS, which includes 36 potential gRNA targets, was used as input for evaluation of the ranking of gRNA1 and gRNA2. The *in silico* assisted gRNA selection tools³⁰ amenable for plants and included in the survey were CHOPCHOP v2 (<http://chopchop.cbu.uib.no/>)³¹, CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>)³², SSC (<http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/>)³³, CRISPRater (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>)^{34,35}, and CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>)³⁶.

Protoplast isolation, transformation, editing, ex-plant regeneration. Protoplast isolation, transformation, editing and ex-plant regeneration were essentially done as described in¹².

DNA extraction. Plant gDNA template for PCR and IDAA was purified with GenElute Plant genomic DNA miniprep kit from Sigma and quantified using nanodrop. gDNA from harvested protoplasts was obtained by suspending the cells in H₂O, snap freezing in liquid nitrogen followed incubation at 96 °C for 15'.

Genotyping. To characterize the target region, different combinations of FW primers ttagaccacacatcacATG, ttagaccacacatcacATGG, GCAAGCATCACAGCTTCACACC, AGCATCACAGCTTCACACCACT and, + SNP FW, and RV primers atcatttagGCCCCGCGACA, AAACGTGGGGTTGATCGTGT, ATGGCCCCAAAGCTGGACTAG and + SNP RV, were used for PCR amplification with CloneAmp™ HiFi PCR Premix (Clontech) in total reaction volumes of 25 µl with 0.25 µM primers and 0.4–0.8 ng/µl gDNA according to the manufacturers recommendations with the PCR parameters of 35 cycles: 98 °C 10", 64 °C 15", 72 °C (60" per 1000 bases, extension). In the attempts to reduce PCR derived chimeras, extension time was doubled and the primer concentration increased twofold. For genotyping of edited plants and protoplasts, the edited region was amplified with + SNP FW and + SNP RV. Gel purified PCR products were cloned using the CloneJet PCR cloning Kit (Thermo Scientific), sequenced by Sanger sequencing at Macrogen and analyzed on the CLC Main Workbench.

Screening by Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA). Tri-primer PCR amplicons for IDAA¹⁰ were obtained using the primers + SNP FW, IDAA + SNP RV and Fluorescein Amidite (FAM) labelled FAME, while primers – SNP FW and FAM-labelled –SNP RV were used for di-primer PCR. PCR reactions of 25 µl using CloneAmp™ HiFi PCR Premix (Clontech) with 0.25 µM primers except IDAA + SNP RV at 0.025 µM on a template of 0.4–0.8 ng/µl gDNA or 2.5 µl protoplast cell pool suspension were run with PCR parameters: 98 °C 10", 64 °C 15", 72 °C (60" per 1000 bases, extension) 35 cycles for gDNA, 40 cycles for protoplast suspensions. The PCR product was analysed on a 3500xL Genetic analyzer (Applied Biosystems) as previously described¹⁰.

Phenotypic analysis. Lugol staining was done as described in²⁹.

Received: 28 March 2019; Accepted: 29 August 2019;

Published online: 27 November 2019

References

- Li, J. *et al.* Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J* (2018).
- Nadakuduti, S. S., Buell, C. R., Voytas, D. F., Starker, C. G. & Douches, D. S. Genome Editing for Crop Improvement - Applications in Clonally Propagated Polyploids With a Focus on Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Front Plant Sci* 9, 1607 (2018).
- Potato Genome Sequencing, C. *et al.* Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475, 189–195 (2011).
- D'Hoop B, B. *et al.* Identification of agronomically important QTL in tetraploid potato cultivars using a marker-trait association analysis. *Theor Appl Genet* 127, 731–748 (2014).
- Puchta, H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* 56, 1–14 (2005).
- Wang, Y. *et al.* Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 32, 947–951 (2014).
- Kusch, S. & Panstruga, R. mlo-Based Resistance: An Apparently Universal "Weapon" to Defeat Powdery Mildew Disease. *Mol Plant Microbe Interact* 30, 179–189 (2017).
- Lonowski, L. A. *et al.* Genome editing using FACS enrichment of nuclease-expressing cells and indel detection by amplicon analysis. *Nat Protoc* 12, 581–603 (2017).
- Petersen, B. L. *et al.* Improved CRISPR/Cas9 gene editing by fluorescence activated cell sorting of green fluorescence protein tagged protoplasts. *BMC Biotechnol* 19, 36 (2019).
- Yang, Z. *et al.* Fast and sensitive detection of indels induced by precise gene targeting. *Nucleic Acids Res.* 43, 8 (2015).
- Yang, Z. *et al.* Fast and sensitive detection of indels induced by precise gene targeting. *Nucleic Acids Res* 43, e59 (2015).
- Nicolia, A. *et al.* Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *J Biotechnol* 204, 17–24 (2015).
- Clasen, B. M. *et al.* Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J* 14, 169–176 (2016).
- Andersson, M. *et al.* Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep* 36, 117–128 (2017).
- Long, L. *et al.* Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression. *Plant Methods* 14, 85 (2018).

16. Wang, S. *et al.* Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep* **34**, 1473–1476 (2015).
17. Hu, Y. Q., Brown, J. W., Waugh, R. & Turner, P. C. Cloning and characterisation of a U6 small nuclear RNA gene from potato. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 90–92 (1991).
18. Guerineau, F. & Waugh, R. The U6 small nuclear RNA gene family of potato. *Plant Mol Biol* **22**, 807–818 (1993).
19. Allen, F. *et al.* Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat Biotechnol* (2018).
20. Koornneef, M., Dellaert, L. W. & van der Veen, J. H. EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutat Res* **93**, 109–123 (1982).
21. Wang, S. *et al.* No off-target mutations in functional genome regions of a CRISPR/Cas9-generated monkey model of muscular dystrophy. *The Journal of biological chemistry* **293**, 11654–11658 (2018).
22. Andersson, M. *et al.* Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol Plant* **164**, 378–384 (2018).
23. Ainsworth, C., Clark, J. & Balsdon, J. Expression, organisation and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Mol Biol* **22**, 67–82 (1993).
24. Smyth, R. P. *et al.* Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene* **469**, 45–51 (2010).
25. Gao, C. The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 275–276 (2018).
26. Barrell, P. J., Meiyalaghan, S., Jacobs, J. M. & Conner, A. J. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. *Plant Biotechnol J* **11**, 907–920 (2013).
27. Li, J. F. *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* **31**, 688–691 (2013).
28. Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**, 935–949 (2014).
29. Heilersig, H. J., Loonen, A., Bergervoet, M., Wolters, A. M. & Visser, R. G. Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. *Plant Mol Biol* **60**, 647–662 (2006).
30. Chuai, G. H., Wang, Q. L. & Liu, Q. In Silico Meets In Vivo: Towards Computational CRISPR-Based sgRNA Design. *Trends Biotechnol* **35**, 12–21 (2017).
31. Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B. & Valen, E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res* **44**, W272–276 (2016).
32. Liu, H. *et al.* CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol Plant* **10**, 530–532 (2017).
33. Xu, H. *et al.* Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res* **25**, 1147–1157 (2015).
34. Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J. & Mateo, J. L. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* **10**, e0124633 (2015).
35. Labuhn, M. *et al.* Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Res* **46**, 1375–1385 (2018).
36. Prykhodzij, S. V., Rajan, V., Gaston, D. & Berman, J. N. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences. *PLoS One* **10**, e0119372 (2015).

Acknowledgements

This work was supported by Kartoffelafgiftsfonden, The Danish Councils for Strategic and Independent Research (12–125709, 12–131859), The Danish National Research Foundation (DNRF107), the Copenhagen University Excellence Program for Interdisciplinary Research (CDO2016) and National Science Foundation (NSF) (1755482).

Author contributions

I.E.J., B.L.P. and E.A. designed the experiments; K.L.N. performed U6 sequence retrieval and associated analysis, I.E.J. performed the experiments and Y.L. IDAA analysis; B.J. advised on potato tissue culture work; A.B. advised on starch analyses; E.P.B. advised on IDAA analysis. B.L.P., I.E.J., K.L. and A.B. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

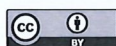
Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.L.P.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

Natur og miljømæssig risikovurdering af stivelsesmodificeret CRISPR-CAS kartoffel Wotan

Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug

Morten Strandberg & Bodil Ehlers

Institut for Ecoscience, Aarhus Universitet



AARHUS
UNIVERSITET

DCA - NATIONALT CENTER FOR FØDEVARER OG JORDBRUG



Datablad

Titel:	Natur og miljømæssig risikovurdering af stivelsesmodificeret CRISPR-CAS kartoffel Wotan.
Forfattere:	Seniorrådgiver Morten Strandberg og seniorforsker Bodil Ehlers, Institut for Ecoscience, AU
Fagfællebedømmelse:	Professor Christian F. Damgaard, Institut for Ecoscience, AU
Kvalitetssikring, DCA:	Specialkonsulent Johanna Höglund, DCA Centerenheden, AU
Rekvirent:	Landbrugsstyrelsen, Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri (FVM)
Dato for bestilling/levering:	08.02.2023 / 11.04.2023
Journalnummer:	2023-0490796
Finansiering:	Besvarelsen er udarbejdet efter kontrakt indgået pr marts 2023 mellem Aarhus Universitet og Landbrugsstyrelsen "Kontrakt om ansøgning vedr. forsøgsudsætning, GMO" (gengivet fra kontrakt).
Ekstern kommentering:	Nej
Eksterne bidrag:	Nej
Kommentarer til besvarelse:	Yderligere har Akademisk medarbejder Inger Holme, Professor Henrik Brinch-Pedersen og Tenure Track adjunkt Claus Krogh Madsen, Institut for Agroøkologi, AU bidraget med rådgivning til den bestilte opgave.
Citeres som:	Strandberg, M. Ehlers B. Natur og miljømæssig risikovurdering af stivelsesmodificeret CRISPR-CAS kartoffel Wotan. 7 sider. Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet, leveret: 11.04.2023
Rådgivning fra DCA:	Læs mere på https://dca.au.dk/raadgivning/

Bestillingen

Landbrugsstyrelsen har modtaget to ansøgninger om godkendelse af forsøgsudsætning af genmodificerede kartofler, jf. vedlagte filer til bestillingen. Inden styrelsen træffer afgørelse, bedes AU om en vurdering af ansøgningen. Det gælder en vurdering af ansøgningen i forhold til udsætningsdirektivet (2001/18/EF) art. 6 og bilag IIIB samt en miljømæssig risikovurdering af den foreslåede forsøgsudsætning.

Landbrugsstyrelsen beder om en miljømæssig risikovurdering af den ansøgte forsøgsudsætning, jf. udsætningsdirektivet. Risikovurderingen skal tage udgangspunkt i det vedlagte materiale fra ansøgeren, herunder ansøgers egen miljørisikovurdering. Risikovurderingen skal identificere mulige uønskede effekter af den genetisk modificerede plante, som forsøgsudsætningen kan medføre, og sandsynligheden for, at de indtræffer. Det bør også vurderes, om ansøgers foreslåede risikohåndtering er fyldestgørende.

Baggrund

Ansøgningen er indsendt af Københavns Universitet og KMC Amba (KMC, 2023a) og gælder forsøgsudsætning af stivelsesmodificeret kartoffel med sortsnavnet Wotan. Formålet med ansøgningen er dels at, teste den CrisprCAS modificerede kartoffels sammensætning af amylopektin og amylose med henblik på at erstatte kemisk modificeret stivelse, dels at, teste om de ændrede stivelsesegenskaber er konstante ved dyrkning på friland. Ansøger oplyser at kartoflerne vil blive optaget med hånden, og i følge ansøger medfører det at meget få kartofler efterlades i jorden. Dette er oplyst uden referencer og er ikke kvantificeret. Ligeledes oplyses at en vinter med vekslende tøj og frost medfører at efterladte knolde fryser ihjel. Dette er også oplyst uden referencer og er ikke kvantificeret i forhold til temperatur og overlevelsesgrad. I risikovurderingen nedenfor er det derfor antaget at Wotan-kartoffelen overlever og spredes som andre kartofler. Derfor udgør ansøgers ikke-refererede og ikke kvantitative oplysninger ikke en hindring for at gennemføre risikovurderingen.

Bortset fra frøafgrøderne korn og raps er kartofler med et dyrket areal på ca. 62800 ha blandt de mest dyrkede afgrøder i Danmark (Miljøstyrelsen 2022; FAOSTAT 2020). Det gennemsnitlige udbytte på tværs af alle kartoffeltyper udgør under danske forhold ca. 44 t/ha. Stivelseskartofler udgjorde i 2020 knap $\frac{3}{4}$ af arealet med kartofler. Samtidig er kartofler med et belastningsindeks på 18,2 BI/ha den danske afgrøde med den højeste pesticidbelastning (Miljøstyrelsen 2022). Stivelseskartofler udgør samtidig en stigende andel af det samlede kartoffelareal og har også et højere BI/ha end de øvrige kartoffeltyper (Miljøstyrelsen 2022).

Transgen kartoffelansøgning

En transgen stivelsesmodificeret og kanamycinresistent kartoffel EH92-527-1 blev godkendt til dyrkning og markedsføring i EU i 2010. Producenten BASF valgte efter et par år at trække den fra det europæiske marked. Efterfølgende blev dyrkningstilladelsen trukket tilbage af de europæiske myndigheder (Reuters 2013). EFSA's GMO-panel vurderede i 2012, at der ikke kunne forventes andre effekter på natur og miljø af den transgene kartoffel EH92-527-1 end dem der forekommer ved anden kartoffeldyrkning (EFSA 2012).

Risikovurdering

AU's natur og miljømæssige risikovurdering omfatter følgende punkter, som alle har til formål at identificere uønskede effekter af forsøgsudsætningen. Det vurderes endvidere om ansøgers risikohåndtering er fyldestgørende for at undgå uønskede effekter på natur og miljø. Vurderingen er gældende for den ansøgte forsøgsudsætning.

1. risiko for spredning af den Crispr-Cas modificerede kartoffel, Wotan til omgivelserne
2. risiko for spredning af den Crispr-Cas modificerede kartoffel, Wotan til naturen
3. risiko for spredning af det modificerede gen fra Wotan kartofflen til vilde slægtninge i Europa
4. risiko for miljø og natur i forbindelse spredning af det modificerede gen fra Wotan kartofflen til dyrkede konventionelt forædlede kartofler.
5. risiko for effekter på naturen
6. risiko for effekter på miljøet i øvrigt
7. behov for overvågning
8. Vurdering af om ansøgers risikohåndtering er fyldestgørende

1. Kartofler *Solanum tuberosum* kan afhængigt af varighed og hårdhed af vinterens kuldegrader i varierende omfang overleve mange danske vintre (Kudsk 2012), hvilket ses som spirende kartofler i efterfølgende afgrøder. Selv fem år efter sidste kartoffelafgrøde kan der forekomme kartofler i efterfølgende afgrøder (Schnipper 2019). Noget lignende gælder sandsynligvis også den Crispr-Cas modificerede kartoffel Wotan. Der er således en stor sandsynlighed for at der vil forekomme overlevende Crispr-Cas-kartofler på det pågældende forsøgsareal året efter dyrkningen. Sandsynligheden for at de modificerede kartofler vil kunne sprede sig fra forsøgsudsætningen og optræde invasivt i omgivelserne, vurderes at være negligerbar. Dette svarer til en tilsvarende dyrkning af ikke modificerede kartofler, som ikke anses for at kunne etablere sig varigt i omgivelserne under danske forhold (Simon et al 2010; Hartvig 2015). Ansøgningen om forsøgsudsætning indeholder ikke oplysninger om den modificerede kartoffels hårdførhed over for frost, hvilket foreslås undersøgt i forbindelse med forsøgsudsætningen og opfølgningen på den. Eventuel vinteroverlevelse på markfladen og dens næromgivelser forventes kun at medføre negligerbare effekter på natur og miljø. Den dermed forbundne risiko for natur og miljø forventes derfor at være negligerbar sammenlignet med dyrkning af tilsvarende konventionelle kartofler.

2. Der er ikke fundet oplysninger om permanente selvreproducerende forekomster af kartoffelplanter i den danske natur, men kartoffelplanter er fundet flere steder som følge af tilfældig spredning fra spildkartofler efter tidligere dyrkning. I Atlas Flora Danica perioden som forløb fra 1992 til 2015 blev kartoffel således fundet i 647 kvadrater, svarende til 49% af de undersøgte kvadrater (Hartvig 2015). Her blev den især fundet i vejkanter, markkanter, jordbunker, tangvolde og strandbredder mv., hvor den kan forekomme i en årrække efter at den er blevet spredt (Hartvig 2015). Ifølge Hartvig (2015) sker spredningen eksempelvis ved tab i forbindelse med transport og bortskaffelse af haveaffald. Uden for sit oprindelsesområde i Bolivia og Peru anses kartoffel nogle steder som et problematisk ukrudt. Dette gælder lande som USA, Australien, Indonesien, Tyrkiet, Sydafrika, Stillehavsøer m.fl. (CABI 2014). Der opfordres i flere af disse områder til at det ved dyrkning sikres at spredning til omgivelserne undgås (CABI 2014).

3. I Danmark og Europa udgøres de nærmeste vilde slægtninge til kartoffel *Solanum tuberosum*, af arter i slægten Natskygge *Solanum*, som kartoffel også tilhører. Der er ifølge Flora Europaea 14 arter der tilhører denne slægt i Europa (Tutin et al. 1972). I Danmark er følgende to hovedarter af slægten naturligt forekommende; sort natskygge og bittersød natskygge. Hartvig (2015) nævner derudover nogle underarter af bittersød natskygge. Nogle af de europæiske arter er også fundet indslæbt i Danmark (Hansen 1984; Hartvig 2015). Krydsninger mellem kartoffel og de europæiske natskyggearter forekommer ikke i naturen, men der er ved menneskets mellemkomst lavet hybrider mellem sort natskygge og kartoffel (Eijlander & Stiekema 1994). Dette foregik ved at fjerne støvdragerne hos sort natskygge og derefter bestøve den med kartoffelpollen. Forsøget medførte frø der kunne spire, men de hybridplanter der kom ud af det var sterile. Ydermere fandt McPartlan og Dale (1994) i et forsøg, hvor planterne stod nær hinanden, ingen genspredning fra kartoffel til sort natskygge og bittersød natskygge. I praksis må kartoffel betragtes som en art, der ikke kan krydse med vilde europæiske arter af Natskygge *Solanum*, og selv hvis dette skulle ske, vil hændelsen kun resultere i sterilt afkom. Risikoen for natur og miljø forbundet med sådan spredning af den stivelsesmodificerede kartoffel vurderes på den baggrund at være negligerbar.

4. Spredning af gener fra Wotan kartofler til konventionelle dyrkede kartofler kan ske ved spredning af pollen. Pollenspredning fra kartoffel kan ske ved insekters pollenindsamling, dog spiller honningbier ingen rolle i spredningen af kartoffelpollen (Enkegaard & Kryger 2012). Nogle arter af humlebier er derimod effektive fremmedbestøvere af kartofler (Batra 1993). Forsøg med kanamycinresistente kartofler har vist at hybridisering mellem kartofler af samme sort aftager meget hurtigt med afstanden mellem planterne. McPartlan og Dale (1994) fandt således, at nærtstående planter havde en hybridiseringsrate på 24%, mens der ved en afstand på 10 m var en hybridiseringsrate på 0,017%. Hvis afstanden var 20 m, blev der ikke fundet hybridfrø. Sandsynligheden for at der i forbindelse med forsøgsudsætningerne sker genspredning fra Wotan-kartoflerne til andre kartofler er derfor ekstremt lav, når det tages i betragtning at blomsterne fjernes i forsøgsudsætningen. Da der samtidig ikke forventes andet end negligerbare effekter for natur og miljø af sådan pollenspredning, vurderes risikoen for natur og miljø forbundet med genspredning fra Wotan-kartofler til dyrkede kartofler at være negligerbar.

5. Påvirkningen af naturindholdet på markfladen forventes ikke at adskille sig fra den påvirkning der finder sted ved anden dyrkning af konventionelle kartofler. Risikoen for forøgede effekter på markfladens natur som følge af dyrkning af den stivelsesmodificerede kartoffel Wotan vurderes derfor at være negligerbar. Sandsynligheden for at Wotan kartoflerne spredes til naturen i forbindelse med forsøgsudsætningen og etablerer sig der, vurderes at være negligerbar. Forekomsten af genspredning til vilde slægtninge forekommer i praksis ikke. Effekterne på arter og natur af en sådan spredning vurderes endvidere at være negligerbare. Risikoen for effekter på naturen forventes derfor også at være negligerbar.

6. Sandsynligheden for effekter på miljøet i øvrigt som følge af forsøgsudsætningen forventes ikke at adskille sig betydende fra dyrkning af konventionelle stivelseskartofler på et tilsvarende areal. Risikoen for miljøet forventes derfor heller ikke at adskille sig fra den risiko for miljøet der er forbundet med dyrkning af konventionelle kartofler, og risikoen for en forøget miljøpåvirkning vurderes derfor at være negligerbar.

7. Behovet for overvågning i forbindelse med forsøgsudsætningen som det er foreslået af ansøger vurderes at være tilstrækkeligt. Den foreslåede efterbehandling året efter forsøget efterlader en lille sandsynlighed for at enkelte stivelsesmodificerede kartofler overlever på arealet ud over det første år. Det vurderes at disse lige som overlevende konventionelle kartofler vil forsvinde i løbet af en kort årrække. Dog bør der ikke på arealet produceres læggekartofler eller andre kartofler i en årrække efter forsøgsudsætningens afslutning. Det formodes at dette under alle omstændigheder vil blive undgået for at undgå spredning af kartoffelsygdomme.

Såfremt en eventuel efterfølgende markedsføringsansøgning skal ske i henhold til EU's Udsætningsdirektiv 2001/18/EC vil der kunne forekomme krav til beskrivelse af en general overvågning, fx indsamling af oplysninger om arter der interagerer med kartofler, fx jordbundsorganismer, herbivorer og pollinatorer.

8. Det vurderes at ansøgers tiltag til at undgå at oversete kartoffelknolde er tilstrækkelige i forhold til at minimere sandsynligheden for mulige uønskede effekter på natur og miljø. Dette skyldes primært at sandligheden for at overlevende knolde vil medføre uønskede effekter på natur og miljø som adskiller sig fra effekter af konventionelle kartofler vurderes at være negligerbar.

Konklusion

Ud over den miljømæssige påvirkning der i form af pesticidanvendelse og intensiv jordbehandling sker ved konventionel kartoffeldyrkning, er der alene identificeret negligerbare risici for natur og miljø forbundet med den ansøgte forsøgsudsætning.

I forbindelse med den specifikke forsøgsudsætning vurderes de af ansøger foreslåede tiltag for at hindre spredning af materiale fra Wotan-kartofflen, at sikre en meget lille sandsynlighed for at der sker spredning til omgivelserne.

Uden at det er et krav til forsøgsudsætningen, endsige noget der påvirker konklusionen af risikovurderingen, foreslås det at den modificerede kartoffels kuldetolerance sammenlignet med tilsvarende ikke modificerede kartoffelsorter undersøges. Spørgsmålet om den modificerede kartoffels mulige ændrede kuldetolerance vil sandsynligvis opstå i forbindelse med en eventuel ansøgning om markedsføring.

Referencer

- Batra, SWT. 1993. Male-fertile Potato Flowers are Selectively Buzz-Pollinated only by *Bombus terrestris* Kirby in Upstate New York. *Journal of the Kansas Entomological Society* 66(2), 252-254.
- CABI 2014 *Solanum tuberosum* (potato) www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.50561
- EFSA 2012. Scientific Opinion on a request from the European Commission for the assessment of the scientific elements put forward by Luxembourg to support the prohibition for the placing on the market of GM potato EH92-527-1 for cultivation purposes in Luxembourg. *EFSA Journal* 10(9), 2874. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2012.2874>
- Eijlander, R. Stiekema, WJ. 1994. Biological containment of potato (*Solanum tuberosum*): outcrossing to the related wild species black nightshade (*Solanum nigrum*) and bittersweet (*Solanum dulcamara*). *Sex Plant Reprod* 7, 29-40.
- Enkegaard, A. Kryger, P. 2012. Honningbier og genmodificerede planter. *DJF Markbrug* 141, 33 s
- FAOSTAT 2020. <https://www.potatonewstoday.com/2022/03/28/fao-updates-global-potato-statistics/>
- Hansen, K. 1984. *Dansk feltflora*. Gyldendal.
- Hartvig, P. 2015. *Atlas Flora Danica*. Gyldendal, København.
- KMC 2023a. Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber. KMC Amba, Herning. 8 s.
- Kudsk, P. 2012. Notat vedrørende udarbejdelse af bekæmpelsesstrategi over for overvintrende genmodificerede kartofler. DCA notat.
- McPartlan, HC. Dale, PJ. 1994. An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. *Transgenic Research* 3, 216-225.
- Miljøstyrelsen 2022. Bekæmpelsesmiddelstatistik 2020, Behandlingshyppighed og pesticidbelastning baseret på salg og forbrug. Orientering fra Miljøstyrelsen nr. 54.
- Reuters 2013. <https://www.reuters.com/article/eu-gmo-potato-idUSL6N0JS1TH20131213>
- Schnipper, SO. 2019. Spildkartofler, pigæbler og andre ukrudtsudfordringer! <https://www.bj-agro.dk/media/1447/bj-agro-kartoffeldag-indlaeg-sos-uoensket-plantvaekst-feb2019.pdf>
- Simon, R. Xie, CH. Clausen, A. Jansky, SH. Halterman, D. Conner, T. Knapp, S. Brundage, J. Symon, D. Spooner, D. 2010. Wild and Cultivated Potato (*Solanum sect. Petota*) Escaped and Persistent Outside of its Natural Range. *Invasive Plant Science and Management* 3, 286–293.
- Tutin, TG. Heywood, VH. Burges, NA. Moore, DM. Valentine, DH. Walters, SM. Webb, DA. 1972. *Flora Europaea* Vol 3. Cambridge University Press.

Landbrugsstyrelsen
Nyropsgade 30
1780 København V
Att. Lars Landbo / Morten Storgaard

Dato: 23-03-2023
J.nr. 23/1004331
JP/KMC - Starch DTU-2.docx

I forbindelse med at vi fra Landbrugsstyrelsen har modtaget to ansøgninger til forsøgsudsætning fra KMC har DTU, Fødevareinstituttet foretaget en vurdering af risikoen. De to ansøgninger vedrører kartofler og er med mange lighedspunkter omkring indeslutningen. Sagerne har vi valgt at behandle hver for sig trods ligheder.

I kontrakten mellem LBST og DTU Fødevareinstituttet er beskrevet to opgaver hvor dette svar er relateret til den anden opgave hvor Landbrugsstyrelsen har bedt om følgende:

*Sundhedsmæssige risikovurdering af den foreslåede forsøgsudsætning (jf. udsætningsdirektivet), herunder en vurdering af de introducerede genetiske ændringer af de to kartoffelsorter
Risikovurderingen skal tage udgangspunkt i det vedlagte materiale fra ansøgeren, herunder ansøgers egen vurdering af virkningen på mennesker og dyrs sundhed.*

Nedenstående vedrører kartoflerne med ændret stivelses-egenskaber¹.

Kort beskrivelse af projektet.

Der ansøges om forsøgsudsætning af genetisk modificeret kartoffel ”Waxy Wotan” linje K33 med ændringer i syntesevejen for stivelse.

Formålet med den genetiske ændring er at ændre forholdet i sammensætningen af amylopektin og amylose med henblik på at erstatte kemisk modificeret stivelse.

Formålet med den eksperimentelle udsætning er at undersøge hvorvidt ændringen i stivelsessammensætningen er konstant under markforhold.

Dyrkningen vil finde sted fra maj til høst i september 2023 og ligger i et konventionelt dansk landbrugsareal. Området for dyrkningen er sat til 380 m².

Kartoffelplanterne vil bestå af en linje baseret på sorten Wotan og dyrkningen vil foregå ved lægning af knolde på arealet.

¹ ”Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber.”

Konstruktion

Ansøger beskriver at de har anvendt en CrisprCAS teknologi til at foretage målrettede mutationer i kartoflerne. Målet for mutation er genet GBSS (granule bound starch synthase) hvor en inaktivering af alle allelerne i kartoffel kan bevirke en kraftig nedsættelse/hindring af amylose dannelsen. Ansøger angiver, at den anvendte metode for ændringerne er som beskrevet i artiklen fra Johansen et al (2019) med den modifikation, at de har anvendt Crispr/Cas i form af et DNA-frit kompleks som benævnes RiboNucleoProtein (RNP). Metoden er beskrevet i en artikel (Carlsen et. al. 2022) som ansøger henviser til.

Det er vurderingen fra DTU, Fødevareinstituttet at den anvendte metode til indførelse af målrettede mutationer kan anvendes meget præcist og mindsker eller udelukker indsættelse af ”fremmed DNA” i kartoflerne. Det kan ikke udelukkes, at der under gensplejsningen er sket utilsigtede mutationer andre steder i genomet, men det må anses for at udgøre en ubetydelig risiko set i relation til traditionel forædling.

Ansøger beskriver en metode til kaldet IDAA (PCR Indel Detection Amplicon Analysis) som kan anvendes til påvisning af mutationerne og identifikation af kartoflerne. Alle fire alleler af GBSS er muteret og er inaktive.

Den udvalgte linje Waxy Wotan K33 er nærmere undersøgt og vist ikke indeholder indsatte sekvenser fra det anvendte plasmid.

DTU, Fødevareinstituttet anser beskrivelsen af gensplejsningen for tilstrækkeligt til, at der kan foretages en risikovurdering af planterne der skal udsættes. DTU, Fødevareinstituttet vurderer ikke at de tilsigtede mutationer vil ændre på kartoflernes sundhedsmæssige status.

Indeslutning:

Den **biologiske indeslutning** vurderes som høj for kartoffel. Dels sker opformering af kartofler ikke ved pollenbestøvning, de er i høj grad selvbestøvende og kartofler er følsomme overfor frost som i Danmark og overvintret sjældent.

Den **fysiske indeslutning** synes ikke specielt høj for den aktuelle udsætning i relation til adgangsbegrænsning. F.x er der ikke hegn omkring forsøgsområdet, men ansøgeren vil dyrke et 3 m bredt bælte med ikke-genetisk modificeret kartoffel omkring feltet. Afstand til nærmeste kartoffelmark er 15m.

Høst foregår manuelt og procedurer for transport, som beskrevet i ansøgningen, sikrer en god indeslutning.

Afklipping af blomster (begyndelsen af juli/når kartoflerne begynder at blomstre) vil i høj grad forhindre utilsigtet pollenspredning og dannelse af frø.

I alt vurderer DTU, Fødevareinstituttet at indeslutningen af kartoflerne samlet set er høj under dyrkningen og vurderer, at der ikke vil ske spredning til andre marker eller kartoffelplanter.

Den efterfølgende overvågning af arealet til året efter udsætning og fjernelse/destruktion af eventuelle kartofler på arealet vurderes at kunne sikre at en tidsmæssig spredning undgås.

Samlet vurdering.

Det er DTU, Fødevareinstituttet vurdering, at kombinationen af den fysiske og biologiske indeslutning af kartoflerne under dyrkning i høj grad sikrer, at der ikke vil ske spredning af GM-materiale (kartofler/pollen/frø).

Det er DTU, Fødevareinstituttet vurdering at et "worst-case senario" hvor de gensplejsede kartofler via knolde eller pollen spredes til kartoffelmarker (fx til konsum eller opformering) ikke vil udgøre et sundhedsmæssigt problem ud fra viden om konstruktionen. De forventede nye egenskaber er ikke forbundet med en sundhedsmæssig risiko af kartofler og bevirker ikke dannelse af nye indholdsstoffer.

Med venlig hilsen

Jan Pedersen