

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."

Forår 2024, 2025 og 2026.

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 mhhp 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, Hjermvej 94, 7560 Hjerm

A.3. Projektets titel

CRISPR-Cas 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.
Forsøget vil bestå af delvist ubehandlede delvist behandlede parceller, se bilag 3.

A.4.b. Udsætningens startdato og varighed.

Udsætning sker omkring 10. april – 10. maj 2024/2025/2026 og høst i perioden 20 - 30. september 2024/2025/2026.

A.4.c. Udsætningsmetode

Kartoffelknolde håndlægges i rækker og dækkes med kartoffelkamme (hyppes).

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 lægning af knoldene.

Under (udsætningen)væksten:

Normal behandling mod ukrudt, skadedyr og sygdomsbekæmpelse imod andre svampesygdomme end kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*). Forsøget vil bestå af ubehandlede og delvist behandlede parceller mod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*), se bilag 3. Planterne vil løbende blive vandet efter behov.

Høst(optagning):

Håndopgravning og opsamling af de CRISPR-Cas editerede planter. 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). 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 *bloknummer 500 207 – 20, IMK, totalareal = 0,5 ha*. Området, der vil blive tilplantet med den CRISPR-Cas modificerede kartoffel, vil være 250-2500 m² brutto/100-1500 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 i 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.

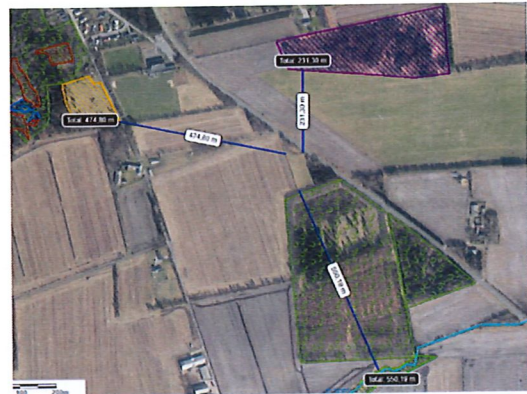
Afstande

§3 Hede: 230 meter

§3 Overdrev: 470 meter

§3 Eng: 550 meter

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

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

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 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 vælges 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

De CRISPR-Cas modificerede kartoffel linjer er fremstillet på Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C (UCPH-PLEN) eller på Sveriges Landbrugs Universitet (SLU)/SolEdits ([SolEdits – solutions through crop innovation](#)) Växtskyddsvägen 1, 234 56 Alnarp, Sverige (SLU/SolEdits).

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 inaktivt'. Ved Knock Out (KO) af *StDMR6-1* genet, fx via anvendelse af CRISPR-Cas, 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 skimlen på sigt vil være betydeligt mindre.

i) Beskrivelse af de metoder der er anvendt

Der er genereret 5+3 liner af PLEN-UCPH (2023, 2024) og 38 ny editerede Ydun-linjer af SLU/SolEdits (2024), hvor målgenet *StDMR6-1* er helt eller delvist slået ud (knock out) med det formål at nedsætte tolerancen/modtageligheden over for primært kartoffel skimmel.

Både SLU/SolEdits og UCPH-PLEN har anvendt DNA-fri CRISPR/Cas9 komponenter, det såkaldte RiboNukleoProtein (RNP) til editeringerne (Carlsen et. al. 2022), hvilket helt udelukker indsættelse af (transgen) DNA i samtlige af de CRISPR-Cas modificerede enkelt plante linjer. Kun de tilsigtede målrettede ændringer vil derfor være i fokus og relevante ift. fremtidige godkendelsesprocedurer af den CRISPR-Cas modificerede plante.

De CRISPR-Cas modificerede kartofler er fremstillet efter den tidligere publicerede protokol (Johansen et al 2019; samt beskrevet herunder), med den modifikation, at UCPH-PLEN og SLU/SolEdits begge, som før nævnt, har anvendt DNA-fri RNP til gen-editeringerne (Carlsen et. al. 2022).

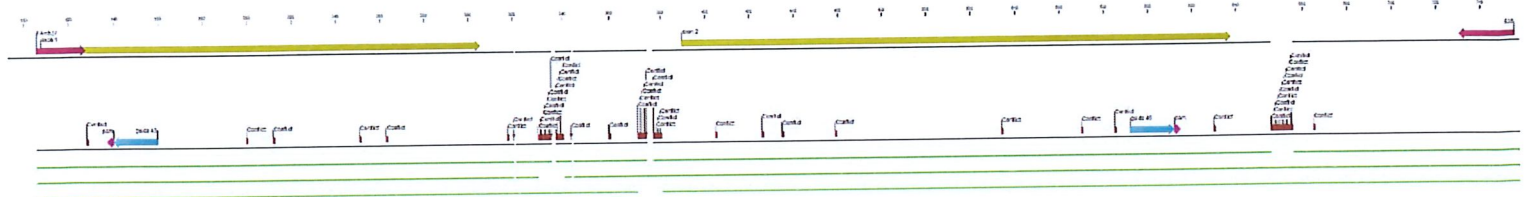
De syntetiske gRNAs (indkøbt syntetiseret af og indkøbt fra Invitrogen), her benævnt sg43 og sg45 og DMR6T4, blev inkuberet med TrueCut™ Cas9 (indkøbt fra Invitrogen) mhp gRNA/Cas9 RNP kompleksdannelse, før transfektion ind i Ydun protoplaster ved hjælp af 25% polyethylenglycol (PEG). TrueCut/gRNA 43 (sg43) og TrueCut/gRNA 45 (sg45) er transfekteret ind i protoplast cellerne samtidigt, kaldet 'multiplex' gen-editering, mens TrueCut/gRNA DMR6T4 er anvendt alene (se endv nedenfor).

Protoplast fremstilling og gene editering i disse:

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 transfektionen 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 plante-linjer blev efterfølgende flyttet til et hormonfrit Murashige and Skoog medium. Screeningen af planterne blev udført ved IDA Analyse (IDAA), også benævnt som HRFA analyse (Andersson et al. 2017), med fluorescens mærket PCR produkter, amplificeret på ekstraheret gDNA fra planterne og separeret på baggrund af størrelse (detektions opløsning +/- 1 bp) via kapliær elektroforese.

UCPH-PLEN – DMR6-1 linjer fremstillet fra 2 sgRNAs (sg43, sg45)



Figur 1. DMR6-1 gen-struktur med angivelse af sgRNAs, sg43 og sg45 (blå)

Der er designet to sgRNA'er sg43 (TTTGAGGGAGAGTAGAGTGG , exon 1) og sg45 (TGGAGAAATATGCTCCTGAA , exon 2) til at generere mutationer i henholdsvis exon 1 og exon 2 af DMR6-1 (disse er markeret i blå på genmodellen nedenfor). Ved samtidig brug (multiplexing) af sg43/RNP sg45/RNP vil de mest sandsynlige scenarier være generering af ex-planter med i) en enkelt mutation forårsaget enten af sg43 eller af sg45, ii) to mutationer fra hhv sg43 og sg45, hvor et sg medieret DNA brud er blevet repareret inden brud fra den anden sg og iii) en deletion mellem sg43 og sg45. 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 (de grønne linjer).

- Fremstilling af DMR6-1 Ydun mutant linje 2, 4, 5, 9 og 14 (UCPH-PLEN) (2023, 2024): PLEN-UCPH plante linjerne (2, 4, 5, 9, 14) er karakteriseret ved fuld allel specifik IDAA analyse og udvalgt til dette markforsøg. IDAA profilerne med tilhørende data ses i det følgende.

- Fremstilling af DMR6-1 Ydun mutant linjer, benævnt 3006, 3008, 3029 (UCPH-PLEN + SLU/Soledits) (2023, 2024): Knock Out linjerne 3006, 3008, 3029, med fuld allel editering, er til og med protoplast transfektion fremstillet ved samtidig anvendelse af sg43 og sg45, foretaget af UCPH-PLEN, mens editerede enkelt-protoplast-celle-til-ex-plante regenereringer er foretaget af SLU/Soledits som også beskrevet ovenfor. Plante linjerne 3006, 3008, 3029 er karakteriseret ved fuld allel specifik sekventering, ved brug af long read sequencing (Eurofins), <https://www.eurofins.se/>, og allel specifikke mutationer er identificeret (se nedenfor) og udvalgt til dette markforsøg.

SLU/SolEdits - fremstilling af 38 DMR6-1 mutant linjer ved anvendelse af enkelt sgRNA (DMR6T4) (2024)

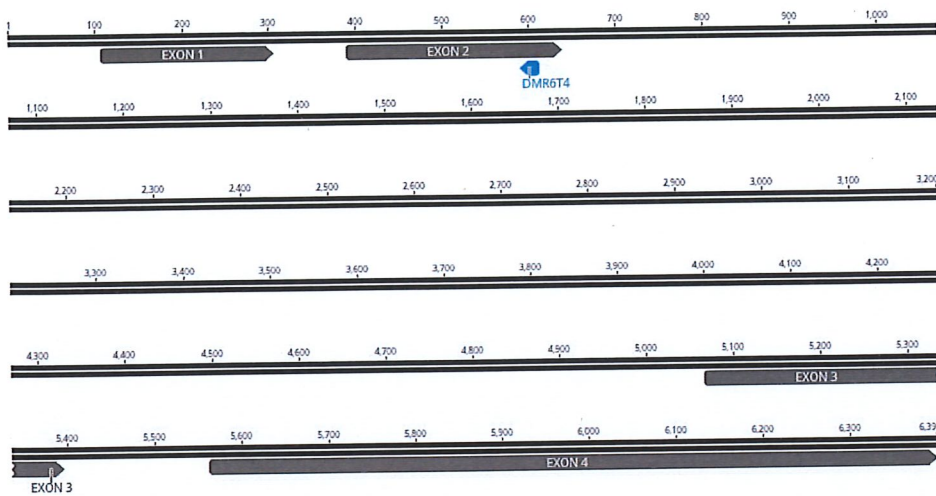


Figure 2. DMR6-1 gen-overview med sgRNA DMR6T4 vist i blåt.

sgRNA, benævnt *DMR6T4* målsekvens 'TCAGGAGCATATTTCTCCAG' (Exon 2) er vist i blåt.

SLU/SolEdits 38 DMR6-1 knock out linjer, genereret ved brug af en enkelt RNP/sgRNA (*DMR6T4*). SLU/SolEdits har stået for hele processen, fra enkelt-protoplast-celle-transfektion til ex-plantaregenerering.

Molekylær Karakterisering af DMR6-1 mutant linjerne

SLU/Soledits DMR6-1 Ydun mutant linjer 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

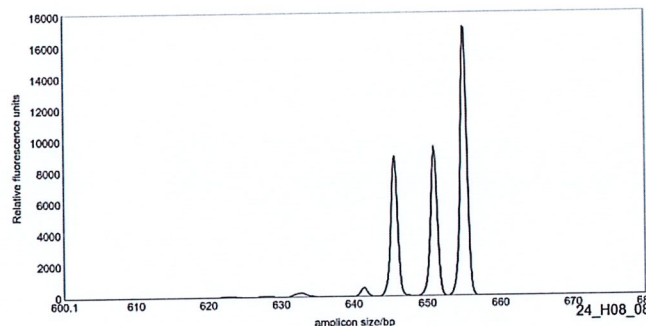
3008				Knock out plant
	1	-5	-4	Out of frame yields stop codon after -5
	2	-10	-1	
	3	-1	-3	
	4	Insert		Double cut, large deletion flipped and inserted in opposit direction

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

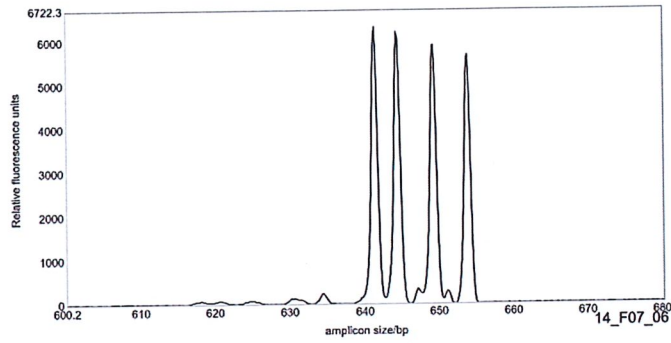


IDAA for WT (ikke editeret) identificerer alle 4 alleler i det amplificerede område med længderne: I (645bp), II (650 bp), III og IV (655 bp, dobbelt højde).

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](#)).

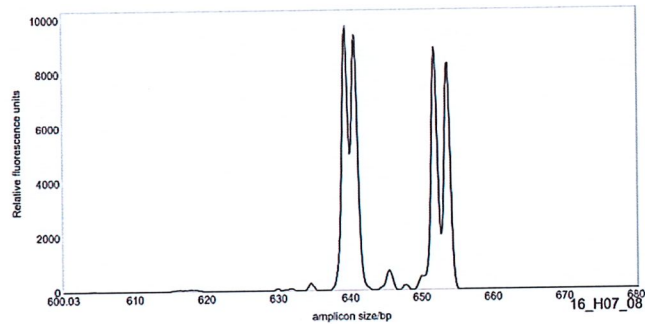
Mutant Ydun DMR6 nr.2

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



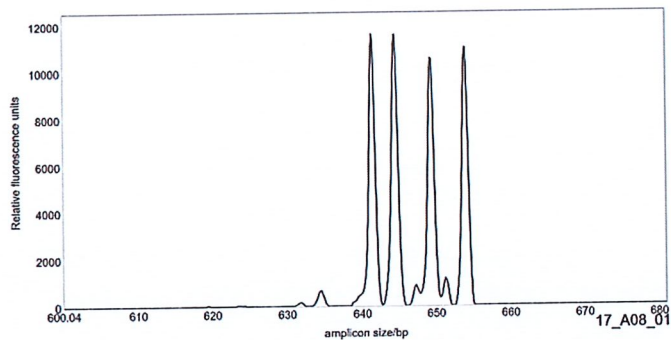
Mutant Ydun DMR6 nr. 4

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



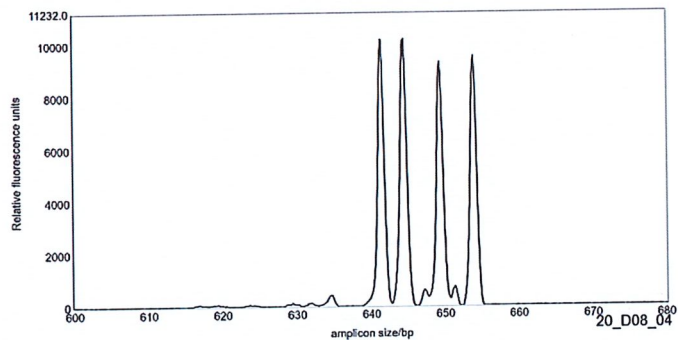
Mutant Ydun DMR6 nr. 5

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



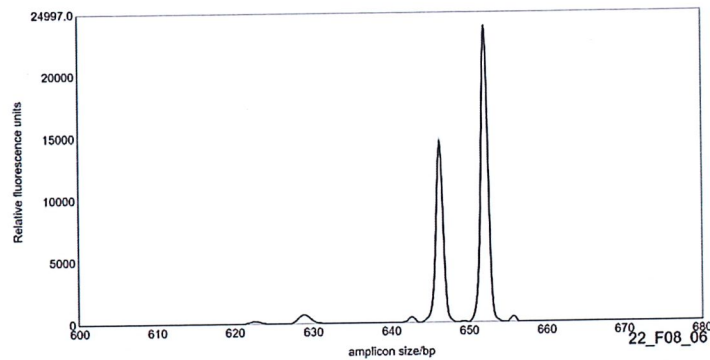
Mutant Ydun DMR6 nr 9

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



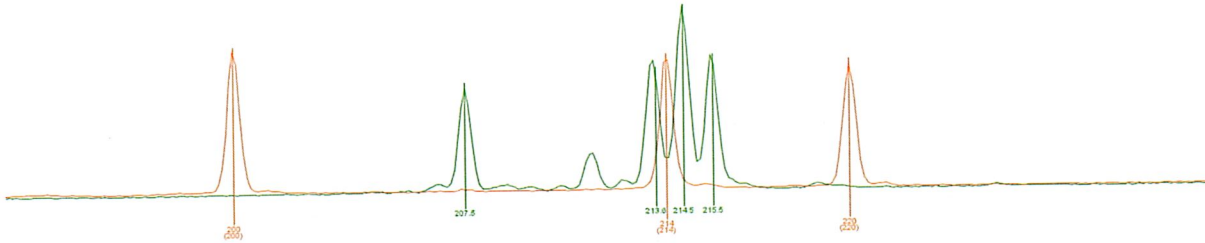
SLU/SolEdits 38 editerede Ydun-linjer under anvendelse af en enkelt (sgRNA/Cas9) RNP benævnt DMRT4.

Tabel 1. Redigerede linjer med unikt ID og størrelsen af InDels i respektive alleler. Linjer i pink har én tilbageværende vildtype allel, streger i orange har alle fire alleler redigeret, men mindst én allel i er fortsat i translations læse rammen, fx "-3" (= proteinet mangler en aminosyre, hvorved det stadig kan være udtrykt og, afhængig af position, stadig kan være aktivt, dog med en forventet lavere aktivitet), og i gul fuld knockout planter, hvor læse rammen i alle alleler er brudt og genproduktet / proteinet er stærkt trunkeret og dermed forventeligt nedbrudt/destrueret. InDels med "-" repræsenterer en deletion og med "+" repræsenterer en insertion. Færre end fire forskellige InDels indikerer, at mindst to alleler deler samme størrelse af InDel. Mangel på "0" betyder, at der ikke er vildtype-allel(er) tilbage i linjen.

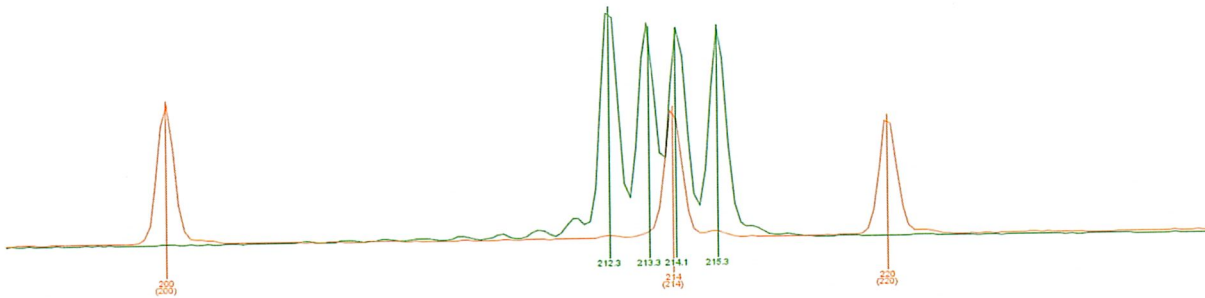
19059	-7;-1;0;+1
41174	-2;-1;0;+1
41197	-7;-4;-1;0
41264	-5;-1;0;+1
41281	-5;-2;-1;0
19006	-3;-1;+1
19032	-4;-3;-1
19068	-5;-3;-1
41283	-5;-3;-1;+1
41336	-16;-4;-3;-1
19003	-5;-1;+1
19011	-1;+1
19054	-7;-5;-2;-1
19060	-1;+1
19066	-4; -1 (replaces 20031)
19077	-2;-1;+1
19080	-1
19088	-10;-5;-2;-1
19092	-5;-2;-1
19097	-10;-5;-1
19099	-4;-2;-1;+1
19102	-5;-4;-1;+1

19105	-2;-1
19110	-4;-2;-1
20003	-5;-1;+1
20027	-2;-1;+1
20031	-1 (discarded, replaced by 19066)
20032	-1;+1
20035	-1;+1
20059	-4;-2;+1
41028	-5;-1;+1
41081	-7;-1;+1 (updated to -7)
41122	-1;+1
41247	-4;+1
41268	-2;-1;+1
41339	-2;-1;+1;+4
41378	-1;+1
41388	-1;+1
41394	-11;-4;-1;+1

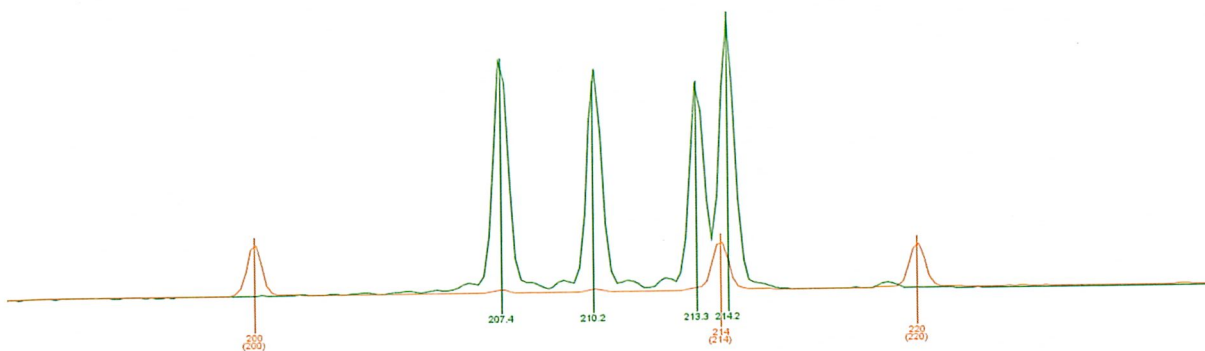
19059 -7;-1;0;+1



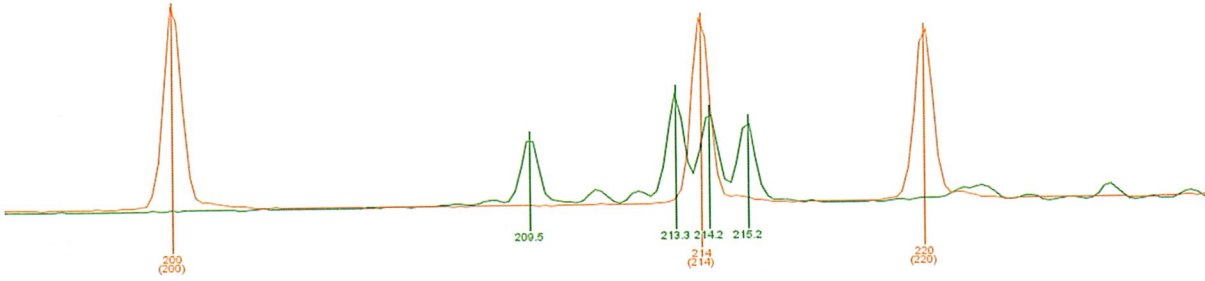
41174 -2;-1;0;+1



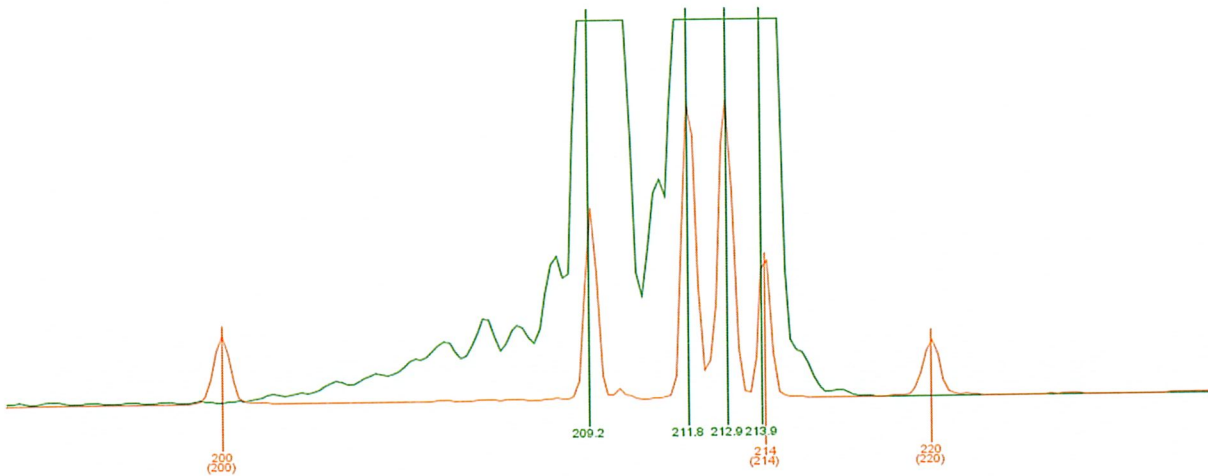
41197 -7;-4;-1;0



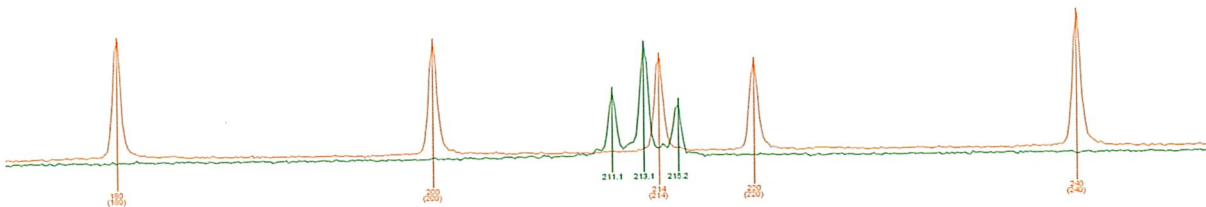
41264 -5;-1;0;+1



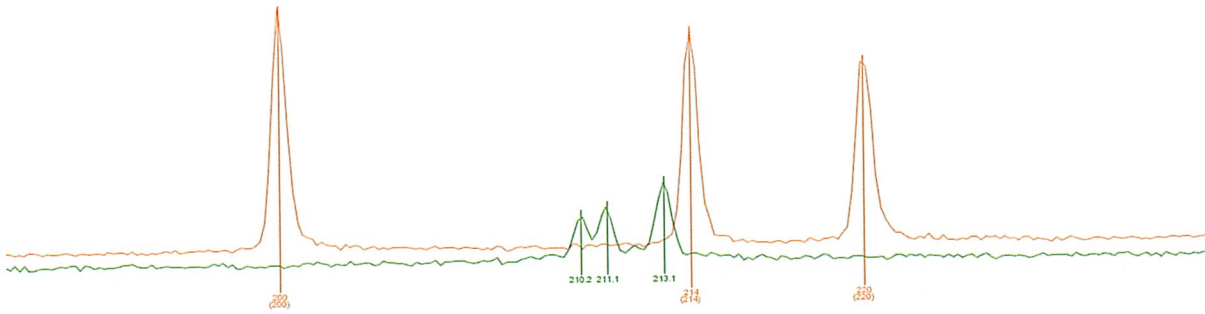
41281 -5;-2;-1;0



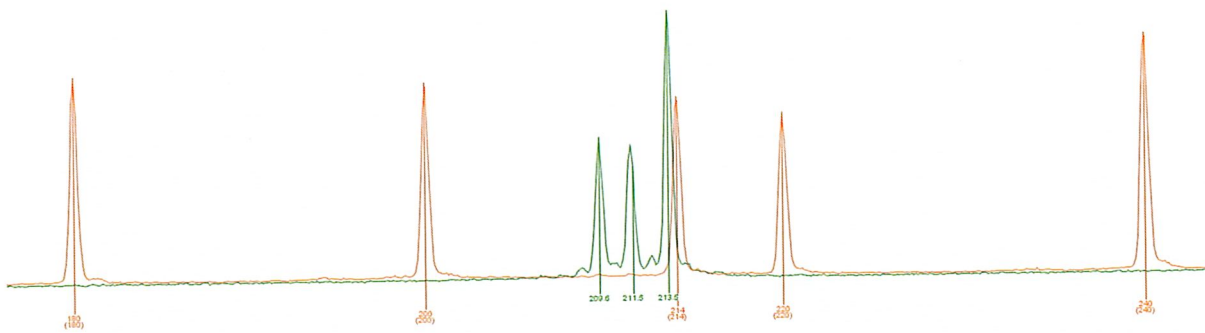
19006 -3;-1;+1



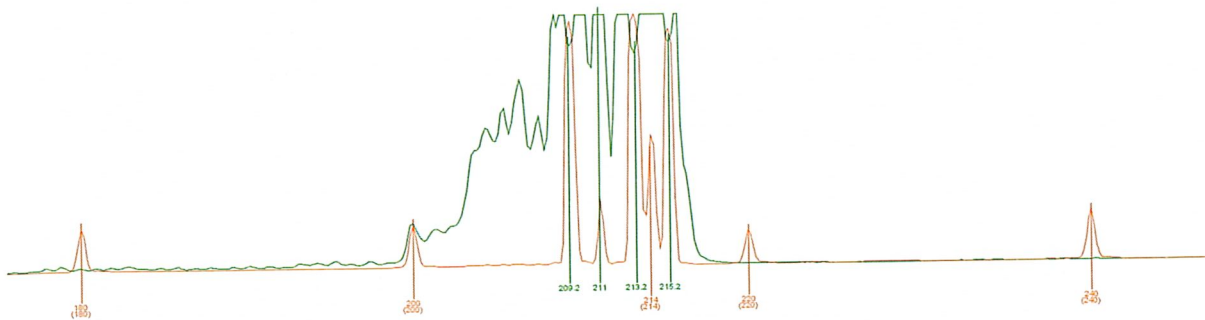
19032 -4;-3;-1



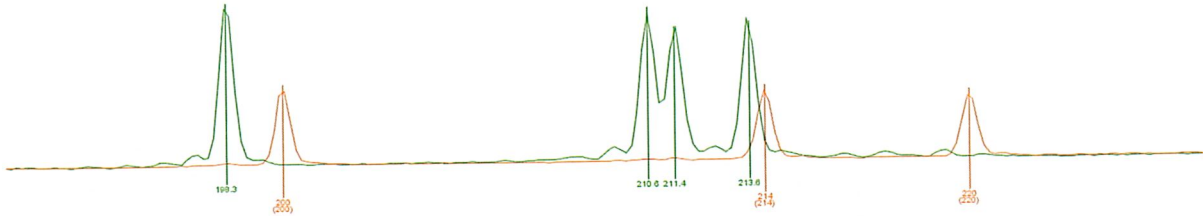
19068 -5;-3;-1



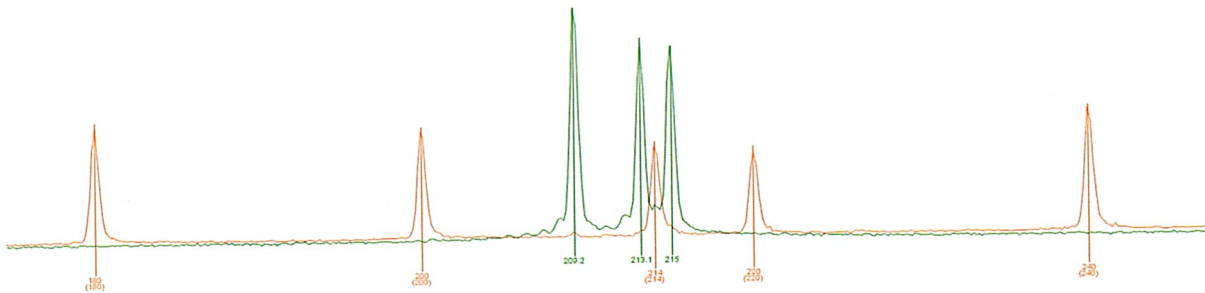
41283 -5;-3;-1;+1



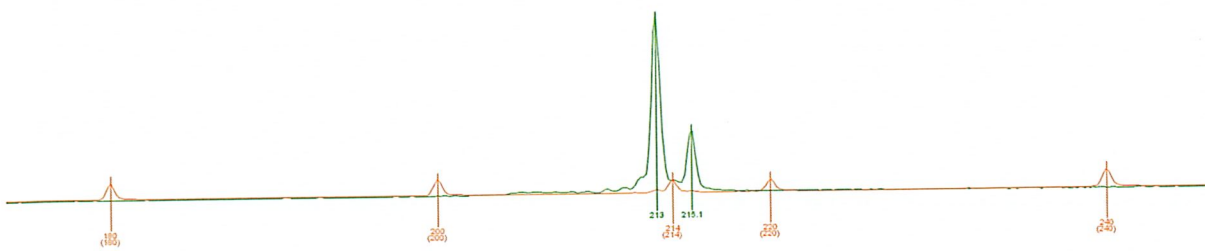
41336 -16;-4;-3;-1



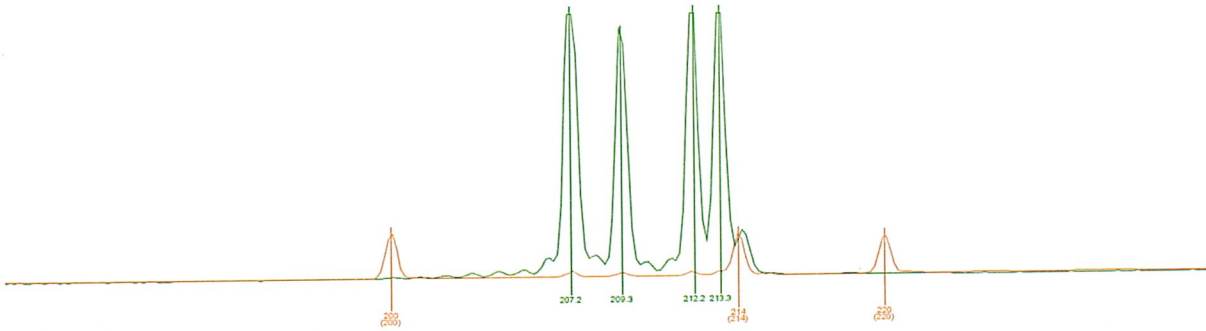
19003 -5;-1;+1



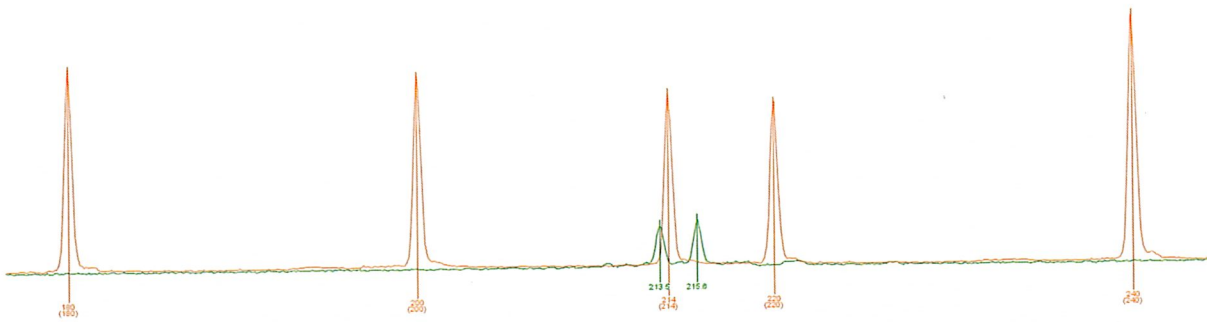
19011 -1;+1



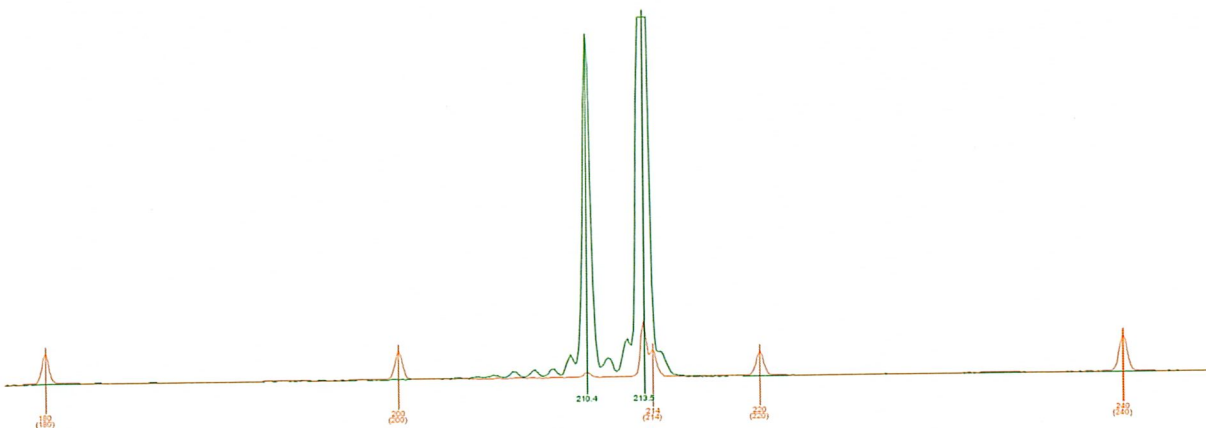
19054 -7;-5;-2;-1



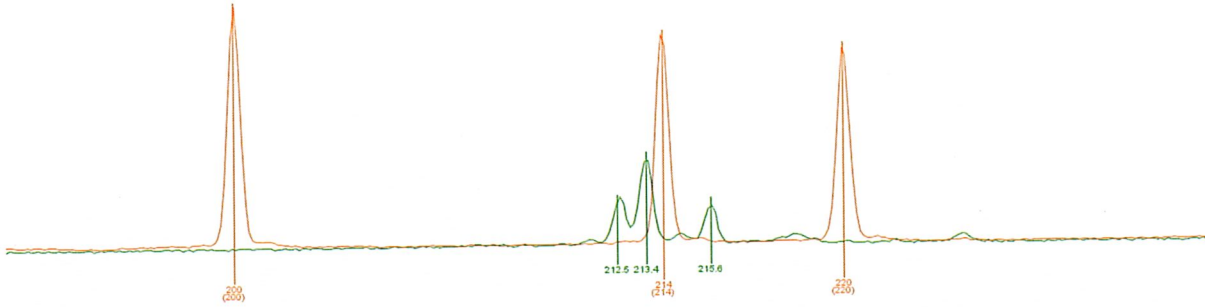
19060 -1;+1



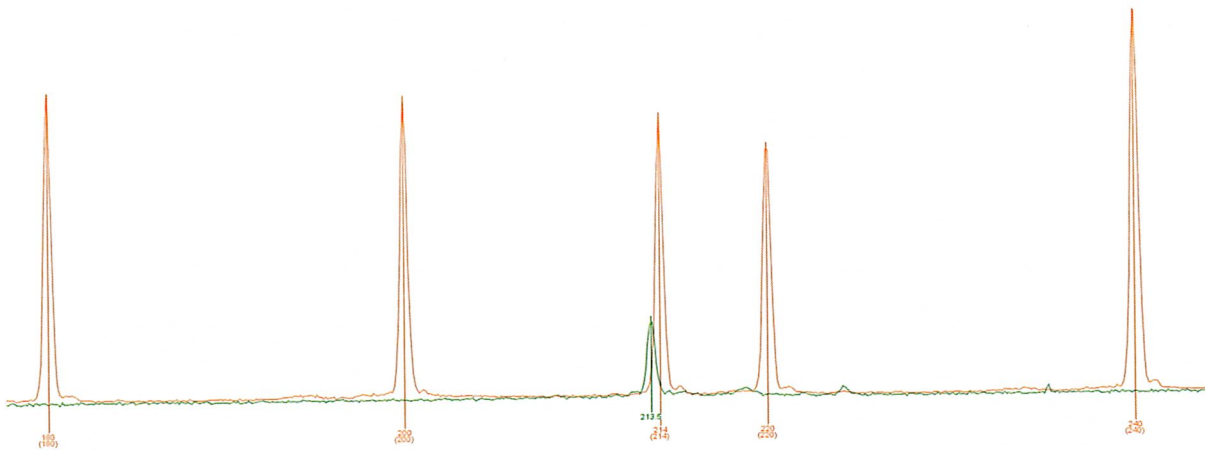
19066 -4;-1



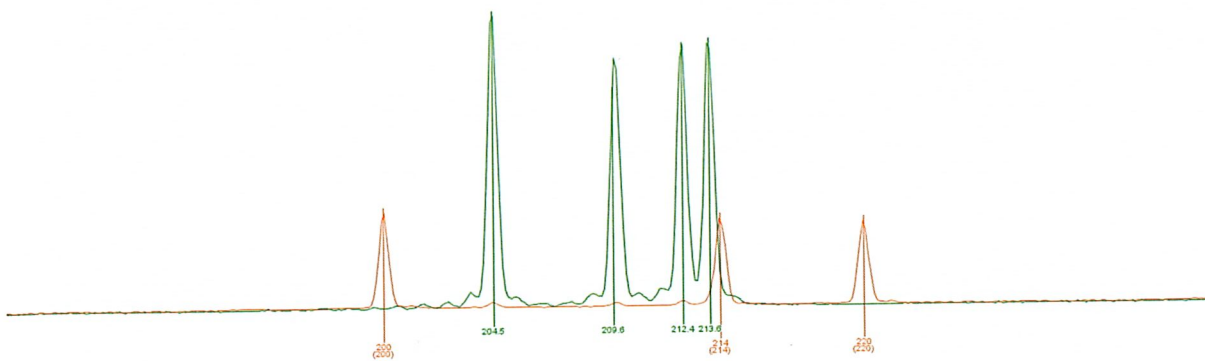
19077 -2;-1;+1



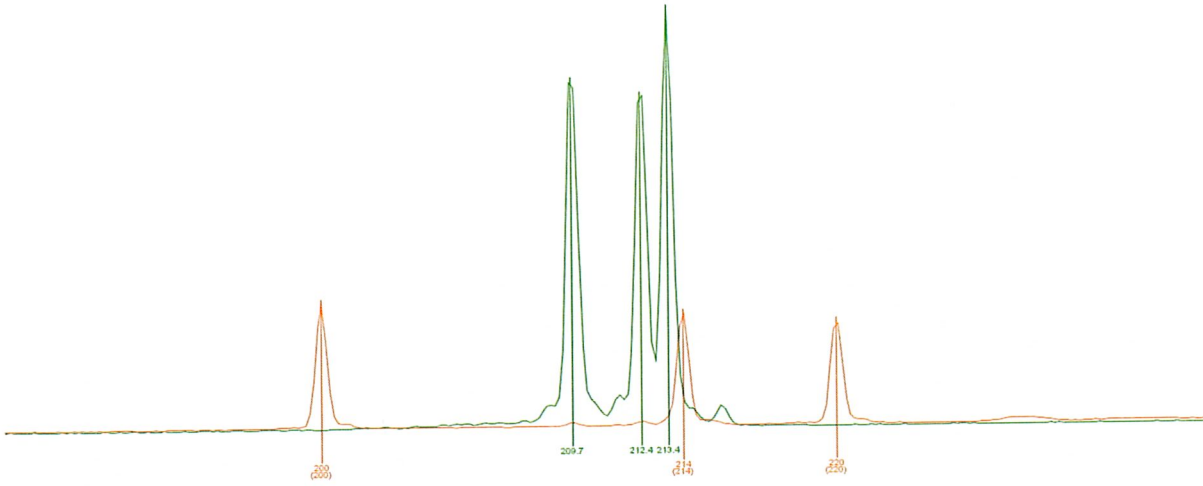
19080 -1



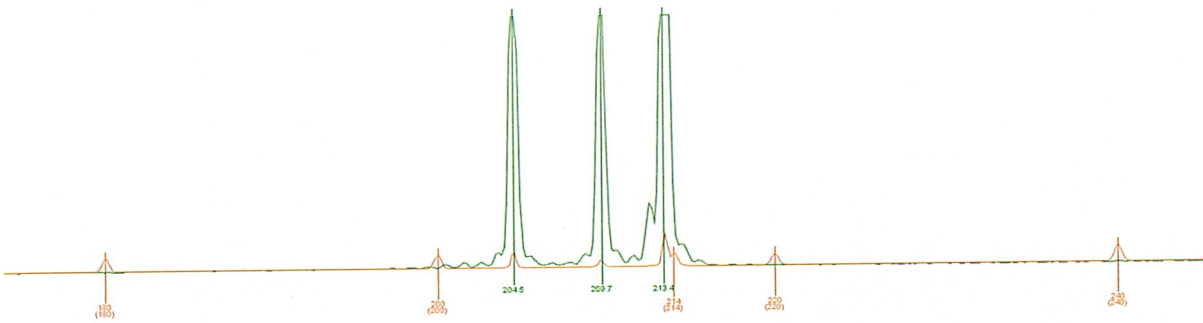
19088 -10;-5;-2;-1



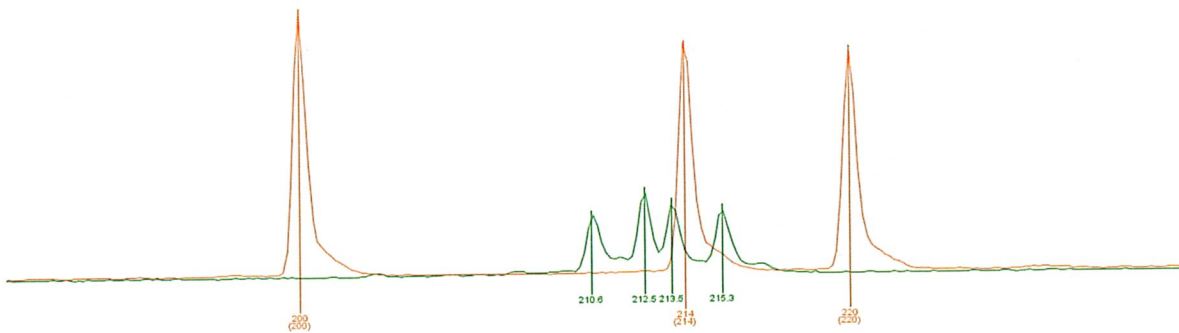
19092 -5;-2;-1



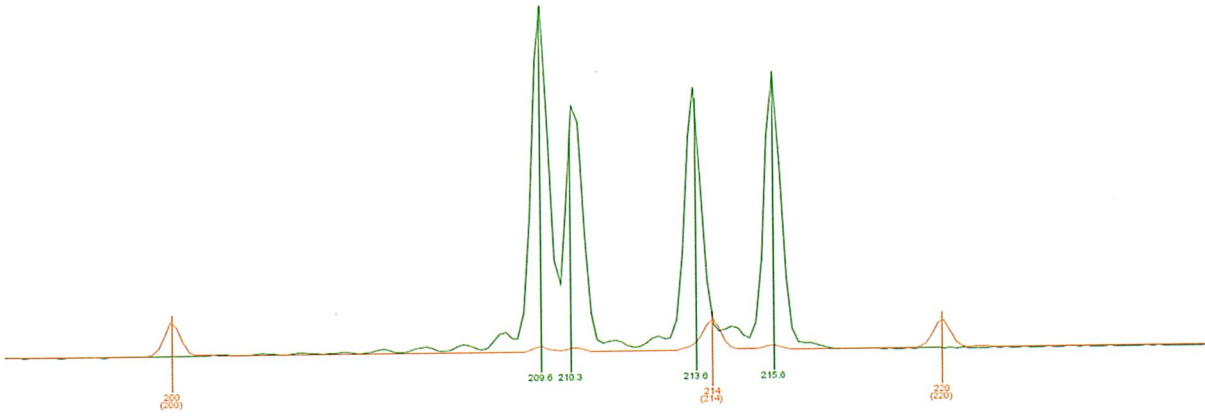
19097 -10;-5;-1



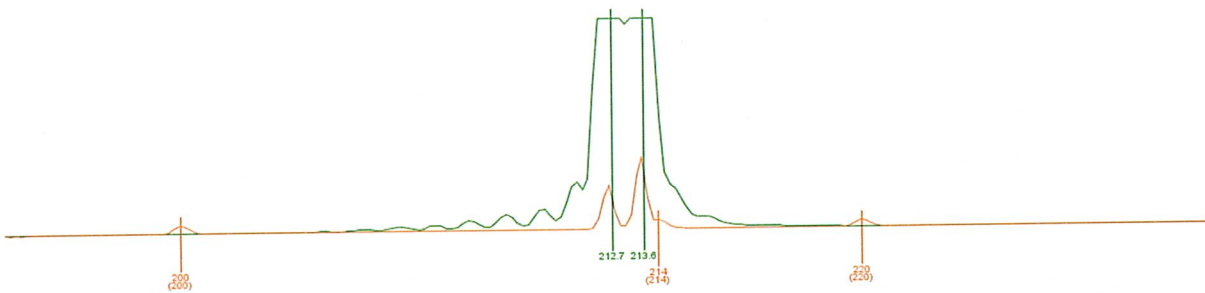
19099 -4;-2;-1;+1



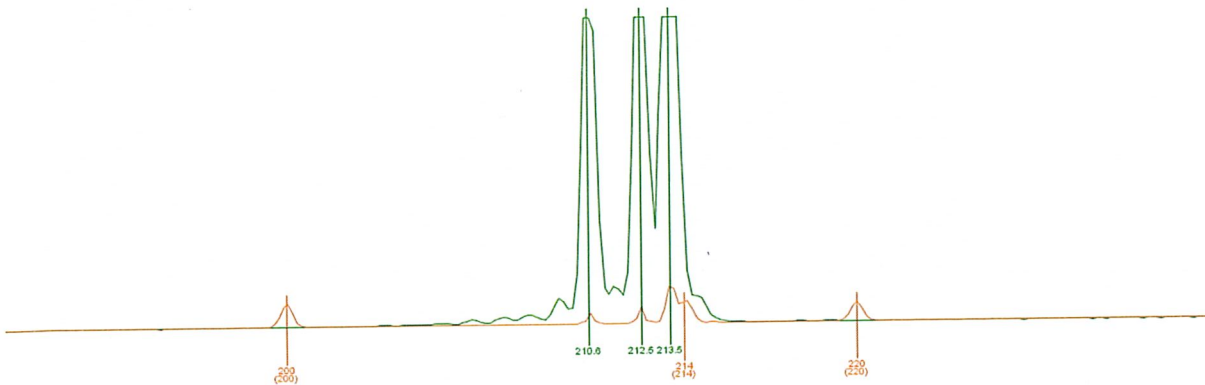
19102 -5;-4;-1;+1



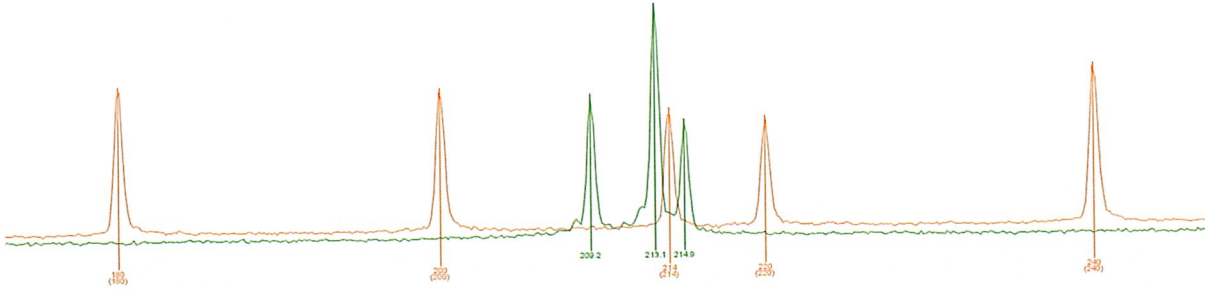
19105 -2;-1



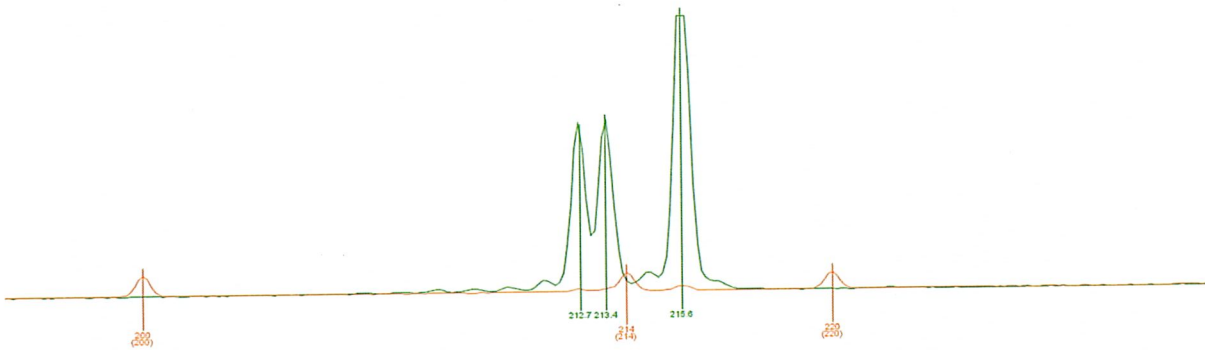
19110 -4;-2;-1



20003 -5;-1;+1

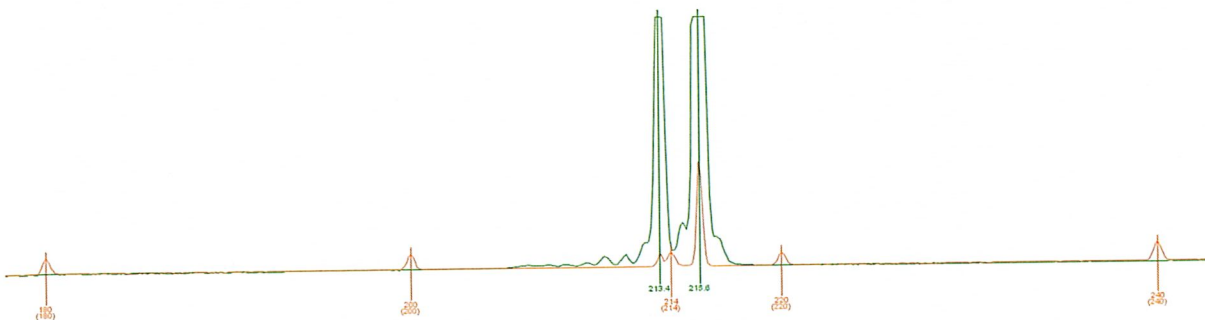


20027 -2;-1;+1

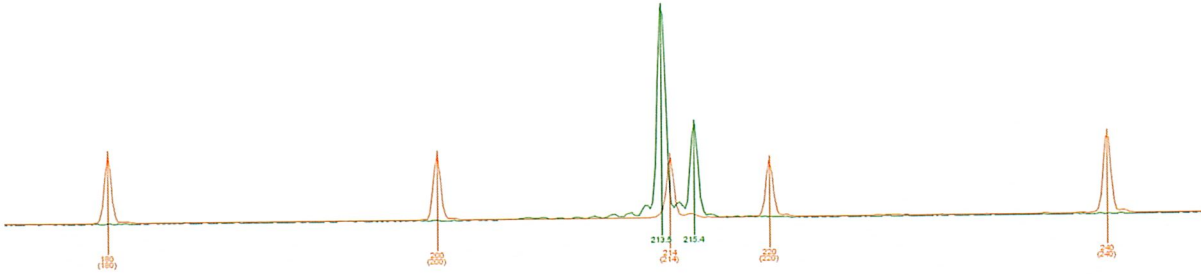


20031 — 1

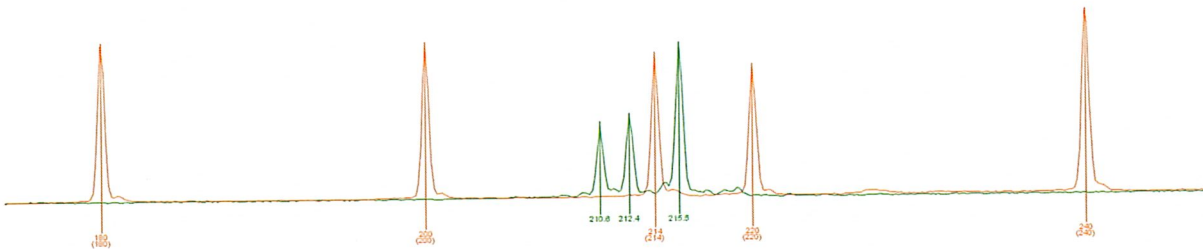
20032 -1;+1



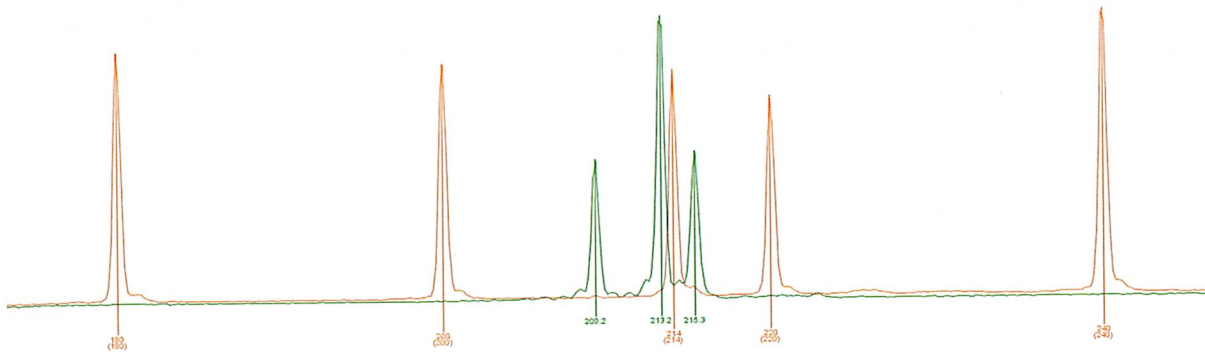
20035 -1;+1



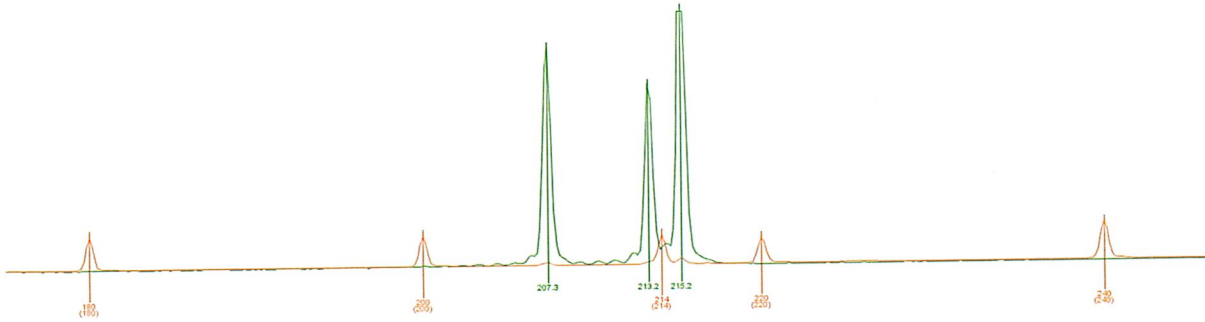
20059 -4;-2;+1



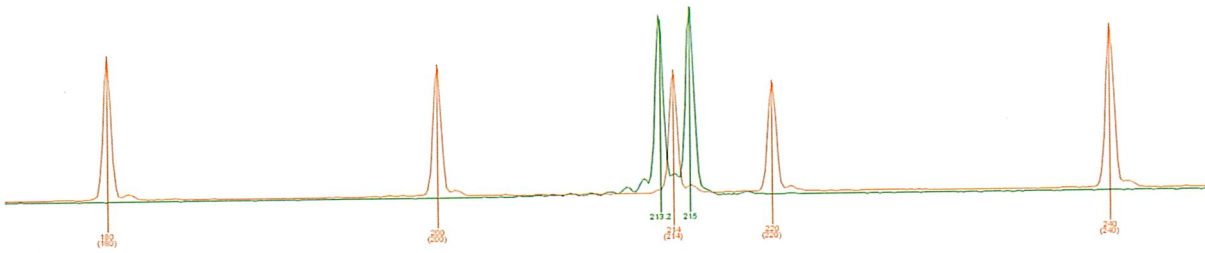
41028 -5;-1;+1



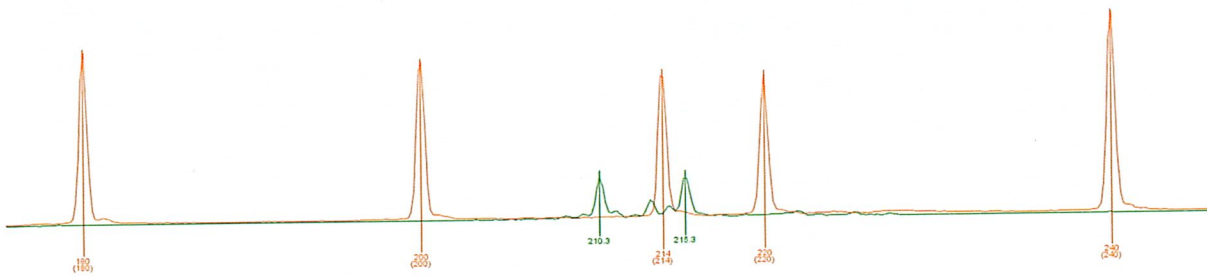
41081 -7;-1;+1



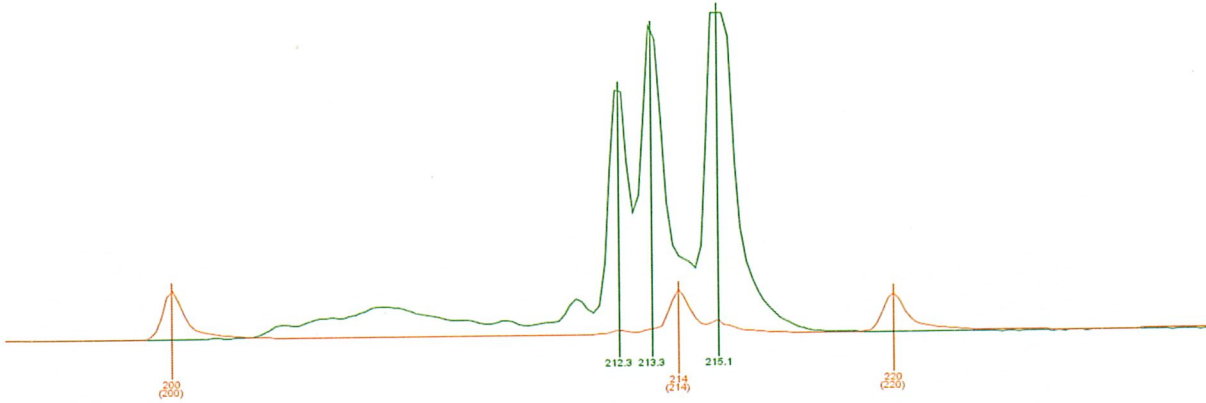
41122 -1;+1



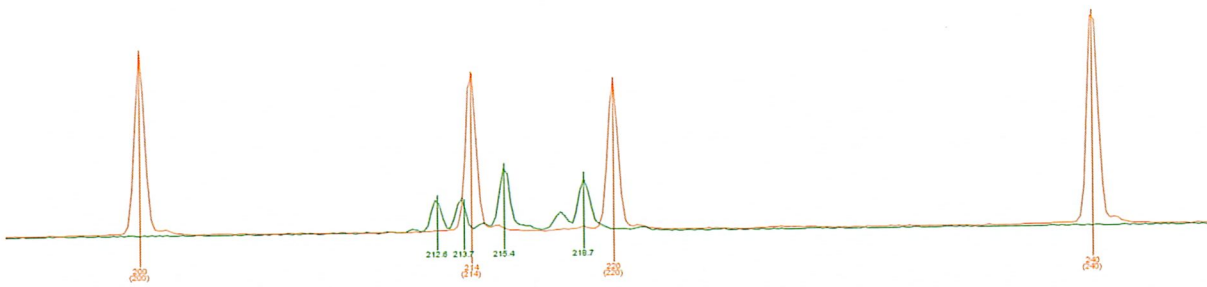
41247 -4;+1



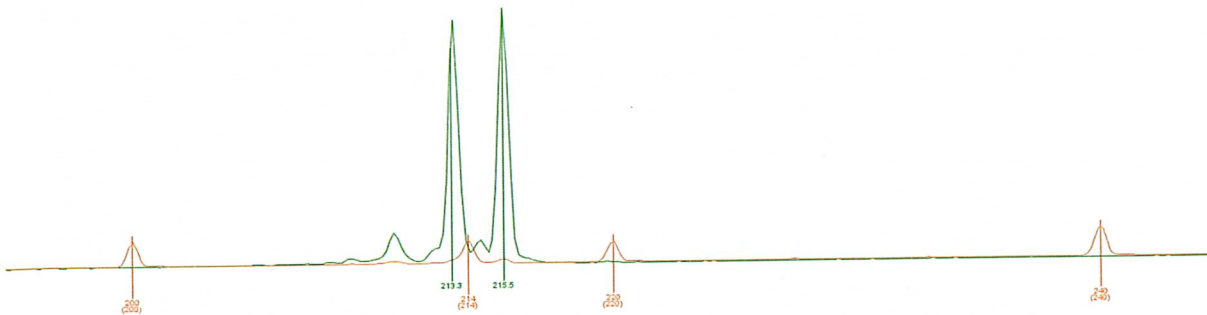
41268 -2;-1;+1



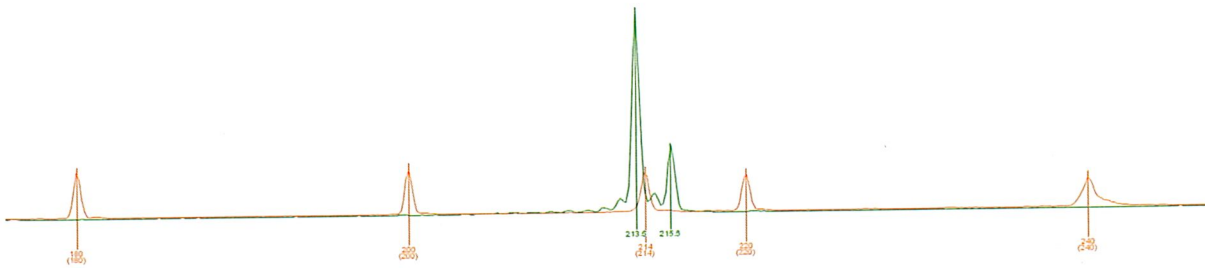
41339 -2;-1;+1;+4



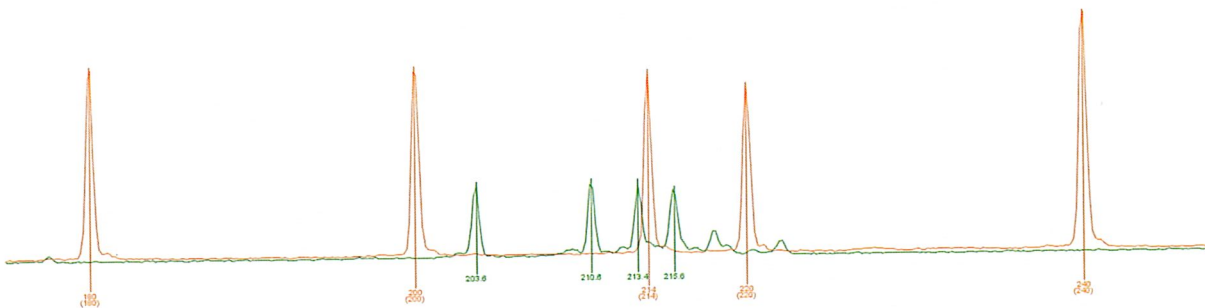
41378 -1;+1



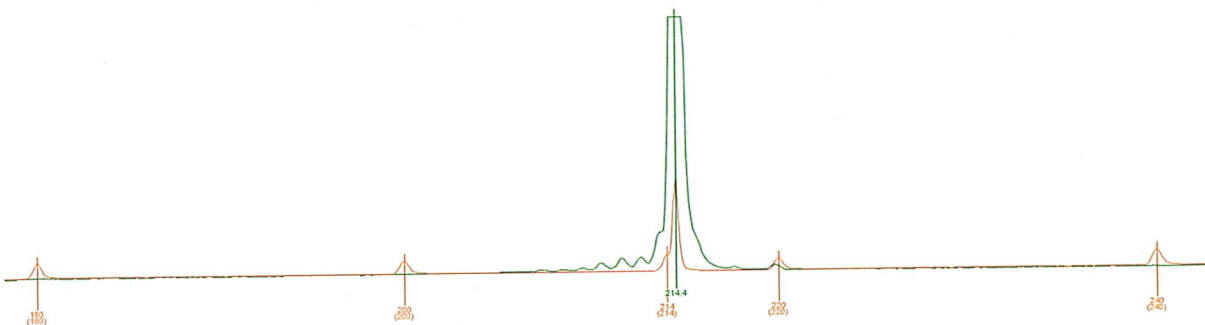
41388 -1;+1



41394 -11;-4;-1;+1



Wild type



Figur 3. HRFA/IDAA-kromatogrammer af editeringer i de 38 linjer. Peak(s), der repræsenterer vildtype-allel/alleler, har den omtrentlige størrelse på 214. En 5 bp deletion vil for eksempel være repræsenteret af en top med den omtrentlige størrelse på 209. For WT-kromatogram (det sidste) angiver grøn en top der er fremkommet fra prøven, og orange angiver markørafledte toppe, her 180, 200, 214, 220 og 240 bp, som blev iblandet prøven (samt de øvrige analyserede linjer).

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 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 CRISPR-Cas, 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 skimlen på sigt vil være betydeligt mindre.

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, og der ikke 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 *DMR6-1* gen overview Figur 1 ovenfor). Se endvidere IDAA profiler for linjerne ovenfor samt sekvensdata oversigt over SLU/SolEdits/UCPH-PLEN linjer [3006](#), [3008](#) og [3029](#).
- *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, 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 overvejede grad kun ved kønnet formering.

c) konklusioner af den molekylære karakterisering

De ovenfor beskrevne målrettede mutations analyser, IDAA og long-read sekventering, vil påvise, alle specifikke mutationer i det analyserede materiale.

Linje 2, 4, 5, 9 og 14: 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 linjerne ser vi editering/mutationer i alle 4 alleler ved IDAA analyse.

Linjerne 3006, 3008 og 3029: er blevet fuld allel specifik sekventeret i mål-området (Eurofins, long read sekventering). I linjerne ser vi editering/mutationer i alle 4 alleler.

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.

IDAA analyse for de 38 liner, der er fremkommet ved anvendelse af en enkelt sgRNA, benævnt DMRT4, er entydige med meget høj grad af allel-specifik mutations angivelser (se tabel ovenfor).

Mutant linje karakteristikkene 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. Utilization of Protoplasts to Facilitate Gene-Editing in Plants. *Frontiers in Genome Editing*, doi: 10.3389/fgeed.2022.780004

Andersson, M., Turesson, H., Nicolai, A. *et al.* Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep* **36**, 117–128 (2017). <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2062-3>

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.

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)

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 sække, som placeres i kasser med låg mærket GMO. Transport mellem landsdele ske i bil, 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 mindst 15 m til nærmeste kartoffelmark.
Udsætningsstedet for den CRISPR-Cas modificerede kartoffel vil desuden blive omgivet af et værn af ikke-CRISPR-Cas 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 planter reproduktionsorganer (F.eks. Pollen, frø, knolde).*
Udsætningsstedet for den CRISPR-Cas modificerede kartoffel vil blive omgivet af værn af ikke CRISPR-Cas 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 i de CRISPR-Cas editerede planter fra primo juli i forbindelse med blomstringen.

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".

Kartoffelknolde vil ved høst blive taget op med hånden, for at sikre, at 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 kort 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 (2025), 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 2026 som kan slås og overvåges.

Arealet med forsøgsudsætning af CRISPR-Cas modificerede kartofler fra 2023 (IMK-arealer 1-0 og 1-1) holdes som sort brak i 2024, og blomsterbrak i årene herefter, se skitse nedenfor.

Der vil ikke blive overlap mellem forsøgsarealerne fra 2023 og 2024 til nye forsøgsarealer indenfor markblok 500207-20, og nedenfor er vist en forventet placering for 2025 og 2026. Størrelserne på forsøgsarealerne for 2025 og 2026 kendes ikke endnu, da det forventes at det vil være et udvalg af linjerne fra 2024, som fortsat skal testes de kommende år.



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 knust forud for høst/optagning.

Plantemateriale fra været udenfor de CRISPR-Cas modificerede planter 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, 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 de CRISPR-Cas editerede 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/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'er

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

Alle plante-linjer (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.

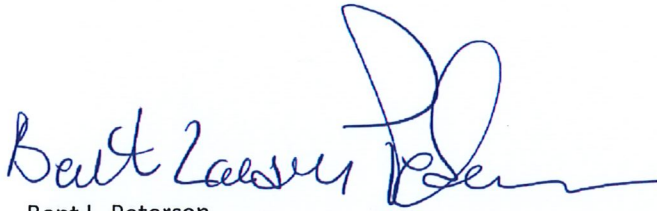
Målgenet er *StDMR6-1* udtrykt i alle kartoffel plantens dele. Læse-rammer i de første kodende regioner (exon 1 og 2) i alle fire alleler er brudt som følge af mutationen, hvorved ingen af genets fire alleler kan blive translateret til et funktionel *StDMR6-1* protein, hvorved *StDMR6-1* gen funktioner er fuldt ud destrueret. Den fænotypiske effekt af fuld allel knock out af *StDMR6* genet er beskrevet i Kieu et al (2020) og udsatte plante linjer 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'er.

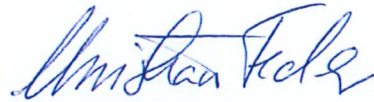
De 5+3 linjer af PLEN-UCPH (2023, 2024) er de samme GMPH'er, som blev udsat og testet i 2023 på nabo-arealet. Desuden testes 38 nye GMPH'er i 2024, som er frembragt ved samme teknik af SolEdits jf. tidligere videnskabelig beskrivelse (afsnit 2).

Dato: 11. marts 2024



Bent L. Petersen

Københavns Universitet



Christian Feder

KMC



KMC
Herningvej 60
7330 Brande · Denmark

Bilag:

1. Miljørisikovurdering
2. Artikel
3. Kort beskrivelse af GUDP-projekt (baggrund for ansøgningen).
4. KMCs GMO-godkendelse af laboratorie.
5. Foreløbig skitse til forsøgsplan i marken

Bilag 1

Miljørisikovurdering

Miljørisikovurdering

Ansøgning udsætning af CRISPR-Cas 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)

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

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

B)

Håndopgravning af knolde vil sikre, at risikoen for overlevende knolde i jorden er ubetydelig. Efterfølgende frost i vinterperioden og sort jord i året efter avl vil effektivt sikre at evt. overlevende knolde fra høst ikke 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 2026 som kan slås og overvåges. Det skal bemærkes, at erfaringer med håndopgravning af kartofler er at der meget sjældent efterlades knolde i jorden.

2. Genoverførsel fra plante til mikroorganismer

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

3. 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 af sikkerhed for at der ikke efterlades knolde i jorden.

Afklipping 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 type mutation er sket "naturligt", har den 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.

Bilag 2

Artikel

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 DMG400000582 (*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 µmol/m²/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>	<i>Hyaloperonospora sp./ 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 5-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 ATATTG 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; Applano et al. 2015), including the hemibiotrophic *P. palmivora*. Silencing of *Capsicum annuum* *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 syringe* (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.

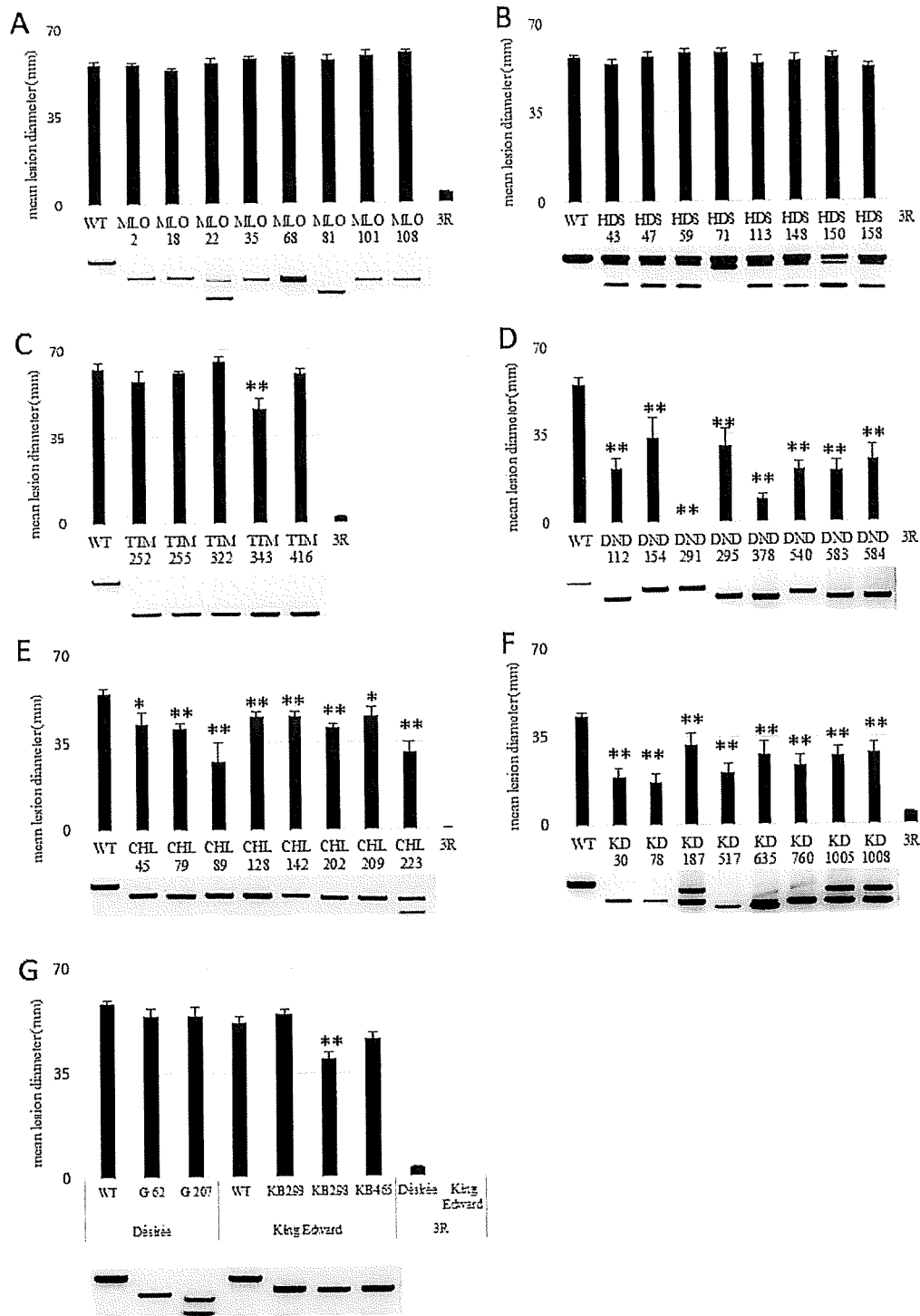


Figure 1: Mean lesion diameter and PCR analysis of potential *S*-gene mutant lines in potatoes. Lesions caused by *Phytophthora infestans* strain 88069 were scored after 7 d and PCRs were performed with

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

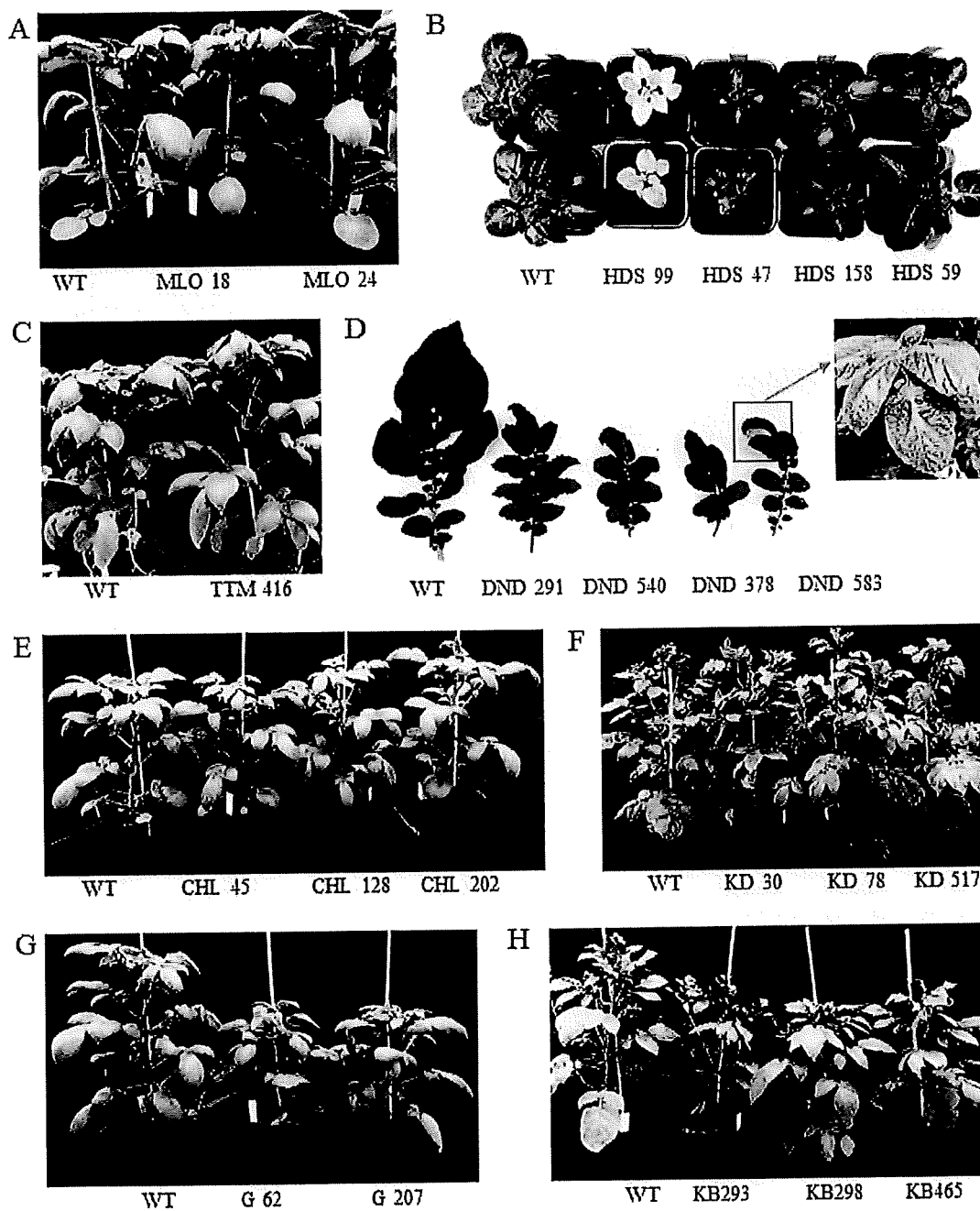


Figure 2: Phenotypes of mutant lines. A: *mlo* at 5-weeks old stage. B: Wild type Désirée and *hds* mutant lines at 2-weeks-old stage. C: Wild type Désirée and one *Stttm2* mutant line. D: Leaf phenotype of wild type and some *Stdnd1* mutant lines. E: Désirée and *Stchl1* mutant lines at 5 weeks old. 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 *SlDMR6-1* 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*.

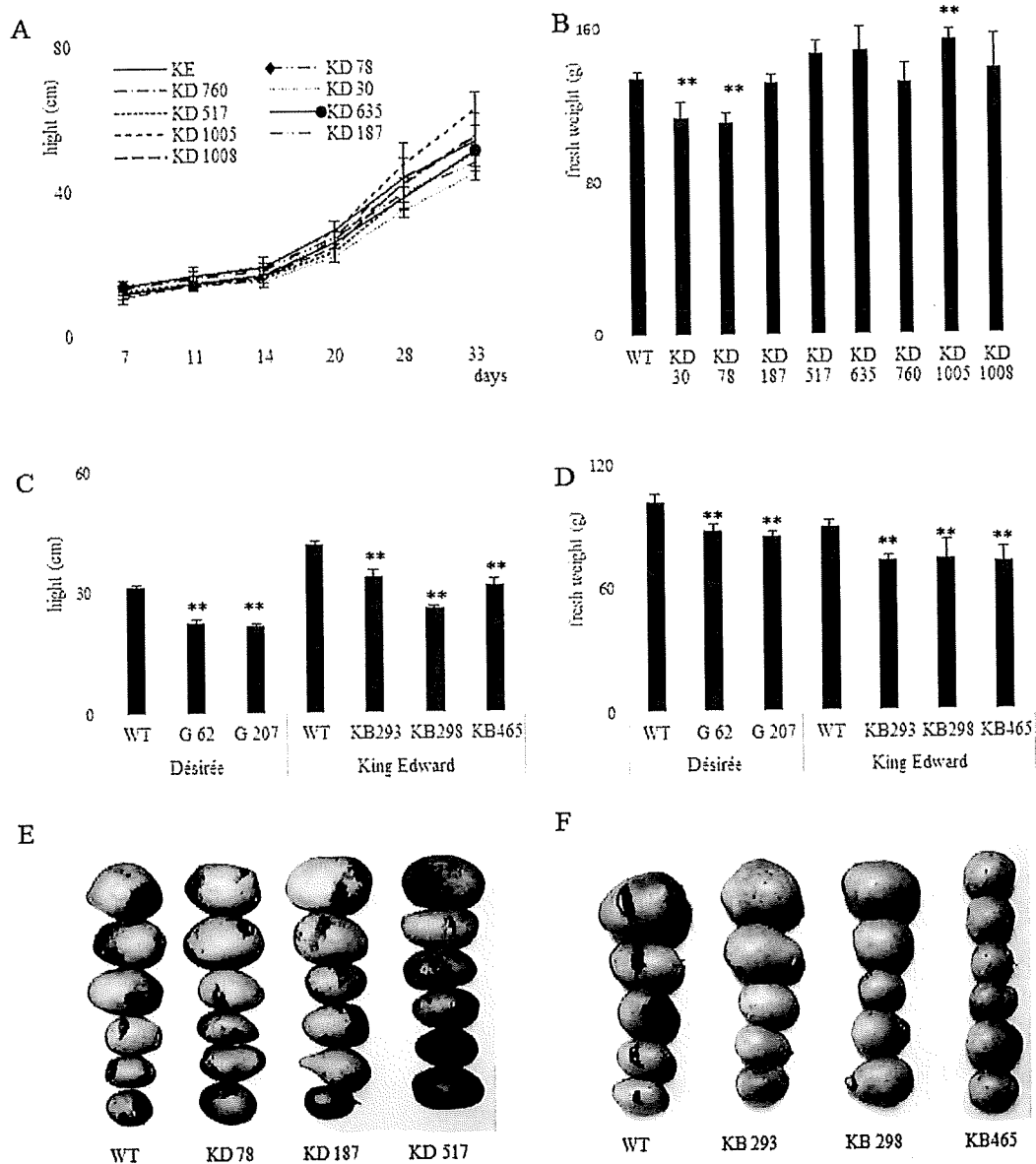


Figure 3: Growth phenotypes of *Stdmr6-1* and *Stdmr-2* mutant lines. A: Growth curve of wild type and *Stdmr-1* mutant lines. B: Fresh weight of 5-week-old wild type and *Stdmr6-1* mutant lines. C: Plant height of wild type and *Stdmr6-2* mutant lines. D: Fresh weight of 5-weeks-old wild type and *Stdmr6-2* 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 tar- get 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-Kreuz 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*.*

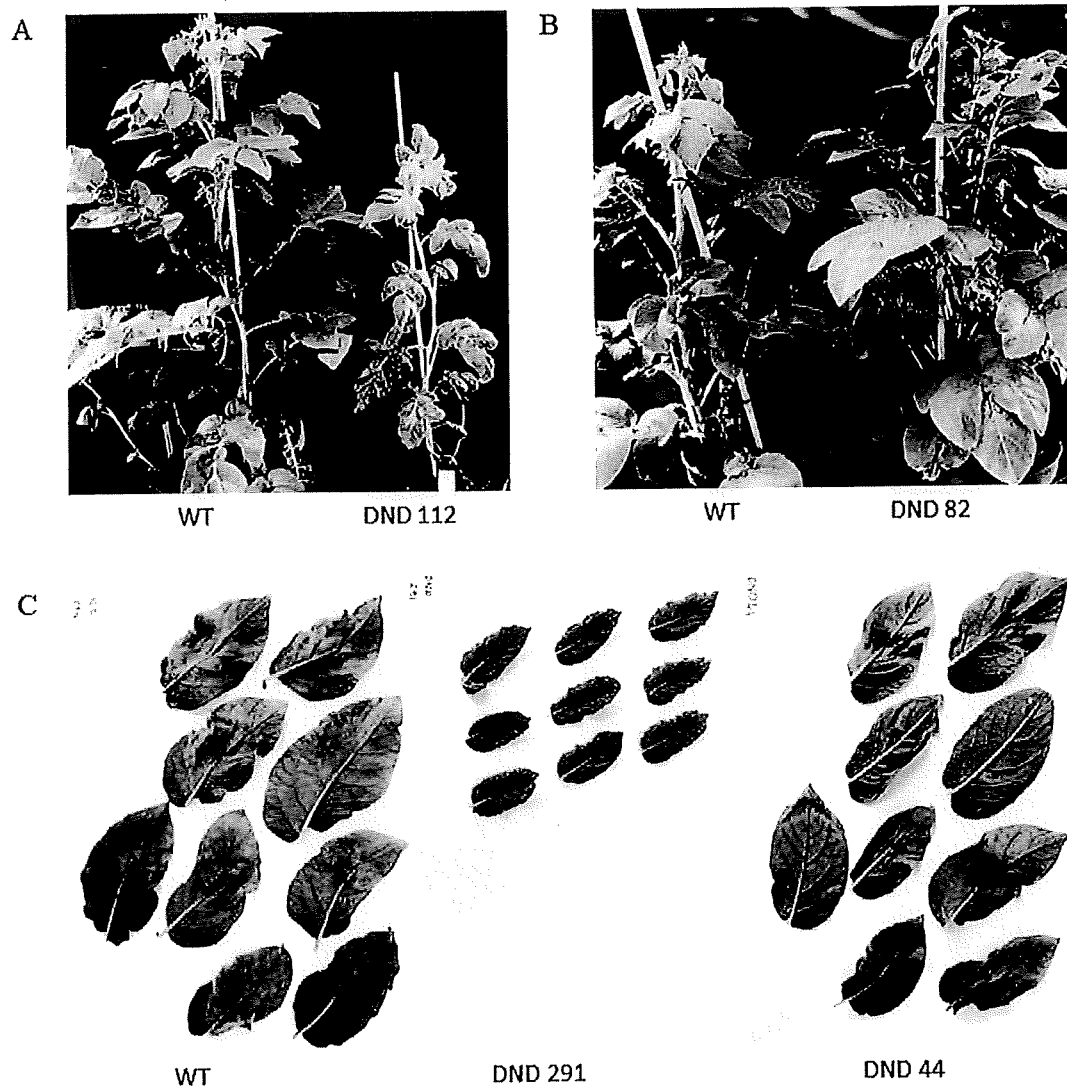


Table S1: Gene-specific primers used for amplification and sequencing of plant DNA, as well as screening of shoots. Primers specific for a potato housekeeping gene (*EF1α*) and an *Agrobacterium* gene (*virG*) were used to confirm the absence of *Agrobacterium* in shoots (Wang et al, 2020). na: not applicable

Gene	Primer	Sequence	Primer	Sequence	PCR amplification and sequencing	PCR analysis of shoots		
						Tm	gDNA WT band, bp	Mutant band, bp
StMLO1	MLO_F3	AGGATTCAGAAAGGGGAGACA	MLO_R3	CGTAATAAGTGAACAGGGGAGG		62	1271	681
StMLO1	MLO_F2	ACTCGTATCTTTGGGTGCCA	MLO_R2	ATGTCCGAGGAGATGCTTGA	x	58		
StMLO1	MLO_F3	AGGATTCAGAAAGGGGAGACA	MLO_R1	TTTGTTTCCAAAAGTGAAATCTGA	x	58		
StHDS	HDS_F835	ACCATGGGAGCCITTCAGA	HDS_R1087	TCCATCCTCACCTCACCAG		54	341	122
StHDS	HDS_F806	AAGTATGGACGTGCAATGCG	HDS_R1087	TCCATCCTCACCTCACCAG	x	58		
StHDS	HDS_F835	ACCATGGGAGCCITTCAGA	StHDS_qPCR_Rev2	CTGAAGAAGTGTGCCAATAC	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	AGTGCACAGGGTTGTGTTC	DND_R3	CGAAGACGATGATCATTATCC	x	58		
StDND1	DND_F2	AGTGCACAGGGTTGTGTTC	DND_R2	GATTGACAAGAACATTGCAGC	x	58		
StCHL1	CHL-F1	AATGGAGGAAATGGAAGCAG	CHL_R4	CTTGAAGTTCTCACTGCCTCTG		60	435	345
StCHL1	CHL_F1	AATGGAGGAAATGGAAGCAG	CHL_R3	AAGAATCATCCCCCTTCG	x	58		
StCHL1	CHL_F2	GCTTGAACGACAACCAGCTA	CHL_R2	TTATTGGCGCTCCITTTGTT	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	CAACATCTGATACGATACACTGT	x	58		
StDMR6-2	DMR62_ F1	AGCAACATTACTATTTGGAGGTTTC	DMR62_ R1	TTACCTGAAAGAAGGAGGATT		54	381	173
StDMR6-2	DMR62_ F2	CAAGTGTCTTTCCGGTGG	DMR62_ R1	TTACCTGAAAGAAGGAGGATT	x	58		
StDMR6-2	DMR62_ F1	AGCAACATTACTATTTGGAGGTTTC	DMR62_ R2	TACGCCGTGACAAAGCAA	x	58		
Potato EF1 α gene	St Ef1 α F2	GAAGTGTCCCTGTTGGTCGT	St Ef1 α R2	GGGTCATCCTTGAGTTTGA		58	220	na
Agrobacterium virG gene	VirG+	CGCACGCGCAAGGCAACC	VirG-	GCCGGGGCGAGACCATAGG		58	606	na

Bilag 3

Kort beskrivelse af GUDP-projekt (baggrund for ansøgningen)

Bilag 3.

Baggrund

I 2019 fik Københavns Universitet (KU), Aalborg Universitet(AAU), Sveriges Lantbruks Universitet(SLU) og KMC godkendt og bevilliget penge fra GUDP til projektet:

” Krisps. Kartoffler med resistens og innovativ stivelse som platform for synergi mellem grøn og økonomisk bæredygtighed”.

GUDP bevilligede næsten 11. millioner kroner til projektet, hvis formål er at anvende CrisprCAS teknologien til hhv. at forbedre/ændre eksisterende sorters modstandsdygtighed overfor kartoffelskimmel dels at frembringe en sort med ændrede stivelsesegenskaber således man i fremtiden vil kunne fremstille såkaldte ”Clean Label” stivelser.

Clean label stivelser er stivelser som ikke er blevet modificeret med kemi.

Den forbedrede modstandsdygtighed (resistens) overfor kartoffelskimmel forventes at kunne reducere anvendelsen af fungicider væsentligt, sammenlignet med samme sort uden den ændrede mutation.

Samarbejdet mellem de ovenstående parter har fungeret (og fungerer) særdeles godt og har resulteret i at vi 2022 kunne konstatere, at det er lykkedes at frembringe 2 kartoffelsorter som opfylder de ovenstående mål.

Vi har kunnet se det virker i laboratoriet hvilket er målet for første del af GUDP-projektet.

Den sidste del af GUDP-projektet indebærer også en markafprøvning, hvor det skal testes hvorvidt de 2 egenskaber også forefindes i planterne under realistiske markforhold.

Projektet er nu nået ind i denne fase, og vi er derfor klar til at skulle teste under realistiske markforhold og vi ansøger derfor Landbrugsstyrelsen om tilladelse til en forsøgsudsætning af de 2 sorter i 2023.

Marktesten er nødvendig for at kalde projektet en succes og få testet de 2 ændrede egenskaber under markforhold.

Skema A: Hovedansøgningskema

Alle felter skal udfyldes. Vejledning til udfyldelse af ansøgningskemaet kan findes her.

Projekt	
A1. Projekttype Projektet indeholder følgende aktiviteter:	<input checked="" type="checkbox"/> Anvendt forskning <input type="checkbox"/> Udvikling <input checked="" type="checkbox"/> Demonstration <input type="checkbox"/> Netværksprojekt
A2. Søges projektet under særligt øremærkede midler?	<i>Ikke relevant i denne ansøgningsrunde.</i>
A3. Projektitel, samt eventuelt akronym: (maks. 2 linjer)	KRISPS. Kartoffler med Resistens og Innovativ Stivelse som Platform for Synergi mellem grøn og økonomisk bæredygtighed.
A4. Kort projektbeskrivelse: (maks. 1.500 karakterer på dansk)	Danmark har en omfattende og moderne kartoffelproduktion, som står overfor væsentlige udfordringer i forhold til grøn omstilling, fordi kartoffelskimmel udgør en vedvarende trussel, der nødvendiggør et højt fungicidforbrug. Forbedret modstandsdygtighed i danske elitesorter, som i forvejen er optimeret mht udbytte og dyrkningsegenskaber, vil derfor medføre store økonomiske og miljømæssige gevinster. Hertil kommer ønsket om egenskaber, som kan mindske kvalitetforringelse under lagring, udvide anvendelsen af stivelsen i industrien, mindske acrylamid dannelse under forarbejdning og forbedre kulhydratsammensætningen rettet mod forebyggelse af livsstilsygdomme. Kombineret med bedre sygdomsresistens vil disse egenskaber bidrage til økonomisk vækst under hensyntagen til miljøet og med gevinst for folkesundheden. Det vil også imødekomme EU's krav til agroindustrien om at nedbringe brugen af pesticider og indføre grænser for acrylamidindhold i forarbejdede kartoffelprodukter som snacks og pommes frites. Projektet vil anvende ny biologisk baseret præcis forædling til at forbedre sygdomsresistens og kvalitet i danske kartoffel elitesorter. Præcis forædling vil, i modsætning til traditionelle metoder, ske uden at kompromittere andre af elitesorternes omhyggeligt opbyggede egenskaber. Vi har etableret og udbygget teknologien i kartoffel, og vi ved, hvordan vi opnår forbedret sygdomsresistens og nye kvalitetsegenskaber.

Ansøger

A5. Navn på hovedansøger/ projektledende virksomhed eller institution:	Kartoffelmelcentralen Amba		
A6. Kommune:	Ikast-Brande		
A7. CVR-nummer:	15230614		
A8. P-nummer:	100884898		
A9. Adresse:	Herningvej 60, 7330 Brande		
A10. Projektleders navn og titel:	Ole Bandsholm Sørensen, Udviklingsdirektør		
A11. Projektleders tlf. og e- mailadresse:	4064 8818, OBS@KMC.DK		
A12. Ansøgt beløb:	kr 9.218.654,00		
A13. Er der eller har der været søgt om tilskud til projektet under andre statslige, regionale eller EU ordninger?	<input type="checkbox"/> Ja – hvilke ordninger samt journalnr.		År:
	<input type="checkbox"/> Nej		
A14. Startdato:	01-01-2020	A15. Slutdato:	31-12-2023

Ansøgers bekræftelse


A16. Ansøgers bekræftelse:

Ved enkeltvirksomhedsprojekter underskrives hovedansøgningseskemaet af virksomhedens/institutionens økonomiansvarlige. Ved samarbejdsprojekter underskrives ansøgningseskemaet af hovedansøgers økonomiansvarlige eller projektleder.

Ansøger forpligter sig til straks at orientere GUDP-sekretariatet, hvis der sker væsentlige ændringer i de indsendte oplysninger. Herunder hvis der modtages finansiering til projektet eller dele af projektet fra anden side, som ansøger ikke havde kendskab til på ansøgningstidspunktet.

Ansøger bekræfter med underskriften, at alle de afgivne data og informationer i ansøgningsmaterialet er korrekte, samt at de angivne grønne og økonomiske effekter er estimeret realistisk og bedst muligt.

Vær opmærksom på, at nogle af de afgivne oplysninger kan blive offentliggjort på internettet, jævnfør indkaldelsens afsnit "Procedure for sagsbehandling af ansøgninger".

Dato: 28/12-2019	Underskrivers navn/stempel: OLE BANDSHOLM	Underskrift: 
----------------------------	---	---

Projektform og virksomhedsstørrelse

A17. Projektform:	<input type="checkbox"/> Enkeltvirksomhedsprojekt <input checked="" type="checkbox"/> Samarbejdsprojekt
A18. Virksomhedsstørrelse:	<input type="checkbox"/> Lille virksomhed <input type="checkbox"/> Mellemstor virksomhed <input checked="" type="checkbox"/> Stor virksomhed <input type="checkbox"/> Offentlig institution

Nøglepersoner

A19. Oversigt over projektets nøglepersoner fra de deltagende virksomheder/institutioner samt det forventede omfang af deres engagement:

I den sidste række i tabellen kan der skrives ekstra deltagere ind efter behov.

Navn:	Stilling:	Timeantal:	Institution/virksomhed:
Christian Feder	Agrochef	800	KMC amba
Ole Bandsholm Sørensen	Udviklingsdirektør	700	KMC amba
Bent Larsen Petersen	Affilieret Lektor	3296	KMC amba/KU
Andreas Blennow	Lektor	1648	KU
Kaare Lehman Nielsen	Professor MSO	412	AAU
Elisabeth Johansen	AC-TAP	5274	KU
Elsa Sverrisdottir	PostDoc	2064	AAU

Ansøgninger med forskningsandel			
A20. Forskningsfaglig vurdering:		OBS! Hvis projektet er søgt med forskningsandel skal skema E udfyldes.	
Detaljeret beskrivelse af projektet			
<p>A21. Projektets baggrund, formål og arbejdsplaner: (maks. 5.000 tegn)</p> <p>Baggrund På verdensplan er kartoffel den fjerdestørste afgrøde og Danmark er førende indenfor produktion af læggekartofler og stivelse. Produktionen står overfor nye udfordringer med hensyn til miljø og folkesundhed og ønsket om bedre kvalitet. I de seneste år er forbruget af pesticider blevet en større økonomisk belastning for erhvervet og står samtidig i vejen for en miljøvenlig produktion. Desuden udgør pesticidforbruget en trussel mod grundvandet og en helbredsrisiko for befolkningen. Kartoffelbladplet (<i>Alternaria solani</i> og <i>A. alternata</i>) er et stigende problem, mens kartoffelskimmel (<i>Phytophthora infestans</i>) udgør den største trussel, og efter introduktionen af kønnede stadier tidligt i 1970'erne har kartoffelskimmelen hurtigt udviklet nye smitteracer, som har overvundet R-gen betinget resistens. Desuden kan et varmere klima og mere regn i vækstsæsonen forværre sygdomsangrebene. For at bekæmpe rettidigt overvåges sygdomsudbredelsen nøje, men i praksis sprøjter mange landmænd ugentlig. Derfor udgør bekæmpelse af kartoffelskimmel mindst 20% af landbrugets samlede fungicidforbrug. Økonomisk betyder det en estimeret omkostning på 4000 kr/ha/år til forebyggelse af skimmel og bladplet, hvilket på landsplan med 30.000 ha, hvor der dyrkes stivelseskartofler i Danmark, giver en årlig omkostning på over 120 mill. kr. Forsinkelse af sygdomsudbredelsen kan mindske behovet for sprøjtning væsentligt, og derfor er sorter med forøget resistens en attraktiv mulighed. Mens R-gen betinget resistens har begrænset varighed, anses susceptibilitets gener (S-gener) for at have en bedre mulighed for at give varig beskyttelse. S-gener er nødvendige for skimmelenes etablering og vækst i planten, og hvis de slås ud, opnås en mindre modtagelighed og i nogen tilfælde også beskyttelse mod flere sygdomme. På SLU har Erik Andreasson opnået gode resultater med flere gener med op til 50% reduktion af skimmelinfektionen. For at drage nytte af disse forskningsresultater i danske elitesorter, er der brug for en forædlingsteknologi, som ikke påvirker de øvrige dyrkningsegenskaber og kvaliteter. Forædling har traditionelt benyttet sig af krydsning, kemisk behandling eller bestråling. Fælles for disse er, at de ikke giver mulighed for at bevare elitesorterne, fordi de skaber nye genkombinationer eller mange uønskede mutationer. En ny biologisk baseret metode, bedre kendt som CRISPR teknologi, benytter sig af et enzym (Cas9), som ved hjælp af et lille stykke guideRNA (gRNA), bliver dirigeret til præcis det gen, der ønskes slukket for. Både enzymet og gRNA molekylet nedbrydes hurtigt herefter, så man ender med en mutation, som ikke er anderledes, end hvad der kan opstå naturligt, eller som opnås med traditionelle forædlingsmetoder – dog med den store fordel, at der ikke sker andre ændringer. På KU-PLEN har vi opnået betydelig ekspertise på området, og har med præcis forædling fremstillet en variant af elitesorten Wotan med amylosefri stivelse.</p> <p>Status ved projektstart:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Effektivt genkonstrukt til produktion af amylosefri og lav sukker stivelse i knolden • Knolde af CRISPR forædlet amylosefri (GBSS) linjer klar til AP4 • 1. generation kartofler-planter med CRISPR-forædlet lav-sukker (GWD) forventes klar til AP4 • Et antal S-gen kandidater, som SLU har vist mindsker skimmelangreb, klar til AP1 <p>Formål</p>			

At imødekomme miljømæssige udfordringer og skabe potentiale for økonomisk vækst ved at forbedre sygdomsresistens i danske elite kartoffelsorter kombineret med en forbedring af stivelseskvaliteter, som efterspørges i industrien og forbedring af ernæringsmæssige kvaliteter, der forebygger livsstilsrelaterede sygdomme eller forhindrer dannelse af uønskede sundhedsskadelige stoffer.

Arbejdspakker

Arbejdspakkerne er ens for alle egenskaber der ønskes forbedret. I de tilfælde, flere egenskaber ønskes kombineret, vil AP2-AP5 blive itereret.

AP1: gRNA selektion

Sekvensen af målgenet karakteriseres i den valgte sort og er udgangspunkt for valg af gRNA og optimering af PCR assays. For at undersøge gRNA effektiviteten transformeres protoplaster med genkonstrukt, som udtrykker gRNA og Cas9, som høstes efter mutagenese (24 timer). Det muterede område amplificeres med PCR og analyseres med IDAA, der muliggør kvantificering af editeringen. Der analyseres 6-10 gRNA for hvert gen, hvoraf de to bedste bruges i AP2.

AP2: DNA-fri CRISPR

Protoplaster transformeres med et kompleks af Cas9 og syntetisk gRNA og kultiveres til der dannes skud. Der isoleres gDNA fra de enkelte skud, som analyseres med IDAA og sekventering for finde individer med mutation i alle fire alleler. Disse opformeres in vitro og etableres på jord til hhv AP3 og AP4.

AP3: Resistens analyse

Analyse af sygdomsresistens med "detached leaf assays".

AP4: Stivelses kvalitet

Analyse af stivelseskvalitet med relevante kromatografiske, kemiske og rheologiske metoder.

AP5: Markforsøg

Opformering og dyrkningstest.

AP6: Projektledelse

A22. Projektets nyhedsværdi: (maks. 1.500 tegn)

Beskriv projektets nyhedsværdi og hvordan projektets output adskiller sig fra andre lignende produkter. Projektet tager udgangspunkt i ny biologisk teknologi til præcis forædling af planter. CRISPR-teknologi er i modsætning til hidtige klassiske forædlings metoder, der skaber en mængde tilfældige og måske uønskede mutationer, en præcis og ren teknologi, som er målrettet netop det gen/den egenskab, man ønsker at ændre. Kemisk (EMS) og bestråling's mutagenese resulterer i fra 0.2 til 5 mutationer pr 1000 baser i DNAet, hvilket betyder, at en række gener rammes tilfældigt. For at komme af med de uønskede mutationer, krydses den muterede plante med sit ophav gentagne gange. Herved opstår mange nye genkombinationer, og i kartoffel med et tetraploid komplekst genom betyder det, at tidligere omhyggeligt fremavlede egenskaber i elitesorten går tabt. I kartofler er CRISPR/Cas teknologien pt den eneste teknologi, der tillader at ændre eller tilføje en egenskab i en given sort uden, at al tidligere forædling tabes. Derfor er CRISPR forædling klart at foretrække i forhold til andre teknologier som fx TILLING. Fælles for CRISPR/Cas, EMS og strålings mutagenes er, at der dannes et brud / klip i DNA/genomet, som repareres af cellens eget reparations system (NHEJ) med mindre mutationer tilføje.

I kartoffel er CRISPR-teknologien særdeles attraktiv, fordi den giver mulighed for målrettet forbedring af eksisterende elitesorter og den bringer muligheden for at kombinere forskellige forædlingsmål indenfor rækkevidde. For eksempel sygdomsresistens og stivelseskvalitet.

A23. Projektets konkrete effekter inden for grøn bæredygtighed: (maks. 2.500 tegn ekskl. effektskema)

Bedre resistens mod kartoffelskimmel vil være en vigtig milepæl i bestræbelserne for at opnå en stabil og bæredygtig produktion af kartofler. Igennem 175 år har denne sygdom været en udfordring. Den håndteres nu gennem et intensivt sprøjteprogram, som er en belastning for miljøet og en økonomisk udfordring for avlerne.

Bedre resistens mod kartoffelskimmel *Phytophthora infestans* og *Alternaria alternata* og *A. solani*, som forårsager bladplet, vil især forbedre muligheden for at kontrollere den epidemiske spredning og begrænse behovet for sprøjtninger sidst på vækstsæsonen, hvor smittetrykket er størst. Jo længere tid det er muligt at holde sygdommen i skak og jo flere sunde planter, der er i marken, jo bedre kan man udnytte tilgængelige vand og næringsstoffer. Eftersom spredningen af begge sygdomme påvirkes af de lokale vejrforhold, vil udbyttestabiliteten forbedres som resultat af øget resistens. I tørre somre er smittetrykket lidt mindre, men til gengæld er der behov for vanding, som kan foretages mere optimalt, hvis man ikke i samme grad behøver at tage højde for risiko for smittespredning.

Der sprøjtes i gennemsnit ti gange i vækstsæsonen mod de to sygdomme. Hvis forøget resistens kan nedbringe sprøjtningens behov til det halve på de godt 30.000 ha, der, ifølge Danmarks Statistik (DS), dyrkes med stivelseskartofler i Danmark, vil man opnå en betydelig gevinst. På sigt vil resistenserne også kunne udnyttes i spisekartofler (13.000 ha) og produktionen af læggekartofler (7900 ha). Den reducerede sprøjtning vil mindske risikoen for pesticid udvaskning og nedsivning af pesticider og deres nedbrydningsprodukter til grundvandet. Ligesom det reducerede pesticidforbrug vil mindske risikoen for pesticid rester i spisekartofler og andre kartoffelprodukter. Dertil kommer et reduceret energi forbrug, når der sprøjtes færre gange.

Projektets konkrete grønne effekter skal angives i et eller begge effektskemaer nedenfor. Se den nuværendes rundes vejledning på vores hjemmeside.

Effektskema 1 – Grøn bæredygtighed

Parameter		Effekt (husk enhed)	Udbredelse (husk enhed)	Total effekt (effekt x udbredelse)	Forventes opnået år	Kildehenvisning
Begrænset påvirkning af miljøet fra næringsstoffer (N og P), pesticider og klimagasser	Kvælstof (N)					
	Fosfor (P)					
	Pesticider	5 sprøjtninger	30.000 ha/år	150.000 s x ha/år	2030	PI DS
	Klimagasser (CO ₂ -ækv.)					

Effektskema 2 – Grøn bæredygtighed

Parameter	Kort beskrivelse (maks. 240 tegn)	
Bæredygtig ressourceanvendelse		
Fødevarerikkerhed, fødevarer kvalitet, human sundhed og ernæring	Fødevarerikkerhed	
	Fødevarer kvalitet	

	Human sundhed og ernæring	Et af målene er at forædle kartofler til at danne mindre frit sukker, hvilket vil nedsætte dannelsen af acrylamid ved senere forarbejdning
Skånsomme Produktionsmetoder		Mindsket pesticidforbrug og mindsket risiko for udledning af sprøjtemidler i grundvandet og i kartoffelprodukter. Mindsket udledning af salte i miljøet ved at erstatte konventionel kemisk modificering med stivelsesmodificering i kartofflen.

A24. Projektets konkrete effekter inden for økonomiske bæredygtighed: (maks. 2.500 tegn ekskl. effektskema)

Bedre resistens mod kartoffelskimmel vil, som beskrevet i A23, mindske behovet for sprøjtning. I AKS's budgetkalkyle fra 2016 angives at dækningsbidraget 8545 kr/ha. Det vil kunne øges væsentligt, hvis sprøjtebehovet nedsættes til det halve. Udgifterne til bekæmpelsesmidler mod skimmel og bladplet angives at være henholdsvis 2000 og 500 kr/ha. Dertil kommer udgifter til sprøjtning, som samlet set er sat til 1430 kr/ha. Dvs omkostningerne til bekæmpelse af skimmel og bladplet, hvor der i gennemsnit sprøjtes 10 gange i vækstsæsonen, er på ca. 400 kr/ha pr sprøjtning pr år eller 4000 kr/ha pr år. En halvering af dette vil øge indtægten med 2000 kr/ha om året, hvilket på landsplan svarer til 60 mill kr alene på de arealer, hvor der dyrkes stivelseskartofler.

Dertil kommer økonomiske gevinster ved at kunne producere specialstivelse direkte på marken. Det globale marked for modificeret stivelse er i vækst, og i Danmark produceres 300.000 ton stivelse årligt. Fra forskning i transgene planter ved man slukning af udvalgte gener, kan forholdet mellem amylose og amylopektin ændres, ligesom fosfat og fri-sukker indhold kan sænkes. Som eksempler på anvendelser kan nævnes proces-stabil høj-amylopektin stivelse, der anvendes til papirindustrien og til fødevarerindustrien i frugt- og mejeriprodukter. Høj-amylose stivelse med stort potentiale som gelatine-erstatte i f.eks. konfekturer eller til coating, vandresistente film og bioplast, men måske specielt som sundhedsfremmende resistent stivelse. Lav-fosfat stivelse mindsker indholdet af frit sukker i knoldene, hvilket begrænser dannelse af kræftfremkaldende acrylamid i friterede produkter og øger lagerholdbarheden ligesom lave fosfatniveauer giver stærkere geler.

Konkrete effekter skal indføres i et eller begge af de to skemaer, der knytter sig til økonomisk bæredygtighed. Se evt. vejledningen side 16.

Effektskema - Projektets provenu

Projekt deltager	Provenu i kroner (Indtjening fratrukket omkostninger)				
	År 1	År 2	År 3	Sum	Kildehenvisning

*Det skal fremgå af den supplerende tekst, hvordan provenuet genereres for de enkelte deltagere i tabellen. Herunder skal det beskrives hvad der forventes at blive solgt, hvor mange enheder (den forventede udbredelse) og til hvilken nettoindtjening. Det skal være tydeligt, hvordan provenu er udregnet, og tallene i tabellen skal kunne genfindes i den supplerende tekst med en forklaring. Provenu inkluderer alene økonomiske effekter for projektgruppen.

Effektskema – Projektets videre økonomiske effekt

Videre økonomisk effekt for	Effekt (husk enhed)	Udbredelse (husk enhed)	Total effekt (effekt x udbredelse)	Forventet implementeret år	Kildehenvisning
Fungicid forbrug	2000 kr/ha	30.000 ha/år	60.000.000 kr/år	2028	PI AKS

*Videre økonomisk effekt er projektets potentielle ved udbredelse af projektets resultater i erhvervet målt i kroner. Videre økonomisk effekt er desuden samfundsøkonomiske effekter. Videre økonomisk effekt må ikke indeholde effekter, som ligger indenfor projektdeltagerkredsen.

A25. Projektets organisering og ledelse: (maks. 2.500 tegn)

Konsortiet består af essentielle enheder med både overlappende og distinkte komplementerende fagligheder: KMC, SLU som underleverandør til KMC, BIOSCI-AAU, KMC/KU, PLEN-KU.

KMC vil koordinere projektet (AP6). KMC vil trække på erfaringer fra andre universitets samarbejder, herunder tre igangværende projekter under Innovationsfonden plus flere GUDP projekter. KMC vil arrangere årlige koordinationsmøder og sikre den løbende vidensudveksling mellem parterne. KMC vil formidle af projektets resultater til interessenter i erhvervet, så der kan opnås en bred forståelse for og accept af de nye metoder, som projektet benytter sig af. KMC vil desuden gennemføre testdyrkinger af de forædlede elitesorter mhp fremtidig produktion (AP5).

For at sikre, at projektet drager nytte af den nyeste forskning indenfor resistens mod kartoffelskimmel har KMC truffet aftale med Erik Andreasson på Sveriges Lantbruksuniversitet i Alnarp om at være underleverandør med viden om S-gen valg (AP1), samt de resistenstest, som skal udføres på de forædlede elitesorter (AP3).

Kåre Lehmann (KLN) fra AAU vil sikre at projektet får adgang til sekvensdata og bioinformatiske ressourcer, som er nødvendige for valg af de specifikke gener, som bliver mål for forædlingen. AAU vil stå for deep sequencing af udvalgte gener (AP1) og analyse af regenererede planter (AP2). KLN vil desuden bidrage med sin store viden indenfor kartoffeludviklingsbiologi, molekylær forædling og

genomanalyse.

Bent Larsen Petersen (BLP) vil være ansat ved KMC, men med primær arbejdsplads på KU. BLP vil med den dobbelte affilering være bindeled og central for projektets ledelse. BLP og IEJ vil gennemføre det praktiske arbejde i AP1-2. BLP vil være ansvarlig for publicering og præsentation af projektets resultater i internationale tidsskrifter og på konferencer. BLP vil desuden have en central rolle i at følge fremskridt i CRISPR-teknologien, så projektet kontinuert kan drage nytte af disse.

Andreas Blennow (AB) fra KU vil bidrage til AP1 med sin viden om stivelsesbiosyntese, og være ansvarlig for stivelsesanalyser under AP4. AB vil desuden være projektets stivelsesekspert, som følger den internationale forskning tæt.

Ida Elisabeth Johansen (IEJ) ansættes på KU i forskningsmiljøet, hvor CRISPR-teknologien i kartoffel gennemføres. BLP og IEJ vil gennemføre det praktiske arbejde i AP1, og IEJ desuden være ansvarlig for AP2. IEJ vil varetage dokumentation og kvalitetskontrol af projektets resultater.

Projektleders og deltagernes kompetencer til at gennemføre projektet (maks. 5 linjer per deltager).

KMC (Kartoffelmelcentralen A.M.B.A). Ole Bandsholm Sørensen (OBS) og Christian Feder (CF) – med viden indenfor kartoffel forædling og stivelses kvalitet og funktionalitet - vil koordinere projektet. KMC har stor erfaring med universitetssamarbejder, og deltager pt i tre projektet, som er støttet af Innovationsfonden og har deltaget som partner i flere GUDP projekter.

SLU (Sveriges Lantbruksuniversitet) er underleverandør til KMC. Erik Andreasson (EA), SLU-ALNARP har 15 års erfaring med resistens i planter og anvender CRISPR-teknologi i sin forskning. EA har specifikt arbejdet med skimmelresistens i kartofler i ti år, og har proof of concept ved at have genereret over 100 S-gen mutanter i kartoffelmodellen Desirée vha transgen teknologi og screenet disse for resistens.

BIOSCI-AAU (Aalborg Universitet). Kåre Lehmann Nielsen (KLN), Sektion for Bioteknologi på AAU er eksperte indenfor kartoffel genom analyse. KLN har bidraget med metodeudvikling, dataanalyse og bioinformatik til karakterisering af det komplekse kartoffelgenom. Omfattende sekventering har resulteret i 10 fuldt sekventerede sorter og associationsdata fra mere end 2000 kloner.

PLEN-UCPH1 (Københavns Universitet). Bent Larsen Petersen (BLP), Sektion for Glycobiologi har stor viden indenfor komplekse kulhydrater og deres biologiske funktion. BLP har fra starten været med til at implementere CRISPR/Cas9 teknologien i planteforskningen. BLP har bidraget til udviklingen af IDAA, og været drivkraften i udviklingen af den amylosefri variant af Wotan.

PLEN-UCPH2 (Københavns Universitet). Andreas Blennow (AB), Sektion for Glycobiologi er internationalt anerkendt for sin ekspertise indenfor stivelse og har 25 års dokumenteret erfaring med stivelses syntese, bioengineering af funktionalitet i fødevarer og materialer. AB vil derfor kunne udvælge gener, som har betydning for modificering af stivelsen og vil have en central rolle, når stivelsens egenskaber skal karakteriseres.

Ida Elisabeth Johansen (IEJ) har de sidste tre år stået for det praktiske arbejde med CRISPR-teknologien i kartofler, herunder protoplasttransformation, vævskultur og regenerering af planter. IEJ har optimeret CRISPR-teknologien, så op til 35% af de regenererede planter har mutationer i alle alleler, og har ligeledes opnået vigtig indsigt i valg af gDNA, allelkarakterisering og mutationsanalyse.

A26. Projektets sammenhæng med andre tidligere og igangværende projekter: (maks. 2.500 tegn)

Ved sidste GUDP ansøgningsrunde fik projektet bedømmelsen "Relevant projekt, der vil kunne have stor økonomisk betydning for kartoffelavlere, industrien og miljøet.". Det blev ikke bevilget fordi "Der er dog stor usikkerhed med hensyn til om produktet vil kunne anvendes i Danmark, da forædlingsteknikken ikke er undtaget fra GMO-direktivet". Denne usikkerhed har vi adresseret under A28, A32, A34 og A35. Desuden har vi siden sidste ansøgningsrunde bragt CRISPR teknologien i kartofler til et stadie, hvor DNA-fri CRISPR er rutine på KU, og SLU har vist, at mutation af et enkelt S-gener kan mindske skimmelangreb med 50%. Begge fremskridt placerer projektet senere i værdikæden, og har bragt forskning til frem til udvikling, hvilket imødekommer vurderingen af proekettet som "forskningstungt og ligger meget tidligt i værdikæden."

Projektet har afsæt i projektet "Helt nye stivelseskartofler genereret ved Præcis Genom-Editering", som blev støttet af Kartoffelafgiftsfonden 2016-18. Projektet var et samarbejde mellem KMC og PLEN-KU med Andreas Blennow som ansøger og Bent Larsen Petersen som co-PI. Her blev CRISPR-teknologien til kartofler implementeret på KU af Ida Elisabeth Johansen (IEJ). Det har givet en betydelig erfaring med alle aspekter af det praktiske arbejde og resulterede i forædlede linjer af elitesorten Wotan med amylosefri stivelse. Disse linjer er nu klar til testdyrkning. I den sidste fase af projektet viste IEJ, at DNA-fri CRISPR fungerer effektivt i kartofler. Den DNA-fri teknologi sikrer at de forædlede planter på intet tidspunkt i forædlingsprocessen indeholder fremmed DNA og vil blive brugt i det ansøgte projekt. CRISPR-teknologien til kartofler blev oprindeligt udviklet på SLU i Alnarp, hvor Erik Andreasson, var en af projektdeltagerne.

Anvendelsen af IDAA i planter var en del af UCPH Excellence Programme for Interdisciplinary Research (CDO2016) 'Precision Genetic Editing: UCPH as a leader in the next generation of Designer organisms', med Bent Larsen Petersen som Co-PI.

Genom og sekvens ressourcerne MASPot (STF: 0603-00451B) fra AAU, som vil blive brugt i projektet kommer fra Innovationsfondprojektet GenSAP. Disse resultater vil sammen med resultater fra Erik Andreassons projekter på SLU være af stor værdi for udvælgelsen af S-gen kandidater. Viden om stivelse, stivelses analyse og anvendelser har sit udspring i et flertal tidligere industridrevne og basale projekter, som ledes af Andreas Blennow.

A27. Projektets forventede samarbejde med relevante virksomheder/institutioner/projekter både nationalt og internationalt: (maks. 2.500 tegn)

Sveriges Lantbruksuniversitet, som er underleverandør, har resultater fra sorten Desiree, som er muteret i S-gener ved hjælp af transgen teknologi, som viser, om S-gen mutationen giver øget resistens. Dette arbejde er sket under ledelse af Erik Andreasson (EA), som også har været med til at udvikle den PEG baserede transformation, som anvendes i projektet. EA har arbejdet med skimmelresistens i mere end 10 år, og har opbygget en forskningsgruppe på 15 personer og har over 25 publikationer på området. EA har udviklet "detached leaf assays" til test af skimmelresistensen i laboratoriet. Sammenholdt med markforsøg har det givet erfaring med hvordan laboratorie test og markforsøg hænger sammen. Således er "field-omic" et centralt interesseområde for gruppen. Field-omic består af og forbinder forskellige metoder af relevans for udforskningen og løsningen af videnskabelige og agronomiske problemer. EA og KMC har underskrevet en fortrolighedserklæring og rettighedsaftale, som dækker viden og sorter, som udveksles og udvikles i det ansøgte projekt.

IDAA til analyse af CRISPR-mutagenese foregår i på Center for Glycomics på Københavns Universitets Sundhedsvidenskabelige Fakultet, som Bent Larsen Petersen har længe arbejdet sammen med gennem fælles bevillinger, publikationer og studerende.

A28. Kommunikationsplan: (maks. 2.500 tegn)

Samvirke har interviewet projektgruppen på KU i forbindelse med udarbejdelse af en artikel, som skal give et bredere kendskab til CRISPR-teknikken og dermed skabe forståelse for teknologiens muligheder og centrale placering i en grøn omstilling. Artiklen vil blive bragt i foråret 2019. KMC vil orientere andelshaverne gennem nyhedsbrevet 'Dansk Kartoffelstivelse' om både teknologien og dens muligheder og om projektets resultater. Væsentlige fremskridt vil blive præsenteret gennem relevante skriftlige og digitale medier.

Projektdeltagerne vil bruge muligheden for at fortælle om teknologiens muligheder. Herunder miljømæssige fordele i form af mindre sprøjtning, økonomiske potentiale gennem bedre stivelses kvaliteter, for eksempel brug af stivelse i stedet for gelatine, som vil give mulighed for afsætning til vegetarer og veganere, samt fordelene for økologisk og plantebaseret produktion. Det kan være i debat fora som fx DR1 nyheder, DR2 Deadline, TV2 news og andre relevante nyhedskanaler.

Projektgruppen deltager i en EU-kreds, som gennem oplysning forsøger at påvirke lovgivningen i EU, så EU-landene ikke kommer bagud i udnyttelsen af DNA-fri CRISPR, samtidig med at nye plante- og plantebaserede produkter fra den øvrige verden frit kan markedsføres i EU, fordi der ikke er nogen mulighed for at påvise, om de har deres oprindelse i traditionel eller CRISPR baseret forædling.

Projektets forskningsdel vil blive præsenteret på nationale og internationale konferencer, deriblandt 'Starch Round' Tables i EU og USA, Starch Convention, Detmold og 'EPNOE International Polysaccharide Conference' og 'ICPPPS International Conference on Plant Physiology and Plant Science meetings'. og publiceret i fagfællebedømte internationale tidsskrifter.

Ole Bandsholm, KMC, vil være kontaktperson for medvirken i interview eller evt. i en 'informationskampagne' for GUDP.

A29. Forretningsplan

A30. Angiv hvilken deltager forretningsplanen vedrører:

KMC

OBS! Skal ikke udfyldes af netværksprojekter

A31. Projektets output: (maks. 2.500 tegn)

Projektet vil færdiggøre arbejdet med den forædlede Wotan med amylosefri høj-amylopektin stivelse, så den kan indgå i KMC's pipeline af nye elitesorter.

Der arbejdes for nuværende med at frembringe lav-fosfat stivelse i elitesorten Saturna, som vil have et lavere indhold af frit sukker, som blandt andet er årsag til acrylamid dannelse.

Dertil kommer Wotan med bedre resistens mod kartoffelskimmel, som ikke er fremstillet endnu, men hvor der kan opnås 50% reduktion i sygdomssymptomerne.

Disse tre forædlede sorter bliver udgangspunkt for helt nye linjer som kombinerer høj-amylopektin eller lav-fosfat stivelse med skimmelresistens, og høj-amylopektin- med lav-fosfat stivelse, som har potentiale som plantebaseret gelatine erstatning.

Forædling af flere egenskaber eller kombination af S-gener samt monitorering af baggrundsresistens i udvalgte kultivars er uddybet under projektets forskningsdel i skema E.

Resultaterne vil lave grundlag for at skimmelresistensen kan indføres i andre elitesorter, da de effektive gRNA, som er fundet i arbejdet med Wotan, kan bruges direkte.

Herudover vil projektet give nye forædlingsmål til yderligere at højne sygdomsresistensen og forbedre stivelsens kvalitet. Effektiviteten af CRISPR teknologien afhænger af effektive gRNA, så identifikation af disse i flere gener, er et stort skridt på vejen i arbejdet udviklingen af nye elitesorter, som kan bidrage til bæredygtig produktion, erstatte kemisk modifikation og finde vej til nye markeder, fx til den stigende efterspørgsel efter plantebaserede fødevaringredienser og biologisk nedbrydelige polymerer til industrien.

A32. Markedet og kunder: (maks. 2.500 tegn)

De skimmelresistente sorter vil ikke skabe et nyt marked eller nye kunder, men vil blive en gevinst for miljøet og vil forbedre kartoffelproducenternes økonomi betydeligt. Nye stivelseskvaliteter kan give nye markedsandele til KMC, som omsætter for 12.000 mill. kr kartoffelprodukter, hvoraf halvdelen afsættes udenfor EU.

Processtabilitet er en vigtig parameter for fødevarerindustrien. Høj-amylopektin stivelse der produceres i relevante elitesorter vil derfor tage betydelige markedsandele fra tilsvarende så kaldt "waxy maize starch" fra majs.

Funktionaliteten for høj-amylopektin / lav-fofat stivelse har betydelig potentiale som plantebaseret gelatine erstatning. Potentialt for gelatine er forventet at stige til 3.6 milliarder USD til 2023, med en CAGR af 6.6% i perioden 2018-2024 <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/gelatin-market-850.html>. Plantebaserede alternativ til gelatine udvikles hurtigt (<https://www.ingredientsnetwork.com/industry-innovation-targets-gelatin-alternatives-news075109.html>), hvor specialestivelses efterspørges til en stigende gruppe af vegetar og veganforbrugere.

Lav-fofat stivelse i kartofler er relateret til lavt sukkerindhold og lagringsstabilitet og er derfor interessant for produkter som fritteres eller bages, fordi det kan nedsætte risikoen dannelsen af acrylamid, som er en reaktion mellem reducerende sukkerarter og aspargin. KMC producerer omkring 22.000 tons kartoffel pulver og kartoffelflager, som afsættes til snackindustrien, fx Pepsico, Intersnack, Eurosnack, URL og Liwayway. Det er under 10% i et voksende marked, som i 2015 blev estimeret til at have en værdi på \$90.000 mill og forventes at stige med 3% om året. KMC oplever en stigende interesse for kartoffelpulver og kartoffelflager med lavt sukker indhold, og KMC forventer at fordoble sin produktion indenfor 5 år og med muligheden for at tilbyde lav-sukker produkter er sandsynligheden for at udnytte kapaciteten på kort sigt betydelig større.

A33. Forretningsgrundlag: (maks. 2.500 tegn)

KMC er ejer af sorten Wotan, som har været udgangspunkt for den DNA-fri CRISPR forædling, som er gennemført på KU. Det indledende arbejde har resulteret i flere linjer med amylose-fri stivelse. KMC har rettighederne til denne og andre forædlede egenskaber i Wotan. Der vil blive udarbejdet en samarbejdsaftale om den økonomiske fordeling, hvis projektet modtager støtte. De forædlede skimmelresistente sorter vil gøre det muligt for landmænd, der dyrker disse sorter, at reducere sprøjtningen og pesticidforbruget. I et gennemsnitligt år forventes antallet af sprøjtninger at blive reduceret fra 10 til 5 gange. En sprøjtning koster ca. 400 kr / ha, hvilket svarer til en besparelse på ca. 2.000 kr / ha. Hvis alle KMCs stivelseskartofler, som dyrkes på ca 25.000 ha, får den øgede resistens, vil den samlede besparelse give en øget indtægt på 50 mill. kr. Der kræves et spektrum af sorter til forskellige agronomiske forhold for at opnå den fulde fordel, og det vil naturligvis tage lidt tid, (3-5 år

efter der er opnået dokumentation for effekten i Wotan), at introducere resistensen i flere sorter. Besparelserne ved den reducerede sprøjtning kommer avlerne, der ejer KMC, til gode. KMC vil være sortsejer og vil stå for den overvejende del af formeringen og salget af læggekartofler med den forbedrede resistens. Selvom der er udsigt til en økonomisk gevinst, er det ønsket om at dyrke kartofler på en mere bæredygtig måde, der driver denne ansøgning. Målet er, at kartoffel og stivelsesproduktion fremover kan fortsætte med betydeligt mindre belastning af miljøet og heraf følgende sundhedsrisici. Der er ca 275 ansatte på KMC og de tre stivelsesfabrikker, og derudover anslået 2000 jobs indenfor landbruget og den afledte industri og service sektor, som er direkte relateret til kartoffelstivelsesindustrien.

De nye CRISPR forædlede kartofler, som kombinerer skimmelresistens med forbedret stivelseskvalitet, som mindsker indholdet af reducerende sukkerarter, vil gøre det muligt for KMC at imødekomme industriens efterspørgsel af kartoffelpulver og flager med lavt sukkerindhold. Ved at fokusere på lavsukkerholdige specialprodukter, som er en KMC-niche, forventes det, at ca. halvdelen af den nuværende produktion på ca. 10.000 tons vil blive solgt til ca. 0,10 kr højere pr. kg. Dette vil give en omsætning på ca. 1.000.000 DKK / år. Disse indtægter vil blive brugt til at hæve betalingen af andelshaverne i pulverfabrikken KMC granules.

A34. Forretningsmodel: (max 2.500 tegn)

KMC råder selv over organisationen, som formerer og dyrker læggekartofler og forsyner avlerne, som dyrker stivelseskartoflerne til KMC. De nye sygdomsresistente sorter og sorter med lavt indhold af reducerende sukker kan nemt indgå i dette setup. I 2018 blev der ifølge Danmarks Statistik dyrket læggekartofler på 7879 ha i Danmark og KMC solgte 22.500 tons læggekartofler i foråret 2018. Markedsmæssige risiko konsekvenser af EU Dom af 25.7.2018, hvor DNA-fri CRISPR forædlede planter klassificeres som GMO, er adresseret under næste punkt (E35 Risikoanalyse). Dommens mulige konsekvenser for forretningsmodel scenarier behandles i det følgende.

1. Hvis EU-lovgivningen, under eller tæt efter projektperioden, ikke ændres, vil projektet have tilvejebragt en mål-gen (facit) liste, der så anvendes til opnåelse af de ønskede egenskaber gennem mutagenese forædling via f.eks. TILLING.
2. KMC har en omsætning på 1,2 mia. DKr, hvoraf 94% stammer fra eksport, hvoraf igen 47% uden for EU, dvs. at en substantiel del af den totale omsætningen stammer fra eksport til lande uden for EU, hvor CRISPR forædlede afgrøder ikke reguleres som GMO.
3. Handelsbarrierer i lande som USA, der pålægges sfa den nylige EU-CRISPR-GMO-afgørelse, kan imidlertid i mange tilfælde imødegås gennem internationale samarbejdsaftaler mellem firmaer i de pågældende lande, således at eksport af CRISPR produceret afgrøder / tilsætningsstoffer til lande udenfor EU kredsen aligevel i nogen omfang muliggøres.
4. Herudover vil de DNA-fri CRISPR fremavlede sorter ligge klar til masseopformering, når CRISPR-GMO dommen ændres, enten sfa sund fornuft eller sfa, at den nuværende CRISPR-GMO lovgivning på sigt ikke kan håndhæves i en globaliseret verden, der endv kræver intelligent og ren teknologi til at imødegå fremtidens udfordringer.

A35. Risikoanalyse: (max 2.500 tegn)

S = Sandsynlighed; K = Konsekvens; score fra 1 (meget lav) to 5 (meget høj). Risikoværdier mellem 1 og 8 anses for at være lav, mellem 9 og 17 middel og mellem 18 og 25 høj.

Resistenstest på SLU har vist, at mutation i blot et enkelt S-gen kan give op til 50% øget resistens i sorten Desirée.

Risiko for at samme effekt ikke opnås i andre sorter: S:1. K:4. SxK=4

Synergistiske effekter af flere S-gener er ukendt og mutation af visse S-gener kan påvirke plantens

vækst negativt. Det gælder dog ikke det S-gen, som har givet den største reduktion i symptomerne.

Risiko for at resistens ikke kan opnås uden negativ påvirkning af plantes vækst: S:2. K:3 SxK=6

Ændringer i stivelsen kan opnås ved at mutere enkeltgener, og herstammer de fleste forsøg fra transgene planter. CRISPR-mutation af GBSS-genet gav den forventede høj-amylopektin stivelse uden at have negative effekter på planternes vækst. De nye kartofler kan noget have noget lavere udbytte hvilket ikke er meget alvorligt men risikoen beregnes at være høj.

Risiko for at ændringer i stivelseskvalitet påvirker plantens vækst: S:5 . K:2. SxK=10.

Den 25.7 2018 besluttede EU domstolen, at DNA-fri CRISPR forædlede planter, skal klassificeres som GMO, selvom planterne ikke vil kunne skelnes fra traditionelt forædlede planter. Argumentet er, at metoden er unaturlig. Det stiller EU-landene i en forringet konkurrencesituation, fordi den øvrige verden, der lægger sig op af USA, som sidestiller DNA-fri CRISPR med traditionel forædling. Det undrer, at kemisk- og bestålings mutagenese kan betragtes som naturlig og sikker, mens enzymbaseret CRISPR-teknologi karakteriseres som unaturlig og risikofyldt. I andre sammenhænge betragtes netop enzymbaserede metoder som sikre og miljøvenlige. Også DN og Økologisk Landsforening undrer sig over, at fokus er på metoden snarere end slutproduktet, og kan se potentialet i den DNA-fri CRISPR, som kan give både miljø gevinster og fremme økologisk dyrkning. Hvis EU ikke ændrer lovgivningen, vil projektets resultater, kunne anvendes som facit liste til fx mutagenese ved TILLING. Konsekvenserne for at produkterne ikke bliver godkendte i eller lige efter projektperioden er store, men sfa at KMCs marked er globalt mindskes risikoen for at produkterne ikke kan markedsføres. Risiko for at EU ikke ændrer klassificeringen af DNA-fri CRISPR indenfor de næste 5-7 år: S:1. K:4. SxK=4.

Persondata

A36. Offentliggørelse af persondata på internettet.

Vær opmærksom på, at nogle af de angivne oplysninger kan blive offentliggjort på internettet, som det også fremgår af indkaldelsens afsnit "Procedure for sagsbehandling af ansøgninger".

For GUDP Sekretariatets behandling af personoplysninger, kontaktoplysninger til de dataansvarlige, mulighed for indsigt i og berigtigelse af personoplysninger m.m. se indkaldelse af ansøgninger til GUDP, afsluttende kapitel "Behandling af personoplysninger".

Tjekliste

A37. Tjekliste inden du indsender ansøgningsmaterialet:

- Skema A – Hovedansøgningsskema er udfyldt og underskrevet af projektleder.
- Skema B – Budget og gantt-diagram er udfyldt.
- Skema C – Deltagerskemaer for alle projektets deltagere inkl. hovedansøger/projektleder er udfyldt og underskrevet. Skemaet underskrives af virksomhedens økonomisk ansvarlige.

- Skema D – Ekstra forretningsplan, hvis der er flere forretningsplaner pr. projekt.
- Skema E – Engelsk projektbeskrivelse af ansøgningens forskningsfaglige andel er udfyldt. Skemaet skal kun udfyldes, såfremt du søger tilskud til et projekt med forskningsandel.
- Skema F – Skriftlige samarbejdsaftaler er udfyldt og underskrevet.
- Op til 4 siders bilag
- CV for alle nøglepersoner i projektet (angivet under A19.) skal vedhæftes som bilag. Tjek, at de ikke fylder mere end maks. 1 side pr. nøgleperson, for projektleder dog maks. 2 sider.

Alle relevante ansøgningsskemaer, CV'er og bilag samles i 1 pdf-fil, foruden skema B og skema E, der begge vedhæftes i separate filer (hhv. 1 excel-fil og 1 pdf-fil). Den samlede pdf-fil indsendes i en ikke-scannet version uden underskrifter og i en scannet version med samtlige underskrifter. Se tjekliste nedenfor:

- pdf-fil: Ikke-scannet version uden underskrifter
- pdf-fil: Scannet version med samtlige underskrifter
- Excel-fil (skema B): ikke-scannet version indeholdende budgetskeema og gantt-diagram
- Skema E som pdf-fil, hvis du søger et projekt med forskningsandel
- Ansøgningen sendes via e-mail til GUDP-sekretariatet på gudp@lbst.dk. Skriv projektets titel i emnefeltet.

Bilag 4

KMCs GMO godkendelse af laboratorie



Arbejdstilsynet

KMC, KARTOFFELMELCENTRALEN, AMBA
Herningvej 60
7330 Brande

Arbejdstilsynet
Tilsynscenter Øst
Landskronagade 33
2100 København Ø

T 70 12 12 88
at@at.dk
www.amid.dk

CVR 21481815

9. marts 2020

Sag
20200014678/4
Ansvarlig:
Rikke Kolding Hansen

CVR 15230614
P 1000884898

Side 1/2

Afgørelse om genteknologisk forskningsprojekt klasse planter "KRISPS"

Arbejdstilsynet har den 4. marts 2020 modtaget anmeldelse fra Ole Bandsholm Sørensen, e-mail; obs@kmc.dk vedrørende forskningsprojektet om "KRISPS", der skal udføres i lab id 230 582 af forskningsleder Ole Bandsholm Sørensen.

Ansøgningen har været forelagt Miljøstyrelsen, der ingen indvendinger har.

Vurdering

Arbejdstilsynet har, efter høring af Miljøstyrelsen jf. § 18, ingen bemærkninger til anmeldelsen og godkender hermed, at den indeholder tilstrækkelige oplysninger i følge bilag 4, del A, jf. § 17, stk. 1 i Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 910 af 11. september 2008 om genteknologi og arbejdsmiljø.

Afgørelse

Arbejdstilsynet godkender, at arbejdet med projektet udføres i lab id 230 582, jf. § 6 stk. 3 og § 15, stk. 1 i Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 910 af 11. september 2008 om genteknologi og arbejdsmiljø.

Vejledning

Ifølge § 19, stk. 1 i Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 910 af 11. september 2008 om genteknologi og arbejdsmiljø, bortfalder anmeldelsen efter 5 år med mindre den fornys. Endvidere gøres opmærksom på, at enhver væsentlig ændring af oplysningerne i anmeldelsen hurtigst muligt skal anmeldes til Arbejdstilsynet, jf. § 30 i Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 910 af 11. september 2008 om genteknologi og arbejdsmiljø.

Klage

Klage over afgørelsen skal indsendes til Arbejdstilsynet inden 4 uger fra afgørelsens dato.

Venlig hilsen

Rikke Kolding Hansen

Bilag 5

Foreløbig skitse til forsøgsplan i marken 2024

Bilag 5

		Ubehandlet	Behandlet	Ubehandlet	Behandlet	Ubehandlet	Behandlet
		Rk.1	Rk.2	Rk.3	Rk.4	Rk.5	Rk.6
75 meter	1	CrisprCAS-editerede linjer	Værn	CrisprCAS-editerede linjer	Værn	CrisprCAS-editerede linjer	Værn
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
	9						
	10						
	11						
	12						
	13						
	14						
	15						
	16						
	17						
	18						
	19						
	20						
	21						
	22						

18 meter