



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 kartoffelstivelses-produktion, med forbedret modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*)

Den 28. marts 2023 modtog Landbrugsstyrelsen (LBST) en ansøgning KMC Amba og Københavns Universitet om tilladelse til forsøgsudsætning af genetisk modificeret CRISPR/Cas-kartoffel (*Solanum tuberosum*) 'Ydun' 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 Ydun, som har fået indført en målrettet mutation, der giver en forbedret modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*). 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 100 m².

Formålet med udsætningen er at teste muligheden for at reducere anvendelse af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) i den CRISPR/Cas-ændrede (SDN1) kartoffel. Formålet er desuden at teste om egenskaben er konstant, 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 for at forhindre spredning vil være tilstrækkelige til at sikre, at sandsynligheden for at der sker uønsket påvirkning af natur og miljø vil være negligerbare.

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 (Ydun) 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 plantning 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 plantningen underrettes om dato og tid for plantningen. Denne underretning skal finde sted senest kl. 12:00 dagen før plantningen. Årsagen er, at Landbrugsstyrelsen skal føre tilsyn med plantningen og skal kunne være til stede ved plantningens 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 en 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 plantning 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-kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med forbedret modstandskraft mod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*), YDUN.
- **Bilag 2:** Risikovurderinger - Ydun

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 kartoffel til
kartoffelstivelsesproduktion, med forbedret
modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora
infestans*)

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

Ansøgning udsætning af CrisprCAS kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med forbedret modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*)

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 mhbp 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, Hjermevej 94, 7560 Hjern

A.3. Projektets titel

CrisprCAS kartoffel med forbedret modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*).

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

Undersøge muligheden for at reducere anvendelse af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) i kartoffel.

Dette sker ved at teste de udsatte linjers modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) under markforhold.

A.4.b. Udsætningens startdato og varighed.

Udsætning sker omkring 15-25. maj 2023 og høst i perioden 20 - 30. september 2023.

A.4.c. Udsætningsmetode

Kartoffelplanterne vil blive udsat fra potter, hvorefter der hyppes op med markjord.

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 andre svampesygdomme end kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*).

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 250 m² brutto/100 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.

Ved blomstringen i begyndelsen af juli vil vi, som ekstra sikkerhed, klippe blomsterne af planterne. Dette vil forhindre en evt. teoretisk mulighed for krydsninger.

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.

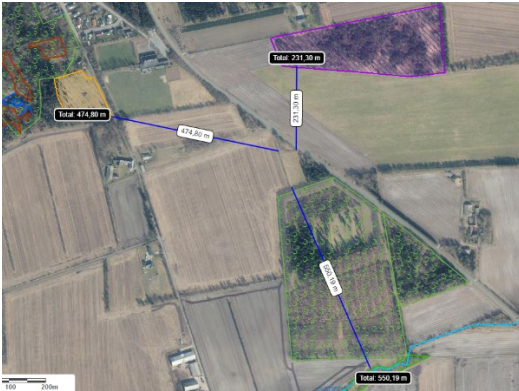
Afstande

§3 Hede: 230 meter

§3 Overdrev: 470 meter

§3 Eng: 550 meter

Fedskov: 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	Ydun
Almindeligt navn	Kartoffel (stivelse) "Ydun"

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 opformerer (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 der yderst sjældent spontant krydsning mellem kultivarer (sorter) af kartofler, hvorfor risiko for krydsbestøvning anses som værende teoretisk.

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)

Generel betragtning vedr. risiko for spredning

Det er meget vanskeligt at forstille sig at et givent patogen/mikroorganisme skulle få selektive fordele ved overførsel af et destrueret plante-modtageligheds gen, der i planten bremser plantens forsvar overfor patogenet – snarere tværtimod. Pathogenet udnytter plantens funktionelle modtageligheds gen til at gøre planten mere modtagelig overfor patogenet.

Vi forventer ikke en 100 % modstandskraft, nærmere en udsættelse af angrebet med 3 – 6 uger.

Kartoffelskimmel er epidemisk og vil per erfaring altid angribe planten. Mere end 100 års erfaring med kartoffeldyrkning har vist at 100 % modstandskraft *ikke* findes.

Målet er at udsætte og reducere anvendelsen af fungicider, *ikke* at skabe en plante der har 100 % modstandskraft. Kartoffelskimmel tilpasser sig, hvorfor balancen mellem plante og patogen blot forrykkes i forhold til en mere modtagelig sort.

- Generelt er tab af gen funktion ledsaget af reduceret konkurrence evne i naturen.

- Der er desuden ingen rapporter om produktion af giftige forbindelser som følge af mutationer i modtageligheds gener.

B.1.g.

Ikke relevant

B.1.h.

Kartofflen vekselvirker ikke med andre planter eller organismer, hvor den dyrkes konventionelt, og der er 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 er fremstillet på Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C eller ved SLU/SolEdits (SolEdits - solutions through crop innovation) Växtskyddsvägen 1, 234 56 Alnarp Sverige.

Der er ved brug af Crispr-Cas teknologien frembragt små målrettede mutationer i et såkaldt modtagelighedsgen (eng: susceptibility gene), her i genet *StDMR6-1*, i sorten Ydun. *StDMR6-1* genproduktet er en negativ regulator (bremse) af plantens immunforsvar. Som led i infektionen af planten high-jacker/opregulerer skimmelen produktionen af *StDMR6-1* genproduktet, hvorved plantens immun forsvar dæmpes / 'holdes indaktivt'. Ved Knock Out (KO) af *StDMR6-1* genet, fx, via anvendelse af CrisprCAS, fjernes 'bremsen på immunsystemet', incl skimmelens mulighed for at styre reguleringen af genet, så planten derved bliver mindre modtagelig overfor kartoffelskimmelen. Det forventes derfor, at forbruget af svampemidler til kontrol af skimmelen på sigt vil være betydeligt mindre.

i) Beskrivelse af de metoder der er anvendt

Den Crispr-Cas modificerede kartoffel er fremstillet efter vores tidligere publicerede protokol (Johansen et al 2019; samt beskrevet her under), med den modifikation, at vi her har anvendt Crispr-Cas9 i form af det DNA-fri såkaldte RiboNukleoProtein (RNP) (Carlsen et. al. 2022), hvilket helt udelukker indsættelse af (transgen) DNA i samtlige af de Crispr-Cas modificerede enkelt planter. Kun de tilsigtede målrettede ændringer vil derfor være i fokus og relevante ift. fremtidige godkendelsesprocedurer af den Crispr-Cas modificerede plante.

De to anvendte gRNA 43 og 45 er syntetiseret af Invitrogen, og er de så kaldte "True guide™ gRNA", Cas9 proteinet er lige ledes fra Invitrogen, det så kaldte "TrueCut™". Da TrueCut/gRNA 43 og TrueCut/gRNA 45 er transformeret ind samtidigt i protoplast cellerne, er anvendt mere end et RNP kompleks i transformationen, og dermed tale om 'multiplex' i editering.

Protoplaster blev isoleret fra 5 uger gamle vildtype (WT) *in vitro* planter ved enzymatisk fordøjelse af cellevæggen. De isolerede protoplaster blev mixet med RNP og transfektion medieret med 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 kapliær elektroforese. I alt blev 5 KO planter, med fuld allel editering, identificeret via IDAA og disse er udvalgt til dette markforsøg. IDAA profilerne med tilhørende data ses herunder.

Fremstilling af DMR6-1 Ydun mutant linjer

Samtlige protoplast RNP editeringer (TrueCut/gRNA 43 og TrueCut/gRNA 45) og efterfølgende enkelt protoplastcelle indstøbninger i algenate linjer er fortaget af PLEN-UCPH. I alt er 8 DMR6-1 Ydun mutant linjer med fuld allel editering udvalgt, hvor 3 af linjerne (3006, 3008, 3029) er regenereret af Sveriges landbrugs Universitet (SLU) / Soledits (SolEdits - solutions through crop innovation), og hvor de resterende 5 linjer (2, 4, 5, 9, 14) er regenereret af PLEN-UCPH. Alle linjer er regenereret efter samme protokol som ovenfor beskrevet. SLU/Soledits plante linjerne 3006, 3008, 3029 er karakteriseret ved sekventering, ved brug af long read sequencing (Eurofins), <https://www.eurofins.se/>) og de allel specifikke mutationer er identificeret, mens PLEN-UCPH plante linjerne (2, 4, 5, 9, 14) er karakteriseret ved fuld allel IDAA analyse.

Herunder er en oversigt over mutationerne ved de to cut sites for gRNAs 45 og 45 (sg 43 og sg45)

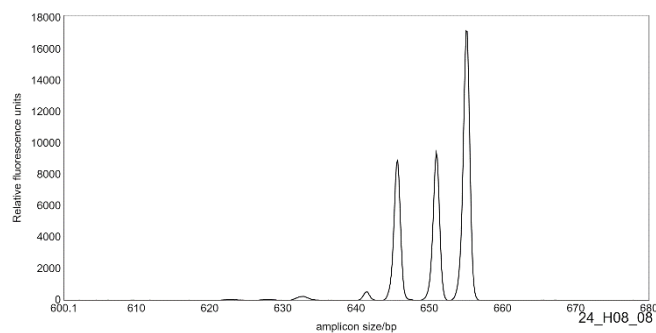
SLU/Soledits DMR6-1 Ydun mutant linjerne 3006, 3008, 3029:

KMC-Ydun-DMR6		sg43	sg45	
S3000-lines	Allele	Target 1	Target 2	Comment
3006				
				Knock out plant
	1			Double cut, large deletion
	2			Double cut, large deletion
	3	-5	-1	
	4	Insert		Double cut, large deletion flipped and inserted in opposit direction
3008				
				Knock out plant
	1	-5	-4	Out of frame yields stop codon after -5
	2	-10	-1	
	3	-1	-3	
	4	Insert		Double cut, large deletion flipped and inserted in opposit direction
3029				
				Knock out plant
	1	0	-2	
	2	0	-1	
	3	0	-1	
	4	0	+1	

PLEN-UCPH DMR6-1 Ydun mutant plante linjerne 2, 4, 5, 9, 14:

Vildtype DMR6 Ydun IDAA profil:

peak 1	645bp
peak 2	650bp
peak 3	655bp
peak 4	655bp

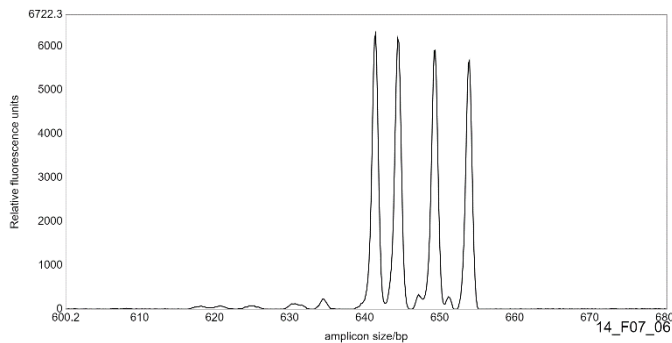


IDAA for WT (ikke editeret) identificerer alle 4 alleler i det amplificerede område med længderne: I (645bp), II (650 bp), III og IV (655 bp, dobbelt højde).

I mutant nr. 2, 4, 5, 9 og 14 er alle positioner / toppe forskellig fra - og ændret til positioner, der ikke findes i WT IDAA profilen. Dette viser, at alle alleler er muteret. Dog kan IDAA profilerne ikke med vished linke mutation til den enkelte allel. IDAA metoden har en separationsopløselighed på ned til +1/-1 bp og alle IDAA profiler er genereret i samme IDAA kørsel og endvidere kørt i duplikater. PCR til IDAA er udført på UCPH-PLEN mens IDAA prøverne er analyseret af Taq Copenhagen (TAG Copenhagen A/S).

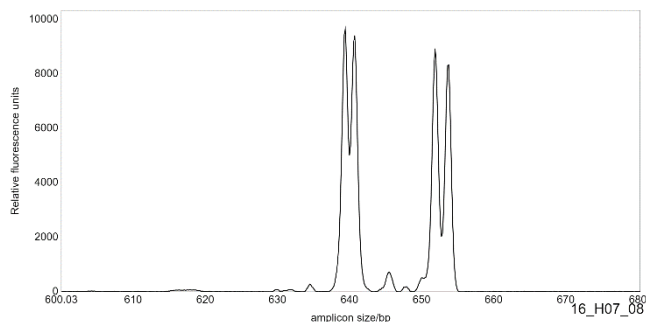
Mutant Ydun DMR6 nr.2

peak 1	641
peak 2	644
peak 3	649
peak 4	654



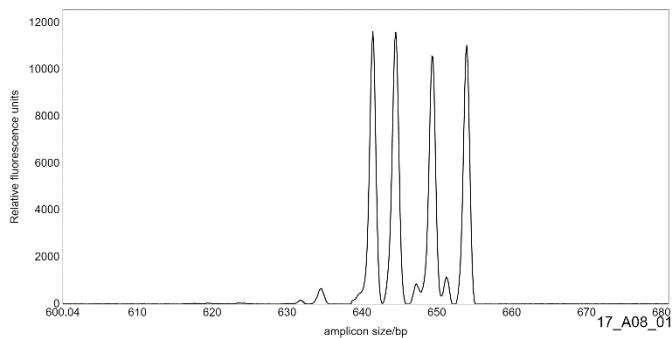
Mutant Ydun DMR6 nr. 4

peak 1	639
peak 2	640
peak 3	652
peak 4	653



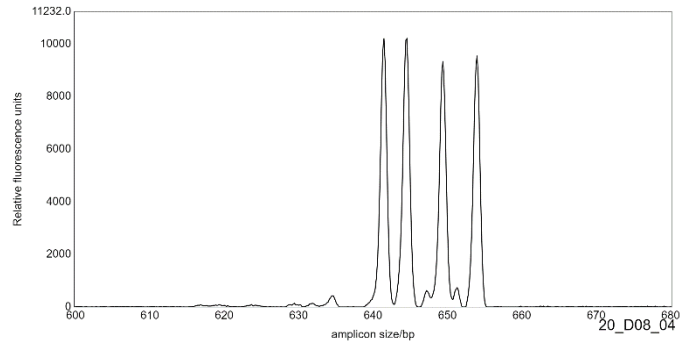
Mutant Ydun DMR6 nr. 5

peak 1	641
peak 2	644
peak 3	649
peak 4	654



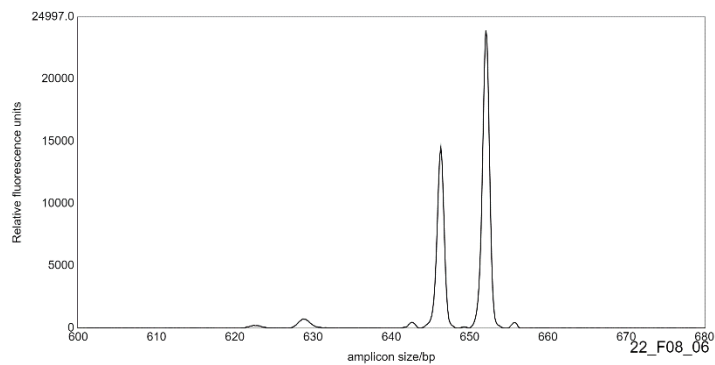
Mutant Ydun DMR6 nr 9

peak 1	641
peak 2	644
peak 3	649
peak 4	653



Mutant Ydun DMR6 nr.14

peak 1	646
peak 2	646
peak 3	651
peak 4	651



ii) den anvendte vektors art og oprindelse

- Ikke relevant, da der ikke er anvendt DNA (konstrukt) på noget tidspunkt i processen. Der er brugt DNA fri Crispr-Cas i form af RiboNukleoProtein (RNP).

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 ikke er tale om indsættelse af DNA og der ikke er anvendt DNA i processen.

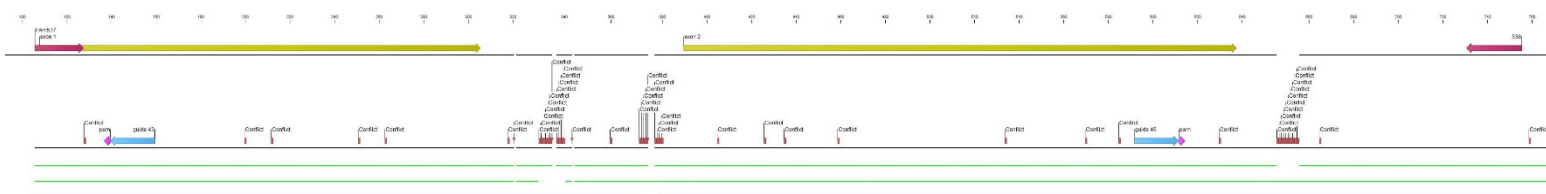
b) Oplysning om GMHP'erne

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

Der er ved brug af Crispr-Cas teknologien frembragt små målrettede mutationer i et såkaldt modtagelighedsgen (eng: susceptibility gene), her i genet *StDMR6-1*, i sorten Ydun. *StDMR6-1* genproduktet er en negativ regulator (bremse) af plantens immunforsvar. Som led i infektionen af planten high-jacker/opregulerer skimmelen produktionen af *StDMR6-1* genproduktet, hvorved plantens immunforsvar dæmpes / 'holdes inaktivt'. Ved Knock Out (KO) af *StDMR6-1* genet, fx, via anvendelse af CrisprCAS, fjernes 'bremsen på immunsystemet', incl skimmelens mulighed for at styre reguleringen af genet, så planten derved bliver mindre modtagelig overfor kartoffelskimmelen. Det forventes derfor, at forbruget af svampemidler til kontrol af skimmelen på sigt vil være betydeligt mindre.

Der er designet to gRNA'er (sg43 og sg45) til at generere mutationer i henholdsvis exon 1 og exon 2 af DMR6-1 (disse er markeret i i blåt på genmodellen nedenfor). Med det valgte IDAA PCR primer design, hvor primere er designet til at dække begge exons, identificerer IDAA PCR i WT Ydun 2 alleler med samme størrelse, og yderligere to alleler med forskellige størrelse (vist ved de grønne linjer på nedenstående figur).

Plante resistens markør(er) er ikke relevant da kun DNA fri RNP komplekser har indgået i transformations/editerings processen. De fremkommende mutationer må betegnes som værende af INDEL 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 ikke er tale om indsættelse af DNA er anvendt DNA (konstrukt) på noget tidspunkt i genediteringsprocessen.
- I tilfælde af deletion angives den eller de deleterede regioner størrelse og funktion
- Hensigten med anvendelse af to gRNAs til deletion har være, at sikre fuld tab af gen funktion for alle 4 alleler i DMR6-1. Se endvidere IDAA profiler for linjerne længere nede samt sekvensdata oversigt over SLU/SolEdits linjer.
- 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 ikke er tale om indsættelse af DNA er anvendt DNA (konstrukt) på noget tidspunkt i genediteringsprocessen.

iii) Dele af Planten, hvori insertet udtrykkes

- Ikke relevant, da der ikke er tale om indsættelse af DNA er anvendt DNA (konstrukt) på noget tidspunkt i genediteringsprocessen.

iv) Insertets genetiske stabilitet og GMHP'ernes fænotypiske stabilitet

- Ikke relevant, da der ikke er tale om indsættelse af DNA. Der er ikke anvendt DNA (konstrukt) på noget tidspunkt i processen. Kartoffel er kendt for at bibeholde plantens genetiske setup, når de propageres via knold (klon) formering. Rekombination sker i langt overvejede grad kun ved kønnet formering.

c) konklusioner af den molekylære karakterisering

Ved brug af DNA-fri CRISPR-Cas teknologi, har vi umuliggjort indsættelse af fremmed DNA. Vores IDAA primer design og dermed profiler viser at vi amplificerer alle 4 alleler i WT (ikke editeret Ydun). I de udvalgte linjer ser vi editering i alle 4 alleler ved IDAA analyse. Linjerne 3006, 3008 og 3029 er endvidere blevet fuld sekventeret i mål-området (Eurofins, long read sekventering).

I linjerne 2, 4, 5, 9 og 14 kan et deleteret fragment teoretisk set være blevet indsat igen, men resultatet er at alle alleler er editeret med overvejende sandsynlighed for tab af gen funktion.

Den ovenfor beskrevne målrettede mutations analyse (IDAA og sekventering) vil påvise, hvorvidt mutationen forefindes i det analyserede materiale.

5 af linjerne (i alle fire alleler) vha IDAA analyse og sekvensering (3 linjer), som beskrevet ovenfor, og vil blive anvendt til entydig mutant/line identifikation i indhentet materiale, der evt. ift. en usandsynlig spredning, kunne påtænkes analyseret.

Litteratur med direkte relevans for linjerne

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>

For RNP-resistens forædling af kartoffel af genet *StDMR6-1* i Ydun:

Carlsen FM, Johansen IE, Yang Z, Liu Y, Westberg IN, Kieu NP, Jørgensen B, Lenman M, Andreasson E, Nielsen KL, Blennow A, **Petersen BL** (2022) Strategies for Efficient Gene Editing in Protoplasts of *Solanum tuberosum*, Theme: Determining gRNA Efficiency Design by Utilizing Protoplast', *Frontiers in Genome Editing*. doi: 10.3389/fgeed.2021.795644

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.

(se desuden uddybende beskrivelse i medsendte bilag 1, Miljørisikovurdering M5-D2)

a)

Der forventes ingen ændringer i hverken persistens eller invasionsevne, ej heller i evnen til at overføre genetisk materiale til beslægtede plantearter.

(se desuden afsnittet '*Generel betragtning vedr. risiko for spredning*')

b)

Der forventes ingen ændringer i evnen til at overføre genetisk materiale til mikroorganismer.

(se desuden afsnittet '*Generel betragtning vedr. risiko for spredning*')

c)

Ikke relevant. Planternes forsvarsmekanismer imod kartoffelskimmel (*p. infestans*) forbedres.

d)

Der forventes ingen ændringer.

e)

Den potentielle ændring i landbrugspraksis vil være, at der skal sprøjtes færre gange med svampemidler i kartoflerne. Det betragtes som en positiv ændring, både i relation til landbrugspraksis og i relation til miljøet bredt set (inkl. fx forekomst i drikkevandsboringer, CO2 regnskab i forbindelse med svampemiddels fremstilling og udbringning etc.).

f)

Der forventes ingen påvirkninger på de abiotiske miljøer.

g)

Der er ingen forventning om, at der er sket ændringer i stivelsessyntesen eller den øvrige måde planten vokser på.

De udsatte/reducerede skimmelangreb vil forventeligt give en mere jævn vækstrytme for planten, da angreb stresser planten og presser dens vækst. Dette antages at have en positiv effekt på plantens generelle vækst, hvilket bl.a. er kendt fra den praktiske avl.

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

Der forventes ingen toksisk, allergenisk eller anden skadelig påvirkning på menneskers eller dyrs sundhed.

h)

Der forventes ingen øget risiko for miljøpåvirkning, hverken på mennesker, dyr eller omkringliggende natur. Den forventede reducerede mængde svampemiddel forventes derimod at mindske risikoen for skadelige påvirkninger på alle omgivelser.

Generelle betragtninger vedr. transport (fra drivhusanlægget på Thorvaldsensvej 40, 1871-Frederiksberg C (opformering af kartoflerne) til KMC, og fra mark og til KMC, mhhp post-forsøgs destruktion): knolde (og post-forsøg) plante materiale placeres i dobbeltposer, placeret i GMO mærket flamenco kasser. Transport mellem landsdele sker ved brug af lejet varevogn, ledsaget af Christian Feder. Transport mellem mark og KMC sker via KMC ejede køretøj (se desuden beskrivelser ovenfor og følgende for håndtering).

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.

Efter brug vil vægten og kasser blive rengjort og desinficeret og knolde vil blive kørt til forbrænding/deponi.

4.b. Metoder til efterbehandling af stedet efter udsætning

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

1. harvning vil ske kort efter høst, således at 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 andre sygdomme en kartoffelskimmel.

Høst: Håndoptagning/høst. Ved håndoptagningen (høst) er risikoen for spild meget lille. Alt overjordisk plantemateriale vil blive opsamlet i plastiksække, og kørt til forbrænding/deponi.

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

De høstede knolde vil blive transporteret i dobbelt GMO mærkede plastposer, placeret i kasser til stivelsesvægten.

Efter brug vil vægten og kasser blive rengjort og desinficeret, og knolde 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 og i årene efter (jf. pkt.4b) 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 (dobbelte 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

Genomisk DNA fra knolde, stængel eller blade isoleres og målgenet *StDMR6-1* amplificeres ved fluorescens mærket PCR Indel Detection Amplicon Analysis, kaldet IDAA, for hurtig, men sikker, mutationsidentifikation, og amplificeres ved umærket PCR for mutationsidentifikation på nukleinsyre base niveau. Alle trin er implementeret, og udføres løbende, på PLEN-KU som beskrevet i Johansen et al (2019) og Carlsen et al (2022) (se ovenfor). Isoleret genomisk DNA fra Ikke-CRISPRCas modificerede Ydun planter anvendes som negativ kontrol.

Da DNA på intet tidspunkt har indgået i den RNP medierede mutagenese, vil analyse af fremmet DNA være irrelevant. Den ovenfor beskrevne målrettede mutationsanalyse vil alene påvise, hvorvidt mutationen forefindes i det analyserede materiale eller ej.

Alle plante-linier (kloner af mutationen) vil være fuldt karakteriseret (i alle fire alleller) 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.

Målgenet er *StDMR6-1* udtrykt i alle kartoffel plantens dele. Læse-rammer i de første kodende regioner (exon 1 og 2) i alle fire alleller er brudt som følge af mutationen, hvorved ingen af genets fire alleller kan blive translateret til et funktionelt *StDMR6-1* protein, hvorved *StDMR6-1* gen funktioner er fuldt ud destrueret. Den fænotypiske effekt af fuld allel knock out af *StDMR6* gen er beskrevet i Kieu et al (2020) og udsatte plante linier vil blive screenet mht deres modstandsevne overfor kartoffelskimmel ved brug af 'detach leaf assay' og mulige, men ikke sandsynlige, væsentlige vækst relaterede fænotyper. 'detach leaf assay' og vækst monitorering af fuld allel *StDMR6-1* knock out kartoffel linjer er beskrevet i Kieu et al (2020).

Kieu, NP, Lenman, M, Wang, **Petersen BL**, Andreasson E (2020) Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. *Sci Rep* **11**, 4487 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83972-w>

6. Oplysninger om tidligere udsætninger af GMPH'erne

Ikke relevant, da denne specifikke GMPH ikke tidligere har ansøgt udsat, hverken i DK eller øvrige EU.

Dato: 21. marts 2023

Bent L. Petersen
Københavns Universitet

Christian Feder
KMC

Bilag:

1. Miljørisikovurdering
2. Artikel, Kieu et al.

Miljørisikovurdering

Ansøgning udsætning af CrisprCAS kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med forbedret modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*)

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)

Afklipning af blomster vil effektivt forhindre en risiko for pollenspredning. Risikoen for pollenspredning vurderes som ubetydelig, men afklipningen 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. Hen 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 korden.

2. Genoverførsel fra plante til mikroorganismer

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

3. GMPHernes vekselvirkning med målorganismer

Forbedret modstandskraft overfor kartoffelskimmel = vurderes til at være positivt da bedre modstandskraft overfor skimmel vil styrke planten.

Vi forventer ikke at der vil ske ændringer i populationen af kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) eller ændringer i dennes aggressivitet.

Den ændrede egenskab forventes udelukkende at udsætte angrebene af kartoffelskimmel med 3 – 6 uger, jf. erfaringer fra SLU i Sverige i sorten King Edward.

4. GMPHernes 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

Det forventes ikke at kartoffelskimmel populationerne vil ændre sig, men kunne blive forsinket i deres udbredelse. Denne forsinkelse forventes at kunne reducere anvendelsen af fungicider væsentligt.

7. Virkninger på menneskers og dyrs sundhed

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

Bedre modstandskraft imod skimmel vil principielt forventes at virke positivt på både mennesker og dyrs sundhed, da der forventes at der skal anvendes en betydelig mindre mængde plantebeskyttelsesmidler (svampemidler) end i den oprindelige cultivar (sort).

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* denne typer mutationer er sket "naturligt", har det ikke haft betydning på hverken mennesker eller dyrs sundhed.

I forbindelse med almindelig resistensforædling har det heller ikke haft nogen kendt betydning for hverken mennesker eller dyrs sundhed.

MUTATION INTRODUCED IN SUSCEPTIBILITY GENES THROUGH CRISPR/CAS9 GENOME EDITING CONFER INCREASED LATE BLIGHT RESISTANCE IN POTATOES

Nam Phuong Kieu, Marit Lenman, Eu Sheng Wang, Bent L Petersen¹, Erik Andreasson

Department of Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences Alnarp, Sweden.

1. Department of Plant and Environmental Sciences, Thorvaldsen's vej 40, 1871-Frederiksberg C, University of Copenhagen, Denmark.

Abstract

The use of pathogen-resistant cultivars is expected to increase yield and decrease fungicide use in agriculture. However, in potato breeding, increased resistance obtained via resistance genes (R-genes) is hampered because R-gene(s) are often specific for a pathogen race and can be quickly overcome by the evolution of the pathogen. In parallel, susceptibility genes (S-genes) are important for pathogenesis, and loss of S-gene function confers increased resistance in several plants, such as rice, wheat, citrus, tomatoes, and potatoes. In this article, we present the mutation and screening of seven putative S-genes in potatoes, including two DMR6 potato homologues. Using a CRISPR-Cas9 system, which conferred co-expression of two guide RNAs, tetra-allelic deletion mutants were generated and resistance against late blight was assayed in the plants. Functional knockouts of *StDND1*, *StCHL1*, and DMG40000582 (*StDMR6-1*) generated potatoes with increased resistance against late blight. Plants mutated in *StDND1* showed pleiotropic effects, whereas *StDMR6-1* and *StCHL1* mutated plants did not exhibit any growth phenotype, making them good candidates for further agricultural studies. Additionally, we showed that DMG401026923 (here denoted *StDMR6-2*) knockout mutants did not demonstrate any increased late blight resistance, but exhibited a growth phenotype, indicating that *StDMR6-1* and *StDMR6-2* have different functions. To the best of our knowledge, this is the first report on the mutation and screening of putative S-genes in potatoes, including two DMR6 potato homologues.

Keywords: Susceptibility genes, gene editing, CRISPR-Cas9, late blight resistance, DMR6, potato, *Phytophthora infestans*, multi-guide RNA, StCHL1

Key Message: Gene editing in StCHL1 and StDMR6 resulted in increased potato resistance to *Phytophthora infestans*

Introduction

Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) are the fourth most important staple crop worldwide with 450 million tons produced in 2018 (www.fao.org) and are a major and irreplaceable part of the human diet

in some countries (Eriksson et al. 2016). Potatoes have potential for extraordinarily high yield, have a high nutritional value, and are a good source of energy, minerals, protein, fats, and vitamins (Koch et al. 2019). However, potato crops are affected by pests and many diseases, such as late blight, early blight, bacterial wilt, potato blacklegs, Colorado potato beetles, and cyst nematodes (<https://cipotato.org/crops/potato/potato-pests-diseases/>).

Late blight is the most serious disease of potato crops worldwide. It is caused by the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*, which can infect the leaves, stems, and tubers of potato plants. Under favourable conditions like moderate temperatures and moderate to high humidity, an unprotected potato field with a late blight susceptible cultivar can be destroyed in a matter of days by *P. infestans* infection (Fry 2008). The control of late blight disease is mainly dependent on the use of fungicides and resistant potato varieties. Normally, several fungicide sprays are applied during a cropping season to control late blight disease (Mekonen and Tadesse 2018). Resistant potato crop varieties require less fungicide use; therefore, use of resistant crops is a more sustainable method for control of late blight. Late blight-resistant potato varieties have been developed for more than a century by introgression of resistance genes (R-genes) from wild *Solanum* species (Roman et al. 2017). However, virulent races of *P. infestans* have rapidly evolved to overcome all 11 major R-genes introduced from *S. demissum* (Fry 2008). Recently, breeders have tried to combine several R-genes from different wild *Solanum* relatives to increase late blight resistance in potatoes (Zhu et al. 2012; Ghislain et al. 2019). However, classical breeding by recurrent selection is time-consuming as well as complicated in tetraploid potatoes.

Another type of resistance, based on the loss-of-function of a susceptibility gene (S-gene), has more recently been described. S-genes are utilized by the pathogen during colonization and infection. Therefore, the knockout of S-genes may induce recessive resistance in plants (Pessina 2016). One typical S-gene is *MLO* (Mildew Locus O), which was originally characterized in spring barley in the 1940s and later used in European plant breeding programs in the 1970s. Because it provides nonspecific resistance, and durable in the field, MLOs have been used in a wide range of plant crops such as apples, barley, cucumbers, grapevines, melons, peas, tomatoes, and wheat (Le Fevre et al. 2016; Kusch and Panstruga 2017; Gruner et al. 2020). Based on biological function, S-genes have been divided into three groups (Sun et al. 2016; Engelhardt et al. 2018). The first group includes genes needed for host recognition by the pathogen. One example is *GLOSSY 11* in maize (Sun et al. 2016). The second group comprises genes that support pathogen demands, such as *SWEET* sugar transporters. The third group includes genes that control plant defence responses. Many S-genes encode negative regulators of plant defence responses, such as *DMR6*, *TTM2*, and *LSD1*. Using RNAi silencing, Sun et al. (2016) identified some S-genes in potatoes, including *StDND1* and *StDMR6* that upon knockdown showed enhanced late blight resistance. However, downregulation of homologous genes can cause undesirable phenotypes, or silencing of the introduced transgene may produce uneven results using the RNAi method. Finally, RNAi approaches are clearly classified as genetically modified organisms (GMOs).

Recently, genome editing technologies have progressed and become powerful genetic tools for increasing pathogen resistance in plants (Chen et al. 2019). These technologies include the use of transcription activator-like effector nucleases (TALENs) or clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) (Nicolia et al. 2015; Chen et al. 2019). CRISPR-Cas is the preferred genome editing tool because of both the versatile and easy design, which

only requires replacement of the sgRNA to confer new target specificity. This makes it cost and labour effective, as well as giving it the ability to produce trans-free offspring (Andersson et al. 2018; Chen et al. 2019). Recently, CRISPR-Cas has been used to knock out *elf4E* in cucumbers, *SWEET14* in rice, *CsLOB1* in citrus, and *DMR6-1* or *JAZ2* in tomatoes (Yin and Qiu 2019), but it has not been applied in tetraploid potatoes for enhanced disease resistance (e.g. Hameed et al. 2018).

Most potato cultivars used commercially are tetraploid and rarely produce berries (Sevestre et al. 2020). Therefore, increased resistance of these cultivars by traditional breeding methods is laborious, and finding natural or chemical mutants, which are mutated in all four alleles, is exceedingly difficult and cumbersome. Čermák et al. (2017) developed a whole array of CRISPR-Cas9 vectors, which were used to produce deletion mutants on diploid plants, such as tomatoes and *Medicago*. Additionally, larger CRISPR/Cas mediated deletions may easily be scored by PCR with primers specific to the target region (Čermák et al. 2017; Srivastava et al. 2017).

To produce late blight resistance potato cultivars in the future, we initiated the first step of screening putative S-genes in potatoes. Based on predicted gene function, target candidates in potatoes were selected using the following criteria: pathogen resistance phenotype, small gene family size, and different gene functions and pathways. Seven putative S-genes from the literature were selected (Table 1), and plants with mutated genes were generated by CRISPR/Cas9 and analysed for late blight resistance. Our results demonstrated that *StDMR6-1* and *StCHL1* are promising S-gene candidates for generating increased late blight resistance in potatoes.

Materials and Methods

Materials

Tetraploid *Solanum tuberosum* Désirée and King Edward (susceptible to late blight infection) were maintained *in vitro* by sub-culturing the apical portion of 3–4 week-old stems on Murashige and Skoog (MS) basal nutrient including vitamins (Duchefa, M0222.0050) with 10 g/L sucrose and 7.5 g/L Phyto agar (MS10) (Wang et al 2020). Genetically modified lines containing three resistance genes, 3R, Rpi-blb2, Rpi-blb1, and Rpi-vnt.1 (Ghislain et al. 2019; Wang et al. 2020), in Désirée and King Edward were used as resistant controls. The *P. infestans* strain 88069 (A1 mating type, race 1.3.4.7) was propagated as previously described (Hodgson and Grainger 1964).

Vector constructs

Candidate genes were selected (Table 1) and the coding sequence analysed for possible CRISPR targets and their number of off-targets using Cas-designer (<http://www.rgenome.net/cas-designer>; (Park et al. 2015)) and CRISPOR (<https://crispor.org>; (Haeussler et al. 2016)). For each candidate, two PCR primer pairs were designed to amplify a region containing putative targets with the fewest potential off-targets and used in PCR amplification of genomic DNA and cDNA (see Supplementary Table). PCR products were run on 1 % agarose gels, gel-purified, and each band was sequenced using two primers. For each candidate, the two targets that were conserved in all sequences, and that had the lowest number of potential off-targets were selected. The targets were assembled into the Csy4 multi-gRNA

vector pDIRECT_22C, using protocol 3A (Čermák et al. 2017) to form the plasmid pDIRECT_22C_S-gene.

Potato transformation protocol

The protocol for the *Agrobacterium* transformation of *S. tuberosum* Désirée and King Edward was modified from the original protocol (Visser 1991; Wang et al. 2020). A 10 mL overnight liquid culture of *Agrobacterium tumefaciens* C58 carrying the plasmid of interest was centrifuged at 5,000 rpm in a 15 ml tube for 10 min, the supernatant was discarded, and the pellet was re-suspended in 10 mL dH₂O containing 50 µl of acetosyringone (76 mM). For transformation, 1 mL of the *Agrobacterium* suspension (OD 1.9–2.0) was pipetted onto dissected leaf explants that were placed on the co-cultivation media. Leaf explants were incubated under reduced light (50% intensity) for 48 h before they were transferred to selective media (400 mg/L cefotaxime + 100 mg/L kanamycin, and 2 mg/L for Désirée and 5 mg/L for King Edward of zeatin ribose) for regeneration (Wang et al. 2020). Leaf explants were sub-cultured onto fresh media every 7–10 d to maintain selection pressure. Shoots that emerged after 4–5 weeks were dissected and rooted on MS media containing no plant growth regulators but with continued selection (100 mg/L kanamycin). Only shoots that initiated roots in the selective media were screened at the molecular level.

PCR screening

Genomic DNA was extracted from young leaves of regenerated potato shoots (Edwards et al. 1991) and used as a template in the PCR analysis. The PCR reaction mixture contained 1× Buffer, 1 µL genomic DNA, 0.2 mM dNTPs, 0.5 µM of each primer, and 0.2 U Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in a final volume of 25 µL. The PCR amplification program was as follows: one cycle of 5 min at 95°C followed by 35 cycles of 20 s at 94°C, 20 s at 54 to 62°C (depending on the T_m of the primers), and 30 s at 72°C, with a final extension at 72°C for 5 min. The samples were analysed on 2 % agarose gels and tetra-allelic deletion mutant lines were selected (except the HDS gene, see results).

In-vitro propagation and in-vitro long-term storage

Selected mutant lines were propagated by cutting node segments and culturing them in 90 × 25 mm Petri dishes containing 25 mL MS10 medium. The plates were sealed with micropore medical sealing tape and grown in a tissue culture room (20°C, 16 h photoperiod, 40–60 µmol/m²/s). After 14 d, three rooted plants (for each mutant line) were transferred onto the soil for further analysis. To maintain each line in vitro, 1 to 2 shoots were transferred into a Petri dish containing MS10 medium, sealed with Parafilm, cultured for 4 weeks in a tissue culture room; thereafter, the in-vitro line was maintained at 9°C, 8 h photoperiod, 10 µmol/m²/s for 6 months (Kieu et al. 2020).

Growth phenotype study and generation of leaf material for pathogenic resistance assay

In-vitro plants of the wild type, 3R, and tetra-allelic deletion mutant lines were grown in 2 l plastic pots containing potting soil (Emmaljunga Torvmull AB, S 28022 Vittsjö, Sweden). All plants were grown for 5 to 6 weeks in climatized rooms (20°C, 16 h photoperiod, 160 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 65% relative humidity [RH]) with watering every second day (Bengtsson et al. 2014).

Detached-leaf assay

For each experiment, nine fully developed leaves from 5-week-old plants from each line were used for detached-leaf assays (DLAs). The inoculum of *P. infestans* was prepared by harvesting sporangia from 12 to 14 d-old plates of *P. infestans* in clean tap water (Goth and Keane 1997). The inoculum was adjusted to 20,000 sporangia/mL and 25 μL of the spore solution was pipetted onto the abaxial side of the leaflet. The infected leaves were maintained in a humid environment (RH ~100 %) under controlled conditions (Abreha et al. 2015). Results were recorded by measuring the infection size of each leaflet at 7 d post-inoculation (dpi). The difference between the means was tested using a t-test with the significance level of $p < 0.05$ or 0.01 . We also calculated the percent successful infection.

Result and Discussion

Selection of putative S-genes in Potato against *Phytophthora infestans*

S-genes involved in susceptibility to different types of pathogens have been found in many different plant species (Zaidi et al. 2018; Yin and Qiu 2019). Here, S-gene candidates were selected based on the following criteria: pathogen resistance phenotype, being either a single gene or belonging to a small confined gene family in potatoes, each S-gene concerning other candidates must have a different function, and if possible, function in different pathways (see Table 1).

MLO (Mildew resistance locus) encodes a plasma membrane-localized seven transmembrane domain protein associated with vesical transport and callose deposition (Pessina 2016; Kusch and Panstruga 2017; Kusch et al. 2019). The *MLO* protein contains a domain that is predicted to bind with calmodulin and is required for full susceptibility to powdery mildew infection (Kusch and Panstruga 2017). In this study, we included *MLO* because it is a typical S-gene, which has been successfully applied in many plants, such as roses, peas, melons, and apples (Kusch and Panstruga 2017). Furthermore, *mlo* mutants also showed resistance to two oomycetes: the hemibiotrophic *Phytophthora palmivora* (Le Fevre et al. 2016) and the biotrophic *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Kim and Hwang 2012). Because *P. infestans* also has a hemibiotrophic lifestyle, we decided to include this gene in the screening. Appiano et al. (2015) identified the corresponding *MLO* gene in potatoes and named it *StMLO1* (Appiano et al. 2015).

Table 1: Selected putative S-genes in potatoes.

Candidate Gene name	Pathogen/host	Function	Pleiotropic phenotypes	Reference	Potato gene
<i>MLO</i>	<i>Phytophthora palmivora</i> /barley <i>H. arabidopsidis</i> / Arabidopsis - powdery mildew/barley, wheat, cucumber, tomato	Encodes a seven transmembrane protein involved in vesicle transport and callose deposition	Premature senescence (Barley, wheat, Arabidopsis) Reduced plant size (pepper) None (tomato, pea, tobacco, melon, apple)	(Kim and Hwang 2012; Appiano et al. 2015; Le Fevre et al. 2016; Kusch and Panstruga 2017; Kusch et al. 2019)	<i>StMLO1</i> (AIT98395)
<i>AtHDS</i>	<i>P. syringae</i> / <i>A. thaliana</i>	Encodes 1-hydroxy-2-methyl-2-butenyl 4-diphosphate synthase involved in salicylic acid hormone signalling	Albino phenotype and seedling lethality when homozygous for the deletion	(Zhang et al. 2019)	DMG400008050
<i>AtTTM2</i>	Hyaloperonospora sp./ <i>A. thaliana</i>	Encodes a triphosphate tunnel metalloenzyme; a negative regulator of defence responses	No	(Ung et al. 2014)	DMG400025117
<i>StDND1</i>	<i>P. infestans</i> /potato <i>H. parasitica</i> / <i>A. thaliana</i>	Encodes a cyclic nucleotide-gated ion channel protein which has a role in conducting Ca ²⁺ into plant cells	Necrotic spots on older leaves	(Clough et al. 2000; Sun et al. 2016, 2017)	DMG400001441
<i>StCHL1</i> (bHLH7)	<i>P. infestans</i> / Tobacco, tomato	Encodes a transcription factor, involved in brassinosteroid (BR) hormone signalling, which interacts with the RXLR effector AVR2	Unknown	(Turnbull et al. 2017)	DMG400000711
<i>AtDMR6</i>	<i>P. infestans</i> / potato <i>B. cinerea</i> / tomato Downy mildew / <i>A. thaliana</i>	Encodes a salicylic acid 5-hydroxylase that fine-tunes salicylic acid homeostasis	Chilling stress tolerance (tobacco, tomato)	(De Toledo Thomazella et al. 2016; Sun et al. 2016; Wang et al. 2017; Hu et al. 2019)	DMG400000582 (here denoted <i>StDMR6-1</i>) and DMG401026923 (here denoted <i>StDMR6-2</i>)

In *Arabidopsis*, *HDS* encodes a chloroplast localized hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate synthase, one of the last steps in the methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway from which chlorophyll, carotenoids, gibberellins, and other isoprenoids are derived (Zhang et al. 2019). *HDS* is a negative regulator of salicylic acid (SA) by reducing the amount of its substrate, methylerythritol cyclodiphosphate (MEcPP) (Xiao et al. 2012). *Arabidopsis HDS* mutant plants show enhanced resistance to biotrophic, but not to necrotrophic, pathogens (Gil et al. 2005). In potatoes, we only encountered one *HDS* gene homologue.

The triphosphate tunnel metalloenzymes (TTMs) hydrolyse organophosphate substrates (Ung et al. 2014). *Arabidopsis* encodes three TTM proteins, where *TTM2* is involved in pathogen resistance via an enhanced hypersensitive response and elevated SA (Ung et al. 2017). *Atttm2* mutant lines showed enhanced resistance to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*. The closest potato homologues to the *AtTTM2* gene, DMG400025117 and DMG400001931. DMG400025117 appeared to be induced by BTH, whereas DMG400001931 was not (http://bar.utoronto.ca/efp_potato/cgi-bin/efpWeb.cgi); therefore, we chose to analyse DMG400025117. Furthermore, as *TTM2* has only been studied in *Arabidopsis*, its relevance in acquiring resistance in crop plants is unknown.

Sun et al. (2016, 2017) analysed potato plants, where *StDND1* had been knocked-down using RNAi and found that the plants were more resistant toward *P. infestans* (Sun et al. 2016, 2017). *StDND1*-silenced plants displayed auto-necrotic spots only in the leaves of older plants and a few well-silenced *StDND1*-transformants showed dwarfing (Sun et al. 2016), a phenotype that might result from inadequate specificity of the RNAi approach or the efficiency of silencing may fluctuate during development. The *DND1* gene encodes a cyclic nucleotide-gated ion channel, which has been implicated in Ca²⁺ signalling related to various physiological processes (pathogen defence, development, and thermotolerance) (Chin et al. 2013).

StCHL1 is a putative S-gene in potatoes. Originally, *StCHL1* was found through microarray analysis of brassinosteroid responsive marker genes in potatoes. Gene overexpression and virus-induced gene silencing experiments showed this gene to be important for *P. infestans* colonization of *Nicotiana benthamiana* (Turnbull et al. 2017). *CHL1* is a transcription factor, which regulates brassinosteroid hormone signalling and immune response (Turnbull et al. 2019); in potatoes, we located only one such gene.

DMR6 proteins belong to the 2-oxoglutarate (2OG)-Fe (II) oxygenase family. In *Arabidopsis*, *AtDMR6* encodes an SA 5-hydroxylase that regulates SA homeostasis by converting SA to 2,5-DHBA (Wang et al. 2017). This gene is a negative regulator of the active SA pool; thus, it is important for the SA-dependent plant immune system. Knockout of *SIDMR6-1* in tomatoes enhanced the resistance to *Phytophthora capsici* and *Pseudomonas syringae* (De Toledo Thomazella et al. 2016). Two DMR6 homologues were identified in potatoes. Knockdowns of *StDMR6* in potatoes by RNAi showed an unclear resistance phenotype, with only six out of 12 transformed plants showing lower transcript levels of DMR6 and four plants showed a resistance phenotype, whereas eight plants showed susceptibility to *Phytophthora infestans* (Sun et al. 2016). Therefore, both potato *DMR6* homologues were investigated separately by knockout experiments along with genome editing.

Efficiency of double guide mediated tetra-allelic mutation varied between genes

By applying two guide RNAs, targeted deletions in the gene of interest may be generated (Čermák et al. 2017; Srivastava et al. 2017). In a study by Čermák et al. 2017, deletions between the two cleavage sites were far more prevalent than individual indels resulting from cleavage of a single site. Therefore, we used the pDIRECT_22C vector (Čermák et al. 2017) encoding two guide RNAs for knocking out S-genes in potatoes. For our screen of edited potato plants, we chose to use PCR with gene-specific primers, spanning both gRNA targets, followed by gel electrophoresis analysis, as a simple, inexpensive, and rapid method for detecting deletions in the target gene. The screening results are shown in Figure 1 for the lines that were subsequently screened for late blight resistance and growth phenotypes. The number of plants with a deletion in all four alleles was related to locus and target sequence (Table 2). Analysis of shoots showed variation in the prevalence of tetra-allelic deletion mutants ranging from 0% to 18%. This number can be regarded as the minimum number because we did not detect single nucleotide mutations with the PCR method, but because it was easy to generate many lines in potatoes we believe this was the most efficient method. Analysing *in silico* target efficiency with several different online tools did not reveal a specific tool that could predict the mutation rate better than others (Table 2).

In *Arabidopsis*, homozygous mutation of HDS caused an albino phenotype and seedling lethality (Zhang et al. 2019)). In the present study, in agreement with this observation, some calli turned white and did not develop into seedlings. Furthermore, none of the *StHDS* genome-edited seedlings were confirmed to be deleted in all four alleles. We, therefore, concluded that, as in *Arabidopsis*, a full tetra-allelic HDS deletion is lethal, although transformed cells with a mutation in one, two, or three alleles were able to develop and form shoots (Table 2).

For all other genes, full allelic knockouts were not linked with lethality. Two genes showed a high number of tetra-allelic deletion mutants, namely 13 % of *StMLO1* and 18 % of *StCHL1* shoots had a deletion in all four alleles. The other four genes showed a prevalence of between 0.7% and 2.4% tetra-allelic deletion mutants. As mentioned above, because the applied PCR screening did not detect point mutations or very short deletions/insertions, the number of mutants detected in the present study may be lower than that of other screening methods, such as CAPS (Cleaved-Amplified-Polymorphic-Sequence) or IDAA (Johansen et al. 2019). However, a combination of constructs expressing two gRNAs with PCR screening of shoots is a low-cost, simple, and fast method enabling large scale screening at the shoot level.

Table 2: Summary of screening of deletion mutants in this study.

Gene name	<i>StMLO1</i>	<i>StHDS</i>	<i>StTTM2</i>	<i>StDND1</i>	<i>StCHL1</i>	<i>StDMR6-1</i>	<i>StDMR6-2</i>	
Potato variety background	Désirée	Désirée	Désirée	King Edward	Désirée	King Edward	Désirée	King Edward

No. of Plants show 4 allele deleted	20 (13%)	No (0%)	5 (1.1%)	14 (2.4%)	39 (18%)	9 (0.7%)	2 (0.9%)	4 (1.2%)
No. of Plants show wild-type band and deleted band	32 (20%)	23 (14%)	74 (15%)	9 (1.5%)	127 (58%)	138 (11%)	50 (23%)	43 (13%)
No. of Plants show only wild-type band	108	145	401	572	55	1124	166	276
Total lines used for screening	160	169	480	595	221	1271	218	323
Targets	TAGCCATAAG GCTAACCATG and TGGCAACAGC TCTTAGAAGC	TATTATGG GGACTC GCCTA and ACGCCTG AACCATA ACTAC	CTAGCTCTCGC ATAGGATAC and TACGGGATA TACAGCGTG CC	AAAGGGACGG CGTAAGCAC C and AGCAGCCCA GGTTCTCCA AT	TTGTTCTCCAT ACAGGGGTC and CCAGTTGGA GTTGGACAC GG	GAGAAAAT GCTAGG GGTAGC and AGACTTC ATTGTCA TCCTC	CAGGGGC ATATTTG TCCAA and GGTGTAT CAAAGA AGGTTA	CAGGGGCATA TTTGTCCAA and GGTGTATCA AAGAAGGTT A
CRISPOR Moreno-Mateos score	59 and 41	66 and 25	35 and 67	50 and 50	46 and 84	35 and 43	69 and 60	69 and 60
CRISPOR Doench score	69 and 55	51 and 50	50 and 67	38 and 56	42 and 69	48 and 45	41 and 59	41 and 59
CISTROME	0,21 and 0.27	0.02 and -0.09	-0.1 and -0,32	0.33 and -0,40	-0.31 and 0.83	-0.57 and -0.36	0.69 and 0.03	0.69 and 0.03
Cas-Designer Score (RGEN)	67 and 73	70 and 60	56 and 57	58 and 53	53 and 46	59 and 54	65 and 65	65 and 65
CRISPRater score (CCTop)	0.59 and 0.52	0.75 and 0.58	0.74 and 0.61	0.73 and 0.64	0.64 and 0.68	0.49 and 0.53	0.79 and 0.6	0.79 and 0.6

***StDND1*, *StCHL1*, and *StDMR6-1* tetra-allelic deletion mutants showed enhanced late blight resistance**

To analyse late blight resistance in tetra-allelic mutant lines, DLAs were performed. Infection lesion diameter was determined 7 d after *P. infestans* inoculation (Figure 1) and the percentage of infected leaves was analysed (Table 3).

Knockout of *StMLO1* in potatoes did not increase late blight resistance as evident by the sizes of the lesion or percentage of infected leaves. The effect on *P. infestans* infection in *mlo* potatoes was tested in the present study for the first time. All eight *Stmlo1* mutant lines were as susceptible to late blight disease as the wild type Désirée (Figure 1A, Table 3). This was somewhat unexpected because the

mutation of orthologous *MLO* genes is effective in many plant and pathogen species (Kim and Hwang 2012; Appiano et al. 2015), including the hemibiotrophic *P. palmivora*. Silencing of *Capsicum annum* *CaMLO2* conferred enhanced resistance against virulent *Xanthomonas campestris*, whereas overexpression of *CaMLO2* in *Arabidopsis* conferred enhanced susceptibility to both *Pseudomonas syringae* and *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Kim and Hwang 2012). Recently, a wheat *mlo* mutant was shown to be susceptible to the hemibiotrophic fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*, whereas it was still resistant to the obligate biotrophic fungus *Blumeria graminis* (Gruner et al. 2020). Thus, the usefulness of *MLO* is dependent on the host as well as the pathogen.

After PCR screening 169 HDS-related shoots, we did not obtain any tetra-allelic mutant lines (Table 2). After 2 weeks in soil, some heterozygous mutants showed an albino phenotype (Figure 2B) and did not grow further, whereas shoots with green leaves grew into adult plants. In *A. thaliana*, the *Athds* was mutagenized with ethyl methanesulfonate (EMS) and influenced chloroplast development and increased resistance to *Pseudomonas syringae* (Gil et al. 2005). Our potato *Sthds* mutants showed weakened growth (Figure 2B) and *P. infestans* screening of eight mutant lines did not show increased resistance to late blight disease (Figure 1, Table 3).

For *StTTM2* (DMG400025117), we analysed five tetra-allelic deletion mutant lines. No mutant line showed any altered phenotype (growth, morphology, or pathogen resistance) when compared with wild-type plants (Figure 1C, Figure 2C). Analysing *TTM2* sequences in *Solanum tuberosum*, two different *StTTM2* genes were identified (DMG400025117 and DMG400001931). The study of Ung et al. (2017) suggested that *AtTTM1* and *AtTTM2* could functionally complement each other; thus, it is plausible that these genes could be functionally complementary to each other and that a double mutant would show resistance to *P. infestans* in potatoes.

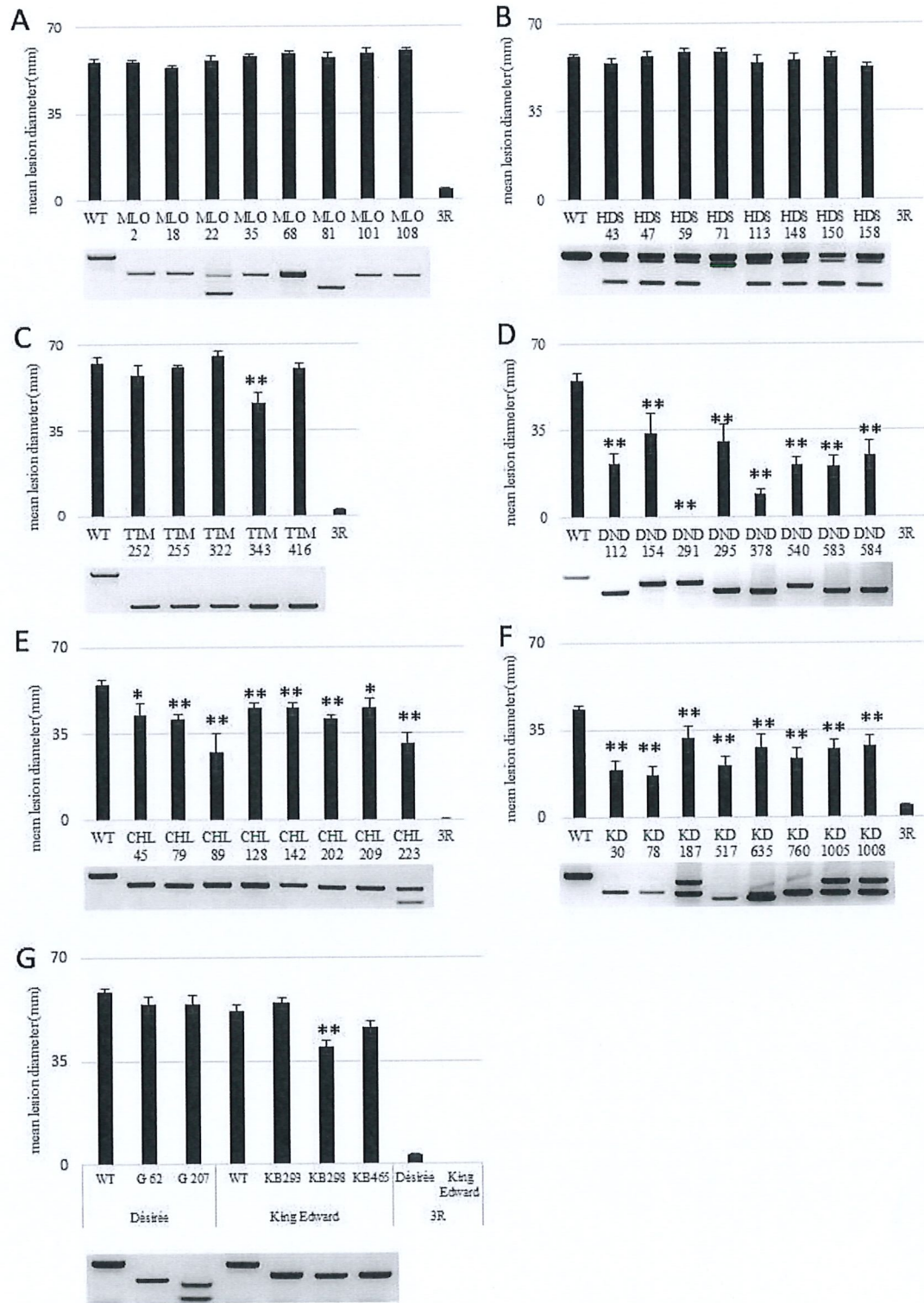


Figure 1: Mean lesion diameter and PCR analysis of potential *S*-gene mutant lines in potatoes. Lesions caused by *Phytophthora infestans* strain 88069 were scored after 7 d and PCRs were performed with

specific primers (Supplementary Table S1) and run in 2% agarose. A: *StMLO1*. B: *StHDS*. C: *StTTM2*. D: *StDND1*. E: *StCHL1*. F: *StDMR6-1*. G: *StDMR6-2*. Error bars shown represent SEM (standard error of the mean) and asterisks denote values significantly different from that of the wild type (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, t-test, $n=9$.)

Sun et al. (2016 and 2017) used RNAi to knockdown potato *StDND1* and found that these plants were more resistant to *P. infestans*. However, the plants were smaller and showed early senescence and necrotic spots on leaves of older plants. In line with their results, our data showed that the size of infection lesions was strongly reduced in all *Stdnd1* mutant lines, whereas the percentage of successful infections was reduced in some of the tetra-allelic lines (Figure 1C and Table 3). Two mutant lines with wild type and mutant PCR-bands (DND 44, DND 82) showed auto-necrotic spots and late blight resistance in older but not young leaves (Figure S1B and S1C).

The tetra-allelic *Stdnd1* mutated potato not only exhibited a late blight resistance phenotype as observed from the results of the RNAi study (Figure 1D) but also showed pleiotropic phenotypes, such as line DND 583 (Figure 2D). The tetra-allelic *Stdnd1* mutant lines, except for the strong resistance phenotype, also showed reduced growth, long and thin stems, as well as necrosis of all leaves (Figure S1A). These latter pleiotropic phenotypes were not found in *StDND1* RNAi mutants (Sun et al. 2016) possibly because of incomplete silencing. Following this, the phenotypes of some of our *Stdnd1* mutants (DND 44 and DND 82) and *StDND1* RNAi mutants were very similar (Fig S1 and fig 3c of Sun et al. 2016), which might indicate that the RNAi technique does not fully downregulate gene expression and function ((Sun et al. 2016), Table 2). Our results indicated that *StDND1*, due to the pleiotropic phenotypes observed in the *Stdnd1* edited lines, was not a good candidate for application in agriculture.

Stchl1 mutations did not affect morphology or growth phenotype (Figure 2E). Tetra-allelic mutant plants showed a significant late blight resistance phenotype with reduced lesion sizes (Figure 1E), but no difference in the percentage of infected leaves (Table 3). This could indicate the importance of this protein is at the disease developmental stage and not in the initial phase. With a function as a *Phytophthora* effector target and transcription factor, and being involved in brassinosteroid hormone signalling and immune response to *P. infestans* (Turnbull et al. 2019), *StCHL1* has clear potential as an S-gene; possibly when combined with other S- or R-factors to improve pathogen resistance.

CRISPR/Cas9 was applied to knockdown both *StDMR6-1* and *StDMR6-2*. Tetra-allelic CRISPR/Cas9 knockdown of *StDMR6-1* showed a significant increase in resistance against *P. infestans* both as measured by infected lesion size and the percentage of infected leaves (Figure 1F, Table 3). This is in contrast to that of *Stdnd1* and *Stchl1* knockout plants, which only showed reduced infection lesion sizes (Figure 1 and Table 3), but no reduction in the percentage of infected leaves. In tomatoes, the CRISPR-Cas9 mediated mutation of the *StDMR6-1* ortholog *SIDMR6-1* showed increased resistance to *P. capsici* and *P. syringae* pv. tomato (De Toledo Thomazella et al. 2016), indicating broad-spectrum disease resistance function of DMR6-1. In potatoes, knockdown of *StDMR6* by RNAi increased late blight resistance without any documented effect on growth phenotype (Sun et al. 2016). However, only 33% of the RNAi lines showed an increased resistance phenotype (Sun et al. 2016). Tomatoes and potatoes each contain two DMR6 genes ((De Toledo Thomazella et al. 2016) Table 1). *StDMR6-2* and *StDMR6-1* transcripts are approximately 80% identical at the nucleotide level. Because these genes

are remarkably similar, RNAi may downregulate both, and therefore knock out of either gene by CRISPR-Cas9 is important for the elucidation of individual gene function.

Genome editing of *StDMR6-2* showed that this gene was not involved in susceptibility to *P. infestans* (Figure 1G and Table 3). Five tetra-allelic mutants in two potato backgrounds (Désirée and King Edward) showed the same infection lesion size and percentage of infected leaves as that of the wild type. De Toledo Thomazella et al. (2016) did not study tomato *SIDMR6-2* further because of the low expression during pathogen infection.

Comparing the DLA results of mutant lines with both wild type (Désirée and King Edward) and an R-gene containing a transgenic line (3R), we identified three genes (*StDND1*, *StCHL1*, and *StDMR6-1*) that when mutated, increased late blight resistance, whereas mutations in *StMLO1*, *StHDS*, *StTTM2*, and *StDMR6-2* did not affect late blight resistance in potatoes.

***DMR6-1* mutants had no obvious growth-related phenotypes**

StDMR6-1 is a promising S-gene because tetra-allelic mutants not only showed increased late blight resistance (Figure 1F and Table 3) but also did not differ in over-all growth phenotype compared with the wild type (Figure 2F). Measurement of plant height (Figure 3A), fresh weight (Figure 3B) and tuber morphology (Figure 3E) showed no differences between mutants and wild types. Plants mutated in the orthologous gene *SIDMR6-1* in tomatoes, showed disease resistance without any documented effects in growth and development under greenhouse conditions (De Toledo Thomazella et al. 2016). Therefore, *StDMR6-1* may be used in potato breeding to create new potato cultivars with broad-spectrum disease resistance.

Table 3: Percent of successfully infected leaflets in detached-leaf assay. Mut-1 to Mut-8 are mutant lines and correspond to the lines in Figure 1 (from left to right). Leaflets from 5-week-old plants were inoculated with 25 μ L 20000 sporangia/mL. Results were scored 7 dpi and a total of nine leaflets per line were used.

Gene\line	WT	Mut-1	Mut-2	Mut-3	Mut-4	Mut-5	Mut-6	Mut-7	Mut-8	3R
<i>StMLO1</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
<i>StHDS</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
<i>StTTM2</i>	100	100	100	100	100	100	NA	NA	NA	0
<i>StDND1</i>	100	100	67	0	89	78	89	100	67	0
<i>StCHL1</i>	100	87	100	67	100	100	100	100	78	0

StDMR6-1	100	44	33	33	11	33	22	22	44	0
StDMR6-2 (Desiree)	100	100	100	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0
StDMR6-2 (King Edward)	93	87	96	78	NA	NA	NA	NA	NA	0

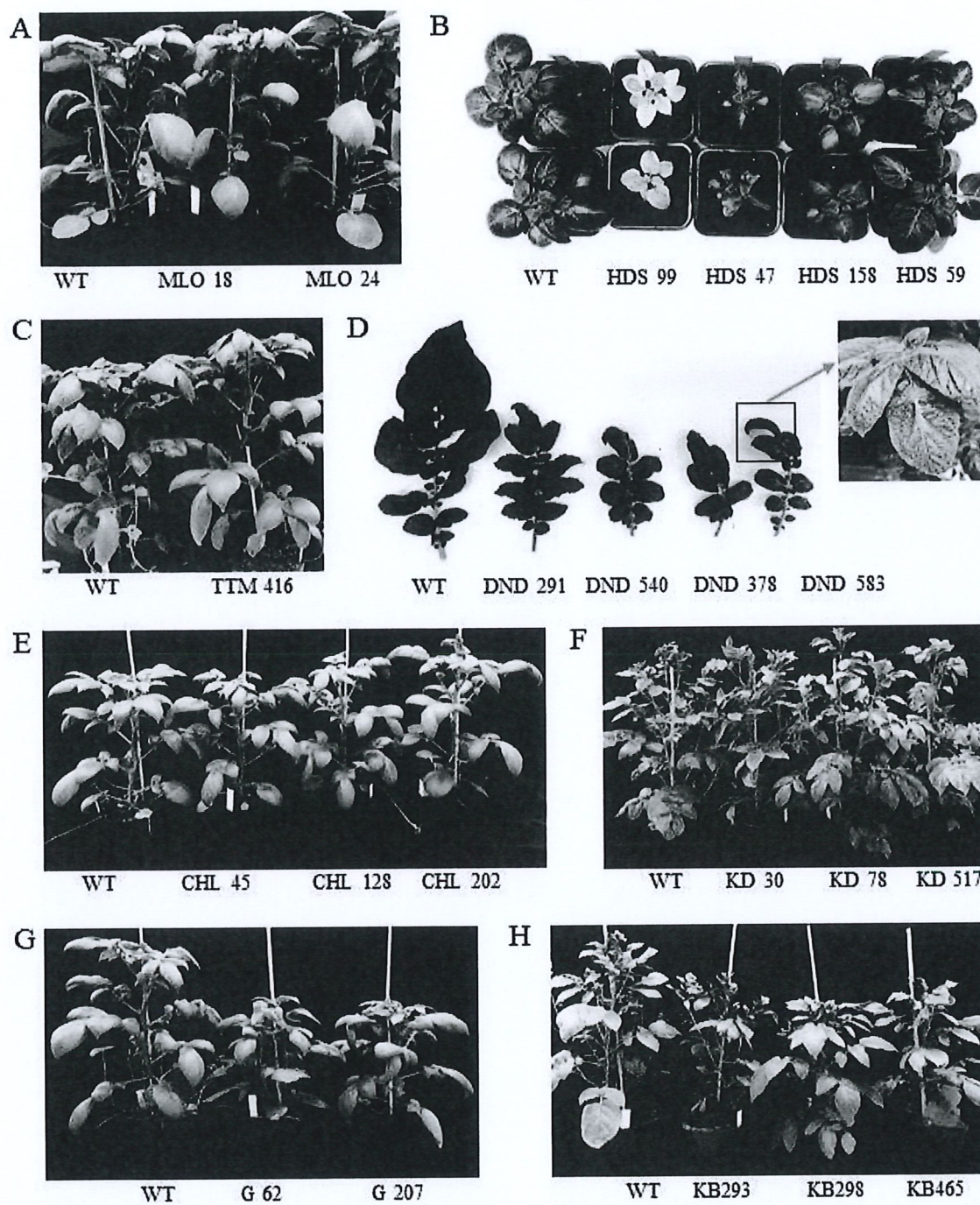


Figure 2: Phenotypes of mutant lines. A: *mlo* at 5-weeks old stage. B: Wild type *Désirée* and *hds* mutant lines at 2-weeks-old stage. C: Wild type *Désirée* and one *Stttm2* mutant line. D: Leaf phenotype of wild type and some *Stdnd1* mutant lines. E: *Désirée* and *Stchl1* mutant lines at 5 weeks old. F: Wild type King Edward and *Stdmr6-1* mutant lines at 5 weeks old. G: Five weeks old wild type *Désirée* and *Stdmr6-2* mutant lines. H: Wild type King Edward and *Stdmr6-2* mutant lines 5 weeks old.

***StDMR6-2* affect growth phenotypes in potato**

StDMR6-1 and its ortholog *SIDMR6-1* are important in pathogen susceptibility (Figure 1, (De Toledo Thomazella et al. 2016)) without any obvious growth phenotype (Figure 3). We investigate the effect of the genome editing of *StDMR6-2* on potato phenotype (Figure 2G and 2H and 3F). Our results did not show any changes in late blight resistance. Analysis of growth phenotype showed that tetra-allelic mutants of *StDMR6-2* had significantly lower plant height (Figure 3G) and fresh weight (Figure 3H) in both cultivar backgrounds. The plants had the same number of leaves as did the wild type, but their nodes were shorter (Figure 2G). Furthermore, the tuber eyes of *StDMR6-2* mutants did not have the reddish colour (anthocyanin) that is typical of King Edward (Figure 3F). Moreover, analysis of amino acid domain of *StDMR6-2* showed that *StDMR6-2* belonged to the 2-oxoglutarate (2OG)-Fe (II) oxygenase family proteins, which are well known for the regulation of secondary metabolism and plant hormones (Farrow and Facchini 2014). Therefore, we hypothesize that *StDMR6-2* may function in plant secondary metabolism (anthocyanidin) and may not be involved in late blight resistance. *StDMR6-1* and *StDMR6-2* share 80 % homology at the amino acid level. The nearest solved structure is ANTHOCYANIDIN SYNTHASE FROM ARABIDOPSIS THALIANA COMPLEXED with naringenin (<https://www.rcsb.org/structure/2brt>), which when superimposed with *StDMR6-1* or *StDMR6-2* yields reliability scores ((Nielsen et al. 2010); <http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) too low to allow for structure prediction/comparison, which could shed light on potential substrate/functionality differences between *StDMR6-1* and *StDMR6-2*.

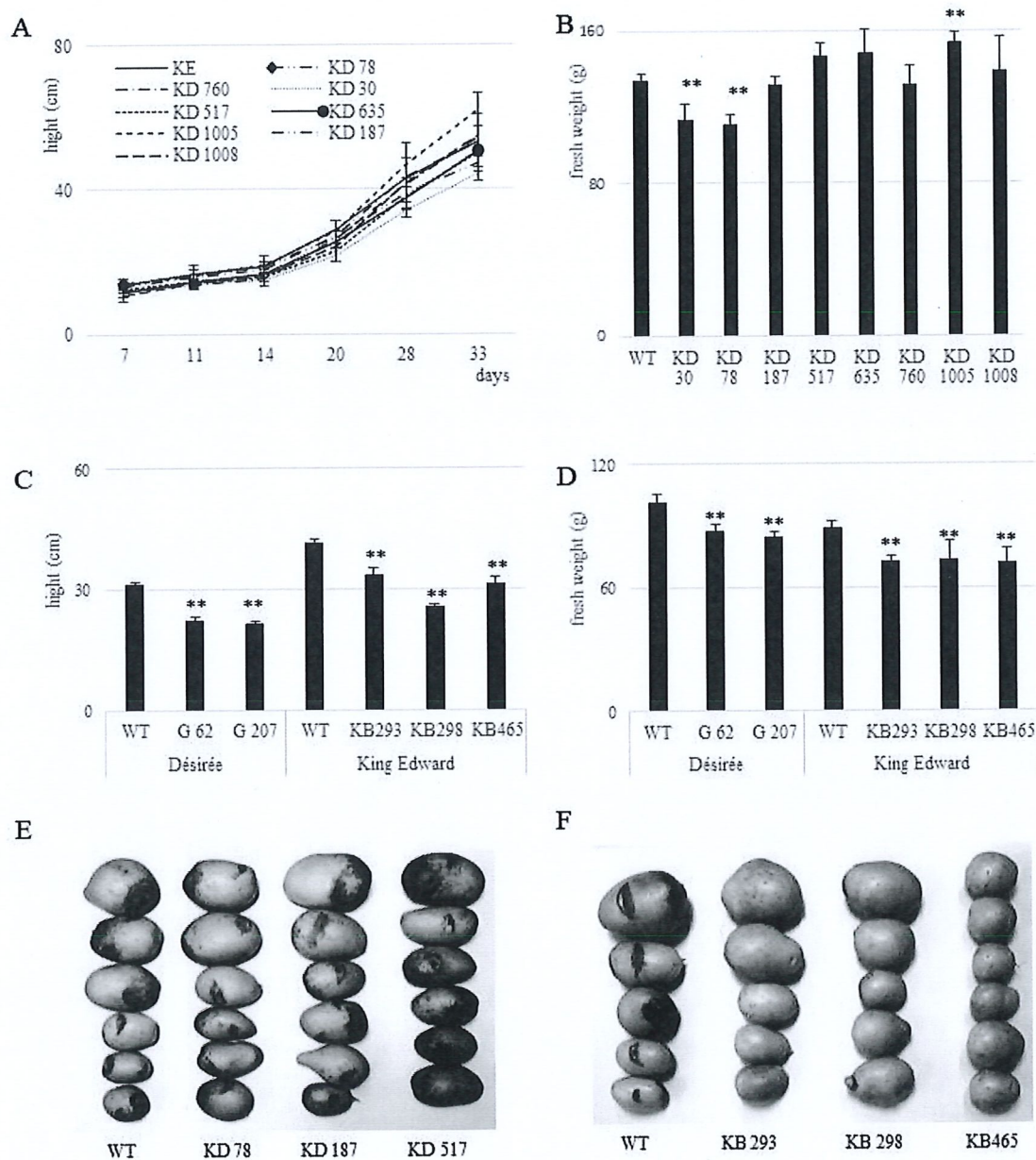


Figure 3: Growth phenotypes of *Stdmr6-1* and *Stdmr-2* mutant lines. A: Growth curve of wild type and *Stdmr-1* mutant lines. B: Fresh weight of 5-week-old wild type and *Stdmr6-1* mutant lines. C: Plant height of wild type and *Stdmr6-2* mutant lines. D: Fresh weight of 5-weeks-old wild type and *Stdmr6-2* mutant lines. E: Tuber morphology of King Edward wild type and its *Stdmr6-1* mutant lines. F: Tuber morphology of King Edward wild type and *Stdmr6-2* mutant lines. Error bars show standard variation and asterisks denote values significantly different from that of the wild type, student t-test (**: $p < 0.01$, $n=4$ for King Edward and $n=6$ for Désirée).

Conclusion

Using CRISPR-Cas9 mediated loss of gene function of seven putative S-genes, we showed that three putative S-genes (*StDND1*, *StCHL1*, and *StDMR6-1*) were involved in late blight susceptibility. Among these three, *StDMR6-1* and *StCHL1* emerged as promising S-gene targets for the breeding of new disease resistance cultivars because they did not show any growth phenotype. We also concluded that the pDIRECT_22C vector and the applied deletion screening system expressing two gRNAs for fast PCR mediated screening of full or partial allele knockout was highly efficient and applicable in potatoes. We have produced gene-edited material in popular cultivars that are ready for further tests in field trials.

Acknowledgements

This work was supported by research funds from The Swedish Foundation for Environmental Strategic Research (Mistra Biotech), The Novo Nordisk Foundation (NNF19OC0057208), The Swedish Research Council Formas (2015-442 and 2019-00512), CF Lundström (CF2019-0037), and the Swedish Farmer's Foundation for Agricultural Research (0-15-20-557). We appreciate Mia Mogren for the excellent technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Abreha KB, Alexandersson E, Vossen JH, et al (2015) Inoculation of transgenic resistant potato by *Phytophthora infestans* affects host plant choice of a generalist moth. *PLoS ONE* 10:2–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129815>
- Andersson M, Turesson H, Olsson N, et al (2018) Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiologia Plantarum* 164:378–384. <https://doi.org/10.1111/ppl.12731>
- Appiano M, Pavan S, Catalano D, et al (2015) Identification of candidate MLO powdery mildew susceptibility genes in cultivated Solanaceae and functional characterization of tobacco NtMLO1. *Transgenic Research* 24:847–858. <https://doi.org/10.1007/s11248-015-9878-4>
- Bengtsson T, Weighill D, Proux-Wéra E, et al (2014) Proteomics and transcriptomics of the BABA-induced resistance response in potato using a novel functional annotation approach. *BMC Genomics* 15:1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-315>
- Čermák T, Curtin SJ, Gil-Humanes J, et al (2017) A multi-purpose toolkit to enable advanced genome engineering in plants. *The Plant Cell* 29:tpc.00922.2016. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00922>
- Chen K, Wang Y, Zhang R, et al (2019) CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. *Annual Review of Plant Biology* 70:667–697. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100049>

- Chin K, Defalco TA, Moeder W, Yoshioka K (2013) The arabidopsis cyclic nucleotide-gated ion channels AtCNGC2 and AtCNGC4 work in the same signaling pathway to regulate pathogen defense and floral transition. *Plant Physiology* 163:611–624. <https://doi.org/10.1104/pp.113.225680>
- Clough SJ, Fengler KA, Yu IC, et al (2000) The Arabidopsis dnd1 “defense, no death” gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:9323–9328. <https://doi.org/10.1073/pnas.150005697>
- De Toledo Thomazella PD, Brail Q, Dahlbeck D, Staskawicz B (2016) CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *bioRxiv*. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.1101/064824>
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* 19:1991
- Engelhardt S, Stam R, Hüchelhoven R (2018) Good Riddance? Breaking Disease Susceptibility in the Era of New Breeding Technologies. *Agronomy*. <https://doi.org/10.3390/agronomy8070114>
- Eriksson D, Carlson-Nilsson U, Ortíz R, Andreasson E (2016) Overview and Breeding Strategies of Table Potato Production in Sweden and the Fennoscandian Region. *Potato Research* 59:279–294. <https://doi.org/10.1007/s11540-016-9328-6>
- Farrow SC, Facchini PJ (2014) Functional diversity of 2-oxoglutarate/Fe(II)-dependent dioxygenases in plant metabolism. *Frontiers in Plant Science* 5:1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00524>
- Fry W (2008) Phytophthora infestans: The plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* 9:385–402. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00465.x>
- Ghislain M, Byarugaba AA, Magembe E, et al (2019) Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnology Journal* 17:1119–1129. <https://doi.org/10.1111/pbi.13042>
- Gil MJ, Coego A, Mauch-Mani B, et al (2005) The Arabidopsis csb3 mutant reveals a regulatory link between salicylic acid-mediated disease resistance and the methyl-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Journal* 44:155–166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02517.x>
- Goth RW, Keane J (1997) A detached-leaf method to evaluate late blight resistance in potato and tomato. *Am J Potato Res* 74:347–352
- Gruner K, Esser T, Acevedo-Garcia J, et al (2020) Evidence for allele-specific levels of enhanced susceptibility of wheat mlo mutants to the hemibiotrophic fungal pathogen magnaporthe oryzae pv. Triticum. *Genes* 11:1–21. <https://doi.org/10.3390/genes11050517>
- Haeussler M, Schönig K, Eckert H, et al (2016) Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPOR. *Genome Biology* 17:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1012-2>
- Hameed A, Zaidi SS e. A, Shakir S, Mansoor S (2018) Applications of new breeding technologies for potato improvement. *Frontiers in Plant Science* 9:1–15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00925>
- Hodgson WA, Grainger PN (1964) Culture Of Phytophthora Infestans On Artificial Media Prepared

From Rye Seeds. *Can J Plant Sci* 44:853

- Hu T, Wang Y, Wang Q, et al (2019) The tomato 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase gene SIF3HL is critical for chilling stress tolerance. *Horticulture Research* 6:.
<https://doi.org/10.1038/s41438-019-0127-5>
- Johansen IE, Liu Y, Jørgensen B, et al (2019) High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato. *Scientific Reports* 9:1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>
- Kieu NP, Lenman M, Andreasson E (2020) Potato as a Model for Field Trials with Modified Gene Functions in Research and Translational Experiments in “*Solanum Tuberosum: Methods and Protocols*,” *Methods in. Springer, Berlin/Heidelberg, Germany*
- Kim DS, Hwang BK (2012) The pepper MLO gene, CaMLO2, is involved in the susceptibility cell-death response and bacterial and oomycete proliferation. *Plant Journal* 72:843–855.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12003>
- Koch M, Naumann M, Pawelzik E, et al (2019) The Importance of Nutrient Management for Potato Production Part II: Plant Nutrition and Tuber Quality. *Potato Research* 63:121–137.
<https://doi.org/10.1007/s11540-019-09430-3>
- Kusch S, Panstruga R (2017) Mlo-based resistance: An apparently universal “weapon” to defeat powdery mildew disease. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30:179–189
- Kusch S, Thiery S, Reinstädler A, et al (2019) Arabidopsis mlo3 mutant plants exhibit spontaneous callose deposition and signs of early leaf senescence. *Plant Molecular Biology* 101:21–40.
<https://doi.org/10.1007/s11103-019-00877-z>
- Le Fevre R, O’Boyle B, Moscou MJ, Schornack S (2016) Colonization of Barley by the Broad-Host Hemibiotrophic Pathogen *Phytophthora palmivora* Uncovers a Leaf Development–Dependent Involvement of Mlo . *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/mpmi-12-15-0276-r>
- Mekonen S, Tadesse T (2018) Effect of Varieties and Fungicides on Potato Late Blight (*Phytophthora infestans*, (Mont.) de Bary) Management. *Agrotechnology* 07:2–5.
<https://doi.org/10.4172/2168-9881.1000182>
- Nicolia A, Proux-Wéra E, Åhman I, et al (2015) Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *Journal of Biotechnology* 204:17–24.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.021>
- Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Petersen TN (2010) CPHmodels-3.0-remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic Acids Research* 38:576–581.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkq535>
- Park J, Bae S, Kim J (2015) Sequence analysis Cas-Designer : A web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics* 31:1–3. <https://doi.org/10.1101/005074>.Bae
- Pessina S (2016) Role of MLO genes in susceptibility to powdery mildew in apple and grapevine. Wageningen NL: Wageningen University
- Roman ML, Izarra M, Lindqvist-Kreuzer H, et al (2017) R/Avr gene expression study of Rpi-vnt1.1 transgenic potato resistant to the *Phytophthora infestans* clonal lineage EC-1. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 131:259–268. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1281-9>

- Sevestre F, Facon M, Wattebled F, Szydlowski N (2020) Facilitating gene editing in potato: a Single-Nucleotide Polymorphism (SNP) map of the *Solanum tuberosum* L. cv. Desiree genome. *Scientific Reports* 10:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58985-6>
- Srivastava V, Underwood JL, Zhao S (2017) Dual-targeting by CRISPR/Cas9 for precise excision of transgenes from rice genome. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 129:153–160. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1166-3>
- Sun K, van Tuinen A, van Kan JAL, et al (2017) Silencing of DND1 in potato and tomato impedes conidial germination, attachment and hyphal growth of *Botrytis cinerea*. *BMC plant biology* 17:235. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1184-2>
- Sun K, Wolters AMA, Vossen JH, et al (2016) Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance. *Transgenic Research* 25:731–742. <https://doi.org/10.1007/s11248-016-9964-2>
- Turnbull D, Wang H, Breen S, et al (2019) AVR2 targets BSL family members, which act as susceptibility factors to suppress host immunity. *Plant Physiology* 180:571–581. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01143>
- Turnbull D, Yang L, Naqvi S, et al (2017) RXLR Effector AVR2 Up-Regulates a Brassinosteroid-Responsive bHLH Transcription Factor to Suppress Immunity. *Plant Physiology* 14:356–369. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01804>
- Ung H, Karia P, Ebine K, et al (2017) Triphosphate tunnel metalloenzyme function in senescence highlights a biological diversification of this protein superfamily. *Plant Physiology* 175:473–485. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00700>
- Ung H, Moeder W, Yoshioka K (2014) Arabidopsis triphosphate tunnel metalloenzyme2 is a negative regulator of the salicylic acid-mediated feedback amplification loop for defense responses. *Plant Physiology* 166:1009–1021. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248757>
- Visser RGF (1991) Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens*
- Wang ES, Kieu NP, Lenman M, Andreasson E (2020) Tissue Culture and Refreshment Techniques for Improvement of Transformation in Local Tetraploid and Diploid Potato with Late Blight Resistance as an Example. *Plants* 9:. <https://doi.org/10.3390/plants9060695>
- Wang J, Liu C-J, Zhao J, et al (2017) S5H/DMR6 Encodes a Salicylic Acid 5-Hydroxylase That Fine-Tunes Salicylic Acid Homeostasis . *Plant Physiology*. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00695>
- Xiao Y, Savchenko T, Baidoo EEK, et al (2012) Retrograde signaling by the plastidial metabolite MEcPP regulates expression of nuclear stress-response genes. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.038>
- Yin K, Qiu JL (2019) Genome editing for plant disease resistance: Applications and perspectives. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 374:. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0322>
- Zaidi SS e. A, Mukhtar MS, Mansoor S (2018) Genome Editing: Targeting Susceptibility Genes for Plant Disease Resistance. *Trends in Biotechnology*
- Zhang L, Zhan X, Wang X, et al (2019) SEED CAROTENOID DEFICIENT functions in isoprenoid biosynthesis via the plastid MEP pathway. *Plant Physiology* 179:1723–1738. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01148>

Zhu S, Li Y, Vossen JH, et al (2012) Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. *Transgenic Research* 21:89–99.
<https://doi.org/10.1007/s11248-011-9510-1>

Supplementary material

*Figure S1: The phenotype of Stdnd1 mutant lines. A: The tetra-allelic deleted mutant showed a dwarf phenotype with growth in vivo. B: The heterozygous Stdnd1 mutant (DND 44, DND 82) did not have any effect on growth phenotype but only had auto-necrotic spots on older leaves. C: The tetra-allelic deleted mutant (DND 291) and the heterozygous Stdnd1 mutant (DND 44) showed different levels of resistance against *Phytophthora infestans*.*

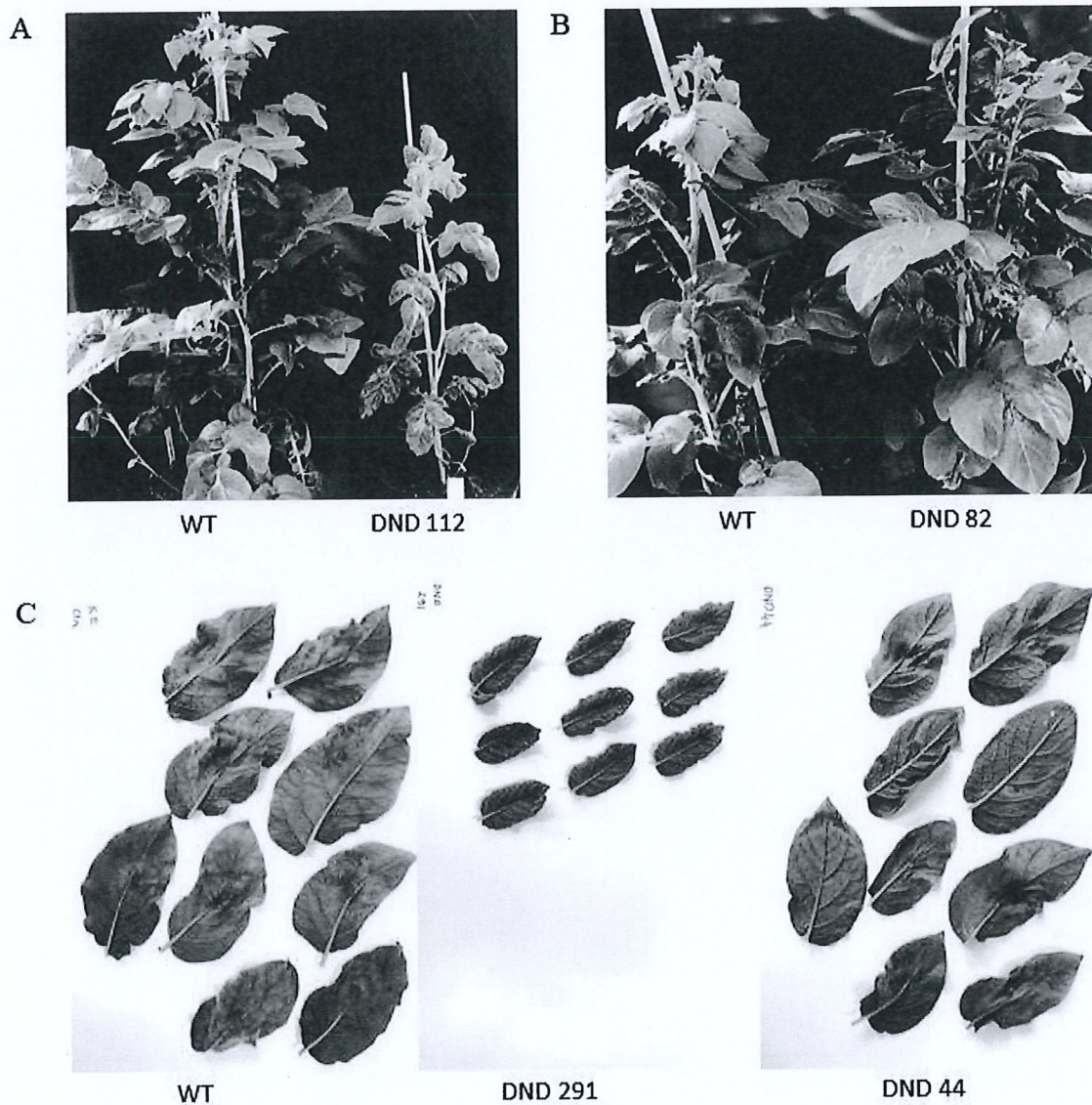


Table S1: Gene-specific primers used for amplification and sequencing of plant DNA, as well as screening of shoots. Primers specific for a potato housekeeping gene (*EF1 α*) and an *Agrobacterium* gene (*virG*) were used to confirm the absence of *Agrobacterium* in shoots (Wang et al, 2020). na: not applicable

Gene	Primer	Sequence	Primer	Sequence	PCR amplification and sequencing	PCR analysis of shoots		
						Tm	gDNA WT band, bp	Mutant band, bp
StMLO1	MLO_F3	AGGATTTAGAAAAGGGGAGACA	MLO_R3	CGTAATAAGTGAACAGGGGAGG		62	1271	681
StMLO1	MLO_F2	ACTCGTATCTTTGGGTGCCA	MLO_R2	ATGTCCGAGGAGATGCTTGA	x	58		
StMLO1	MLO_F3	AGGATTTAGAAAAGGGGAGACA	MLO_R1	TTTGTTTCCAAAAGTAAAATCTGA	x	58		
StHDS	HDS_F835	ACCATGGGAGCCTTTCAGA	HDS_R1087	TCCATCCTCACCTTACCAG		54	341	122
StHDS	HDS_F806	AAGTATGGACGTGCAATGCG	HDS_R1087	TCCATCCTCACCTTACCAG	x	58		
StHDS	HDS_F835	ACCATGGGAGCCTTTCAGA	StHDS_qPCR_Rev2	CTGAAGAAGTGTCCAATAC	x	58		
StTTM2	TTM_F3	CGACTTACAGACTATGATACATTGC	TTM_R2	ATGTGCAGTCTTGAGATCAGG		60	1330	280
StTTM2	TTM_F1	GCCTAAAGATACTAGTAATGGTGAATC	TTM_R2	ATGTGCAGTCTTGAGATCAGG	x	58		
StTTM2	TTM_F2	TCTTAAAGGACCAGGTTTCGAC	TTM_R1	TTTGATCGACTTGACATCC	x	58		
StDND1	DND_F1	ATCGCGTTAAGCCACTTG	DND_R2	GATTGACAAGAACATTGCAGC	x	60	590	410
StDND1	DND_F2	AGTGACACAGGTTGTGTTC	DND_R3	CGAAGACGATGATCATTATCC	x	58		
StDND1	DND_F2	AGTGACACAGGTTGTGTTC	DND_R2	GATTGACAAGAACATTGCAGC	x	58		
StCHL1	CHL_F1	AATGGAGGAAATGGAAGCAG	CHL_R4	CTTGAAGTTCTACTGCCTCTG		60	435	345
StCHL1	CHL_F1	AATGGAGGAAATGGAAGCAG	CHL_R3	AAGAATCATCCCCCTCTTCG	x	58		
StCHL1	CHL_F2	GCTTGAACGACAACCAGCTA	CHL_R2	TTATTGGCGCTCCTTTTGT	x	58		
StDMR6-1	DMR61_F1	ACTTAGGTTGCGGAGACCAA	DMR61_R1	TTACCTGAAAGACGATGGAT		54	409	237
StDMR6-1	DMR61_F2	CGAAAGTTATTTCCAGCGG	DMR61_R1	TTACCTGAAAGACGATGGAT	x	58		

StDMR6-1	DMR61_ F1	ACTTAGGTTGCGGAGACCAA	DMR61_ R2	CAACATCTGATACGATACACACTG T	x	58		
StDMR6-2	DMR62_ F1	AGCAACATTACTATTTGGAGG TTTC	DMR62_ R1	TTACCTGAAAGAAGGAGGATT		54	381	173
StDMR6-2	DMR62_ F2	CAAGTGTCTTTCCGGTGG	DMR62_ R1	TTACCTGAAAGAAGGAGGATT	x	58		
StDMR6-2	DMR62_ F1	AGCAACATTACTATTTGGAGG TTTC	DMR62_ R2	TACGCCGTGACAAAGCAA	x	58		
Potato EF1 α gene	St Ef1 α F2	GAAGTGTCCCTGTTGGTCGT	St Ef1 α R2	GGGTCATCCTTGGAGTTGA		58	220	na
Agrobacterium virG gene	VirG+	CGCACGCGCAAGGCAACC	VirG-	GCCGGGGCGAGACCATAGG		58	606	na

Natur og miljømæssig risikovurdering af skimmelresistent CRISPR-CAS kartoffel Ydun

Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug

Morten Strandberg

Institut for Ecoscience, Aarhus Universitet

Datablad

Titel:	Natur og miljømæssig risikovurdering af skimmelresistent CRISPR-CAS kartoffel Ydun.
Forfattere:	Seniorrådgiver Morten Strandberg, 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. Natur og miljømæssig risikovurdering af skimmelresistent CRISPR-CAS kartoffel Ydun. 8 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 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 forslåede risikohåndtering er fyldestgørende.

Baggrund

Ansøgningen er indsendt af Københavns Universitet og KMC Amba (Petersen og Feder 2023) og gælder forsøgsudsætning af skimmelresistent kartoffel med sortsnavnet Ydun. Formålet med ansøgningen er at teste Ydun-kartoffelens modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) under markforhold. 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 overlevelseshastighed. I risikovurderingen nedenfor er det derfor antaget at Ydun-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 ¾ af arealet med kartofler. Samtidig er kartofler med et belastningsindeks på 18,2 BI/ha den danske afgrøde med den højeste pesticidbelastning (Miljøstyrelsen 2022).

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, Ydun til omgivelserne
2. risiko for spredning af den Crispr-Cas modificerede kartoffel, Ydun til naturen
3. risiko for spredning af det modificerede gen fra Ydun kartoffelen til vilde slægtninge i Europa
4. risiko for miljø og natur i forbindelse med spredning af det modificerede gen fra Ydun kartoffelen 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 Ydun. 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 optræde invasivt i Danmark eller andre steder i verden vurderes ikke at adskille sig fra andre sorter af *Solanum tuberosum*. Derfor vurderes sandsynligheden for at der kan ske spredning med efterfølgende etablering i omgivelserne at være negligerbar, lige som det gælder for ikke modificerede kartofler (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, Nogle Stillehavsøer, Tyrkiet, Sydafrika m.fl. (CABI 2014). Der opfordres til at det ved dyrkning i sådanne områder 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 er ikke påvist 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 højst sandsynligt kun resultere i sterilt afkom. Risikoen for natur og miljø forbundet med sådan spredning af den skimmelresistente Crispr-Cas modificerede kartoffel vurderes på den baggrund at være negligerbar.

4. Spredning af gener fra Ydun 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 20m, blev der ikke fundet hybridfrø. Sandsynligheden for at der i forbindelse med forsøgsudsætningerne sker genspredning fra Ydun-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 for miljø forbundet med genspredning fra Ydun-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 skimmelresistente kartoffel Ydun vurderes derfor at være negligerbar. I forbindelse med den ansøgte forsøgsudsætning vurderes sandsynligheden for at Ydun kartoflerne spredes til naturen og etablerer sig der, at være negligerbar. Sandsynligheden for at modifikationen har ændret Ydun-kartoffelens kuldetolerance så den får en øget vinteroverlevelse, vurderes at være negligerbar, og der forventes derfor ikke nogen forskel på Ydun-kartoffelens overlevelsesmulighed i naturen i forhold til andre skimmelresistente kartofler. Forekomsten af genspredning til vilde slægtninge forekommer i praksis ikke. Effekterne på arter og natur af en eventuel 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 betydeligt fra dyrkning af konventionelle kartofler på et tilsvarende areal. Risikoen for miljøet forventes derfor heller ikke at adskille sig betydeligt fra den risiko for miljøet der er forbundet med dyrkning af konventionelle kartofler, og risikoen for en forøget miljøpåvirkning vurderes derfor at være negligerbar. Tværtimod vil dyrkning af skimmelresistente kartofler kunne medvirke til at nå målet om en 50% reduktion af pesticidforbruget i EU inden 2030 (European Commission 2020). Et svensk studie har for nylig vist at man ved information, hvor man fremviser marker og produkter, samt besvarer spørgsmål kan øge andelen af befolkningen der er positive over for transgene skimmelresistente kartofler (Bubolz et al 2022). Samtidig er skimmelresistente kartofler økonomisk attraktive for landbrugserhvervet, da besparelser på dyre bekæmpelsesmidler kan øge overskuddet ved kartoffeldyrkning. I Sverige er det estimeret at bekæmpelse af skimmel i kartofler udgør en udgift på ca. 3000 dkr/ha (Fagerström og Wibe 2011; Eriksson et al. 2016).

7. Den af ansøger foreslåede overvågning i forbindelse med forsøgsudsætningen vurderes at være tilstrækkeligt. Den foreslåede efterbehandling med gentagne harvninger året efter forsøget efterlader en lille sandsynlighed for at enkelte skimmelresistente Crispr-Cas kartofler overlever på arealet. Overvågning og fjernelse af disse i de følgende fire år vurderes at være tilstrækkelig til at sikre at sandsynligheden for spredning af kartofler efter forsøget er negligerbar.

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 fjerne oversete kartoffelknolde er tilstrækkelige til at minimere sandsynligheden for uønskede effekter på natur og miljø. Dette skyldes bl.a. 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 negligerbare.

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. Ved eventuel dyrkning vil der være mulighed for reduceret anvendelse af fungicider til bekæmpelse af kartoffelskimmel, hvilket medfører at påvirkningen af miljøet i og omkring dyrkningsstedet bliver mindre end ved tilsvarende dyrkning af kartofler som ikke er skimmelresistente. Endvidere vil anvendelse af skimmelresistente kartofler bidrage til EU's mål om at reducere pesticidforbruget, hvilket også vil spare landbruget for udgifter til fungicider.

I forbindelse med den specifikke forsøgsudsætning vurderes de af ansøger foreslåede tiltag for at hindre spredning af materiale fra Ydun-kartoflen at være tilstrækkelige til at sikre at sandsynligheden for at der sker en uønsket påvirkning af natur og miljø vil være negligerbar.

Det vurderes meget lidt sandsynligt at den pågældende modifikation til skimmelresistens vil medføre ændringer i kartoflens kuldetolerance. Dette udelukker dog ikke at spørgsmålet kan opstå i forbindelse med en eventuel markedsføring af Ydun-kartoflen.

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.
- Bubolz, J. Sleboda, P. Lehrman, A. Hansson, S-O. Lagerkvist, C.J. Andersson, B. Lenman, M. Resjö, S. Ghislain, M. Zahid, M.A. Kieu, N.P. Andreasson, E. 2022. Genetically modified (GM) late blight-resistant potato and consumer attitudes before and after a field visit. *GM Crops & Food* 13, 290-298.
- 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, W.J. 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
- Eriksson, D. Carlson-Nilsson, U. Ortiz, R. Andreasson, E. 2016. Overview and breeding strategies of table potato production in Sweden and the Fennoscandian Region. *Potato Res.* 59(3), 279–94.
- European Commission (EC), 2020. A farm to fork strategy for a fair, healthy and environmentally-friendly food system; https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-05/f2f_action-plan_2020_strategy-info_en.pdf
- FAOSTAT 2020. <https://www.potatonewstoday.com/2022/03/28/fao-updates-global-potato-statistics/>
- Fagerström, T. Wibe, S. 2011. Genvägar eller senvägar? Rapport till Expertgruppen för miljöstudier 2011:3, ISBN 978-91-38-23594-2
- Hansen, K. 1984. Dansk feltflora. Gyldendal.
- Hartvig, P. 2015. Atlas Flora Danica. Gyldendal, København.
- Kudsk, P. 2012. Notat vedrørende udarbejdelse af bekæmpelsesstrategi over for overvintrende genmodificerede kartofler. DCA notat.
- McPartlan, H.C. Dale, P.J. 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.
- Petersen, B.L. Feder, C. 2023. Ansøgning udsætning af CrisprCAS kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med forbedret modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*). GUDP-projekt: "KRISPS. Kartofler med Resistens og Innovativ Stivelse som Platform for Synergi mellem grøn og økonomisk bæredygtighed."
- 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 - resistance DTU -
2.docx

I forbindelse med at vi fra Landbrugsstyrelsen har modtaget to ansøgninger til forsøgsudsætning fra KMC har DTU, Fødevarerinstitutionen 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 Fødevarerinstitutionen 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 øget resistens overfor kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*)¹.

Kort beskrivelse af projektet.

Der ansøges om forsøgsudsætning af genetisk modificeret kartoffel med forbedret resistens mod kartoffelskimmel forårsaget af svampen *Phytophthora infestans*. Formålet med den genetiske ændring er at mindske tab i udbytte ved angreb af kartoffelskimmel og undgå (mindske) sprøjtning med pesticid. Formålet med den eksperimentelle udsætning er, at undersøge den forbedrede resistens over for kartoffelskimmel under markforhold.

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

Kartoffelplanterne vil bestå af flere linjer baseret på sorten Ydun og blive udsat fra potter.

Konstruktion

Ansøger beskriver at de har anvendt en CrisprCAS teknologi til at foretage målrettede mutationer i kartoflerne. Genet StDMR6-1 i Ydun, anvendes af skimmelsvampen som ”genkendelse” af planten og medvirker til infektionen af planten. Ved at indføre en målrettet mutation i alle generne

¹ ”Ansøgning udsætning af CrisprCAS kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med forbedret modstandskraft imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*)”

StDMR6-1 (kartoffel er tetraploid) ved brug af CrisprCAS teknikken, som bevirker at generne inaktiveres, bliver kartoflerne mindre modtagelige for kartoffelskimmel.

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. Efterfølgende har ansøger beskrevet mere detaljeret, at der er anvendt ”multiplex” editering hvor mutationerne er målrettet til to exons i det aktuelle gen (fire alleler).

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.

Ansøgningen vedrører i alt 8 forskellige linjer som er udvalgt til nærmere undersøgelse under dyrkningsforhold.

Ansøger beskriver en metode til kaldet IDAA (PCR Indel Detection Amplicon Analysis) som kan anvendes til påvisning af mutationerne og identifikation af kartoflerne. Kartofflerne er vist at være muteret i de aktuelle alleler hvor der kan forekomme lidt forskellige typer af mutationer herunder deletioner. Der foreligger ikke analyser for fravær af sekvenser fra det anvendte plasmid, hvilket kan opvejes af den høje grad af indeslutning.

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 overvintrer 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) 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