

Ansøgning om udsætning af cisgene stivelseskartofler med flere komplementære resistensgener med øget resistens 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	11
c) Konklusioner af den molekulære karakterisering	13
B.3. Oplysninger om specifikke risikoområder	14
a) Eventuelle ændringer i GMHP'ernes persistens	14
b) Eventuelle ændringer i GMHP'ernes evne... ..	14
c) Vekselvirkningsmekanisme mellem GMHP'erne og målorganismerne... ..	14
d) Potentielle ændringer i GMHP'ernes vekselvirkninger... ..	14
e) Potentielle ændringer i landbrugspraksis	14
f) Potentielle vekselvirkninger med det abiotiske miljø... ..	14
g) Oplysninger om enhver toksisk, allergenisk... ..	14
h) Konklusioner vedrørende de specifikke risikoområder	14
B.4. Oplysninger om kontrol, overvågning og efterbehandling- og affaldshåndteringsplaner	16
4.a. Trufne forholdsregler	16
4.b. Metoder til efterbehandling af stedet efter udsætning	16
4.c. Behandlingsmetoder, efter udsætning, herunder affald	17
4.d. Overvågningsplaner og teknikker	18
4.e. Beredskabsplaner	18
4.f. Metoder og procedurer til beskyttelse af stedet	18
B.5. Beskrivelse af teknikker til påvisning og identifikation af GMHP'erne	19
B.6. Oplysninger om tidligere udsætninger af GMPH'erne	20
Underskrift	21
Bilag:	22
Appendix:	22



Ansøgning om udsætning af cisgene stivelseskartofler med flere komplementære resistensgener med øget resistens imod kartoffelskimmel (Phytophthora infestans)

A. Generelle oplysninger

A.1. Anmelderens navn og adresse

Kåre Lehmann Nielsen, Senior R&D scientist, KMC Amba, Herningvej 60, 7330 Brande
e-mail: kln@kmc.dk

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

A.2. De ansvarligere forskeres navne

Kåre Lehmann Nielsen, senior R&D scientist, KMC, samt professor i Genomik på Aalborg Universitet, PhD, Gruppeleder, > 25 års erfaring i kartoffel-genomik og biologi, samt udvikling af avancerede forædlingsmetoder baseret på statistiske, bioinformatiske metoder samt nye forædlingsteknologier.

Christian Kjær Olesen, R&D scientist, KMC. Cand polyt I bioteknologi fra AAU med speciale i plantetransformation. Har 3 års erfaring med metodeudvikling og implementation af NGT i planter, herunder de sidste 2 år i kartofler.

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 Field Trials, Hjermvej 94, 7560 Hjerm.



A.3. Projektets titel

Cisgene stivelseskartofler med flere komplementære resistensgener med øget resistens 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 ubehandlede parceller.

A.4.b. Udsætningens startdato og varighed.

Udsætning sker i perioden 01. april – 15. juli 2025 og høst i perioden 01. september – 30. oktober 2025.

A.4.c. Udsætningsmetode

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 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 ubehandlede parceller mod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*).

Planterne vil løbende blive vandet efter behov.

Høst (optagning):

Høst af de cisgenetisk modificerede kartoffelplanter 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 de cisgenetisk modificerede kartoffelplanter, vil være 20-60 m² brutto og 10-30 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 planterne i de cisgenetisk modificerede kartoffelplanter. 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, 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 resistensgener, der giver planten forsvar overfor pathogenet.

Vi forventer ikke en 100 % resistens, men nærmere en udsættelse af angrebet med 3 – 6 uger i ubehandlede led. Kartoffelskimmel er epidemisk og vil per erfaring altid angribe planten, hvis den er ubeskyttet. 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 % resistente. Kartoffelskimmel tilpasser sig, hvorfor balancen mellem plante og patogen blot forrykkes i forhold til en mere modtagelig sort.

Forstærket resistens i form af flere resistensgener er erfaringsmæssigt med til at give planten en konkurrencefordel i forhold til kartoffelskimmel.

Der er desuden ingen rapporter om produktion af giftige forbindelser som følge af flere resistensgener.



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

Tre gener fra 2 *Solanum* arter som er krydsningkompatible med *Solanum tuberosum*, vnt1.1 fra *Solanum venturii*; blb1 og blb2 fra *Solanum bulbocastanum*, samt deres flankerende region (~1 kb upstream) og 400-600 bp downstream) er forsøgt indsat som en kontinuær insertion i kartoffelsorten Ydun. De tre linjer i denne ansøgning indeholder dog kun de hele gener for blb1 og blb2, hvorimod kun der er sket en trunkering af genet for vnt1.1 hvor hele promotersekvensen for alle linjer og 1781 bp, 367 bp og 218 bp for hhv. YSF5, YSF12 og YSF13 mangler. Derfor har alle tre linjer kun indsat forventede funktionelle gener for blb1 og blb2.

Alle 3 gener er kendte racespecifikke resistensgener mod kartoffelskimmel forårsaget af *Phytophthora infestans* af typen NB-LRR gener, som populært kaldes R-gener i kartoffelforskningen. R-gener fungerer som immunreceptorer som kan registrere infektion og forårsage et passende immunrespons som forhindrer videre infektion. De tre gener genkender distinkte molekulære strukturer fra *P. infestans* og vil derfor i kombination med hinanden udgøre en meget effektivt værn mod infektion her og nu, men også være en meget betydelig forhindring for genetisk udvikling af *P. infestans* stammer, som kan undgå detektion af hvert af disse gener og dermed bryde resistensen. Det er derfor også forventningen, at denne *stacking* af komplementære R-gener giver en betydeligt længerevarende effektiv resistens end hos sorter, som kun indeholder et enkelt R-gen.

i) Beskrivelse af de metoder der er anvendt

Konstruktion af DNA sekvens.

DNA sekvensen af vnt1.1; blb1 og blb2, samt plasmidvektor PCambia2300, herefter benævnt som pCambia2300_3Rgenes (se appendix 1 for præcis sekvens og plasmid map) er kemisk synteseret. Plasmidet blev propagaderet ved introduktion i *Escherichia coli* Top10, vækst og efterfølgende plasmid oprensning. DNA sekvensen af det resulterende plasmid blev verificeret ved Long-Read DNA sekventering (Oxford Nanopore MINION).

Transformation og regeneration af Kartoffelplanter.

Herefter blev plasmidet transformeret ind i *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1. En koloni blev opdyrket i flydende kultur og denne kultur blev efterfølgende brugt til at transformere plantemateriale som beskrevet nedenfor.

Sterile *In vitro* kartoffelplanter af sorten Ydun blev skåret i stykker af ca. 0,5 cm² (bladmateriale) og ca. 1 cm nodale stængelstykker, og co-kultiveret med *Agrobacterium*-kulturen. Herefter blev plantemateriale overført til callus-inducing media (CIM) agarplader indeholdende Timentin for at fjerne Agrobakterier fra den videre vækst. CIM-plader indeholder hormoner som fremmer plantecelledeling, men hæmmer vævsdifferentiering. Efter 7-9 dage blev plantestykker med synlige calli overført til shoot-inducing media (SIM), som indeholder plantehormoner som stimuleret skuddannelse og vækst. Efter 4-12 uger blev synlige skud skåret fra enkeltvis og overført til root-inducing media. Efter 4 uger blev de planter som havde dannet



rødder overført til almindeligt *in vitro* plante vækstmedie uden hormoner og propageret som individuelle *in vitro* kultur linjer og karakteriseret som beskrevet nedenfor.

For at verificere at *Agrobacterium* er elimineret, testes plantematerialet 40-60 dage efter transformationen via PCR.

Karakterisering af udvalgte kartoffellinjer

Formodede transformante *in-vitro* linjer blev testet ved at smitte planterne med en sporesuspension af *Phytophthora infestans* (88069), som inficerer og dræber modtagelige planter (f.eks. den genetiske baggrund Ydun), men hvor linjer som indeholder R-gener er resistente og derfor overlever. Kun planter som efter 8-12 dage udviste resistens blev videreført.

Molekylær detektion af insert ved Polymerase kæde reaktion (PCR)

En lille plantedel, typisk 0,5 mm³, blev udtaget fra hver linje samt fra den negative kontrol (baggrundssorten Ydun) og brugt som template i en PCR reaktion med kemisk syntetiserede DNA primere, som er komplementære til en del af det indsatte DNA. Fragmenterne blev detekteret ved standard TAE-agarose gel-elektroforese. Tilstedeværelse af fragmenter med den forventede størrelse i de rekombinante linjer (og fravær i den negative kontrol, Ydun) blev taget som indikation for mindst delvis tilstedeværelsen af gen-kassetten.

Fuld genom DNA sekventering af primære linjer.

Genomisk DNA fra rekombinante linjer samt baggrundssorten, Ydun, blev isoleret med standard CTAB metode efterfulgt af Genomic Tip oprensning (Qiagen). Efterfølgende blev det genomiske DNA forberedt til Long-read DNA sekventering med Ligation Sequencing protokol (Oxford Nanopore Technologies). Der blev frembragt mindst 80 Gigabp DNA sekvens, svarende til min. 80x dækning af det haploide genom.

Bioinformatisk analyse.

De rå sekvensreads blev importeret ind i CLC Genomics workbench v25 og mappet til et sekvensfragment indeholdende 100 bp i hhv. overgangen mellem henholdsvis vnt1.1 og blb1 og blb2. Formålet er at isolere sekvensreads som er specifikke for den indsatte sekvens. Reads som mapper til disse områder blev mappet til hele pCambia2300_3Rgenes sekvensen. Herfra kan insert-enderne bestemmes (se appendix 3)

5'-Insert-flankerende sekvenser blev identificeret og isoleret og sammenlignet med reference genomsekvensen for *S. tuberosum* (DMv6.1) for at identificere insertionssite. Bedste signifikante BLAST hit blev antaget som insertionssite. Kun linjer som havde et unikt insertionssted blev udvalgt. Det blev fundet at YSF5-insert er indsat på chr7 nt 20034368; YSF12-insert er indsat på kromosom 1 nt 81232018 og YSF13-insert er indsat på kromosom 11 nt 35056228. YSF5 og YSF12 er indsat i områder som ikke koder for andre kendte gener, men for YSF-13 er kassetten indsat i en intron af genet of Soltu.DM.11G017710.1, som koder for en *alpha/beta-Hydrolases superfamily protein*. Det er sandsynligt, at denne allel af dette gen er inaktiveret i YSF-13. Det vides ikke om funktionen af dette gen er vigtigt for kartoffel, men givet at kartofler er tetraploide og vores insertion kun er sket i en enkelt genomisk fase, er det sandsynligt, at den biologiske funktion af dette gen locus er uændret. Vi har ikke i øvrigt ikke observeret nogen umiddelbar fænotypisk forskel mellem de tre plantelinjer.



For at analysere om uønskede dele af vektoren (herunder et Kanamycin resistens gen, som bruges til selektion af Agrobacterier inden transformation af planter) skulle være indsat andre steder i genomet, så blev reads mappet vektorsekvens uden insert. Der blev for alle linjer ikke fundet reads som mapper til uønskede vektordele. Vi konkluderer, at kun insertsekvenserne som beskrevet er indsat i genomet.

ii) Den anvendte vektors art og oprindelse

Vektordesign for cisgenetisk modifikation er baseret på plasmid pCambia2300 modificeret i forhold til Appendix 1. Selve DNAet er kemisk syntetiseret og efterfølgende propageret og oprenset fra *E. coli*. *Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 er brugt til at levere DNA ind i cellerne og translokation ind i genomisk DNA.

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

Design af de tre R-gener vnt1, blb1 og blb3 er baseret på sekvenser i Genbank databasen med Accession numre FJ423044.1, AY426259, DQ122125.1. De præcise sekvenser af angivet i appendix 2 og de tre gener har henholdsvis størrelserne 3785 bp, 4992 bp og 5491 bp inkl promoter og 3'-UTR.

b) Oplysning om GMHP'erne

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

Information for alle tre gener er givet, men bemærk, at det kun er blb1 og blb2 som forventes at være aktive, da kun disse gener er indsat i fuld længde. De tre indsatte R-gener er kendte og velkarakteriserede racespecifikke resistensgener mod *P. infestans* (van der Vossen et al. 2003; van der Vossen et al. 2005 and Pel et al. 2009). Derfor forventes kartoffellinjer, som indeholder og udtrykker disse gener, at være mere modstandsdygtige overfor kartoffelskimmel end deres baggrundsort (Ydun). I alle andre aspekter forventes de rekombinante linjer at være fænotypisk identiske med baggrundssorten.

De tre R-gener genkender forskellige molekyler fra *P. infestans* og derfor er derfor forventes deres effekt at være additiv og samlet set meget stor. Men mindst lige så vigtigt er det, at en stor udfordring for brug af racespecifikke R-gener i landbrugets monokultur, er at den genetiske tilpasningevne i den meget store *P. infestans* population er stor og der opstår mutationer som kan overkomme et enkelt R-gen med jævne mellemrum som en naturlig konsekvens af udviklingen af populationen. Varianter som opstår spontant som kan overkomme enkeltresistensgener bliver selekteret med høj effektivitet pga. de store arealer som dyrkes netop dette R-gen, hvor de jo har en stor fordel i forhold til andre *P. infestans* varianter. Ved brug af komplementære R-gener, skal der ske flere specifikke genetiske ændringer samtidigt i en enkelt *P. infestans* variant for at opnå en selektiv fordel. Dette anses som meget usandsynligt og derfor forventes resistensen af være langvarig i forhold til sorter med et enkelt R-gen eller sorter med R-gener som genkender samme dele af *P. infestans*.

Derfor er det vores forventning, at de frembragte sorter har brug for betydeligt færre behandlinger med svampebekæmpelsesmidler og med mindre mængde aktivt stof. Både på kort og lang sigt.



ii) Oplysninger om faktisk indsatte/deleterede sekvenser

Der er indsat en enkelt kopi i cellekerne DNA i en enkelt fase (dvs. 1 ud af 4 kromosomsæt). Størrelsen af inserts er YSF5: 11765 bp (nt 8695-20459 i appendix 1), YSF12: 13156 bp (nt 7289-20444 i appendix 1) og YSF13: 13328 bp (nt 7132-20459 i appendix 1) samlet 14294 bp. Disse sekvenser består af de tre gener (sekvenser angivet i appendix 2), sammensat præcist ende mod ende i rækkefølgen vnt1, blb1 og blb2, dog med de omtalte trunkeringer af vnt1. Der er anvendt de native promoter sekvenser, så det er vores forventning at generne overordnet er udtrykt på samme måde som i *S. bulbocastanum* (blb1 og blb2). Det er kendt at det ikke er muligt at måle genekspressionen af R-gener pålideligt direkte vha. RNASeq eller RT-PCR, pga. den meget store mængde (> 300) homologe og næsten identiske R-gener som findes naturligt i kartofflens genom som forstyrrer analysen.

iii) Dele af Planten, hvori insertet udtrykkes

Det forventes at resistensgenerne udtrykkes i hele planten.

iv) Insertets genetiske stabilitet og GMHP'ernes fænotypiske stabilitet

Kartofler propageres normalt via klonal formering via knolde og kartoffel er kendt for at bibeholde deres genetiske setup ved denne metode. Rekombination sker i langt overvejende grad ved kønnet formering, som ikke er relevant for denne ansøgning. Opformering af plantemateriale sker udelukkende ved klonal propagadering i form af enten in-vitro kulturer (via stem-cuttings) eller via knoldopformering som andre kartoffelsorter. Hyppigt tab af gener eller rekombination af genomet under knoldopformering er ikke beskrevet i kartofler. Vi verificerer løbende vha. PCR, at de planter vi multiplicerer er som forventede og under frembringelsen af disse tre linjer er insertion-sites karakteriseret flere gange over multiple klonale generationer (stem-cuttings). Der blev ikke observeret rekombination af det indsatte område på noget tidspunkt. Ydermere, har vi aldrig i nogle af de mere end 100 linjer vi har re-genereret observeret "mosaik-kartoffelplanter" hvor kun en del af planten er blevet transformeret. Derfor er det usandsynligt, at disse tre linjer skulle indeholde utransformeret væv, som kunne give ophav til ikke transformerede knolde eller stem-cuttings. Samlet set har vi ikke data som tyder på, at disse linjer ikke er permanent og stabilt transformerede.

Med hensyn til fænotypisk stabilitet så er en væsentlig del af formålet med disse varianter at forøge den fænotypiske stabilitet (resistens mod kartoffelskimmel). Den kendte udfordring med fænotypiske ustabilitet for racespecifikke R-gener udgøres af den enorme genetiske tilpasningsevne af *P. infestans* populationen. Ved at indsætte flere komplementære R-gener samtidig forventes den fænotypiske stabilitet at forøges dramatisk, da det således kræves at et enkelt *P. infestans* individ opnår flere genetiske ændringer samtidig for at opnå en selektionsfordel på disse sorter og det anses som meget usandsynligt.



c) Konklusioner af den molekylære karakterisering

To R-gener, blb1 og blb2, er indsat i fuld længde og tre forskellige fragmenter af vnt1 er indsat, en variant i hver linje. Det forventes derfor, at linjerne får tilført resistens forårsaget af blb1 og blb2, men ikke vnt1.

Der er kun fundet evidens for indsættelse af en kopi af insert pr. linje og derfor er hver linje heterozygot for insert med alleldosis en.

Der er ikke fundet tegn på at uønskede dele af den anvendte plasmid-vektor er indsat andre steder i genomet.

Litteratur med direkte relevans for linjerne

van Der Vossen, E., Sikkema, A., Hekkert, B.t.L., Gros, J., Stevens, P., Muskens, M., Wouters, D., Pereira, A., Stiekema, W. and Allefs, S. (2003), An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. The Plant Journal, 36: 867-882.

van der Vossen, E.A.G., Gros, J., Sikkema, A., Muskens, M., Wouters, D., Wolters, P., Pereira, A. and Allefs, S. (2005), The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. The Plant Journal, 44: 208-222.

Pel M., A., Foster, S., J., Park, T., H., Rietman, H., van Arkel, G., Jones, J.D.G., van Eck, H., Jacobsen, E. Visser, R., G., F. and van der Vossen, E., A., G., Mapping and Cloning of Late Blight Resistance Genes from *Solanum venturii* Using an Interspecific Candidate Gene Approach. Molecular Plant-Microbe Interactions 2009 22:5, 601-615.



B.3. Oplysninger om specifikke risikoområder

(se desuden uddybende beskrivelse i medsendte bilag 1, Miljørisikovurdering 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.

De cisgenetisk modificerede kartoffelplanter transporteres fra Aalborg Universitet, Fredrik Bajers Vej 7H,



9220 Aalborg Ø til KMC i netkasser med netlåg mærket GMO. Transport mellem landsdele ske i bil, ledsaget af person med GMO – kørekort. Transport mellem mark og KMC sker via KMC ejede 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 de cisgenetisk modificerede kartoffelplanter vil desuden blive omgivet af et værn af ikke-GMO 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 de cisgenetisk modificerede kartoffelplanter vil blive omgivet af værn af ikke cisgenetisk modificerede kartoffelplanter, 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 cisgenetisk modificerede kartoffelplanter 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", og kartoffeltoppen bliver efterladt på GMO-forsøgsarealet, hvor det indtørre og indarbejdes i jorden.

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 cisgenetisk modificerede 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: Håndoptagning/høst. Ved håndopgravning og opsamling er risikoen for spild meget lille. Alt overjordisk plantemateriale vil blive knust forud for høst/optagning, og kartoffeltoppen bliver efterladt på GMO-forsøgsarealet, hvor det indtørre og indarbejdes i jorden.

Plantemateriale fra værnet udenfor de cisgenetisk modificerede kartoffelplanter vil også blive knust forud for høst/optagning.



De høstede 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: Kåre Lehmann Nielsen, 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 cisgenetisk modificerede kartoffelplanter/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

Vi har udviklet flg. metode til detektion af GMHP'erne baseret på overgangen mellem de indsatte gener blb1 og blb2: Ved brug af primerne: Blb1_F1 (ACTGATCAAGCGGTGTGAGA) og Blb2_R1 (TCACTCCACACTCTCCAACC) med en annealingstemperatur på 64,2 C og en elongeringstid på 30 sec genererer et produkt på 1157 bp ved brug af Phire Plant Direct PCR kit (Thermo Scientific). Produktet af fraværende i den genetiske baggrund (Ydun). Vi har heller ikke fået et baggrundprodukt i 6 andre sorter vi har testet og da de to gener ikke er lokaliseret ved siden af hinanden i *Solanum bulbocastanum*, hvor generne oprindeligt kommer fra, vi betragter vi det som grænsende til umuligt at opnå et PCR produkt med disse primere af den størrelse i nogen kartoffelsort. Skulle der, mod vores forventning, opstå tvivlstilfælde, så kan DNA sekventering af det opnåede PCR produkt præcist fastslå transformationsstatus.



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

Ikke relevant.



Underskrift

Dato: 24. marts 2025

Kåre Lehmann Nielsen
KMC

Christian Feder
KMC



Bilag:

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

Appendix:

1. Nukleotidsekvens af anvendte plasmid
2. Gensekvenser
3. Sekvensdokumentation for inserts