

Ansøgning om udsætning af stivelseskartoffel med CRISPR-Cas knockout af CBP-gen til undersøgelse af forbedret tolerance imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*)

Forår 2025.



Indhold

A. Generelle oplysninger	3
A.1. Anmelderens navn og adresse	3
A.2. De ansvarligere forskeres navne	3
A.3. Projektets titel	4
A.4. Udsætningen	4
A.5. Oplysninger om udsætningsstedet	5
B. Videnskabelige oplysninger	6
B.1. Oplysninger om recipientplanten eller - hvor det er relevant - forældreplanter	6
B.2. Molekylær karakterisering	9
a) Oplysninger om den genetiske modifikation	9
b) Oplysning om GMHP'erne	12
c) Konklusioner af den molekulære karakterisering	20
B.3. Oplysninger om specifikke risikoområder	21
a) Eventuelle ændringer i GMHP'ernes persistens	21
b) Eventuelle ændringer i GMHP'ernes evne... ..	21
c) Vekselvirkningsmekanisme mellem GMHP'erne og målorganismerne... ..	21
d) Potentielle ændringer i GMHP'ernes vekselvirkninger... ..	21
e) Potentielle ændringer i landbrugspraksis	21
f) Potentielle vekselvirkninger med det abiotiske miljø... ..	21
g) Oplysninger om enhver toksisk, allergenisk... ..	21
h) Konklusioner vedrørende de specifikke risikoområder	21
B.4. Oplysninger om kontrol, overvågning og efterbehandling- og affaldshåndteringsplaner	23
4.a. Trufne forholdsregler	23
4.b. Metoder til efterbehandling af stedet efter udsætning	23
4.c. Behandlingsmetoder, efter udsætning, herunder affald	24
4.d. Overvågningsplaner og teknikker	25
4.e. Beredskabsplaner	25
4.f. Metoder og procedurer til beskyttelse af stedet	25
B.5. Beskrivelse af teknikker til påvisning og identifikation af GMHP'erne	26
B.6. Oplysninger om tidligere udsætninger af GMHP'erne	27
Underskrift	28
Bilag:	29



Ansøgning om udsætning af stivelseskartoffel med CRISPR-Cas knockout af CBP-gen til undersøgelse af forbedret tolerance imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*)

A. Generelle oplysninger

A.1. Anmelderens navn og adresse

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

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

A.2. De ansvarligere forskeres navne

Bent L. Petersen, Indtil 31.12.2024, Associated prof, PhD, ved PLEN-KU, fra 01.01.2025 Research Scientist, KMC, med arbejdsplads på KU-PLEN og forventet snarlig fuld adjungering til KU-PLEN. Gruppeleder, > 25 års erfaring i Plante genetik med anvendelsesområder omfattende forædling af kulhydrat polymerer, herunder stivelse, resistens forædling samt kulhydrater påsat terapeutiske proteiner for mhp ny funktionalitet. Særligt fokus sidste 8 år: stivelses- og resistensforædling i kartofler ved brug af gen-saksen CRISPR-Cas.

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

Christian Feder, Cand.agro og Agrochef hos KMC Amba. 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 Field Trials, Hjermvej 94, 7560 Hjerm.



A.3. Projektets titel

Stivelseskartoffel med CRISPR-Cas CBP-gen knockout til undersøgelse af forbedret tolerance imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*).

A.4. Udsætningen

A.4.a. Formålet med udsætningen

Undersøge muligheden for at reducere anvendelse af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) i kartoffel.
Forsøget vil bestå af delvist ubehandlede og/eller delvist behandlede parceller.

A.4.b. Udsætningens startdato og varighed.

Udsætning sker i perioden 01. april – 31. maj 2025 og høst i perioden 1. september – 30. oktober 2025.

A.4.c. Udsætningsmetode

Kartoffelknolde håndlægges i rækker og dækkes med kartoffelkamme (hyppes), og/eller der udplantes pottedyrkede kartoffelplanter, som sættes i en færdighyppet kam.

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

Forår:

Marken er pløjet og/eller harvet op inden lægning af kartoffelknolde/udplantning af pottedyrkede kartoffelplanter.

Under (udsætningen) væksten:

Normal behandling mod ukrudt, skadedyr og sygdomsbekæmpelse imod andre svampesygdomme end kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*). Forsøget vil bestå af delvist ubehandlede og/eller delvist behandlede parceller mod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*).
Planterne vil løbende blive vandet efter behov.

Høst (optagning):

Høst af de CRISPR-Cas editerede planter vil foregå ved en rodunderskæring og løsning af kammen, efterfulgt af håndopgravning og opsamling samt vejning i marken.

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

De høstede knolde forarbejdes til kartoffelmel på KMCs GMO godkendte laboratorium i Brande.



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 markbloksnummer 500207-20.

Området, der vil blive tilplantet med CRISPR-Cas editerede kartoffel, vil være 50-500 m² brutto og 40-400 m² netto.

Forskel mellem brutto og netto areal 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 de CRISPR-Cas editerede planter. 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

Fredskov: min. 15 meter





B. Videnskabelige oplysninger

B.1. Oplysninger om recipientplanten eller - hvor det er relevant - forældreplanter

B.1.a. Fuldstændigt navn

Taxonomi	Latinske navn
i) Familie	<i>Solanaceae</i>
ii) Slægt	<i>Solanum</i>
iii) Art	<i>Solanum tuberosum</i>
iv) Underart	<i>Tuberosum</i>
v) Kultivar	Ydun
vi) 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".

Langt de fleste kommercielle kartoffel kultivarer (sorter), som fx Ydun, Kuras og Desiree, er tetraploide, hvilket vil sige at der er fire kopier (kaldet alleler) af hvert gen i kartofflens genom.

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 rodunderskåret og jordløsnet, efterfulgt af håndopgravning og opsamling, 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 spille små knolde, som kan give ny vækst året efter. Derfor vælges den manuelle håndopgravning og opsamling, 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-modtagelighedsgen, der i planten bremser plantens forsvar overfor patogenet – snarere tværtimod. Pathogenet udnytter plantens funktionelle modtagelighedsgen 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.

Kartoflen 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.



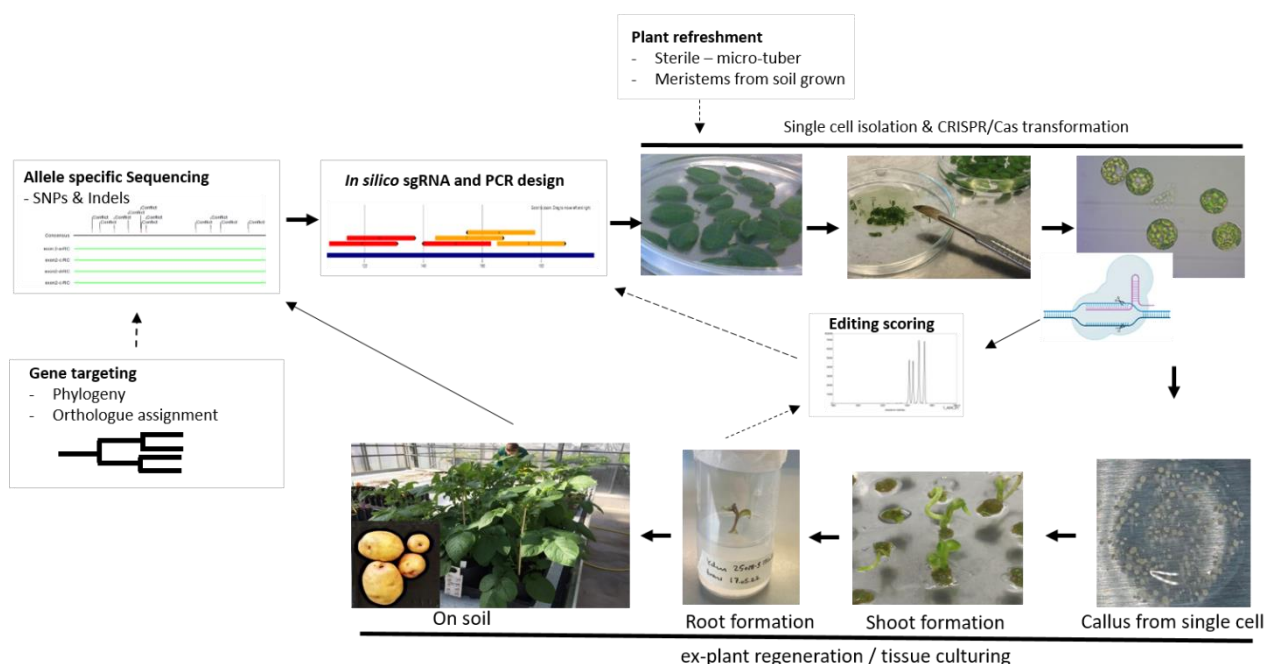
B.2. Molekylær karakterisering

a) Oplysninger om den genetiske modifikation

i) Beskrivelse af de metoder der er anvendt

Opsummering af enkelt celle gen editering og ex-plante regenerering i tetraploid kartoffel

Hele protokollen fra protoplast isolering & Ribonucleoprotein (RNP) transformation til ex-plante regenerering er detaljeret publiceret i 'Carlsen et al 2024, Strategies and Protocols for Optimized Genome Editing in Potato', s. 9-12). Med udgangspunkt i Figur 2 i 'Carlsen et al 2024', er protokoller og workflow endvidere opsummeret i Figur 1 nedenfor.



Figur 1. CRISPR-Cas gen editering. Workflow, fra enkeltcellet CRISPR-Cas gen editering til ex-plante regenerering i tetraploide kartofler, involverer: (i) fuld allel karakterisering af mål regionen på genomet; (ii) sgRNA og diagnostisk PCR-editering scorings design; (iii) isolering af protoplaster fra blade og polyethylenglycol (PEG) medieret transformation; (iv) optimering af editerings effektivitet via robust 'high-throughput editing scoring', ved brug af Indel Detection of Amplicon Analysis (IDAA) eller sekventering (nano-pore, Illumina eller Sanger), for udvælgelse af høj effektive sgRNA(er); (v) isolering af og ex-plante regenerering fra enkelt editerede protoplast celler. Alle trin (*in silico* og *in vitro*) bidrager til vellykket og effektiv gen editering. Når trin (i) og til (ii) er udført, kan optimering af editering i målgenet starte. Høj editeringseffektivitet opnås ved at teste flere sgRNA'er på protoplast pool niveau, og udvælge de(n) bedste, hvilket især i 'multiplex settings' vil øge frekvensen af ønskede editerede ex-planter samt begrænse det ofte omfattende celle kultur arbejde. Yderlige input til de centrale arbejdsgange kan inkludere en ofte ikke-trivielt korrekt udvælgelse af otologe mål gen(er) samt vedligehold / etablering af 'frisk' plante materiale. Valgfri input og potentielle iterationer er angivet med stiplede pile. Tykke pile angiver centrale arbejdsgange, hvorimod tyndere pile angiver yderligere arbejdsgange.

De CRISPR-Cas editerede kartofler er fremstillet efter vores tidligere publicerede protokol (Johansen et al 2019), samt beskrevet herunder 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 editerede enkelt planter. Kun de tilsigtede målrettede



ændringer vil derfor være i fokus og relevante ift. fremtidige godkendelsesprocedurer af de CRISPR-Cas editerede planter (se endv Figur 1).

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 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. Carlsen et al 2024).

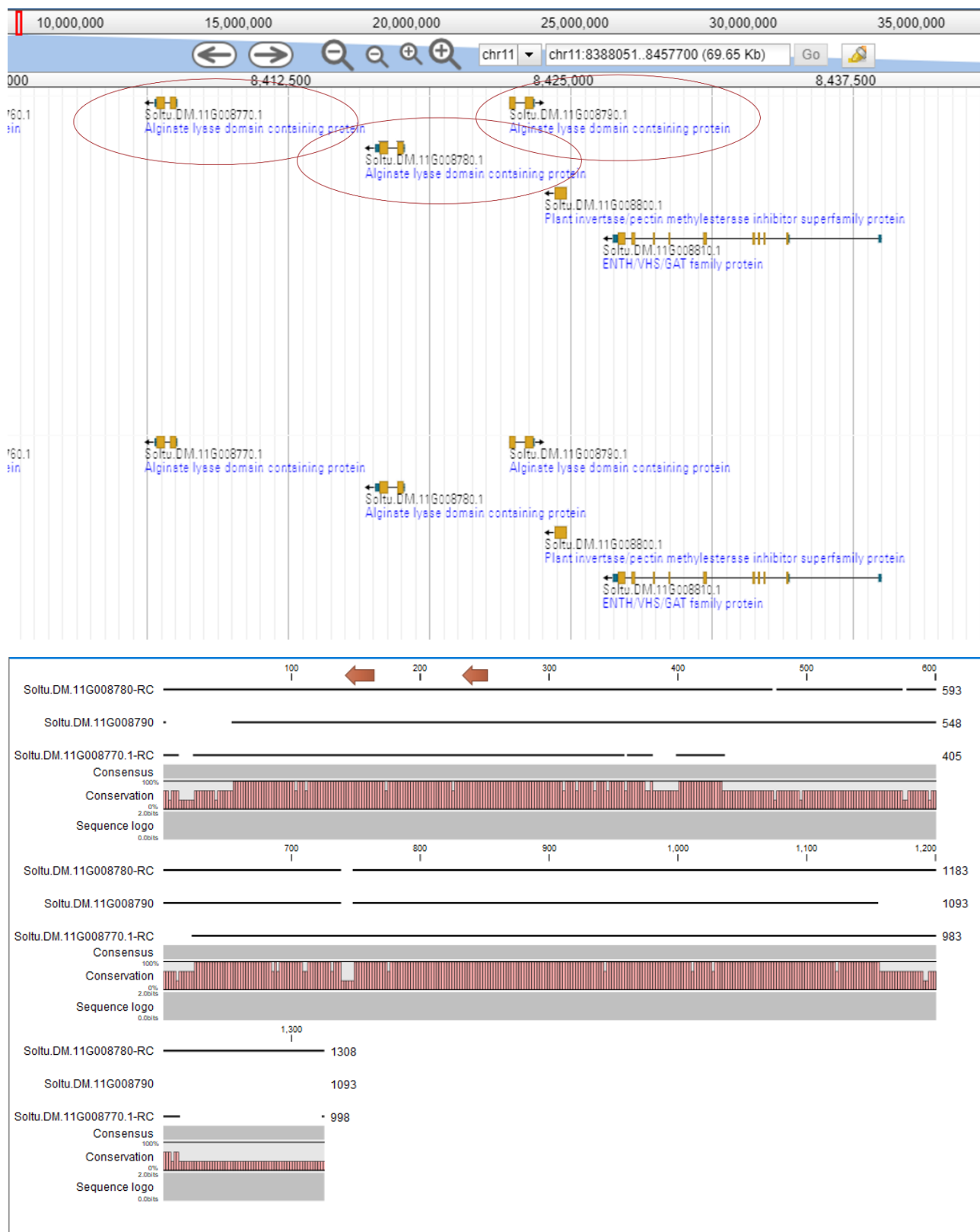
De regenererede planter er efterfølgende flyttet til et hormonfrit Murashige and Skoog medium. Screeningen af planterne blev udført og i alt blev 4 KO plante-linjer, linje 3, 9, 10 og 11, med formodet fuld allel editing, identificeret og karakteriseret ved sekventering, ved brug af long read sequencing, og allel specifikke mutationer blev identificeret. Linje 3, 9, 10 og 11 er udvalgt til markforsøg.

De CRISPR-Cas editerede kartofler – målgener og karakteristik

De CRISPR-Cas editerede kartofler er fremstillet på Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C.

Der er ved brug af CRISPR-Cas teknologien frembragt små målrettede mutationer i et modtageligheds gen (eng: susceptibility (S) gene), her i genet Citrate Binding Protein (*StCBP*), i sorten Ydun. I modsætning til *S*-gen DMR6-1 genproduktet, der forefindes inde i plante cellen, forefindes *StCBP* genproduktet udenfor plante cellen (kaldet apoplasten). Som led i infektionen af planten, formodes patogenet, herunder skimmel, at hijacke/opregulere produktionen af *StCBP* genproduktet, der sekvestrerer/binder citrate udenfor cellen (apoplasten), som har betydning for patogenets næringsstofoptagelse og stofskifte og som er involveret i planteforsvarsmekanismer. Ved Knock Out af *StCBP* genet reduceres 'nærings-kilde' og 'bremsen på immunsystemet', inkl. patogenets mulighed for at styre reguleringen af genet, så planten derved forventes at blive mindre modtagelig overfor fx skimmelen. Det forventes derfor, at forbruget af svampemidler til kontrol af skimlen på sigt vil kunne reduceres.

Planter af linjerne 3, 9, 10 og 11 er karakteriseret ved brug af long read sequencing (Eurofins), <https://www.eurofins.se/>), baseret på nanopore- teknologien, og allel specifikke mutationer er identificeret (se nedenfor) og er efterfølgende samlet og analyseret af Aalborg Universitet, ved PI kartoffel genomics ekspert Professor Kåre Lehmann Nielsen.



Figur 2. Nukleotid alignment af exon 1, intron og exon 2 af Soltu.DM.11G008770.1; Soltu.DM.11G008780.1; Soltu.DM.11G008790.1, der har >93% nt identitet. Pile angiver sgRNA 1 (Sg 1; venstre) og sgRNA 2 (Sg 2, højre).



De to såkaldte "True guide™ gRNA", Sg 1 (ATGGGAGTGAAACCATCAGT) og Sg 2 (TTTGTGTACTCCATCAATGA) og Cas9 proteinet ("TrueCut™"), er alle fra Invitrogen. Da TrueCut/Tru guide (Sg 1) og TrueCut/ Tru guide (Sg 2) er transformeret ind samtidigt i protoplast cellerne, er der tale om multipel / 'multiplex' i editering mhp at generere en deletion i de tre CBP gener.

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

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

Der er tre meget homologe CBP gener (Soltu.DM.11G008770.1; Soltu.DM.11G008780.1; Soltu.DM.11G008790.1) på kartoffel genomet (SPUD, doubled monoploid *S. tuberosum* Group Phureja; <http://spudadb.uga.edu/>), der genfindes i Ydun med > 93 % identitet på nukleotid (nt) niveau (kodende dele (exons)). Vi har anvendt sgRNA1 og sgRNA2, der begge 'targeter' nt sekvenser med 100% identitet (i alle alleler) i Exon 1.

Der er designet to gRNA'er (sg1 (ATGGGAGTGAAACCATCAGT) og Sg2 (TTTGTGTACTCCATCAATGA)) til, ved samtidig brug (multiplexing), at generere mutationer af ca. 90 bp deletion i exon 1 af CBP, dersom Sg 1 og Sg2 har virket optimalt (se genmodel ovenfor).

ii) Oplysninger om faktisk indsatte/deleterede sekvenser

Sekvens data for linje 3, 9, 10 og 11

gDNA fra linjerne er blevet sekventeret ved brug af long read sequencing technology (nano-pore), og sekvenser er efterfølgende samlet og analyseret af Aalborg Universitet, ved PI kartoffel genomics ekspert Professor Kåre Lehmann Nielsen.

Vedrørende Figur 3-6:

Sekvensen middelbart under de enkelte reads er referencesekvensen fra Soltu.DM.11G008770. Reads herunder repræsenterer enkelte Oxford Nanopore lange DNA-reads (svarende til kontinuerlige strækninger/reads af en DNA-streng). Grøn er reads i forward orientering og rød er reads i reverse orientering. 'Shaded' reads mapper ikke i dette område og er ikke umiddelbart relevante for analysen. Tilfældige sekvensfejl følger af den anvendte teknologi og observeres én gang, hvorimod allelvarianter vil fremstå som polymorfier, der observeres i sekvenslæsninger /reads flere gange, fordi samlinger af individuelle DNA-molekyler langt overskrider antallet af allel-varianter, men er langt lavere end det mulige antal forskellige sekvensfejl. Derfor rekonstruerer gruppering af polymorfi observeret flere gange den underliggende allelstruktur af den sekventerede linje. Sammenligning med den genetiske baggrundslinje (wt) tillader identifikation af editerede linjer. Det er væsentligt at pointere, at de tre gener er meget



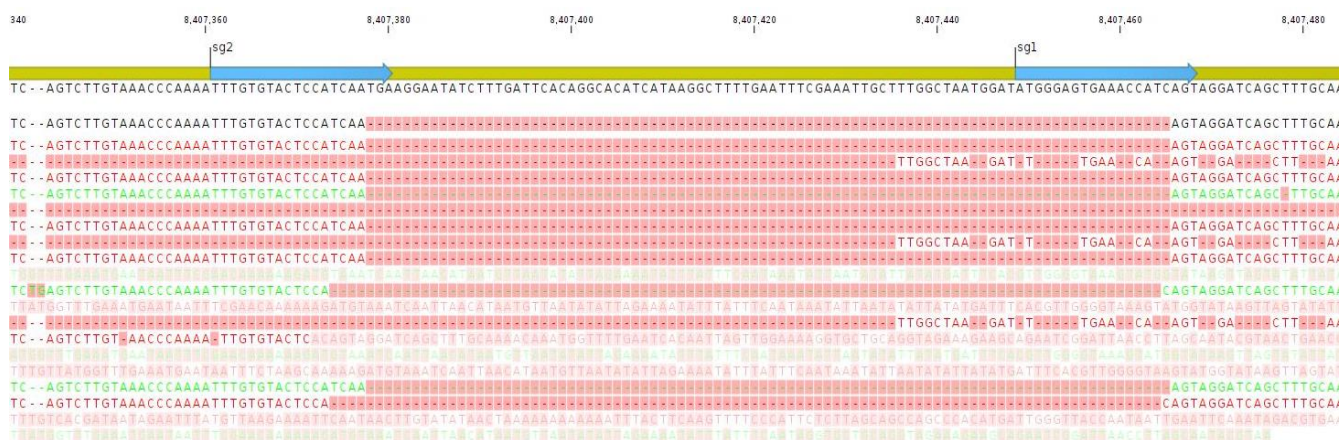
homologe i den viste region og adskiller sig kun med få nukleotider. Derfor er loci-specifik reads-kortlægning afhængig af dele af de lange DNA-reads, der mappes ihht til heterologe flankerende områder (ikke vist på figurer).

Ved anvendelse af to sgRNAs, har CRISPR Kartoffel gruppen ved KU-PLEN og AAU gennem årene erfaret, at kartoffel hyppigt (gen)indsætter det deleterede (udskårne) genom fragment, eller permutationer af dette, igen under reparation af DNA enderne. Ved større insertions, fx > 10 bp, er der generelt tale om genindsættelse af udskårne kartoffel genom fragmenter.

'-' angiver deleteret nukleotid fra RNP-Sg 1 og / eller RNP-Sg-2, grøn angiver sekventering af den ene DNA streng, mens rød angiver sekventering af den anden DNA streng.

Specifikt for de enkelte linjer med tilhørende figur.

Soltu.DM.11G008770.1

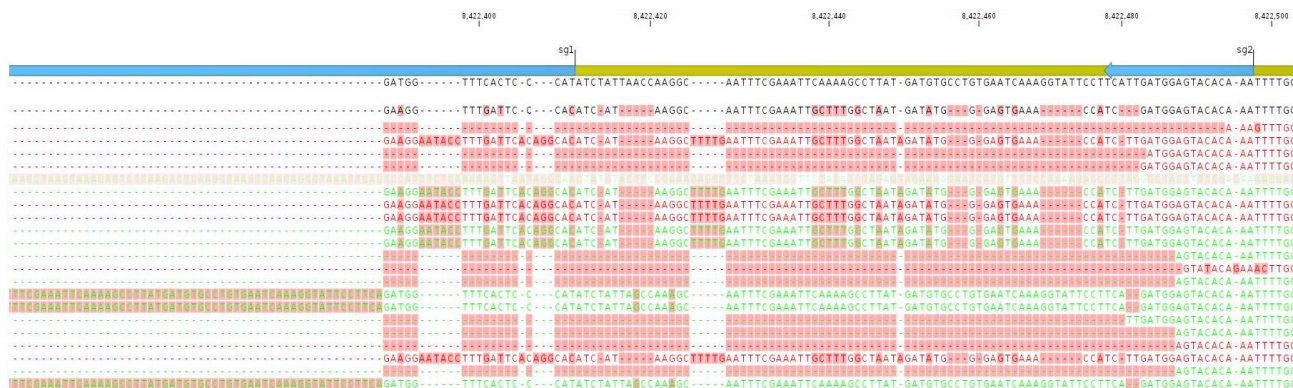


Soltu.DM.11G008780.1





Soltu.DM.11G008790.1



Figur 3. Linje 3 (Ydun).

Soltu.DM.11G008770.1: Der observeres ingen reads, der sammenlignet med referencesekvensen, mappes til de loci, der ikke indeholder en deletion. Tre forskellige varianter er observeret: delta(8407378-8407463) observeret i 7 ud af 13 reads; og delta(8407374-8407462) observeret i 2 af 13 reads og derefter en allel, der stammer fra den genetiske baggrund (WT), som bærer en større deletion og ikke indeholder hverken sg2 eller sg1 - derfor kan editering i denne allel ikke forventes, hvilket er observeret i 3 af 13 tilfælde. Et enkelt tilfælde viser også et read, hvor hele regionen er deleteret. Dette er kun observeret én gang, og vi mener, at dette er en sekventerings-/mappings artefakt, og under alle omstændigheder ville tilstedeværelsen af en sådan allel ikke give anledning til et funktionelt protein. Hvis ser bort fra den sidste read, er det observerede i overensstemmelse med følgende allelstruktur: 2x) delta(8407378-8407463)/1x og (8407374-8407462)/1x inaktiv wt-allel. Alle varianter forventes at være KO's.

Soltu.DM.11G008780.1: Der observeres ingen reads, der mapper til de loci, der ikke indeholder en deletion sammenlignet med referencesekvensen. Tre forskellige varianter observeres mere end én gang. Delta(8417440-8417525) i 5 ud af 11 læsninger, delta(8417440-ud over region) i 3 af 11 læsninger og delta(8417437-8417525) i 3 af 11 tilfælde. Dette stemmer overens med følgende allelstruktur: 2x delta(8417440-8417525)/1x delta(8417440-ud over region)/1x delta(8417437-8417525). Alle varianter forventes at være KO's.

Soltu.DM.11G008790.1: Fire varianter er observeret mere end én gang. 7 af 17 reads observeret mere end én gang understøtter en allel med to insertioner i sg1. Denne allel er ikke blevet redigeret i dette 'site', men der observeres en enkelt nt frame shifting deletion ved den kanoniske position i sg2 (8422480). 5 af 17 reads indeholder delta (ud over region-8422485). 3 af 17 reads indeholder en 2 nt frameshifting-deletion ved sg2. To reads understøtter en deletion uden for regionen ved 8422482 (eller 3). Selvom det ikke er muligt at afgøre, om deletionerne ender præcist ved 8422482 eller 3 ud fra disse data, peger de samstemmende på en tilstedeværelsen af en stor deletion, som vil destruere allel-funktion. Samlet set er dette i overensstemmelse med 1x tilstedeværelsen af alle fire varianter. Alle varianter forventes at være KO's.



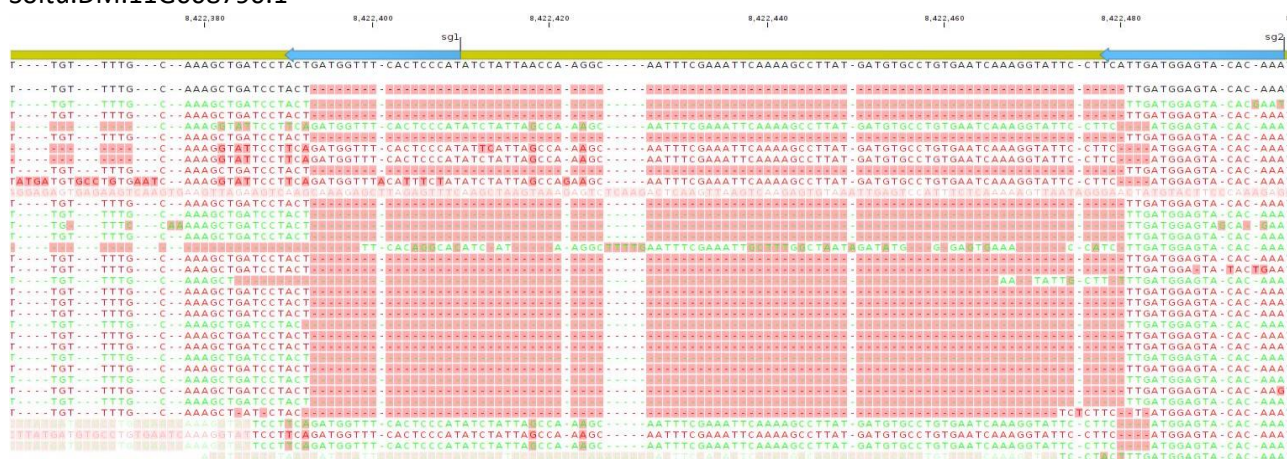
Soltu.DM.11G008770.1



Soltu.DM.11G008780.1



Soltu.DM.11G008790.1





Figur 4. Linje 9 (Ydun):

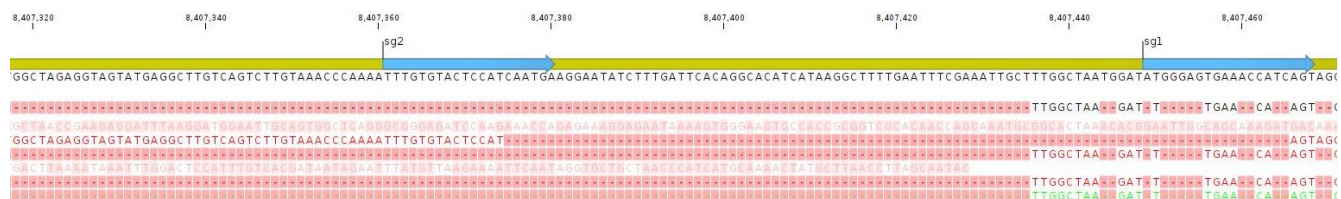
Soltu.DM.11G008770.1: Der observeres ingen reads, der mapper til loci, der ikke indeholder en deletion. Derfor forventes ingen funktionelle alleler at være til stede. 8 reads har en deletion, der strækker sig forbi sg2; 6 reads indeholder delta(8407376-8407465); 2 reads indeholder delta (8407372-8407465) og yderligere 3 reads indeholder delta (8407336-beyond region). I alt observeres 19 read varianter mere end én gang. I overensstemmelse med en allelstruktur på 1x af hver variant. Alle varianter forventes at være KO's.

Soltu.DM.11G008780.1: Der observeres ingen reads mere end én gang, der ikke indeholder en deletion. 11 reads supporterer delta(8417334-8417525); 6 reads supporterer delta(8417338-8417525) og 2 reads supporterer delta(8417521-8417524). I alt er 19 read varianter observeret mere end én gang. Dette stemmer overens med en allelstruktur på 2x delta(8417334-8417525)/1x delta(8417338-8417525)/1x delta(8417521-8417524). Alle varianter forventes at være KO's.

Soltu.DM.11G008790.1: Der observeres ingen reads, der mapper til de loci, der ikke indeholder en deletion. Kun to varianter er observeret mere end én gang. 7 reads supporterer delta(8422480-8422483); 22 reads supporterer delta(8422393-8422480). Dette stemmer overens med en allelstruktur på 3x delta(8422393-8422480)/1x delta(8422480-8422483). Alle varianter forventes at være KO's.



Soltu.DM.11G008770.1



Soltu.DM.11G008780.1



Soltu.DM.11G008790.1



Figur 5. Linje 10 (Ydun):

Soltu.DM.11G008770.1: Der var relativ lav 'cover age' for denne analyse. Ikke desto mindre observeres der ingen reads, der ikke indeholder en deletion. Der blev ikke fundet evidens for baggrundsalleler. 4 af 4 reads understøtter den samme deletion, delta(ud over sg2-8407435). Alle varianter forventes at være KO's.

Soltu.DM.11G008780.1: Der observeres ingen reads mere end én gang, der ikke indeholder en deletion. To varianter observeres mere end én gang. 6 reads supporterer delta(8417438-8417525). 4 reads supporterer delta(8417434-8417525). I alt understøtter 10 read varianter mere end én gang. Dette stemmer overens med en allelstruktur på 2x delta(8417438-8417525)/2x delta(8417434-8417525). Alle varianter forventes at være KO's.

Soltu.DM.11G008790.1: Der observeres ingen reads mere end én gang, der ikke indeholder en deletion. 1 read indeholder en 4 bp rammeskiftende deletion ved sg2 og 10 reads indeholder delta(8422393-8422480). Den relativt lave read-dækning i denne region tillader os ikke at konkludere, om allelstrukturen er 1xdelta(sg2)/3xdelta(8422393-8422480) eller homozygot for delta(8422393-8422480). Men i begge tilfælde forventes alle observerede varianter at være KO's.



Soltu.DM.11G008790.1



Figur 6. Linje 11 (Ydun):

Soltu.DM.11G008770.1: Der observeres ingen reads, der ikke indeholder en deletion. Imidlertid giver to små deletioner ikke læse rammeskift, og vi kan ikke konkludere, at proteinaktivitet er destrueret i disse tilfælde. 8 reads understøtter et stort deleterings-delta (ud over sg2-8407355); 5 reads supporterer delta(8407460-8407465); 12 reads delta(7407462-8407464) og 5 reads en frameshifting 1bp deletion ved nt 8407665. Dette er sandsynligvis en allelstruktur med 1x af hver af de observerede varianter. 2 incidenter forventes at være KO's og 2 incidenter kan være KO's.

Soltu.DM.11G008780.1: 4 reads understøtter et dobbelt deletions-delta(8417434-8417438;8417523-8417525); 5 reads supporterer delta(8417434-8417438); 10 reads supporterer delta(8417520-beyond sg1) og 8 reads supporterer delta(8417526-'beyond sg1'). 29 reads understøtter varianter observeret mere end én gang. Samlet set er dette i overensstemmelse med en allelstruktur med 1x af hver variant. Alle varianter forventes at være KO's.

Soltu.DM.11G008790.1: 11 reads understøtter delta(8422480-8422483); 6 reads understøtter delta(8422481-8422483); 7 reads understøtter delta (ud over sg1-8422480). Samlet set understøtter 24 reads varianter, der er observeret mere end én gang, og dette stemmer overens med en allelstruktur på 2x delta(8422480-8422483)/1x delta(8422481-8422483)/1x delta(ud over sg1-8422480). Alle varianter forventes at være KO's.

Plante resistens markør(er) er ikke relevant da kun DNA fri RNP-komplekser har indgået i 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 editerings processen.

iii) Dele af Planten, hvori insertet udtrykkes

Ikke relevant, da der ikke er tale om indsættelse af DNA, og der ikke 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 overvejende 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. I de udvalgte linjer ser vi editering i alle 4 alleler ved long read (nano pore) sekvens analyse i de tre CBP gener. Linjerne 3, 9, 10 og 11 udviser fuld knock out / tab af CBP gene funktion i alle tre CBP gener.

Den ovenfor beskrevne målrettede mutations analyse allel specifik long-read sekventering vil påvise, hvorvidt mutationen forefindes i det analyserede materiale.

De allel specifikke sekvensanalyser (Long read sequencing) af de 4 linjer med KO alle fire alleler 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

Metode:

Carlsen FM, Westberg I, Johansen IE, Andreasson E, **Petersen BL** (2024) Strategies and Protocols for Optimized Genome Editing in Potato. The CRISPR journal. DOI: 10.1089/crispr.2024.0068

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

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>

(RNP)-resistens forædling af kartoffel af genet StCBP i Ydun:

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>

Carlsen FM; Kieu, NP; Sørensen T; **Nielsen KL**; Andreasson E, **Petersen BL** (2025) CRISPR-Cas9 (RNP) mediated knock out of susceptibility genes StCBP and StDMR6-1 confer increased resistance towards *Phytophthora infestans* in potato variety Ydun as evidenced by detached leaf assay; manuscript in preparation.



B.3. Oplysninger om specifikke risikoområder

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

a) Eventuelle ændringer i GMHP'ernes persistens...

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) Eventuelle ændringer i GMHP'ernes evne...

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

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

c) Vekselvirkningsmekanisme mellem GMHP'erne og målorganismene...

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

d) Potentielle ændringer i GMHP'ernes vekselvirkninger...

Der forventes ingen ændringer.

e) Potentielle ændringer i landbrugspraksis...

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) Potentielle vekselvirkninger med det abiotiske miljø...

Der forventes ingen påvirkninger på de abiotiske miljøer.

g) Oplysninger om enhver toksisk, allergisk...

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

Det 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, allergisk eller anden skadelig påvirkning på menneskers eller dyrs sundhed.

h) Konklusioner vedrørende de specifikke risikoområder

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. Knolde opbevares i dobbelt lukkede sække, som placeres i kasser med låg mærket GMO. Transport mellem landsdele sker i bil, ledsaget af person med GMO – kørekort. Transport mellem mark og KMC sker via KMC ejet køretøj (se desuden beskrivelser ovenfor og følgende for håndtering).



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

4.a. Trufne forholdsregler

i) *Afstand fra krydsningskompatible plantearter, både beslægtede vilde plantearter og afgrøder.*

Der vil være mindst 10 m til nærmeste kartoffelmark.

Udsætningsstedet for den CRISPR-Cas editerede kartoffel vil desuden blive omgivet af et værn af ikke-CRISPR-Cas editerede kartofler.

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

Som ekstra sikkerhed afklippes blomster i blomstringsperioden, typisk fra primo juli til afsluttende blomstring primo august.

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

Udsætningsstedet for den CRISPR-Cas editerede kartoffel vil blive omgivet af værn af ikke CRISPR-Cas editerede 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 i de CRISPR-Cas editerede planter i blomstringsperioden, typisk fra primo juli til afsluttende blomstring primo august.

Spande, kurve og øvrige redskaber anvendt ved udplantningen vil blive grundigt rengjorte og eftersat for lægge knolde.

3 – 5 dage før forventet høst/optagning vil toppen bliver knust med en top-knuser. Derved knuses alt top og evt. "æbler".

Efter topknusning og forud for høst af kartoffelknolde, vil kammene blive rodunderskåret og løsnet, efterfulgt med håndopgravning og opsamling, for at sikre der ikke efterlades knolde i jorden.

Høstede CRISPR-Cas editerede knolde vil blive opsamlet i dobbelt lukkede plastposer, mærket med GMO, og transporteres i kasser til bestemmelse af stivelsesindhold på indendørs stivelsesvægt.

Alle knolde bliver efterfølgende destrueret, da der laves kartoffelmel på alle knolde i KMCs GMO-godkendte laboratorium i Brande.

Den producerede kartoffelmel analyseres efter KMCs standard analyser. Kartoffelmelet destrueres herefter.

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

4.b. Metoder til efterbehandling af stedet efter udsætning

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

1. harvning vil ske efter høst, så 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 (2026), 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 slåningsbrak fra 2027, som kan slås og overvåges.

Nedenfor er vist en forventet placering af forsøgsarealet i 2025 i markblok 500207-20, hvor der ikke er overlap til tidligere GMO-forsøgsarealer.



Det skal bemærkes, at erfaringen med håndoptagning og opsamling 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 end kartoffelskimmel.

Høst: Ved håndopgravning og opsamling er risikoen for spild meget lille. Alt overjordisk plantemateriale vil blive knust forud for høst/opsamling.

Plantemateriale fra værnet udenfor de CRISPR-Cas editerede planter vil også blive knust forud for høst/optagning.

De høstede CRISPR-Cas editerede knolde vil blive transporteret i dobbelt lukkede plastposer mærket med GMO, 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 i vækstperioden, 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. Petersen, Frida Meijer Carlsen, Christian Feder, Agrochef KMC og Kristian Elkjær, Teamleder R&D KMC.

4.f. Metoder og procedurer til beskyttelse af stedet

i)

Alt arbejde med de CRISPR-Cas editerede planter/knolde vil ske som håndarbejde, hvorfor den mekaniske spredningsrisiko betragtes som minimal.

Al transport til og fra mark vil ske i lukkede enheder/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.



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

Da DNA på intet tidspunkt har indgået i den RNP medierede mutagenese, vil analyse af fremmet DNA være irrelevant.

Den nedenfor beskrevne målrettede mutations analyse vil alene påvise, hvorvidt mutationen forefindes i det analyserede materiale eller ej.

Genomisk DNA fra knolde, stængel eller blade isoleres og målgenet StCBP amplificeres ved fluorescens mærket PCR Indel Detection Amplicon Analysis, kaldet IDAA, for hurtig, men sikker, mutation identifikation, og amplificeres ved umærket PCR for mutations identifikation 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-CRISPR-Cas editerede Ydun planter anvendes som negativ kontrol. Herudover anvendes allel specifik long read sekventering til identifikation af SNPs og mindre længde polymorfier og fuld karakterisering af editerede alleler.

Alle plante-liner (kloner af mutationen) vil være fuldt karakteriseret (i alle fire alleler) vha. IDAA og sekvensering analyse, som beskrevet ovenfor, og vil blive anvendt til entydig mutant/line identifikation i indhentet materiale, der evt. ift. en usandsynlig spredning, kunne påtænkes analyseret.



B.6. Oplysninger om tidligere udsætninger af GMPH'erne

Ikke relevant, ingen tidligere udsætning.



Underskrift

Dato: 17. marts 2025

Bent L. Petersen
Københavns Universitet / KMC

Christian Feder
KMC



Bilag:

1. Miljørisikovurdering
2. KMCs GMO-godkendelse af laboratorie.
3. Foreløbig skitse til forsøgsplan i marken
4. Rodunderskæring og jordløsning