

# Ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg

# Indhold

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

Underskrift .....

Bilag .....

Appendix: .....

## A. Generelle oplysninger

### A.1 Anmelderens navn og adresse

Kim Hebelstrup, Aarhus Universitet, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse

e-mail: [kim.hebelstrup@agro.au.dk](mailto:kim.hebelstrup@agro.au.dk)

Anders Vestergaard, Aarhus Universitet, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse

e-mail: [anders.vestergaard@agro.au.dk](mailto:anders.vestergaard@agro.au.dk)

Charlotte Frihauge, AKV AmbA, Gravsholtvej 92, 9310 Vodskov

e-mail: [cfr@akv.dk](mailto:cfr@akv.dk)

### A.2 De ansvarligere forskeres navne

**Kim Hebelstrup**, Lektor, Ph.d., gruppeleder, Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet, Flakkebjerg, > 25 års erfaring i forskning, udvikling, analyse og håndtering af transgene og GMO klassificerede planter (Arabidopsis, byg, hvede og kartofler).

**Isaac Kwesi Abuley**, Adjunkt, Ph.D, gruppleder, Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet, Flakkebjerg. Internationalt anerkendt plantepatolog og ekspert i kartoffelsygdomme.

Markpersonalet erhvervede GMO - kørekort på Bygholm Landbrugsskole før markforsøgene igangsættes. Datoen for kurset var d. 5-6 februar.

Jordbrugsteknologer/markforsøgs personale fra Flakkebjerg der har erhvervet GMO kørekort:

Hans Hansen

Thor Hougaard

Josefine Frost

Henrik Jespersen

Henrik Skydebjerg

Anders Vestergaard

Laborant der erhverver GMO kørekort:

Rikke Jacobsen (Mere end 10 års erfaring med GMO laboratorier, og håndtering af GMO mærket materiale)

Markforsøgs personale fra AKV der har erhvervet GMO kørekort:

Tommi Støttrup

Charlotte Frihauge

### A.3 Projektets titel

Udsætning af cisgene kartofler i sædskifteforsøg

### A.4 Udsætningen

#### A.4.A Formålet med udsætningen

Forsøgene vil foregå på to lokaliteter: Ved **Aarhus Universitet, Flakkebjerg**, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse samt ved **AKV AmbA** · GRAVSHOLTVEJ 92 · 9310 VODSKOV, herefter betegnet henholdsvis Flakkebjerg og AKV (se desuden bilag over ansøgte områder)

For Flakkebjerg:

Formålet er at teste sædskifte i cisgene kartofler. For kartofler ønskes specifikt at undersøge muligheden for at reducere anvendelse af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) i kartoffel.

Der bruges en blanding af lucerne og vikke i sædskiftet. Lucerne/vikke planterne i forsøget er ikke GMO.

Forsøget vil bestå af behandlede og ubehandlede parceller.

For AKV:

Her dyrkes udelukkende kartofler i perioden 2026-2029 med formålet at reducere anvendelse af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*).

Beskrivelserne af dyrkningen af lucerne/vikke er således kun relevant for lokaliteten Flakkebjerg og ikke for lokaliteten AKV.

#### A.4.B Udsætningens startdato og varighed.

Udsætning sker i perioden 15. marts – 15. juli og høst i perioden 01. september – 30. oktober i årene 2026-2028 i Flakkebjerg og 2026-2029 ved AKV

#### A.4.C Udsætningsmetode

I Flakkebjerg:

Lucerne/vikke: Der udplantes fra frø i parceller

I både Flakkebjerg og AKV:

Kartofler: Der udplantes pottedyrkede kartoffelplanter i parceller i en færdighyppet kam og/eller knolde i klargjort jord som efterfølgende hyppes.

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

##### **Forår:**

Marken er det første år pløjet og/eller harvet op inden udplantning af byg eller pottedyrkede kartoffelplanter og læggekartofler. De efterfølgende år vil der kun blive harvet.

##### **Under (udsætningen) væksten:**

Normal behandling mod ukrudt, skadedyr og sygdomsbekæmpelse.

For kartoflerne vil forsøget bestå af ubehandlede parceller mod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) samt øvrige parceller, hvor der behandles mod kartoffelskimmel.

Planterne vil løbende blive gødet med kunstgødning (granulat eller flydende) og desuden vandet efter behov.

##### **Høst (optagning):**

Høst af de cisgenetisk modificerede kartoffelplanter vil foregå ved en rodunderskæring og løsning af kammen, efterfulgt af håndopgravning eller maskinoptagning. Ved maskinoptagning rengøres maskinerne på anviste rengøringspladser (se bilag) på de ansøgte arealer. Der vil altid være minimum 20 meter til konventionelt dyrkede kartofler.

Opgravede kartofler destrueres efter godkendte forskrifter for GMO plantemateriale eller fragtes efter godkendte forskrifter for GMO plantemateriale til GMO godkendte (klasse: planter) faciliteter som forefindes på matriklen i Flakkebjerg

Transport af GMO plantemateriale mellem lokaliteten AKV og GMO godkendte faciliteter i Flakkebjerg udføres udelukkende af personale der har erhvervet GMO kørekort. Der bruges ikke eksterne transportører.

Al GMO materiale destrueres ved forsøgenes endelige afslutning. Dette inkluderer også materiale, der har været analyseret i GMO godkendte laboratorier.

Parceller med lucerne skæres og nedfræses i jordbunden. Lucerne/vikke dyrkes således kun med henblik på jordforbedring.

Alle maskiner der anvendes på det godkendte område rengøres ligeledes på anviste rengøringsplads (se bilag) på det ansøgte areal. Maskiner rengøres med 8 bar vandtryk og/eller trykluft som forefindes på stedet. Det sikres at spildevandet nedsiver på det anviste rengøringsområde.

#### A.4.E Omtrentlig antal planter per kvm.

Kartofler: 3 - 6 planter per kvm.

Lucerne/vikke: 50-100 planter per kvm (OBS: Disse planter er ikke GMO)

## **A.5 Oplysninger om udsætningsstedet**

### A.5.a Udsætningsstedets størrelse og beliggenhed

For Flakkebjerg:

Udsætningsstedet er beliggende i markbloksnummer 651133-27 Flakkebjerg. Midten af udsætningsstedet er 55° 19' 32.2854"N 11° 22' 54.8646"E.

Området, der vil blive tilplantet med afgrøder, vil være 7200 m<sup>2</sup> brutto og 720 m<sup>2</sup> netto.

Forskel mellem brutto og netto areal er værn og sti. Værn består af et slået græsareal og sort jord (se desuden bilag).

For AKV:

Udsætningsstedet er beliggende i markbloksnummer 565332-85. Midten af udsætningsstedet er 57°07'49.0"N 10°05'12.0"E. Området, der vil blive brugt til kartoffeldyrkning er samlet set bruttoareal på 9415 m<sup>2</sup> og nettoareal på 1231 m<sup>2</sup>. Forskel mellem netto og bruttoareal vil være værn og sti, som består af græs og eller sort jord. (se desuden bilag).

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.

Som udgangspunkt er det derfor ikke nødvendigt at fjerne blomster fra kartoffelplanterne, idet det vurderes at pollen ikke spredes. Men hvis det vurderes nødvendigt antager vi den option at udsætningen kun godkendes under det forbehold at: 'Ved blomstringen vil vi, som ekstra sikkerhed, klippe blomsterne af kartoffelplanterne'.

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

For arealet beliggende i markblok 651133-27 (Flakkebjerg) er afstanden:

§3 mose: 200 meter

For arealet beliggende i markblok 565332-85m (AKV) er afstanden:

§3 sø: 350 meter

§3 mose: 203 meter

§3 eng: 203 meter

## B. Videnskabelige oplysninger

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

#### B.1.a Fuldstændige navne

Taxonomi	Latinske navn
i) Familie	<i>Solanaceae</i>
ii) Slægt	<i>Solanum</i>
iii) Art	<i>Solanum tuberosum</i>
iv) Underart	<i>Tuberosum</i>
v) Kultivarer	Kuras
vi) Almindeligt navn	Kartoffel (stivelse) "Kuras"

#### B.1.b Udbredelse og dyrkning i Unionen

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

#### B.1.c Reproduktion

i)

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

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

Langt de fleste kommercielle kartoffel kultivarer (sorter), som fx kuras, 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 ubetydelig så længe afstandskrav overholdes.

Men for at eliminere selv den mindste risiko for krydsbestøvning af kartofler antager vi den mulighed, at udsætningen kun kan godkendes, hvis det pålægges os løbende at klippe blomsterne af, når planterne blomstre – typisk primo juli til august.

iii)

Kartofler er 1. årige. Spildkartofler kan dog overleve milde vintre.

#### **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 kartoffelknolde kan overleve i jorden hen over en mild vinter uden betydende frost.

Almindeligt vintervejr med gentagen nat og dagsfrost vil slå eventuelle overskydende knolde i jorden ihjel, de fryser væk.

Alle kartoffelknolde i forsøget på udsætningsstedet vil blive rodunderskåret og jordløsnet, efterfulgt af håndopgravning eller maskinoptagning. Området undersøges altid for spildkartofler manuelt efter høst.

Ved sædskifte vil der altid mellem afgrøder blive bekæmpet med herbicid, så eventuelle spirede kartoffelplanter fra spildkartofler straks nedsprøjtes.

ii)

Ingen særlige faktorer.

#### **B.1.f Spredning**

i)

Maskinoptagning vil i nogle tilfælde spilde små knolde, som kan give ny vækst året efter. Der inspiceres visuelt for spildkartofler efter maskinoptagning og spildkartofler fjernes. Alle maskiner rengøres på de klassificerede område ved brug af trykrensning af vand og/eller luft.

Jorden vil være opløjet således at knolde enten vil blive elimineret ved frost eller nedsprøjtet med herbicid ved eventuel spiring i foråret.

ii)

#### *Generel betragtning vedr. risiko for spredning*

Det er meget vanskeligt at forstille sig at et givent patogen/mikroorganisme skulle få selektive fordele ved overførsel af resistensgener, der giver planten forsvar overfor pathogenet.

Vi forventer ikke en 100 % resistens, men nærmere en udsættelse af angrebet med 3 – 6 uger i ubehandlede led. Kartoffelskimmel er epidemisk og vil per erfaring altid angribe planten, hvis den er ubeskyttet. Mere end 100 års erfaring med kartoffeldyrkning har vist at 100 % modstandskraft *ikke* findes. Målet er at udsætte og reducere anvendelsen af fungicider, *ikke* at skabe en plante, der har 100 % resistente. Kartoffelskimmel tilpasser sig, hvorfor balancen mellem plante og pathogen blot forrykkes i forhold til en mere modtagelig sort.

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

Der er desuden ingen rapporter om produktion af giftige forbindelser som følge af flere resistensgener. Resistensgener findes i alle afgrøder.

#### **B.1.g**

Ikke relevant

#### **B.1.h**

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

## **B.2 Molekylær karakterisering**

### ***a) Oplysninger om den genetiske modifikation***

To gener fra 2 *Solanum* arter som er krydsningskompatible med *Solanum tuberosum*, Rpi-vnt1.1 fra *Solanum venturii*; Rpi-sto1 fra *Solanum stoloniferum*, samt deres promotorer er indsat som én kontinuær insertion i kartoffelsorten Kuras.

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

#### i) *Beskrivelse af de metoder der er anvendt*

Konstruktion af DNA sekvens i kartoffel:

DNA sekvensen af Rpi-vnt1.1 og Rpi-sto1, samt plasmidvektor pBINAW2, herefter benævnt som pBINAW2:vnt-sto (se appendix 1 for præcis sekvens af de to gener Rpi-vnt1.1 og Rpi-sto1 og plasmid map) er fremstillet ved kloning af Rpi-Vnt1.1 fra *S. venturii* og Rpi-sto1 fra *S. stoloniferum*. Plasmidet blev propageret ved introduktion i *Escherichia coli* Top10, vækst og efterfølgende plasmid oprensning. Processen beskrives tidligere uddybende for transformation af sorten Atlantic i: 'Jo, KR., Kim, C.J., Kim, S.J. et al. *Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking*. *BMC Biotechnol* 14, 50 (2014). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-50>'. Det er plasmider og metode til transformation og detektering af indsæt samt fravær af vektor backbone fra denne artikel som er anvendt her. Metoden beskrives desuden på summeret form nedenfor.

DNA sekvensen af det resulterende plasmid blev verificeret ved DNA Sanger sekventering. Vi understreger at der ikke bruges trans-gen atlantic i denne udsætning.

Da der anvendes endogene promotorer forventes et ekspressionsniveau lignende det endogene niveau for R-gener. Vi understreger at der ikke er tale om transgene indsæt, og således kan et transgent ekspressionsniveau ikke måles.

#### *Transformation og regeneration af Kartoffelplanter:*

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

Sterile *In vitro* kartoffelplanter af sorten Kuras blev skåret i stykker af ca. 0,5 cm<sup>2</sup> (bladmateriale) og ca. 1 cm nodale stængelstykker, og co-kultiveret med *Agrobacterium*-kulturen. Herefter blev plantemateriale overført til callus-inducing media (CIM) agarplader indeholdende Timentin for at fjerne Agrobakterier fra den videre vækst. CIM-plader indeholder hormoner som fremmer

plantecelledeling, men hæmmer vævsdifferentiering. Efter 7-9 dage blev plantestykker med synlige calli overført til shoot-inducing media (SIM), som indeholder plantehormoner som stimuleret skuddannelse og vækst. Efter 4-12 uger blev synlige skud skåret fra enkeltvis og overført til root-inducing media. Efter 4 uger blev de planter som havde dannet rødder overført til almindeligt in vitro plante vækstmedie uden hormoner og propageret som individuelle *in vitro* kultur linjer og karakteriseret som beskrevet nedenfor.

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

#### Karakterisering af udvalgte kartoffellinjer:

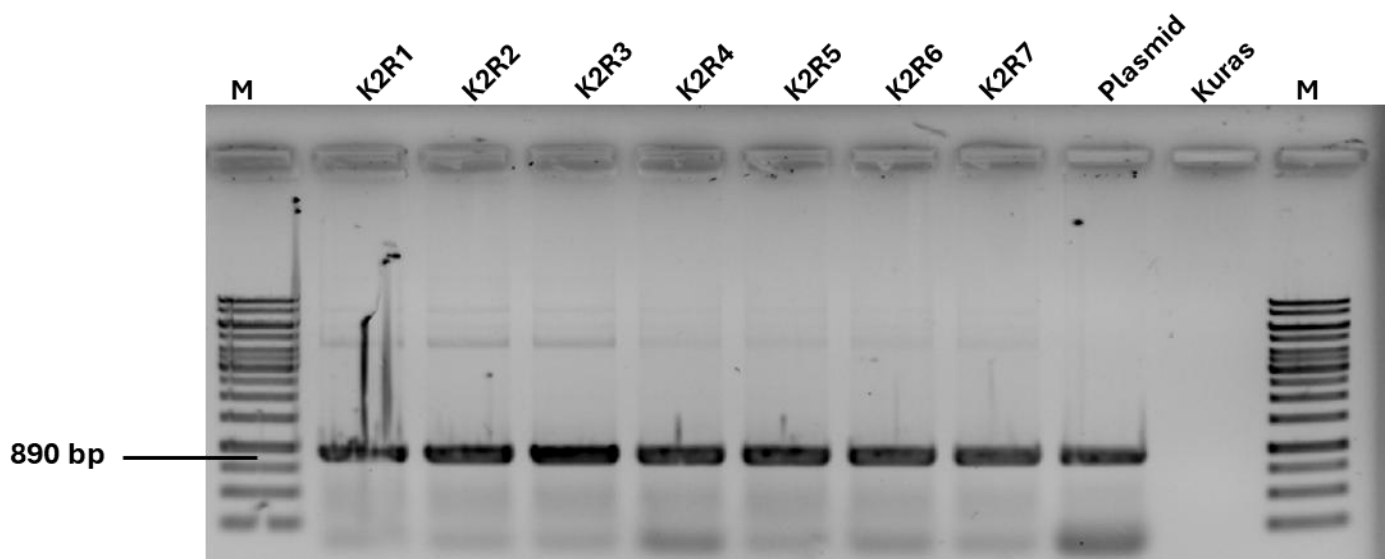
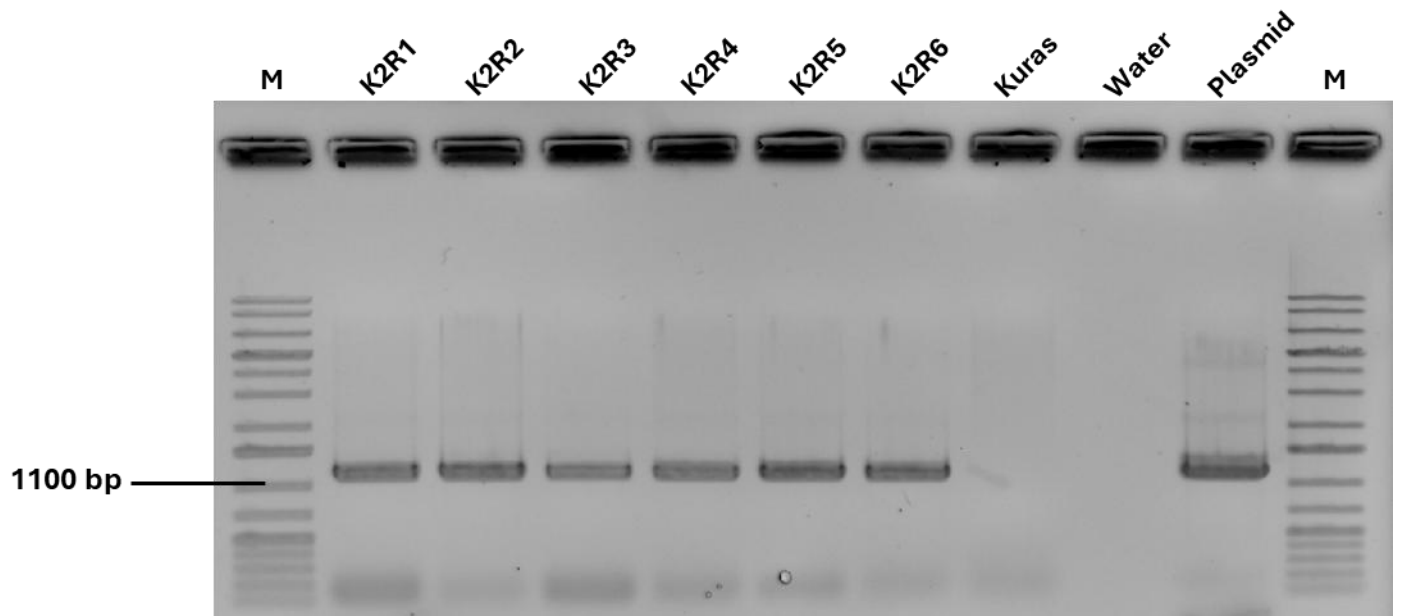
Molekylær detektion af insert ved Polymerase kædereaktion (PCR)

En lille plantedel, typisk 0,5 mm<sup>3</sup>, blev udtaget fra hver linje samt fra den negativ kontrol (baggrundssorten Kuras) og brugt som template i en PCR-reaktion med kemisk syntetiserede DNA primere, som er komplementære til en del af det indsatte DNA. Fragmenterne blev detekteret ved standard TAE-agarose gel-elektroforese. Tilstedeværelse af fragmenter med den forventede størrelse i de rekombinante linjer (og fravær i den negative kontrol, Kuras) blev taget som indikation for mindst delvis tilstedeværelsen af gen- kassetten. Karakteriseringerne er lavet i generation T0. Det understreges at kartofler propageres klonalt gennem knolde og stiklinger.

Geler, der viser bekræftelse af cis-gen-indsætningen med en tekstbeskrivelse (inklusive PCR-betingelser og primere (Det er **linjen K2R1, som ønskes forsøgsudsat**. Øvrige linjer ønskes ikke forsøgsudsat):

Gen ID		Primer sekvens (5'-3')	Fragment størrelse (bp)	Detektion af
<i>Rpi-vnt1.1</i>	forward	ATGAATTATTGTGTTTACAAGACTTG	1100	T-DNA
	reverse	AGCATTGGCCCAATTATCATTAAAC		
<i>Rpi-sto1</i>	forward	ACCAAGGCCACAAGATTCTC	890	T-DNA
	reverse	CCTGCGGTTTCGGTTAATACA		

De to Rpi-gener blev PCR-amplificeret ved hjælp af genspecifikke primere (se ovenfor). PCR-amplifikationen blev udført på en termocycler ved hjælp af Hercules II-polymerase med følgende betingelser: 94 °C i 60 sekunder efterfulgt af 40 cyklusser ved 94 °C i 30 sekunder, 58 °C i 60 sekunder, 72 °C i 90 sekunder og en endelig elongeringstid på 5 minutter ved 72 °C

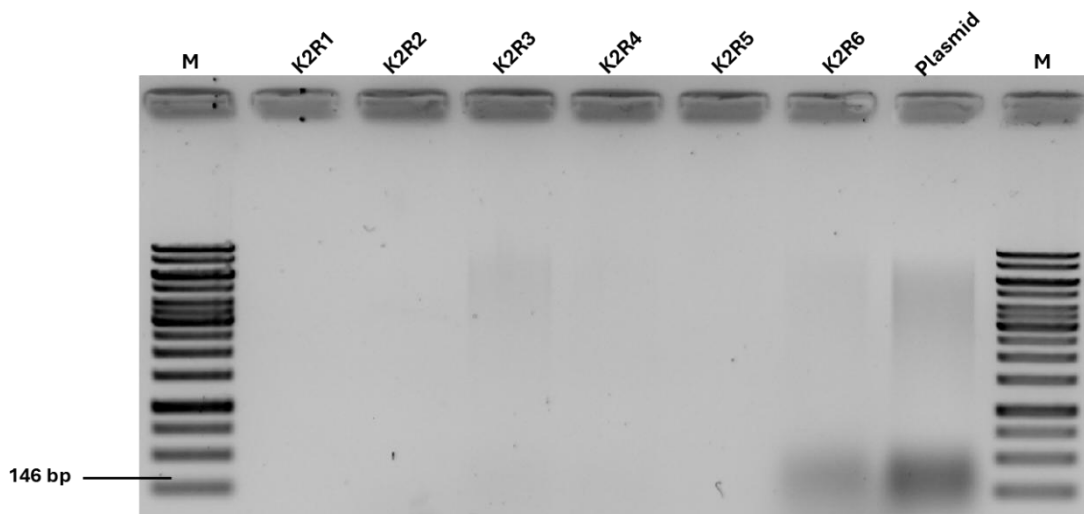


*Vector backbone analyse i kartoffel:*

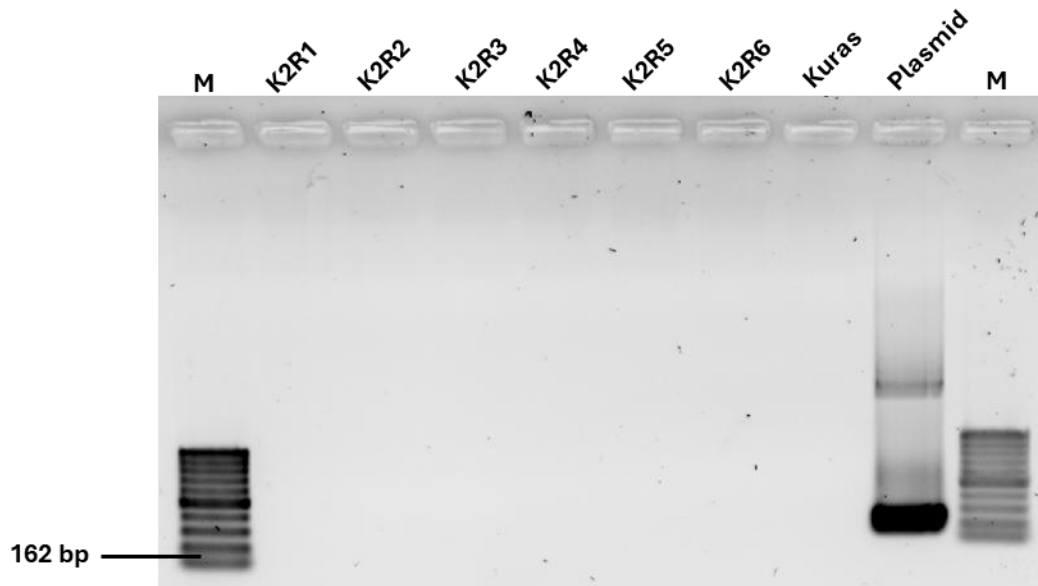
For at analysere om uønskede dele af vektoren (herunder et Kanamycin resistens gen, som bruges til selektion af *Agrobacterium* inden transformation af planter) skulle være indsat i genomet, blev der udført PCR analyser efter samme metode som beskrevet i Jo et al. 2014. Der blev for linjerne K2R1, K2R2, K2R3, K2R4 og K2R5 ikke fundet produkter som svarer til uønskede vektordele (se nedenfor).

Gen ID		Sekvens (5'-3')	Fragment størrelse (bp)	Detektion af
trfA	forward	CGTCAACAAGGACGTGAAGA	146	Vector backbone
	reverse	CCTGGCAAAGCTCGTAGAAC		
NPTII	forward	GAAAGCTGCCTGTTCCAAAG	162	Vector backbone
	reverse	GAAAGAGCCTGATGCACTCC		
oriV	forward	TGCGGCGAGCGGTATCAG	1045	Vector backbone
	reverse	CTTCTTGATGGAGCGCATGGG		
traJ	forward	ACGAAGAGCGATTGAGGAAA	260	Vector backbone
	reverse	CAAGCTCGTCCTGCTTCTCT		

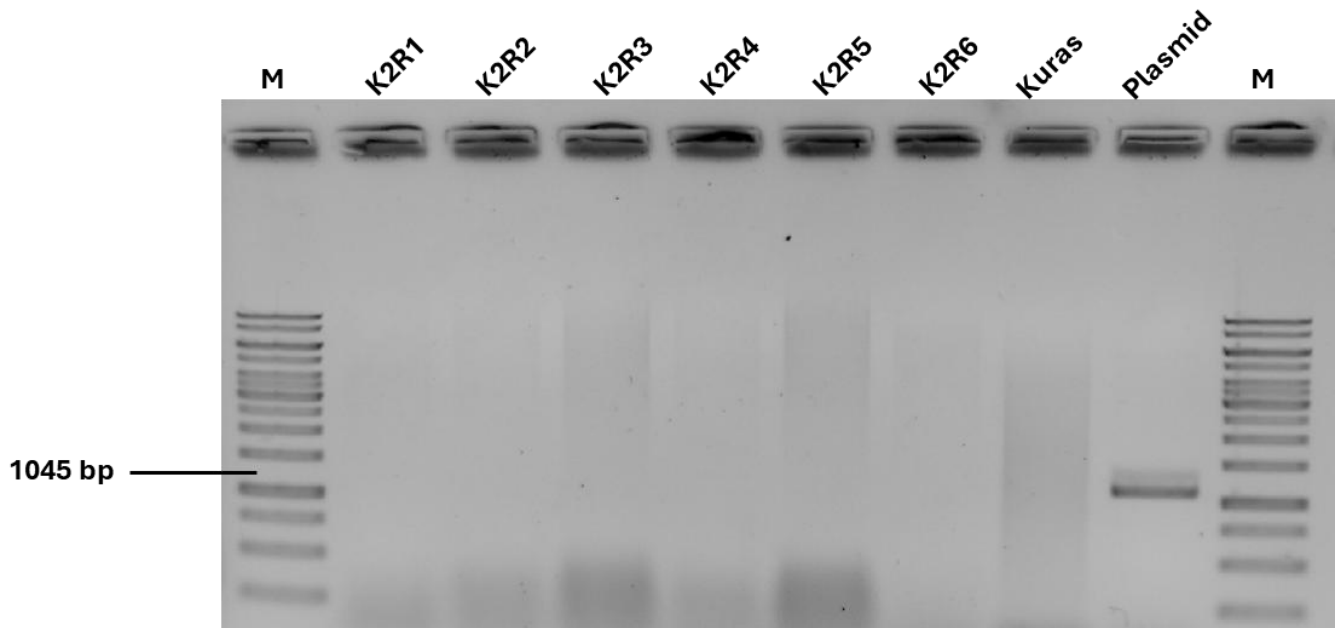
trfA:



NPTII:



oriV:



traJ:



Hver linje har kun indsæt af én kopi af genkasette. Desuden er indsæt sted bestemt, og det ses at indsættet er sket i et ikke-kodende område. Karaktering af kopi-nummer af antal indsæt og indsæt site er beskrevet i appendix 4 for K2R1, som er den linje der ønskes udsat.

ii) *Den anvendte vektors art og oprindelse*

Vektordesign for markørfri indsæt er baseret på plasmid pBINAW2 modificeret i forhold til Jo et al. 2014. Selve DNAet er oprindeligt klonet fra henholdsvis *S. venturii* og *S. stoloniferum* og efterfølgende propageret og oprenset fra *E. coli*.

*Agrobacterium tumefaciens* AGL-1 er brugt til at levere DNA ind i cellerne og translokation ind i genomisk DNA. Den samlede procedure for konstruktionen af den pågældende vektor er beskrevet i Jo et al. 2014.

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

De præcise sekvenser af Rpi-sto1 og Rpi-vnt1.1 angivet i appendix 1 og de to gener har en længde på 10970 bp inkl promoter og 3'-UTR. Funktionen af disse gener er at udtrykke Rpi-sto1 og Rpi-vnt1.1.

Selve DNAet er oprindeligt klonet fra henholdsvis *S. venturii* og *S. stoloniferum* og efterfølgende propageret og oprenset fra *E. coli*. Den samlede procedure for konstruktionen af den pågældende vektor er beskrevet i Jo et al. 2014.

## **b) Oplysning om GMHP'erne**

### *j) Overordnet beskrivelse af de egenskaber og karakteristika, der er indført eller ændret*

De indsatte R-gener er kendte og velkarakteriserede resistensgener mod *P. infestans* (Jo et al. 2014). Derfor forventes kartoffellinjer, som indeholder og udtrykker disse gener, at være mere modstandsdygtige overfor kartoffelskimmel end deres baggrundsort (Kuras). I alle andre aspekter forventes de rekombinante linjer at være fænotypisk identiske med baggrundssorten.

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

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

### *ii) Oplysninger om faktisk indsatte/deleterede sekvenser*

For kartofler:

Der er som beskrevet ovenfor påvist indsat af Rpi-sto1 og Rpi-vnt1.1. Der er anvendt de native promoter sekvenser, så det er vores forventning at generne overordnet er udtrykt på samme måde som i henholdsvis *S. venturii* og *S. stoloniferum*. Det er kendt at det ikke er muligt at måle genekspressionen af R-gener pålideligt direkte vha. RNASeq eller RT-PCR, pga. den meget store mængde (> 300) homologe og næsten identiske R-gener som findes naturligt i kartofflens genom som forstyrrer analysen.

iii) *Dele af Planten, hvori insertet udtrykkes*

Det forventes at resistensgenerne udtrykkes i hele planten.

iv) *Insertets genetiske stabilitet og GMHP'ernes fænotypiske stabilitet*

For kartofler:

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

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

**c) *Konklusioner af den molekylære karakterisering***

To R-gener, Rpi-sto1 og Rpi-vnt1.1, er indsat i de anvendte linjer af Kuras.

Der er ikke fundet tegn på at uønskede dele af den anvendte plasmid-vektor er indsat i de anvendte linjer. **Vi understreger igen, at det er linjen K2R1, som ønskes forsøgsudsat.**

Litteratur med direkte relevans for linjerne

Kartoffel:

Jo, KR., Kim, CJ., Kim, SJ. *et al.* Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnol* **14**, 50 (2014). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-50>

### **B.3 Oplysninger om specifikke risikoområder**

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

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

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

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

#### *b) Eventuelle ændringer i GMHP'ernes evne...*

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

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

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

Kartoffelplanternes forsvarsmekanismer imod kartoffelskimmel (*P. infestans*) forbedres.

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

Der forventes ingen ændringer.

#### *e) Potentielle ændringer i landbrugspraksis...*

Den potentielle ændring i landbrugspraksis vil være, at der skal sprøjtes færre gange med svampemidler i kartoflerne. Det betragtes som en positiv ændring, både i relation til landbrugspraksis og i relation til miljøet bredt set (inkl. fx forekomst i drikkevandsboringer, CO<sub>2</sub> regnskab i forbindelse med svampemiddels fremstilling og udbringning etc.).

*f) Potentielle vekselvirkninger med det abiotiske miljø...*

Der forventes ingen påvirkninger på de abiotiske miljøer.

*g) Oplysninger om enhver toksisk, allergisk...*

For kartoffel gælder:

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

Der forventes ingen toksisk, allergisk eller anden skadelig påvirkning på menneskers eller dyrs sundhed som følge af de genetiske ændringer.

*h) Konklusioner vedrørende de specifikke risikoområder*

Der forventes ingen øget risiko for miljøpåvirkning, hverken på mennesker, dyr eller omkringliggende natur. For kartoflerne gælder, at den forventede reducerede mængde svampemiddel vil mindske risikoen for skadelige påvirkninger på alle omgivelser.

Alle dele af kartoffelplanter anvendt i forsøget transporteres til og fra GMO godkendte (klasse: planter) faciliteter som forefindes på matriklen Flakkebjerg. Transporten foregår ved GMO godkendte forskrifter. Transporten foretages af personer med GMO kørekort.

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

### *B.4.a. Trufne forholdsregler*

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

Der vil være mindst 20 m til nærmeste kartoffelmark. Der dyrkes i øvrigt ikke kartofler på markerne der støder op til forsøgsområdet.

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

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

Kartofler krydser ikke spontant med vilde arter af kartofler eller andre Solanum arter. Der er derfor ikke behov for at afklippe blomster. Men som mulighed for ekstra sikkerhed antager vi den option at udsætningen kun godkendes, under den forudsætning at blomster afklippes i blomsterperioden. Spande, kurve og øvrige redskaber anvendt ved udplantningen vil blive grundigt rengjorte og eftersat for lægge knolde.

3 – 5 dage før forventet høst/optagning vil toppen bliver knust med en top-knuser. Derved knuses alt top og evt. ”æbler”, og kartoffeltoppen bliver efterladt på GMO-forsøgsarealet, hvor det indtørres og indarbejdes i jorden.

Efter topknusning og forud for høst af kartoffelknolde, vil kammene blive rodunderskåret og løsnet, efterfulgt med håndopgravning eller maskinopsamling. Området undersøges efterfølgende ved visuel inspektion for at sikre der ikke efterlades knolde i jorden.

Høstede cisgenetisk modificerede knolde vil blive opsamlet i dobbelt lukkede stof- eller plastposer, mærket med GMO, og transporteres i kasser til GMO godkendt laboratorium, som forefindes på adressen (Se bilag).

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

#### ***B.4.b. Metoder til efterbehandling af stedet efter udsætning***

Følgende beskrivelser gælder for begge arealer (Flakkebjerg) og (AKV):

Efter høst af kartofler vil jorden bliver harvet, for at fritlægge eventuelle knolde, som ikke er taget op. Første harvning vil ske efter høst, så evt. knolde kan frilægges og fjernes. Hen over vinteren vil marken blive harvet efter frostperioder eller mindst 2 gange.

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

Året efter det samlede forsøgs afslutning, vil de i sædskiftet anvendte parceller ligge som sort jord med månedlige harvninger (april til september) og overvågning.

Arealet vil blive overvåget i min. 4 år eller til der ikke længere findes spildplanter eller kartoffelknolde. Hvis der findes blot én kartoffelplante eller én kartoffelknold anses området for ikke ryddet. (jf. vejledning fra

Landbrugsstyrelsen ”Dyrkningsbestemmelser for GM kartofler” marts 2022).

Arealet forventes udlagt med slåningsbrak fra forsøgets afslutning, som kan slå og overvåges.

Lederen af markpersonalet har ansvaret for at observationerne gennemføres, og at evt. uregelmæssigheder indberettes til miljøstyrelsen og landbrugsstyrelsen. Ligeledes vil miljøstyrelsen og landbrugsstyrelsen modtage notifikation om forsøgets afslutning, når observationsperioden på 4 år er gået.

Nedenfor er vist en forventet placering af forsøgsarealet i Flakkebjerg i 2026-2028 i markblok 651133-27, hvor der ikke er overlap til tidligere GMO-forsøgsarealer.



For arealet beliggende i markblok 565332-85 (AKV) er vist forventet placering i årene 2026-2029



#### ***4.C Behandlingsmetoder, efter udsætning, herunder affald***

Under dyrkningen: normal plantebeskyttelse imod ukrudt, skadedyr og andre sygdomme. Der gødes desuden med fast eller flydende kemisk kunstgødning. Der vandes efter behov.

Høst: Alt overjordisk plantemateriale vil blive knust forud for høst/optagning, og kartoffeltoppen bliver efterladt på GMO-forsøgsarealet, hvor det indtørre og indarbejdes i jorden.

De høstede knolde vil blive transporteret i dobbelt lukkede plastposer mærket med GMO, placeret i kasser.

Efter brug vil kasser blive rengjort og desinficeret, og knolde og sække vil blive kørt til forbrænding.

#### ***4.D Overvågningsplaner og teknikker***

Udsætningsmarken vil blive observeret hver uge i vækstperioden, og væksten vil blive noteret og beskrevet. Efter høst og i årene efter (jf. pkt.4b) vil udsætningsmarken blive nøje overvåget for knolde og eventuelle planter.

Eventuelle planterester og knolde vil blive destrueret.

#### ***4.E Beredskabsplaner***

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

Lokaliteten vil blive overvåget med jævne mellemrum. Der vil blive opsat skilte forskellige steder ved marken, der beskriver forsøget samt navne og telefonnumre på de ansvarlige for forsøget: Kim Hebelstrup og Anders Vestergaard (lokaliteten Flakkebjerg) og Charlotte Frihauge (lokaliteten AKV)

#### ***4.F Metoder og procedurer til beskyttelse af stedet***

i)

Alle maskiner bliver rengjorte på det godkendte område med trykluft og vand (8 bar). Rengøringen sker med > 20 meter til nærmeste øvrige dyrkede areal.

Al transport til og fra mark vil ske i lukkede enheder/kasser, hvorfor risiko for spredning under transport også betragtes som minimal.

ii)

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

iii)

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

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

Vi har udviklet flg. metode til detektion af GMHP'erne baseret på overgangen mellem de indsatte gener Rpi-vnt1 og Rpi-sto1: Ved brug af primerne: ATGAATTATTGTGTTTACAAGACTTG og CCTGCGGTTCCGGTTAATACA. Produktet er fraværende i den genetiske baggrund (Kuras og Atlantic). Da de to gener ikke er lokaliseret ved siden af hinanden i nogle arter af *Solanum*, betragter vi det som grænsende til umuligt at opnå et PCR produkt med disse primere i nogen kartoffelsort eller andre planter. Skulle der, mod vores forventning, opstå tvivlstilfælde, så kan DNA sekventering af det opnåede PCR produkt præcist fastslå transformationsstatus. Vores data viser sammenholdt (se molekylær karakterisering og appendix 4 vdr antal gen-kassette indsæt) at PCR metoden kan anvendes helt ned til ét enkelt kopi indsæt, og således har en nødvendig sensitivitet.

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

Ikke relevant. De i ansøgte linjer har ikke tidligere været udsat.

## Underskrifter



Kim Hebelstrup, Aarhus Universitet



Anders Vestergaard, Aarhus Universitet



Charlotte Frhauge, AKV

## **Bilag:**

1. **Miljørisikovurdering**
2. **Aarhus Universitet, Flakkebjergs GMO-godkendelse af laboratorie.**
3. **Foreløbig skitse til forsøgsplaner i marken samt oversigtskort af ansøgte områder (Flakkebjerg)**
4. **Foreløbig skitse til forsøgsplaner i marken samt oversigtskort af ansøgte områder (AKV)**
5. **Beskrivelse af maskiner (Flakkebjerg)**
6. **Beskrivelse af maskiner (AKV)**

## **Appendix:**

1. **Map af anvendte plasmid i kartoffeltransformation (pBINAW2:Rpi-vnt1.1:Rpi-sto1)**
2. **DNA sekvens af plasmidet pBINAW2:Rpi-vnt1.1:Rpi-sto1**
3. **Gensekvenser af cisgenerne Rpi-Vnt1.1 og Rpi-Sto1**
4. **Beskrivelse af bestemmelse af antal indsæt af gen kassette (kopi tal) samt indsæt sted**

# Bilag 1

## Miljørisikovurdering

Ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg.

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

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

A)

Afstanden til nærmeste dyrkede område er altid >20 meter. Således er der ikke risiko for spredning via pollen til andre områder.

Kartoffel krydser ikke spontant med vilde arter af kartoffel eller andre dyrkede *Solanum* arter. Som udgangspunkt er der derfor ikke behov for at fjerne blomster fra kartoffelplanterne, idet det vurderes at pollen ikke spredes. Men hvis det vurderes nødvendigt antager vi den option at udsætningen godkendes under det forbehold at: 'Ved blomstringen vil vi, som ekstra sikkerhed, klippe blomsterne af kartoffelplanterne.'

B)

For kartofler:

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 efter høst, så evt. knolde kan frilægges og fjernes. Men 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.

For begge lokaliteter (AKV og Flakkebjerg)) gælder:

Året efter forsøgenes afslutning vil arealerne 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).

Arealerne forventes udlagt med slåningsbrak fra 2029 i Flakkebjerg og 2030 ved AKV, som kan slås og overvåges. Det skal bemærkes, at erfaringer med opsamling af kartofler i mindre parceller 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. Dog understreges det at den i ansøgningen beskrevne PCR metode til detektion af indsæt af den cisgene gen kassette kan anvendes til detektion i enhver anden organisme.

#### 3. GMHPernes vekselvirkning med målorganismer

Forbedret resistens overfor kartoffelskimmel vurderes at være positivt, da bedre resistens overfor skimmel vil styrke planten.

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

Vi forventer ikke en 100 % resistens, men nærmere en udsættelse af angrebet med 3 – 6 uger i

ubehandlede led.

#### **4. GMHPernes vekselvirkning med ikke-målorganismer**

Det vurderes ikke at de udsatte planter vil have påvirkning på ikke-målorganismer. Vi henviser hertil at der i de seneste år har været udsættelser af kartofler indeholdende cisgene R-gener andetsteds i Danmark, og at der i disse tilfælde også blev vurderet at de ikke ville have påvirkninger på ikke-målorganismer. Dette var vurderingen både før og efter forsøgsudsættelsen.

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

Det vurderes, at arbejdet i forbindelse med håndlægning af knolde og/eller udplantning af pottedyrkede kartoffelplanter, med efterfølgende maskinhypning og jordløsning med maskine forud for opsamling af knolde, sikrer en meget høj grad af sikkerhed for at der ikke efterlades knolde i jorden.

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 har alle taget GMO kørekort når forsøgene igangsættes, hvorfor alle er opdateret med nyeste viden om emnet.

#### **6. Virkninger på biogeokemiske processer**

Det forventes ikke at kartoffelskimmel populationerne vil ændre sig over en kortere tidshorizont, 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 resistens imod skimmel vil principielt forventes at virke positivt på både mennesker og dyrs sundhed, da det forventes at der skal anvendes en betydelig mindre mængde plantebeskyttelsesmidler (svampemidler) end i den oprindelige kultivar (sort). De ændrede egenskaber med flere resistensgener imod kartoffelskimmel, vil kunne forekomme under naturlige forhold, hvorfor virkningen ikke vurderes som væsentlig.

Erfaringerne fra den traditionelle forædling er, at når der selekteres på sorter med flere resistensgener, har det ikke haft betydning på hverken mennesker eller dyrs sundhed.

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

Aarhus Universitet  
Nordre Ringgade 1  
8000 Aarhus C

**Arbejdstilsynet**  
Tilsynscenter Øst  
Landskronagade 33  
2100 København Ø

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

CVR 21481815

11. december 2023

**Sag**  
20230085859/2  
Ansvarlig:  
Rikke Kolding Hansen

P 1017874450

Side 1/2

## **Afgørelse om afmelding af klassifikation til genteknologisk arbejde klasse planter**

Arbejdstilsynet har den 3. december 2023 modtaget anmeldelse fra Forskningscenter Flakkebjerg, Aarhus Universitet ved Inger Holme ([inger.holme@agro.au.dk](mailto:inger.holme@agro.au.dk)) vedrørende afmelding af lokalerne P3A3, P4B1, P4P2 i klassifikation til genteknologisk arbejde klasse planter, LAB-id 214 175 beliggende Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse. Ansvarlig laboratorieleder er angivet til Rikke Jakobsen.

Anmeldelsen er fremsendt i henhold til Arbejdstilsynets bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø nr. 910 af 11. september 2008.

### **Beskrivelse**

Virksomheden har fremsendt 'Anmeldeskema til ændringer af klassifikation'. Virksomheden oplyser, at lokalerne er omhyggeligt rengjorte efter endt anvendelse til GM-planter samt at følgende lokaler vil indgå i lab id'et fremadrettet: P4A1, P4A2, P4SA.

### **Vurdering**

Arbejdstilsynet finder på det foreliggende grundlag, at de omhandlede lokaler kan afmeldes genteknologi klassifikationen.

### **Afgørelse**

Arbejdstilsynet meddeler hermed forsat klassifikation til genteknologisk arbejde klasse planter i lokale P4A1, P4A2, P4SA (fællesgang) samt 20 plastkasser i rum E 128 samt V02 beliggende Forskningscenter Flakkebjerg, Aarhus Universitet, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse, jf. § 7, stk. 1, i Arbejdstilsynets bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø nr. 910 af 11. september 2008.

**Lokalerne har forsat LAB-id nr. 214 175**

**Vejledning**

Opmærksomheden henledes på, at det af hensyn til klassifikationen er vigtigt at sikre, at forskrifter, procedurer m.v. fortsat afspejler de faktiske sikkerhedsmæssige forhold for arbejdet med GMO, herunder arbejdsmetoder og arbejdsgange. Ved at gennemgå dem med jævne mellemrum, fx i forbindelse med revideringen af virksomhedens APV kan dette sikres.

Opmærksomheden henledes endvidere på § 30 jfr. § 11 i bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø nr. 910 af 11. september 2008, hvorefter enhver væsentlig ændring af de oplysninger, der ligger til grund for denne klassifikation, skal anmeldes til Arbejdstilsynet.

Ligeledes henledes opmærksomheden på § 12 i samme bekendtgørelse, hvorefter det forinden skal anmeldes til Arbejdstilsynet, hvis klassifikationen ikke længere ønskes opretholdt. Med henblik på en senere evt. afmelding af klassifikationen kan Arbejdstilsynet anbefale, at virksomheden allerede nu, udarbejder en skriftlig nedklassificeringsprocedure.

**Klage**

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

Kopi af dette brev er sendt til Miljøstyrelsen (J.nr. MST-686-00044), Tolderlundsvej 5, 5000 Odense C.

Venlig hilsen

Rikke Kolding Hansen

Aarhus Universitet  
Nordre Ringgade 1  
8000 Aarhus C

## **Afgørelse om ændringer af klassifikation til genteknologisk arbejde klasse 1 og planter**

Inger Holme, Dept. of Molecular Biology and Genetics, Aarhus University, Forsøgsvej, 4200 Slagelse, e-mail; [inger.holme@mbg.au.dk](mailto:inger.holme@mbg.au.dk) har med henvendelse af 2. september 2019 søgt om ændring af klassifikation til genteknologisk arbejde klasse 1 og planter – lab id 214 167.

Der anmodes om afklassificering af lokalerne B242 og autoklave i B228, begge blevet grundigt rengjort, således at der ikke findes rester af GMO samt anmodes om udvidelse med lokalerne B128, B130, A010, A030 og E224.

Ansøgningen er fremsendt i henhold til Arbejdstilsynets bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø nr. 910 af 11. september 2008.

### **Beskrivelse**

Virksomheden har fremsendt udfyldt skema ”Anmeldelse til klassifikation af genteknologiske laboratorier og laboratorieområder samt anlæg til genteknologiske stor-skalaforsøg eller produktion”.

Ansøgningen har været forelagt Miljøstyrelsen(MST-686-00054), som den 15. oktober har sendt følgende bemærkninger:

*”Miljøstyrelsen foretog besigtigelse af de lokaler der ønskes udvidet med den 28. august 2019 i forbindelse med et tilsyn. Lokalerne er indrettet ligeledes beskrevet i tidligere ansøgninger og som allerede godkendte lokaler.*

*Miljøstyrelsen vurderer, at de oplyste sikkerhedsrutiner og etablerede indeslutningsforanstaltninger yder en effektiv sikring imod at genetisk modificerede planter og mikroorganismer spredes til det ydre miljø.*

*Styrelsen har på det foreliggende grundlag ikke indvendinger mod den søgte klassifikation om ændringer af lab id 214 167.”*

**Arbejdstilsynet**

Tilsynscenter Øst  
Landskronagade 33  
2100 København Ø

T 70 12 12 88  
[at@at.dk](mailto:at@at.dk)  
[www.amid.dk](http://www.amid.dk)

CVR 21481815

16. oktober 2019

**Sag**

20180028531/14

Ansvarlig:

Rikke Kolding Hansen

P 1017874450

Side 1/2

## **Vurdering**

Arbejdstilsynet finder på det foreliggende grundlag, at de omhandlede lokaler, sikkerhedsforskrifter m.m. lever op til de krav, der er gældende for genteknologisk arbejde klasse 1 og planter.

## **Afgørelse**

På baggrund af ovenstående meddeler Arbejdstilsynet hermed klassifikation til genteknologisk arbejde klasse 1 og planter i lokale A010, A030, B108, B110, B128, B130, B132, B138, B139, B140, B153, B155, B161, B244, B246, autoklave i lokale D108, E224 samt tæskemaskine i laden i lokale E101 beliggende Forskningscenter Flakkebjerg, 4200 Slagelse jf. § 7, stk. 1, til Arbejdstilsynets bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø nr. 910 af 11. september 2008.

**Lokalerne har fået tildelt lab. id. nr.: 214 167**

**Denne afgørelse erstatter afgørelse af den 8. november 2018.**

## **Vejledning**

Opmærksomheden henledes på, at det af hensyn til klassifikationen er vigtigt at sikre, at forskrifter, procedurer m.v. fortsat afspejler de faktiske sikkerhedsmæssige forhold for arbejdet med GMO, herunder arbejdsmetoder og arbejdsgange. Ved at gennemgå dem med jævne mellemrum, fx i forbindelse med revideringen af virksomhedens APV kan dette sikres.

Opmærksomheden henledes endvidere på § 30 jfr. § 11 i bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø nr. 910 af 11. september 2008, hvorefter enhver væsentlig ændring af de oplysninger, der ligger til grund for denne klassifikation, skal anmeldes til Arbejdstilsynet.

Ligeledes henledes opmærksomheden på § 12 i samme bekendtgørelse, hvorefter det forinden skal anmeldes til Arbejdstilsynet, hvis klassifikationen ikke længere ønskes opretholdt.

Med henblik på en senere evt. afmelding af klassifikationen kan Arbejdstilsynet anbefale, at virksomheden allerede nu, udarbejder en skriftlig nedklassificeringsprocedure.

## **Klage**

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

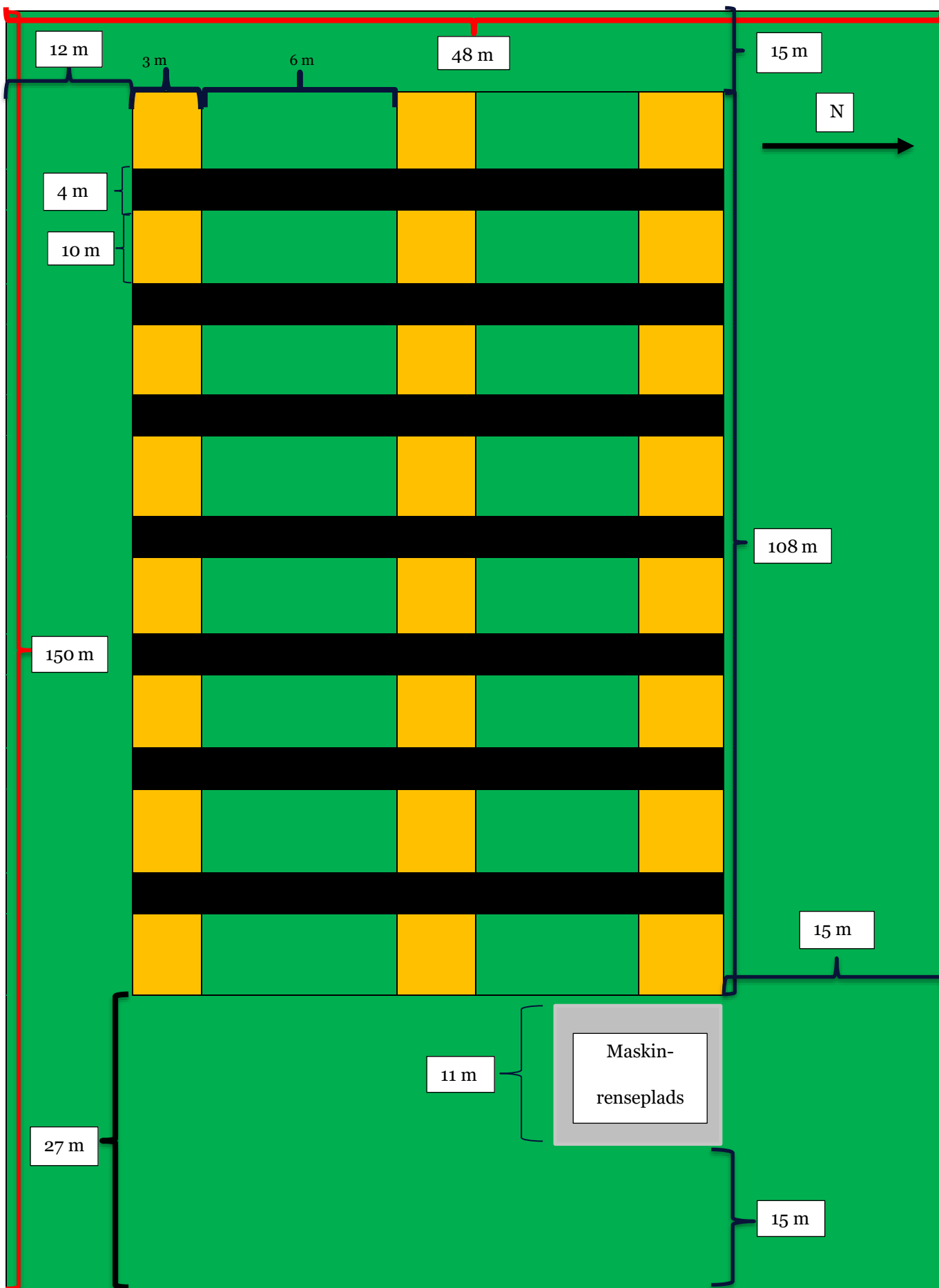
Kopi af dette brev er sendt til MILJØSTYRELSEN, Tolderlundsvej 5, 5000 Odense C.

Venlig hilsen

Rikke Kolding Hansen

Bilag 3 - Foreløbig skitse til forsøgsplaner i marken samt oversigtskort af ansøgte område (Flakkebjerg)

Skitse over forsøgsareal. De gule felter markerer parceller hvor afgrøderne vil blive dyrket. Grøn er græsarealer.



Arealets placering i forhold til nabo (35 meter) og §3 (mose) område (200 meter):



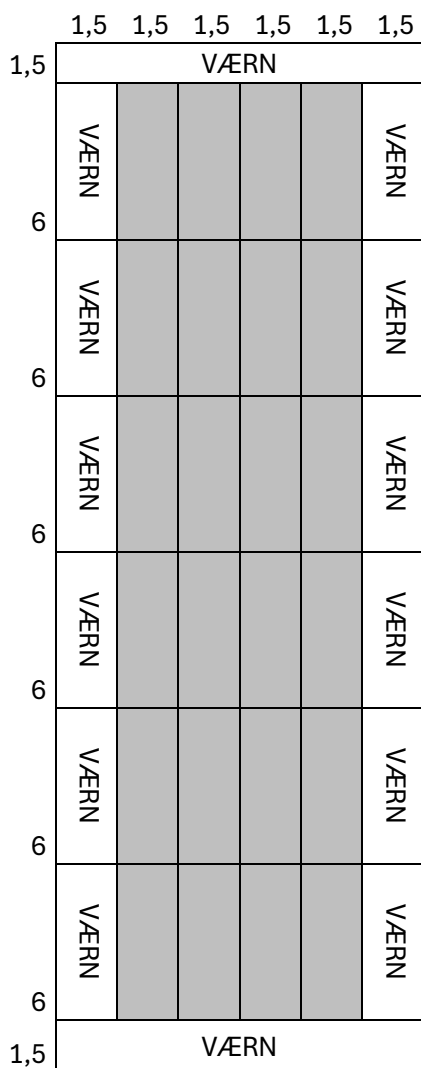


#### Bilag 4 - Foreløbig skitse til forsøgsplaner i marken samt oversigtskort af ansøgte område (AKV)

Principskitse af forsøgene, der vil altid være en alm kuras rundt om forsøget, disse vil blive behandlet som NGT Kuras, dette for at skabe ens forhold for forsøgene, så der ikke bliver vind påvirkning eller lign. NGT Kuras vil blive anlagt i 2 rækker for den enkelte type og i den givne længde, som der er planlagt forsøg med eller knolde til ( i tilfælde af at der ikke er så mange knolde som planlagt i forsøgsplanen).

Renseplads til maskiner i 2026 vil være i umiddelbar forlængelse af forsøget, mens det i 2027 og fremefter vil blive i området mellem 2027 og 2028 forsøgene, dette vil blive markeret med landmålerstokke i marken.

Der er minimum 20 meters afstand til andre kartofler, som følge af jordenes ejerskaber og naboernes brug af jorden.



Oversigtskort for det ansøgte område markblok 565332-85 (AKV)



## Bilag 5 – Beskrivelse af maskiner (Flakkebjerg)

Der vil blive anvendt en del forskellige traktorer til at udføre de maskinelle arbejdsopgaver.

(billeder ikke vedlagt)

Ford 7740, Case 130 CVX, Ford 3600, Ford 3140, Ford 6080



For tilberedning af jorden vil der blive anvendt to fræsere: en fræser med en arbejdsbredde a 1,5 meter (ovenstående billede).



Der vil til tilberedning af jorden også blive en anvendt en fræser af mærket Kuhn EL 92.



Kartoffellægger med 2 rækker a 75 cm. Maskinen vil blive brugt til lave riller til kartoffelrækkerne, og efter lægning af kartoflerne med hånd, at huppe kartoflerne.  
I tilfælde af at arealet med cisgene kartofler vil blive over 500 m<sup>2</sup> kan maskinen også anvendes til at lægge kartoflerne



Til efterhøpning af kartoffelrækker vil der blive brugt en tallerkenhypper med 2 rækker a 75 cm.



Ved høst af kartoflerne vil kartoflerne blive frilagt med en maskine der er udstyret med et jordskær som overskærer rødderne og løfter kartoflerne op samtidig med at jorden bliver rystet af.

Efter frilægning vil kartoflerne blive samlet op med håndkraft.



I tilfælde af at arealet med cisgene kartofler vil komme op på et større areal på over 500 m<sup>2</sup>, vil det blive aktuelt at anvende en 1 rækket kartoffleoptager, der opsamler kartoflerne i en kasse som vist på billedet herunder.



Kvik-up

Anvendelse: Fritlæggelse af spildkartofler.



Agromet Pionier

Topknuser til kartoffeltoppe



Nedvandingssprøjte til behandling med herbicider, fungicider og øvrige plantebeskyttelsesmidler, vækstregulatorer samt flydende kemisk gødning.



Gødningsspreder til granuleret kemisk gødning



Scan agro – brakklipper til afpudsning af værnearealer og køregange



Horsch Terrano 3FX

Dybdeharve



Kongskilde Germinator

Forårsharve til forberedelse af såbed



Kaeser M26 Mobil kompressor

Bruges til at rense maskiner på det klassificerede område med trykluft



Tromle

Bruges kun ved behov



JCB 525.60 teleskoplæsser til transport af materiel. Herunder til transport af kartofler i dobbeltposer i aflukkede containere (som beskrevet i ansøgningen) mellem det anvendte markareal i Flakkebjerg og GM klassificerede laboratorier og faciliteter i Flakkebjerg.  
Ved transport af kartofler i dobbeltposer i aflukkede containere mellem AKV og Flakkebjerg anvendes naturligvis et almindeligt køretøj.

Bilag 6 – Beskrivelse af maskiner (AKV)

Til tildækning af håndlagte kartofler, anvendes denne hypper med bejdseanlæg



Mekanisk ukrudtsbekæmpelse med optiweeder



Optagning med Asa-lift



Fræser til jordbehandling inden lægning, samt til at holde jorden sort. Året efter kartofler.



Traktor der er til rådighed til markarbejde



Opriller til rækkeafstand og gødnings placering



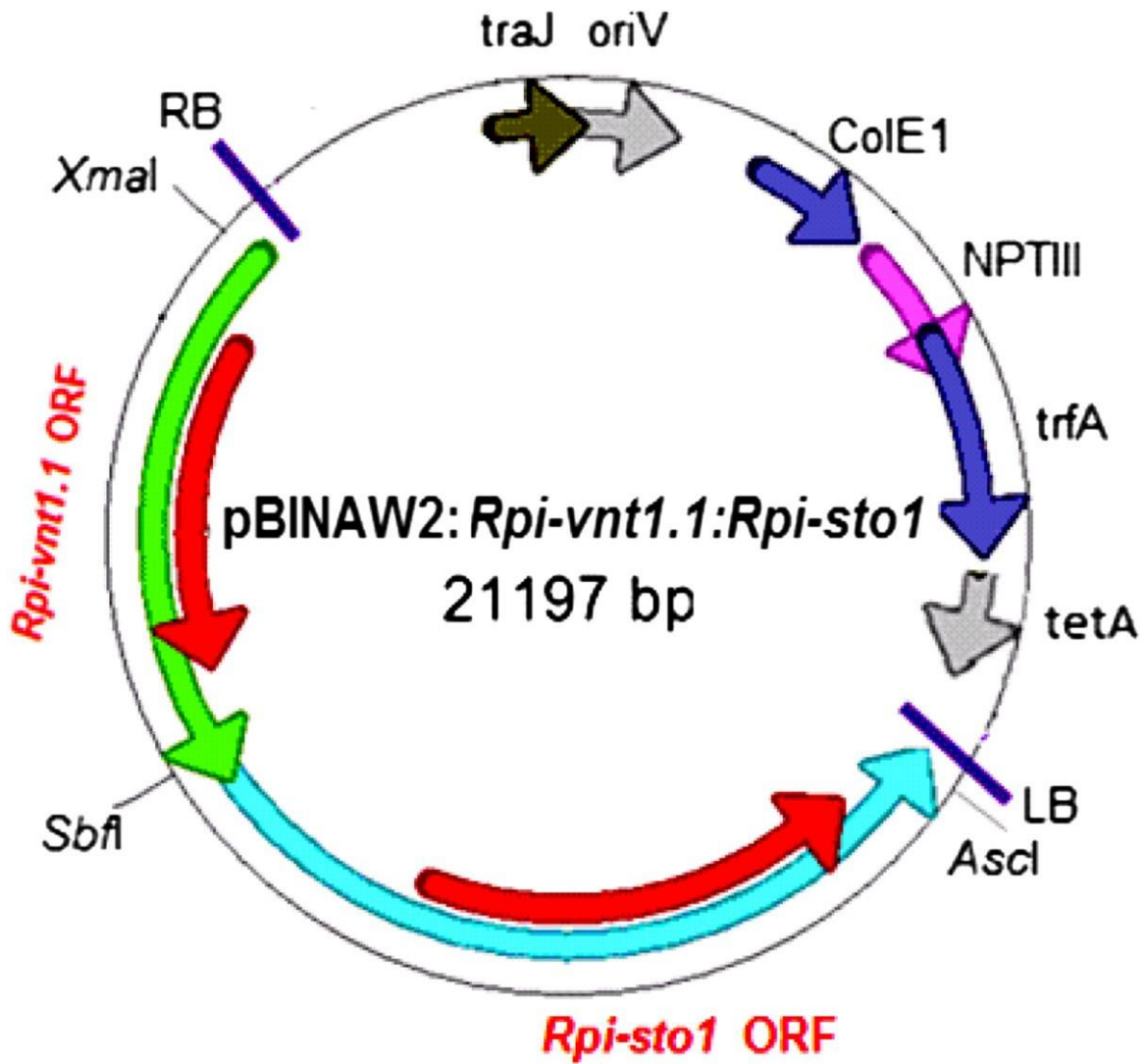
Cykelsprøjte ukrudts behandlinger skimmelbehandlinger mm



Rodunderskæringsmaskine, bruges før optagning/ opgravning



Appendix 1 – map af anvendte plasmid til kartoffeltransformation



Appendix 2 – DNA sekvens af plasmid pBINAW2:Rpi-vnt1.1:Rpi-sto1

attaacacctcgaggtcattatgatgatgtctcacgaccaaatacaaatcaaagttaaataaatatcgaaccgaacgccc  
actctgtatgagtatggcaaaaagatgagagaaatcaagttgcataaaagcctaattttcatggaacatacaaattgagtc  
tcataatagcccaaactcacagccatgaaccaaattgggtaaagtttgaagacgttcatcaaacagttaggaaaca  
taaaatggcgctagatatataataaatttttaacatatgggtgattgatagttatataactaaagatgttgcttagttacgta  
atTTTTcaaaaaaaaaaggtaacattatcaatcatcagtcacaaaatattaaagttactgtttgttttaattccatgtcg  
aatttaattgaatgacacttaaatgggacgaacgggtgaatttctttgactattctactagtatctatccacagcacgtgtt  
gttcctttctttctgttttctttcatttacttgacattattaggagacttggccctgaactccaactattctaagctgaccttctt  
tcctttaccaattatcttcttcttcttaattcgttttacgctagtagtgcctgaattttctgactttcaacgtttgttattcatgct  
tgaaaacgaaataccagctaacaaaagatgaattattgtgtttacaagacttgggcccgttactttcccttctca  
tcctcacatttagaaaaaagaaathtaacgaaaaathtaaggagatggctgaaattctctcacagcagtcataataa  
tcaatagaaatagctggaaatgtactcttcaagaaggtacgcgtttatattgggtgaaagaggacatcgattggctccaga  
gagaaatgagacacattcgatcatatgtagacaatgcaaaggcaagggaagtggaggcgattcaagggtgaaaaactt  
attaaaagatattcaacaactggcaggtgatgtggaggatctattagatgagtttctcaaaaaattcaacaatccaataa  
gttcatttgttccttaagacggtttctttgccgatgagttgctatggagattgagaagataaaaaagaagattgctgatatt  
gaccgtgaaggacaacttacagcatcacagatacaagtaacaataatgatgattgattccattggaccgggagaagat  
tgttccttcatgctgatgaaacagaggtcatcggcttggaaagatgacttcaatacactacaagccaaattacttgatcatg  
atgtgccttaggagttgttcaatagttggcatgcccggttgggaaaaacaactcttgccaagaaactttataggcatgtc  
tgtcatcaattgagtggtcgggactggtctatgtttcacaacagccaaggggcgggagaaatcttcatgacatagccaaa  
caagttggactgacggaagaggaaaggaaagaaaacttggaagaacaacctacgatcactcttgaataaaaaaggat  
gttattctcttagatgacattgggatgttgaatttgggatgatctaaaacttgccttctgaatgtgattcaaaaattggca  
gtaggataattataacctctcgaatagtaatgtaggcagatacataggaggggatttctcaatccacgtgttgcaacccc  
tagattcagagaaaaagctttgaaactttaccaagaaaactttaattttgtaataatggggccaatgcttcaccagac  
ttgtaaatattggtagatgtatagttgagagatgtggaggatataccgctagcaattgtggtgactgcaggcatgttaagggc  
aagaggaagaacagaacatgcatggaacagagtacttgagagtatggctcataaaattcaagatggatgtggttaaggta  
ttggctctgagttacaatgatttggccattgcattaaggccatgttctgtactttggtctttaccccgaggacctgaaatt  
cgtgctttgattgacaaatattggtgattgctgagaagctgatagttgtaataactggcaatggggcagaggctgaaagttt  
ggcggatgatgtcctaaatgatttggttcaagaaacttgattcaagttgccaagggacatattgatggaagaattcaagt  
tgtcgcatacatgacttgttacatagtttgtgtggacttggctaaggaaagtaacttcttcacacggagcacaaatgcatt  
tggatccttagcaatgttgctaggggtgcgaaggattacattctactctgatgataatgccaatgaatgagttcttccattaa  
atcctaagcctatgaagcttcttcaactttctgtttcacaaaagaccgttgcataattttcctcaaatggctcatcttaactca  
aattattgcaagtggtgtagtcatgtctcaaaagggttatcagcatgttactttccccaaaaaattgggaacatgagt  
tgcctacgttatgtcgtgattggagggggcaattagagtaaaattgccaatagtagttgtcaagctcaaatgtctagagacc  
ctggatataattcatagctctagtaaaacttctttgggtgttgggagtctaaaatattgagacatcttgttacacagaagaat  
gttactgtgtctctttgcaagctcattttgccgaatcatgcctcctaataatctcaaaactttgatgtgggtggatgataaatt  
tttgaaccaagattgtgcaccgattgataaatttaagaacattgtgtataatggatgtatccggttctaccattaagatatt  
atcagcattgagccctgtgcctagagcgttggagggtctgaagctcagattttcaagaacacgagtgagcaaaataaactt  
gtcgtcccaccaaataattgtcgagttgggttgggttctcagcaatgctcttgaacattgaagcattccctccaaatct  
tgtcaagcttaattctgtcggcttgatggttagacgggtcatctattggcagtgcttaagaaattgccaataaggatactta  
tattgctttgggtgcagacatgatgcagaaaaatggatctctctggtgatagctttccgcaactgaaagtttgtatattgagg

atgcacaagggtgtctgaagtaacgtgcatggatgatagatgcctaaattgaaaaagctatttctgtacaaggccc  
aacattcccccaattagtctcagggtctcggaacggcttgcaagttgagaatatcacaggactataaataattatta  
cgttaatatccatgatttttaattgtatttagttcatcaactaaatattccatgtctaataaattgcagggatgccttga  
aatgattctgtgtggagagaatcttctgatgcctgttggtattataataactaataataagagaaaaagtttgattactgttc  
aagttaattgcttgattgtaaaaacaaattacttttatatttctctttgtttttttatgttttttatctttaattaatggagta  
ataaaataaaaatcttattttcaatagaaaaagtagaccttattgtggtgcatgtatggtatcttttgaaattttgatata  
ttgctcttgattcgaatttcttgcttatatgatgattgcataaataaaaatattatacaaatacctatgggttggaataata  
gaaatgccaatcaaatgtatacaaaaatcattaatagatagaatcgtaaaagatatcaaatgagaaatgcttgacta  
agaagcttctgcaacctctcacactgagcacaatgcattgggtgatctcggcactattgctgttacttgaagactacgtt  
cccaataagtcttccaaacggcttgcaagctgagaatatgaaaatctcataggttagttgctgcgtaattatttacat  
ttaatatgctcgataagggtgattttaaaaaattgtactagttaattcatgaactaaatatttcattaactccataattct  
gaaatggaaaataaataatatttaataacaagaataaaatgataaattattcattgattttataaattggataaataatta  
aatattcttaataatataatgaacaagtgaagatgaacggaggagatgaagcctcttttcgccgggacactgcagg  
cttgctaattgagtgctgttataatcagtattaactctcaaggtaatagtatattccaacaaatttgtgttaccat  
aaatatatttctaaaactatctgaaagtagttaatatacttttgagtgtgtatcatgttttaataaaaatattaaattaga  
tgaaattactttctagttaaattggtcaaagttgaaagaattcaagtgaaaaagttttaataatttgcttttatgctatatt  
ttaaagttgaacgacttttaataaaaaagaataaaaattatataataatgataatttataatacaatggcctttatgatgaa  
aaaaagaaagaattagatgacaacaatgtccaaaaataatcttaagaattatgatttatataaaaattaaatttaa  
aattgatgaaaaatagagaaaagagggaagatgatgaagtgaatgattgggtgggtccatgtgacattaaaaaaaa  
caattctctaaataatccttcatactaatgataattttttttttttttttactaattgcgtattgagaaaaggaaaatggg  
gcggttaattacaagtagggaatcgaactttatcaagaagttgagagttcaagtaaccaaccaactaaactactaaaat  
tttctaattaatgataattgtaattcatttagcataaaaaattcattgcacttacttttagagtttgaaaacaatacttcac  
tattctatattaattaatcttatattaattaattgtgaggcaatacaaaacttattaagaaaaatatttaaggacataatt  
aatcatattttcactattgtttttgtgaaatcataatataactttgtaaatagtgcaatttatctcctagaagcaaaactc  
actaaagaaaaggcgaagatggaaaagaaactaaatattcatcttaactttgaacaattcaatttttgaacaatga  
aaaaatctcaaaaattcaattaatgaatatttagaggcaaaaaattagtactcctccgttcaactttattgtcatatt  
gcgcttttcgaaagtcaattgactaattttaaagatcaattagattactaattcaatattttaatagaaaaattagata  
ttcaaaaactatacaaaaaatattatacattgcaatttttgcatatcaatataaaaaatataatcgtaaaaatattagtc  
aaaattttatagttgactctaataatgaaaagtataataatagtgagcggaggaagattgtctttccagattgttgc  
cattttgggccaaggaccattagcagttctcttcttctactctgtctcatattagctgggcatcttaaaaaatattgt  
ctcatattacttgattttactaaatcaaaatagaattaattaatttttctcattttaccctccaattaatagtttgaaa  
gttttaacaaatttgaagaatcaaaatctttttgcaagagacttataatataaacaaggataaaaataaaaattg  
tcaattattgacgatcacttaataatcgtgtaaaaatagaaaatgttatctaatatgagacggagaaaaatataatcctaaaat  
attttgatggatgtgatattctaaccattcactagactatattatgcattttagccgcaatgacttatttcagcttaatt  
aattaggaaagaggaaactgccaatgaggaagagtaggggcgtagttgctgtcgacgaaaaaagataataactcactct  
tttcgattttattttatttatcacttttaacctatcatgtaaaaagataatattttttcatgctttatccttagtattaataatt  
aatagggatttttgaataatattatgaataattgtttcgaatgaattgtccagtcacaatgataaataaaaatg  
aacggagagagtagaaaacaaaacaaaagaacaagttgccaacttgagagattaaaagggacaaaacgccttggga  
tttgagattccatgtgaaattccatgaataattgaattgtattattacaatcaaaactttctatttcattccaactagc  
catcttggttcaaaaattacacattcattcattcacagatctaataattcttaatagtgattccacatatggctgaagctttcat  
tcaagttctgttagacaatctcacttcttctcaaaaggggaacttacattgcttttcggttttcaagatgagttccaaggct

ttcaagcatgttttctacaatccaagccgtccttgaagatgctcaggagaagcaactcaacaacaagcctctagaaaatt  
ggttgcaaaaactcaatgctgctacatacgaagtcgatgacatcttggatgaatataaaaaccaaggccacaagattctc  
ccagtctgaatatggccgttatcatccaaaggttatccctttccgtcacaaggtcgggaaaaggatggaccaagtatga  
aaaaactaaaggcaattgctgaggaaagaagaatttcattgcacgaaaaaattgtagagagacaagctgtagacg  
ggaaacaggtactcatctaaattagtattacaacaactaagttatattcattttttggcaattatcaaatcagaaaagg  
gttaaatatactcatgtcctatcgtaaatagtgtaaatatacctctcgttgactttcgatctgaatatactgtcaaatctgg  
caagctcagaatcaaatatccacccaacttttaatactcgacatctttagaatccacctgtctaactcatccacta  
cccattcccttggcttgaattctttctttacctataaaacttggaaactcgcgatccgttttcttttaacaaagcagctca  
gagaaaagaggtttcttctattctgtttctctgtgtgctgcacttgggtccttaatcccattaaaaacagggcatgtaatcc  
caacgacggtagcctttctgacagctgactgtaaattagtctaacaagaaaaaaaagattagacatgttttcctg  
tcattgattaggctggatttcttcagagtggaaacataggggatattggaccaaaaatagaatgggtatatattaaagat  
ttctgatagaacaggagtattgtgcgaaaatcctctattttctgtgtctcctaagattgattgaataatattctcat  
gtggacattgcttgcaccaggttctgtattaaccgaaccgcaggttatggaaagagacaaagagaaagatgagatagtg  
aaatcctaataaacaatgtagtgatgcccaacacctttcagtcctccaatacttggatggggggattaggaaaaacg  
actcttgcccaaatggtcttcaatgaccagagagttactgagcatttccattccaaaatatggattgtgtctcggaaagatt  
tgatgagaagaggtaataaaggcaattgtagaatctattgaaggaaggccactacttggtgagatggacttggctccact  
tcaaaagaagcttcaggagttgctgaatggaaaaagataacttgcctttagatgatgtttggaatgaagatcaacagaa  
gtgggcaaatttaagagcagcttgaaggttgagcaagtggtgcttctgttctaaccactactcgtcttgaaggttgat  
caattatgggaacattgcaaccatataaactgtcaaatctgtctcaagaagattgttggtgttgcctcatgcaacgtgcatt  
ggacaccaagaagaataaatacacaacttggcaatcggaaaggagattgtgaaaaaagtgggtgtgcctctag  
cagccaaaactcttggaggtattttgtgcttcaagagagaagaaagagcatgggaacatgtgagagacagtcgattgg  
aatttgcctcaagatgaaagttctattctgcctgccctgaggcttagttaccatcaacttccacttgaattgaaacaatgctt  
tgcgtattgtcgggttcccaaaggatgccaaaatggaaaaagaaaagctaatctctctctggatggcgcagtggtttctt  
ttatcaaaaggaaacatggagctagaggatgtgggtgatgaagatggaaagaattataacttggaggtctttttccaagaga  
ttgaagttaaagatggtaaaacttattcaagatgcatgatctcatcattggttggcaacatctctgttttcagcaaacaca  
tcaagcagcaatatccgtgaaataaataaacacagttacacacatatgatgtccattggttccgcaagtggtgtttttt  
acactcttcccccttggaaaagttatctcgttaagagtgttaacttaggtgattcgacatttaataagttaccatcttcc  
attggagatctagtagcatttaagatacttgaacctgtatggcagtggtcatgtagtcttccaaagcagttatgcaagcttcc  
aaaatctgcaactcttgcataatattgaccaagcttgggttggcaaaaagaaacaagtaacttggtagtctcc  
gaaatctttactttagtgtagcagtcattgacttgtatgccaccaaggataggatcattgacatgccttaagactctaggt  
caatttgttggaaaggaagaaaggttatcaacttggtagactaggaacctaactctatggctcaattaaaatctcgc  
atcttgagagagtgaagaatgataaggacgcaaaagaagccaattatctgcaaaagggaatctgcattcttaagcatg  
agttggaataacttggaccacatatatgaatcagaagaagttaaagtgttgaagccctcaaccacactccaatct  
gacttcttaaaaaatctatggctcagaggaatccatctccagagtggatgaatcactcagttgaaaaatattgtctct  
attctaattagcaactcagaaaactgctcatgcttaccacccttgggtgatctgccttctagaaaagtctagagttactg  
ggggtctcggatgtggagtatgtgaagaagtgatattgatgttcattctggattcccacaagaataaggtttccatct  
tgaggaaacttgcataatgggacttggtagtctgaaaggattgctgaaaaaggaaggagaagagcaattccctgtgcttg  
aagagatgataattcatgagtgccctttctgacccttcttaacttagggctcttacttccctcagaatttgcataataa  
agtagctacttccatccagaagagatgttcaaaaacttgcataacttgcataacttgcctgcaataatct  
caaaagctgcctaccagcttggctagtctgaatgcttgaagaaagctaaaaattcaattgttgcgactagagagct  
ccctgaggaagggtggaaggttatcttactcacagagttattgttgaacactgtaacatgctaaaaatgtttaccagag

ggattgcagcacctaacaaccctcacaagtttaaaaattcggggatgtccacaactgatcaagcgggtgtgagaagggga  
ataggagaagactggcacaaaatttctcacattcctaattggaatatataattaagttatttgctattgtttctttgtttgtga  
gtcttttggttcctgccattgtgattgcatgtaattttttctaggggtgtttgttgagtgctctctcattggatgtaattttctt  
ttgtaacaaattaacaatctattgtattatacgtttcagaatctattacttattgtaattgttctttgtttgtaaattgtgagt  
atcttattgtatggaattttctgatttttttgaacaaatcaataagatccatctgtattatactcccttcgtctcattttatg  
tgacactttttggattcagattcaacaaatctattttgatcttaattttcatagatcttttaaacattttgaaattacaatt  
attgtgatttttagtactttttatgtagtttacaatatataaaatttttttttaaaaaagaagatttcatgcgcatattcccg  
atcaaaactaaattactagactctcgaaaaatgaaaagtgtcacataaattgagactgaggggagacttgttaattgttgta  
attattggcgaacaataatgttgggtgattatcactttctgaataaatgtgtgtcacgtggaaaaaacaccaaataagaagta  
ttcatgcttttttagtatataaacacgatttttaacttggtttcagcggatagtcacgcttttactctgaatgtgcacaagt  
agatacttgataaaaattaaataattttataaaattatacaaatgacactgagagtaattgataccaattgcagtcgttgc  
tgcttttcgattctctgtcattctctagggcgcgccccgggtacgtgacaggatattggcgggtaaacctaagagaaaaga  
gcgtttattagaataatcggatatttaaaagggcgtgaaaaggtttatccgttcgtccattttgatgtgcatgccaaccacag  
ggttcccagatcaggaccgctgccggagcgcaccccactcactacagcagagccatgtagacaacatcccctccc  
cctttccaccgcgtcagacgcccgtagcagcccgtacgggctttttcatgccctgcccctagcgtccaagcctcacggc  
cgcgctcggcctctctggcggccttctggcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctcgttcggctgcg  
gcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtg  
agcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttctggcgtttttcatagggctccgccccctg  
acgagcatcacaanaatcgacgctcaagtcaagggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccc  
cctggaagctccctcgtgcgtctctctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctccttcgggaagc  
gtggcgttttccgctgcataaccctgcttcggggctcattatagcgtttttcggtatatccatccttttcgcacgatataca  
ggattttgcaaaaagggtctgttagactttccttggtgatccaacggcgtcagccggggcaggataggtgaagtagggcca  
cccgcgagcgggtgttcttcttactgtcccttattcgcacctggcgggtgtcaacgggaatcctgctctgcgaggctgg  
ccggctaccgcccggcgtaacagatgagggcaagcggatggctgatgaaaccaagccaaccaggaaggggcagccca  
cctatcaaggtgtactgccttccagacgaacgaagagcgtttagggaaaaggcggcggcggccggcatgagcctgtcg  
gcctacctgctggccgtcggccagggctacaaaatcacgggcgtcgtggactatgagcacgtccgcgagctggcccgc  
atcaatggcgacctgggcccgtggggcggcctgctgaaactctggctcaccgacgacccgcgcacggcgcggttcgggt  
gatgccacgatcctcgcctgctggcgaagatcgaagagaagcaggacgagcttggcaaggtcatgatgggcgtggtc  
cgcccgagggcagagccatgacttttttagccgctaaaacggccggggggtgcgctgattgccaagcacgtcccctatg  
cgctccatcaagaagagcgaacttcgaggagctggtgaagtacatcaccgacgagcaaggcaagaccgagcgcctttg  
cgacgctcaccgggctggttgcctcgcgctgggctggcggcgtctatggccctgcaaacgcgcccagaaaacgccgt  
cgaagccgtgtgcgagacaccgcggccgcccggcgttgggatacctcgcggaaaactggccctcactgacagatgag  
gggcccagcgttgacacttgaggggcccgactcaccggcgcggcgttgacagatgaggggacaggctcgatttcggccgg  
cgacgtggagctggccagcctcgcaaatcgggcaaaaacgcctgattttacgcgagtttcccacagatgatgtggacaag  
cctgggggataagtgcctcgcggtattgacacttgaggggcccgcgactactgacagatgaggggcccgcgatccttgacactg  
aggggacagagtgtgacagatgaggggcccgcacctattgacatttgaggggctgtccacaggcagaaaatccagcattg  
caagggtttccgcccgttttcggccaccgctaacctgtctttaacctgtctttaaccaatattataaacctgtttttaa  
ccagggctgcgcccctgtgcgctgaccgcgcacgccgaaggggggtgcccccttctgaaccctcccggcccgt  
aacgcgggctccatccccaggggctgcgcccctcggccgcgaacggcctcaccctcaaaaatggcagcgtgg  
cagtccttgccattgccgggatcggggcagtaacgggatgggcatcagcccagcgcgaccccggaagcattgacg  
tgccgcaggtgctggcatcgacattcagcgaccaggtgccgggacgtgagggcggcggcctgggtggcggcctgcctt

cacttcggccgtcggggcattcacggacttcatggcggggccggcaattttaccttgggcattcttggcatagtggtcgcg  
ggtgccgtgctcgtgttcgggggtgcgataaaccagcgaaccatttgaggtgataggttaagattataaccgaggtatgaa  
aacgagaattggacctttacagaatactctatgaagcgccatatttaaaaagctaccaagacgaagaggatgaagagg  
atgaggaggcagattgccttgaatatattgacaatactgataagataatataatctttatatagaagatatcgccgtatgtaa  
ggatttcagggggcaaggcataggcagcgcgcttatcaatatactatagaatgggcaaagcataaaaacttgcattggac  
taatgcttgaaccaggacaataacccttatagcttgaattctatcataattgggtaagtactccaacttattgatagtg  
tttatgttcagataatgccgatgactttgtcatgcagctccaccgattttgagaacgacagcagcttccgtcccagccgtg  
ccaggtgctgcctcagattcaggttatgccgctcaattcgtgcgtatatacgttgcgtgattacgtgcagcttcccttcagg  
cgggattcatacagcggccagccatccgtcatccatataccacgtcaaagggtgacagcaggctcataagacgccc  
cagcgtcgccatagtgcttaccgaatacgtgcgcaacaaccgtcttcggagactgtcatacgcgtaaaacagcca  
gcgctggcgcgatttagccccgacatagccccactgttcgtccattccgcgcagacgatgacgtcactgcccggctgt  
atgcgcgaggttaccgactgcggcctgagtttttaagtacgtaaaaatcgtgttgaggccaacgcccataatcggggctg  
ttcccggcatccaaccattcatggccatataatgattttctgggtgcgtaccgggttgagaagcgggtgtaagtgaact  
gcagttgccatgttttacggcagtgagagcagagatagcgtgatgtccggcgggtcttttgccgttacgcaccacccgt  
cagtagctgaacaggaggagcagctgatagacacagaagccactggagcacctcaaaaacaccatcatacactaaa  
tcagtaagtggcagcatcaccataattgtggtttcaaatcggctccgtcgatactatgttatacgccaactttgaaaac  
aactttgaaaaagctgtttctggtatttaaggttttagaatgcaaggaacagtgaattggagttcgtcttgttataattagctt  
cttggggatctttaaatactgtagaaaagaggaaaggaaataataatggctaaaaatgagaatatcaccggaattgaaaa  
aactgatcgaaaaataaccgctgcgtaaaaagatacggaaaggaatgtctcctgctaaggatataagctggtgggagaaaa  
tgaaaacctatatttaaaaatgacggacagccggataaaagggaccacctatgatgtggaacgggaaaaggacatgatg  
ctatggctggaaggaaagctgcctgttccaaaggtcctgcactttgaacggcatgatggctggagcaatctgctcatgagt  
gaggccgatggcgtccttgcctcggaaagagtatgaagatgaacaaagccctgaaaagattatcagactgatcgggagt  
catcaggctcttctactccatcgacatatacggattgtccctatacgaatagcttagacagccgcttagccgaattggatta  
cttactgaataacgatctggccgatgtggattgcgaaaactgggaagaagacactccatttaaagatccgcgcgagctgt  
atgatttttaaaagacggaaaagcccgaagaggaaactgtcttttccacggcgacctgggagacagcaacatcttggg  
aaagatggcaaagtaagtggctttattgatcttgggagaagcggcagggcggacaagtggatgacattgccttctgcgtc  
cggctgatcaggaggatatacggggaagaacagtatgtcgagctatttttgacttactggggatcaagcctgattgggag  
aaaataaaatattatatttactggatgaattgttttagtacctagatgtggcgaacgatgccggcgacaagcaggagcg  
caccgacttctccgatcaagtgtttggctctcaggccgaggcccacggcaagtatttgggcaaggggtcgtggtatt  
cgtgcagggcaagattcggaaataccaagtacgagaaggacggccagacggctctacgggaccgacttattgccgataa  
ggtggattatctggacaccaagcaccaggcgggtcaaatcaggaataagggcacattgccccggcgtgagtcggggc  
aatcccgaaggagggtgaatgaatcggacgtttgaccggaaggcatacaggcaagaactgatcgacgcgggggtttcc  
gccgaggatgccgaaacctcgcaagccgcaccgtcatgctgcgccccgcgaaacctccagtcctcggctcgat  
ggtccagcaagctacggccaagatcgagcgcgacagcgtgcaactggctccccctgccctgcccgccatcggccc  
ccgtggagcgttcgctcgtctcgaacaggaggcggcaggtttggcgaagtcatgaccatcgacacgcgaggaactat  
gacgaccaagaagcgaaaaaccgccggcagggacctggcaaaaacaggtcagcagggccaagcaggccgcgttgct  
gaaacacacgaagcagcagatcaaggaaatgcagcttcttcttgcgatattgcgcccgtggccggacacgatcgagc  
gatgccaaacgacacggcccgtctgccctgttaccacgcgcaacaagaaaatcccgcgcgaggcgtgcaaaac  
aaggtcattttccacgtcaacaaggacgtgaagatcacctacaccggcgtcgagctcggggccgacgatgacgaactg  
gtgtggcagcaggtgttgagtagcgcgaagcgcacccctatcggcgagccgatcaccttccacgttctacgagctttgcca  
ggacctgggctggtcgatcaatggccggtattacacgaaggccgaggaatgcctgtcgcgcctacaggcgacggcgat

gggcttcacgtccgaccgcttggggcacctggaatcgggtgctgctgctgcaccgcttccgctcctggaccgtggcaag  
aaaacgtcccgttgcaggtcctgatcgacgaggaaatcgtcgtgctgttctggcgaccactacacgaaattcatatg  
ggagaagtaccgcaagctgtcgcggacggcccgcaggatgttcgactattcagctcgcaccgggagccgtaccgct  
caagctggaaaccttccgctcatgtgcggatcggattccaccgctgaagaagtggcgcgagcaggtcggcgaagc  
ctgcgaagagttgcgaggcagcggcctgggtggaacacgcctgggtcaatgatgacctgggtgattgcaaacgctagggc  
cttgggggtcagttccggctgggggttcagcagccagcgtttactggcatttcaggaacaagcggggcactgctcgacg  
cattgcttcgctcagtatcgtcgggacgcacggcgcgctctacgaaactgccgataaacagaggattaaaattgacaa  
ttgtgattaaggctcagattcgacggcttggagcggccgacgtgcaggatttccgagatccgattgtcggccctgaaga  
aagctccagagatgttcgggtccgtttacgagcacgaggagaaaaagcccattggaggcgttcgctgaacgggttcgaga  
tgccgtggcattcggcgcctacatcgacggcgagatcattgggtgctcgggttcaaacaggaggacggccccaaggac  
gctcacaaggcgcacatctgtccggcgtttctggagcccgaacagcaggccgaggggtcgcgggtatgctgctcggg  
cgttccggcgggtttattgctcgtgatgacgtccgacagattccaacgggaatctgggtgatgcgcatcttcatcctgg  
cgcaactaatttcgctattctggagcttgtttatttcggctaccgctcggggcgggggtcgcggcgacggtagggc  
ctgtgcagccgctgatggctgtttcatctcctgctcgtctaggttagcccgatacattgatggcggctcctgggggctatt  
tgcggaaactcggggcgtggcgctgttgggttgacaccaaagcagcgcctagatcctgtcggcgtcgcagcgggcctgg  
cgggggcggtttccatggcgttcggaaccgtgctgacccgcaagtggcaacctcccgtcctctgctcaccttaccgc  
ctggcaactggcggccggaggacttctgctcgttccagtagctttagtgttgatccgccaatcccgatgcctacaggaac  
caatgttctcggcctggcgtggctcggcctgatcggagcgggttaacctacttcttgggttcgggggatctcgcgactc  
gaaacctacagttgttcttactgggctttctcagccccagatctggggctgatcagccggggatgatcaggccgacagt  
cggaaactcgggtccccgacctgtaccattcgggtgagcaatggataggggagttgatcgtcaacgttcaacttaaga  
aatagcgcactcagcttctcagcggcttatccagcgatttctattatgtcggcatagttctcaagatcgacagcctgt  
cacggttaagcgagaaatgaataagaaggctgataattcggatctctgcgagggagatgatatttgatcacaggcagcaa  
cgctctgcatcgttacaatcaacatgctaccctccgcgagatcatccgtgttcaaacccggcagcttagttgccgttctt  
ccgaatagcatcggtaacatgagcaaatcgtccgccttacaacggctctcccgtgacgccgtcccggactgatggg  
ctgcctgtatcgagtggtgattttgtccgagctgccggctcggggagctgttggctggctgggtggcaggatattgtggt  
gtaaactctagaggatcctta

### Appendix 3 - Gensekvenser af cisgenerne Rpi-Vnt1.1 og Rpi-Sto1

gtcattatgatgatgtctcagcaccaaatcaaatcaagttaaataatcgaaccgaac-gcccactctgtatgagtatggcaaaagattttgaga-  
gaatcaagttgcataaaa-gcctaattttcatggaacatacaaatgagtcataa-tagcccaaacacagccatgaacccaattgggtaaagtttgcaa-  
gac-gttcatcaaacagtaggaaacataaaatggcgctagatatataataaatttttaacat-atggtgtgattgatgtatataactaaagatgtttgcttag-  
ttac-gtaatttttcaaaaaaaaaggtagcattatcaatcatcagtcacaaaa-tattaaagtactgtttgttttaaatccatgtcgaatttaatt-  
gaatgacac-ttaaattgggacgaacgggtgaattttttgactatttactagatctatccacagcac-gtgtttcctttctctttctttttcattactt-  
gacattataggagactt-ggccctgaactccaactattctaagctgaccttttctttac-caattatcttcttcttaattcgttttacgctag-  
tactgctgaattttctgacttcaacgtttgttattcatgcttgaacacgaaatac-cagctaacaaaagatgaattattgtgttacaagacttggccggtt-  
gactcttcttccctcctcctcactcatttagaaaaagaaattaac-gaaaaataaggagatggctgaaattcttctcacagcagtcataca-  
taaataatagaaa-tagctggaaatgactcttcaagaaggtagcgtttatattggtgaaagag-gacatcgattggctccagagagaaatgaga-  
cacattcgatcatatgtaga-caatgcaaaggcaaaggaagttggaggcgattcaagggtgaaaaacttattaaaga-tattcaacaactgg-  
caggtgatgtggaggatctattagatgag-tttctccaaaaattcaacaatccaataagttcattttgttccttaagacggtttctttt-gccgatgagtttgc-  
tatggagattgagaagataaaaagaagagttgctgatattgacctg-taaggacaacttacagcatcacagatacaagtaacaa-  
taatgatgattgattccattggac-cggagaagattgtccttcatgctgatgaaacagaggatcggctggaagatgacttcaa-tacactacaa-  
gccaaattactgatcatgatttgccttatggagttgttcaatagttgg-catgcccgtttgggaaaaacaactcttgccaa-  
gaaactttataggcatgtctgtcatcaattgagtggtcgggactggtc-tatgtttcacaacagccaaggcgggga-  
gaaacttcatgacatagccaaacaagtt-ggactgacggaagaggaaaggaaagaaaacttggagaacaacctacgatcactcttgaaaa-  
taaaaaggatgttatttcttagatgacatttgggatgtgaaatttg-gatgatctaaaactgtccttctgaatgtattcaaaaattggcagtagga-  
taattataac-ctctgaaatagtaatgtaggcagatacataggaggggatttctcaatccacgtgtt-gcaaccctagattcagagaaaagcttt-  
gaactttaccaagaaaacttttaatttt-gttaatgataattggccaatgctcaccagacttgtaaatattggtagatgtatagtga-gagatgtg-  
gaggtataccgctagcaattgtgtgactgcaggcatgtaagggaagaggaa-gaacagaacatgcatggaacagagtacttgagag-  
tatggctcataaaattcaa-gatggatgtgtaaggtattggctctgattacaatgattgccatt-gcattaaggccatgtttctgtacttt-  
ggctttaccccgaggaccatgaaattcgtgctttt-gattgacaaatattgtgattgctgagaagctgatagttgtaaaactggcaatggcgca-  
gaggctgaaagtttggcgatgatgtcctaaatgattgtttcaagaaacttgat-tcaagttgcaaaaaggacatgatggaagaattcaagttgctgat-  
acatgactgttaca-tagttgtgtgacttggctaaggaaagtaacttcttccacaggagcaaatgcattt-ggtgatcctagcaatgtt-  
gctaggggtcgaaggattacttactctgatga-taatgcatgaatgagttcttccatttaaatcctaagcctatgaagcttcttccac-  
ttttctgtttcaaaaagaccgtt-gcatattttcctaaatggctcatcttaacttcaaatattgcaagttgtggttag-tcatgtctcaaaagggttatcag-  
catgttactttcccaaaaaaattgggaacatgagttgcc-tacgttatgtgctgattggagggggcaattagagtaaaattgcaaatagattgtcaa-  
gctcaaatgtctagagaccctggatattttatagctctagtaaaactccttttgggtttt-gggagtctaaaatattgagacatctttgtcacagaa-  
gaatgttactgtgtctttt-gcaagtcattttgccgaatcatgctccttaataatctacaaaactttgatgtgggtggatga-taaattttgtgaaccaagattgtt-  
gcaccgattgataaattagaacattgtg-tataatggatgtatccggttctaccattaagatattatcagcattgagccctgtgecta-gagcgtt-  
ggaggttctgaagctcagattttcaagaacacagagtgacaaataaactt-gtcgtccatccaaatattgtcagttgggttgggttctcag-  
caatgctctt-gaacattgaagcattcctccaaatctgtcaagcttaacttctgctgctttaggtagac-ggtcatctattggcagtgcttaagaaatt-  
gcccataaaggatacttattgctttgggtg-cagacatgatgcagaaaaatggatctctctggtatagctttccgcaactgaagtttt-gtatattgag-  
gatgcacaaggggtgtctgaagtaacgtgcatggatgatagag-tatgcctaaattgaaaagctatttctgtacaaggcccaaacatttcccaattag-  
tctcaggtctcggaacggcttcaagattgagaatatcacaggtactataaa-taattattacgtttaatatcatgatttttaaaattgtatttag-  
ttcatcaactaaa-tattcatgtctaaataaattgcagggatgctttgaaaatgattctgtgtggaga-gaatcttctgatgctgttggattataatactaa-  
taataagagaaaaagttgat-tactgtttcaagtttaattgcttggatttgaaaaaacaattactttatatttctt-

gTTTTTTTatgTTTtattatctTTaattaatggagtaataaaataaaaatcttattttcaa-tagaaaaagtagaccttatttgggtgcatgtatggtatctTTTT-  
gaaatttttgata-tatttgcctttgattcgaatttctgcttatatgatgattgcataaatataaaatattata-caaacctatgggttgaaaatagaaa-  
tatgccaatcaaatgtatacaaaaatcattaa-tagatagaatcgtaaaagatatcaaatgagaaatgcttgactaagaagcttcgtgcaac-ctctcacac-  
tgagcacaatgcatttgggtgatctcggcactattgctgttacttgaagac-tacgttcccaataagtctttccaaacggcttgcaaagctgagaa-  
tatgaaaatctcataggt-tagtttgcgcttaattattacatttaaatatgctcgataaggtgattttaaaaaaattt-gtactagttaattcatgaactaaa-  
tatttcattaatactccataaattctgaatatgaaaa-taaataatatttaataacaagaataaaatgataaattattcattgattttataaattgga-taaa-  
tattattaatattcttaataatataatgaacaagtgaagatgaacggaggag-tatgaagcctctttcggccggcacctgcaggcttgctaattgag-  
tgtctgtataatcag-tattaactctcaaggaatagatatccaaacaaatttggttac-caaattaaatatttctaaaactatcttgaagtagtta-  
tatactttgagtgtt-gtatcatgttttaataataaaatattaaaatttagatgaaatttactttctagttaaatt-ggtcaaagttgaaa-  
gaatttcaagtgaaaaagtttttaataatttgcctttatgcta-tatttttaagttgaacgacttttaataaaaaagaataataaaattatataga-  
taattttataatacaatggcctttatgatgaaaaaaagaagaatt-agaatgacaacaatgtccaaaaataatcttaagaattatgattatataa-  
taaaattaaatttaaaattgatgaaaaaatagagaaaaggaa-  
gatgatgaagtgaatgattgggtgggtccatgtgacataaaaaaaacaattctcttaaa-taatctttcactactaatgataatttttttttttttttact-  
aattgcgtattga-gaaaaggaaaatggggcggttaattacaagtagggaatcgactttatcaagaagttgagag-ttcaagtaaccaaccaactaaac-  
tactaaaattttctaaatgataatt-gtaattcatttagcataaaaaattcattgcactacttttagagtttgaaaacaa-tacttcatctattcta-  
tattaattaaattttctatattaattaaattt-gtgaggcaatacaaaacttattaagaaaaatattaaggacataattaaatcatattttcac-tattgttttt-  
gtgaaatcataatataactttgtaaatagtcaattatctcctagaa-gcaaaactcactaaagaaaaggcaagatggaagaaactaaa-  
tattcatcttaaaacttt-gaacaattcaatttttgaacaatgaaaaaatctcaaaaattcaattaatgaa-tatttttagaggcaaaaaattag-  
tactccctcgttcacttttattt-gtcatattgcgcttttcgaaagcaatttgaactaatttttaagatcaattagattcac-taattcaatattttaaa-  
tagaaaaattagatattcaaaaactatacaaaaaatattata-cattgcaatttttgcataatgataaaaaatataatcgtaaaatattag-  
tcaaaattttatagttgactctaaatgaaaagtataataattaatagtgacggag-gaagtattgtcttccagatttggccattttgggccaaggac-  
cattagcag-ttctctcattttctctctctcatattagctgggcatctactaaaatatttgtctca-tattacttgattattactaaatcaaaa-ta-  
gaattaattaatttttctattttaccctccaattaatagtttt-gaaagttttaacaaaatttgaagaatcaaaattcttttgcagagacttattaa-ta-  
taacaaaaggataaaataaaaaatttgcattttattgacgatcacttaataatcgtg-taaaaatagaaaatgtttatctaataatgagacgga-  
gaaaatatacctaaaatatttt-ggatggatagtgatatttcaaccattcactagacta-tattatgcattttagccccaatgacttattcagcttaattaatt-  
aggaaagag-gaaactccaatgagggaagagtagggcgtagttgctgctgacgaaaaaagataa-tactcactctttcgattttattttattatcac-  
tttaacctatcatgtaaaaagataat-tatttttcatgctttatcttagtattaataatattaatagggatttttgaaaa-tatttatgaataattgtttgcg-  
taatgaatttgcagtcaacaatgataaa-taaaaatgaacggagagtagaaaacaaaacaaagaacaagttgccaactgagagat-  
taaaagggacaaaacgccttgattttgagattccatgtgaaatttccatgaaataatt-gaatttgtattattacaaatcaaaactttc-  
tatttcattccaactagccattt-ggtttcaaaattacacattcattcaccagatctaataattcttaatagtgatttccacat-atggctgaa-  
gctttcattcaagttctgttagacaatctcacttttctcaaaagg-gaacttacattgcttttcggttttcaagatgagttcacaaggctttcaagcatgtttc-  
tacaatccaagccgtccttgaagatgctcaggagaagcaactcaacaacaagcctcta-gaaaattggttgcaaaaactcaatgctgctacat-  
acgaagtcgatgacatcttgatgaa-tataaaaccaaggccacaagatttctccagctgaa-  
tatggccgttatcatcacaaggttatcctttccgtcacaaggtcgggaaaaggatggac-caagtgatgaaaaactaaaggcaattgctgaggaaagaaa-  
gaattttcattgac-gaaaaatttagagagacaagctgttagacgggaaacaggtactcatttaattag-tattacaacaactaagttta-  
tattcattttttgcaattatcaaaatcagaaaagggttaaa-tatactcatgctcctatcgtaaatagtgtaaatacctctcgttcttctgatctgaa-ta-  
tactgtcaaatctggcaagctcagaatcaaaatattccaccccaacttttaaa-tactcgacatctttagaaatccacctgtctaaactcaccac-  
taccattccctttgcttt-gaattcttttttacctataaacttgaacactcgatccgttttcttttcttaacaaa-gcagctcagagaaaagggttttctt-

tattctgtttctctgtgtgctgcactt-gggtccttaateccattaaaaacagggcatgtaatcccaacgacgg-tagcctttcctgacagctgactgtaaatttag-  
tctaacaagaaaaaaaagattaga-catgttttccttgcattgattaggctggattctttcagagtgaacataggggata-tattggaccaaaaa-  
tagaatgggtatataattaaagtatttctgatagaacaggag-tatattgtcgaataatcctctattttctgtgtctcctaatgagtttgatgaataa-  
tattctcatgtggacattgcttgcaccaggttctgtattaaccgaaccgcaggttatggaa-gagacaaagagaagatgagatagtgaaaatcctaa-  
taaacaatgtagtgcaccaacac-ctttcagtcctccaatacttggtatgggggattaggaacacgactctt-gcccaaatggtcttcaatgaccaga-  
gagttactgagcatttccattccaaaatattggattt-gtgtctcgggaagattttgatgagaagaggtaataaaggcaatt-  
gtagaatctattgaaggaaggccactacttggtagatggacttggctccacttcaaaagaa-gcttcaggagtgtctgaatggaaaagatacttgcctt-  
gtcttagatgatgttggaatgaa-gatcaacagaagtgaggcaaatataagagcagcttgaaggttgag-caagtggctctgttctaaccac-  
tactcgttctgaaaaggttgatcaattatgg-gaacattgcaaccatataaactgtcaaatctgtctcaagaagattgttgggtgtt-gttcatgcaactgcattt-  
ggacaccaagaagaaataatccaaacttggcaatcg-gaaaggagatttgaaaaaagtggtggtgtgcctctagcagccaaaactctt-  
ggaggatattttgtctcaagagagaagaaagagcatgggaacatgtgagagacagtcctgat-ttggaaattgcctcaagatgaaagttc-  
tattctgcctgcctgaggcttagttac-catcaactccacttgatttgaacaatgctttgcg-tattgtcgggtgtcccaaggatgcaaaaatgaaaaa-  
gaaaagctaatctctctctg-gatggcgcatggtttttatcaaaaggaacatggagctagag-gatgtgggtgatgaagtatggaaagaattatactt-  
gaggtctttttcaaga-gattgaagttaaagatggtaaaacttattcaagatgcatgatctcatccatgatttgg-caacatctctgtttcag-  
caaacacatcaagcagcaaatccgtgaataaataaacacag-ttacacacatatgatgtccattggttccggaagtgtgttttttacac-  
tctcccccttgaaaagttatctcgtaagagtcttaacttaggtgattcgacattaa-taagttaccatcttccattggagatctagtacatttaagatactt-  
gaacctgtatggcagtg-gatgcgtagtcttcaaacagcttatcaagcttcaaaatctgcaaaccttctgatctacaa-tattgcaccaagctttgttgtt-  
gcaaaaagaacaagtaaaacttgtag-tctccgaaacttttacttgatggttagccagtcattgacttgtatgccaccaagga-taggatcatt-  
gacatgccttaagactctaggcaattttgttgggaaggaa-gaaaggtatcaacttggtaactaggaacctaataatctctatggctcaattaaaaatctcg-  
catcttgagagagtgaagaatgataaggacgcaaaagaagccaatttatctg-caaaaggaatctgacttcttaagcatgagttggaataactttggac-  
cacat-atatatgaatcagaagaagttaaagtgttgaagccctcaaacacac-tccaatctgacttcttaaaaatctatggcttcagag-  
gaatccatctccagagtg-gatgaatcactcagattgaaaaatattgtctctattctaattag-caacttcagaaactgctcatgcttaccaccctt-  
ggtgatctgcctgtctagaaagtcta-gagttacttggggctcgggatgtggagatgttgaagaagtgga-tattgatgtcattctggattcccccaa-  
gaataaggttccatcttgaggaaacttgata-tatgggactttgtagtctgaaaggattgctgaaaaaggaaggagaagag-caattccctgtgcttgaa-  
gagatgataattcatgag-tgcccccttctgacctttcttaacttagggcttacttccctcagaatttctataa-taaagtagtacttattccagaaga-  
gatgtcaaaaacttgc aaatctcaatactt-gacaatctctcggtgcaataatctcaagagctgcctaccagcttggctagctgtaattgctt-  
gaaaagctaaaaattcaattgttgcactagagagctcctcaggaagggctg-gaaggttatcttcaactcacagattattgttgaactg-  
taacatgctaaaatgtttac-cagagggttgcagcacctaacaacctcacaagttaaaaatcggg-gatgtccacaactgatcaagcgggtgga-  
gaagggatagagaagactgg-cacaaaattctcacattcctaatgtaatatataaattaaagttatttgc-tattgttcttgttgtgagcttttt-  
ggttctgccattgtgattgcatgtaattttttc-taggggtgttgttgtgagctctctctcattggatgtaattttcttttg-taacaataacaatctattt-  
gtattatacgtttcagaatctattacttatttgaatt-gtttcttgttgaattgtgagatcttattgtatggaattttctgattttatttt-gaaaacaaatcaa-  
taagatccatctgtattatactccttctctcattttatgtgacac-ttttggatttcagattcaacaataatctattttgatcttaaaattttcata-  
gatcttttaacattttgaattatcaattattgtgatttttagtactttttatgtag-tttacaaatataaaaatttttttttaaaaaagaagatttcatgag-  
catattcccgatcaaaacttaataactagactctcgaaaaatgaaagtgtcacataaattga-gactgaggagacttgttaattgtt-  
gtaattattggcgaacaataatgttgggtgattatcac-tttctgaataaattgtgtcactgtgaaaaaacacaaatagaagatttcatgcttttttag-tata-  
tataaacacgatttttaacttggttcagcggatagtcacac-ctttactctgaatgtgcacaagtagataactgtataaaattaaa-taaattttataaaattata-  
caatatgacactgagagtaattgataccaattgcagtcgttcttctgattctctgtcattcteta

## Appendix 4 - Copy number analysis with ddPCR and determination of insertion site by inverse PCR

### Copy number

Digital Droplet PCR (ddPCR) is an advanced PCR technique for quantifying nucleic acids, such as DNA and RNA, with high precision and sensitivity. Unlike traditional PCR methods, which provide relative quantification, ddPCR offers absolute quantification by partitioning a sample into thousands of nanoliter-sized droplets, each serving as an independent reaction chamber.

DNA isolated from the transgenic line and control non-transgenic Kuras (WT) was digested overnight with KpnI-HF enzyme. Reaction with double primers/probe was set, and droplets were generated. The primers used were amplifying EF1a with probe tagged with HEX as a control. Kuras is a tetraploid plant and contains the 4 copies of the EF1a gene. In the same reaction, primers amplifying the fragment of Vnt1.1 gene with a probe tagged with FAM were used to calculate the number of inserts. In the WT there was no detection of the FAM probe, but HEX probe was detected. **In line K2R1 there was 4 copies of the EF1a gene detected (equal to 196 copies/ $\mu$ L) and one copy of the FAM (49 copies /  $\mu$ L), which means there was one inserted copy of the Vnt1.1-Sto1 construct (Figure 2).**

Figure 1: Droplets generated for the sample of K2R1 line (A) and the WT (B) (2D amplitudes). Green and blue droplets indicate FAM and HEX probes, orange contains both probes, and grey does not contain any amplification.

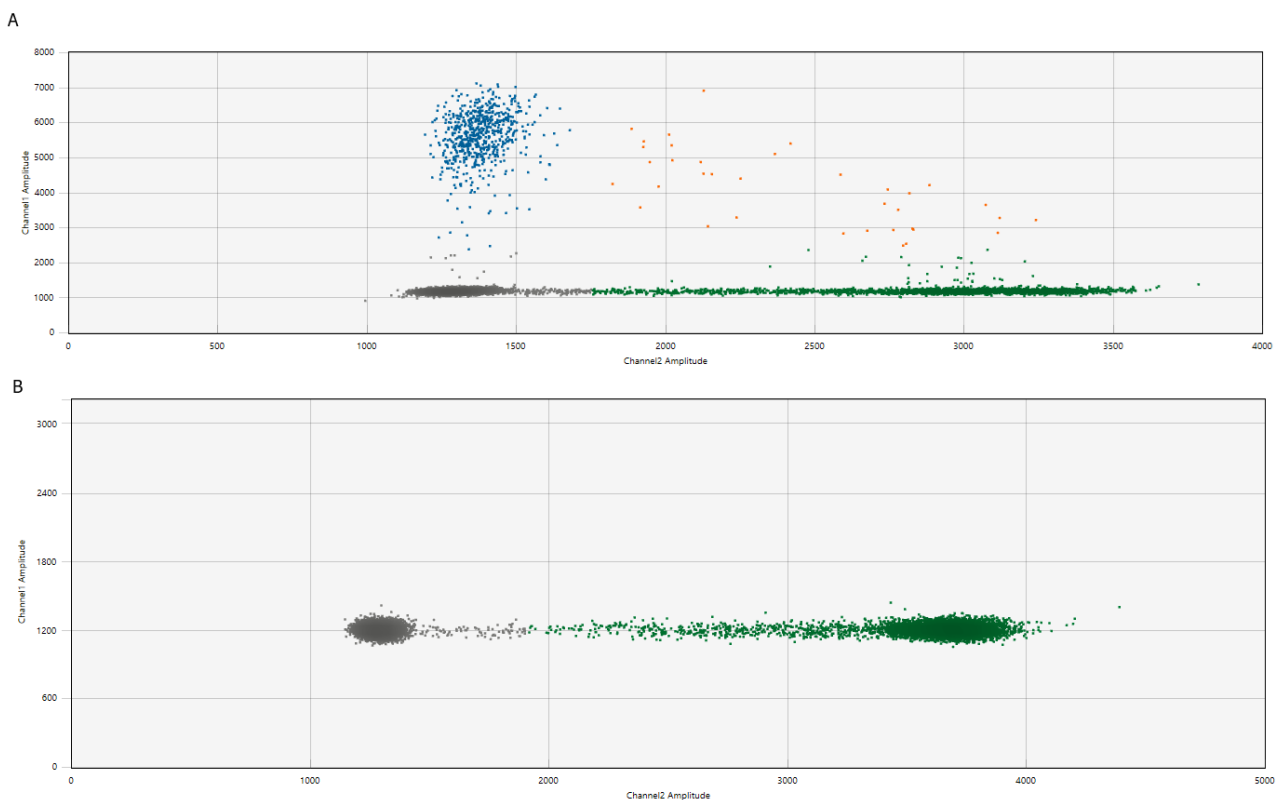
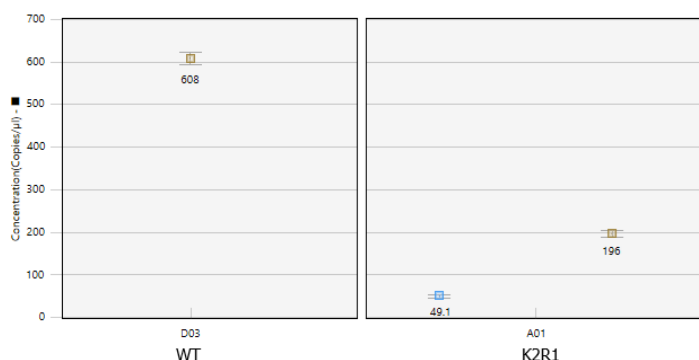


Figure 2. The concentrations (copies/ul) of the samples indicating copy number of the EF1a used as control (brown) and Vnt1 (blue).



### Insertion site in genome: Inverted polymerase chain reaction (IPCR) protocol

IPCR enables the amplification of an unknown sequence, provided that it is flanked by a known sequence. This is useful for obtaining promoters for known cDNA's or finding the sequences flanking a inserted transgene. The method uses genomic DNA from the transgenic plants that is cut into fragments using restriction enzymes, which recognize and cleave DNA at specific short sequence motifs. The enzyme is chosen as the one that lies in the known sequence, close to the border. As the recognition site are 6 specific nt, the probability of one in the genomic DNA being next to the inserted gene is high.

These DNA fragments that have part of know sequence of the insert and part of unknown sequence are then ligated to themselves under dilute conditions, favoring the formation of circular DNA molecules rather than joining different fragments together. Circularization rearranges the DNA so that the unknown flanking regions become directly connected to the known sequence. PCR is then carried out using primers that face outward from the known region, enabling amplification across the ligation junction and revealing the previously unknown DNA. This PCR product is then sequenced and compared to the reference genome to find the localization of the insert. We used the AhdI-HF enzyme for the *sto1* gene and the right border.

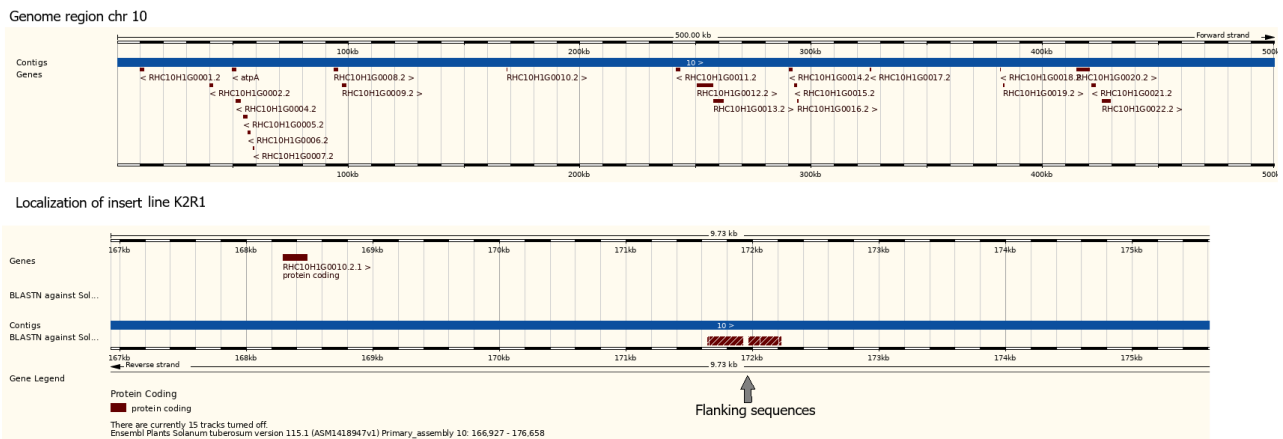
Steps:

- Digest of 5µg DNA in 100µL overnight in 37 °C, then clean up of the DNA and measurement of concentration
- Ligation at final concentration of 2ng/µL purified DNA, overnight in 16 °C
- Nested PCR with Herculase II polymerase that is high-fidelity with proof-reading properties
  - First primer set : P1\_sto\_f:tcatgcgatattcccgatca; P1\_sto\_r: cccttctcacaccgcttgat (Run 20 cycles with annealing temperature of 55 °C)
  - Second primer set: P2\_sto\_f: tcagcggatagtcgatgacc; P2\_sto\_r: gtgctgcaatccctctggta (Run 35 cycles with annealing temperature of 56 °C)
- Second PCR product was run on gel and cut out for clean up with the kit

- PCR product was then inserted in BluntEnd TOPO cloning plasmid. Plasmids were transformed in the *E.coli* Stellar competent cells and grown on the blue-white plate overnight 37 °C
- 6 singular colonies were picked and grown overnight in liquid LB
- Plasmid was isolated from liquid culture and sent for Senger sequencing with standard M13 and SP6 primers to Macrogen Europe.

Sequences were analysed using Benchling and blasted against the *Solanum tuberosum* reference genome RH89-039-16 ASM1418947v1 (EnsemblPlants). The sequence of the gene insertion site was confirmed from 5 individual sequences. **The K2R1 line insert is in chromosome 10 at position 171644 in reverse orientation.** Flanking sequence of 277 bp, got score of 265, E-value of 2.5-147 with 98.9% identity in BLASTn alignment. **The insertion was in a non-coding region outside of any gene** (Figure 3 below).

Figure 3. Localization of the inserted cassette on chromosome 10 in Kuras.



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking

Kwang-Ryong Jo<sup>1,2,3</sup>, Chol-Jun Kim<sup>3</sup>, Sung-Jin Kim<sup>3</sup>, Tok-Yong Kim<sup>3</sup>, Marjan Bergervoet<sup>1</sup>, Maarten A Jongsma<sup>4</sup>, Richard GF Visser<sup>1</sup>, Evert Jacobsen<sup>1</sup> and Jack H Vossen<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Phytophthora infestans*, causing late blight in potato, remains one of the most devastating pathogens in potato production and late blight resistance is a top priority in potato breeding. The introduction of multiple resistance (*R*) genes with different spectra from crossable species into potato varieties is required. Cisgenesis is a promising approach that introduces native genes from the crops own gene pool using GM technology, thereby retaining favourable characteristics of established varieties.

**Results:** We pursued a cisgenesis approach to introduce two broad spectrum potato late blight *R* genes, *Rpi-sto1* and *Rpi-vnt1.1* from the crossable species *Solanum stoloniferum* and *Solanum venturii*, respectively, into three different potato varieties. First, single *R* gene-containing transgenic plants were produced for all varieties to be used as references for the resistance levels and spectra to be expected in the respective genetic backgrounds. Next, a construct containing both cisgenic late blight *R* genes (*Rpi-vnt1.1* and *Rpi-sto1*), but lacking the bacterial kanamycin resistance selection marker (*NPTII*) was transformed to the three selected potato varieties using *Agrobacterium*-mediated transformation. Gene transfer events were selected by PCR among regenerated shoots. Through further analyses involving morphological evaluations in the greenhouse, responsiveness to *Avr* genes and late blight resistance in detached leaf assays, the selection was narrowed down to eight independent events. These cisgenic events were selected because they showed broad spectrum late blight resistance due to the activity of both introduced *R* genes. The marker-free transformation was compared to kanamycin resistance assisted transformation in terms of T-DNA and vector backbone integration frequency. Also, differences in regeneration time and genotype dependency were evaluated.

**Conclusions:** We developed a marker-free transformation pipeline to select potato plants functionally expressing a stack of late blight *R* genes. Marker-free transformation is less genotype dependent and less prone to vector backbone integration as compared to marker-assisted transformation. Thereby, this study provides an important tool for the successful deployment of *R* genes in agriculture and contributes to the production of potentially durable late blight resistant potatoes.

**Keywords:** Potato, Late blight, Resistance gene, Cisgenesis, Marker-free transformation

## Background

Genetic disease resistance is an effective tool for sustainable management of late blight, caused by *Phytophthora infestans*, which is economically the most important disease of potato. Breeding at the beginning of the twentieth century concentrated on major dominant late blight resistance (*R*) genes from the Mexican wild species *Solanum demissum* and eleven of these *R* genes were introgressed

in potato [1-4]. However, rapid breakdown of resistance in potato varieties containing *S. demissum* *R1*, *R2*, *R3*, and *R10* [3,5] has sparked an increased focus on the introgression of multiple broad spectrum *R* genes in order to impart durability to commercial varieties. It has turned out in various crops and pathosystems that stacking of multiple *R* genes is necessary to provide satisfactory resistance in the field [6]. Although the used *R* genes provide resistance to broad spectra of late blight strains, the predominant agricultural deployment of only one *R* gene can drive the evolution of new virulent strains. In the absence of chemical controls this might even result in the destruction

\* Correspondence: jack.vossen@wur.nl

<sup>1</sup>Wageningen UR Plant Breeding, Wageningen University & Research Centre, P.O. Box 386, 6700 AJ Wageningen, The Netherlands  
Full list of author information is available at the end of the article

of an entire harvest [7]. Therefore, the use of combinations of *R* genes with different spectra must be pursued to increase durability of resistance and thereby providing food security under no or little fungicide application. *R* gene stacking might be achieved by genetic crossings but the desired variety characteristics will never be fully recovered due to the high level of heterozygosity in potato. Sarpo Mira is an example of a durably late blight resistant potato variety which contains a stack of at least four *R* genes [8,9]. Unfortunately, the variety has not acquired a large market share yet because established varieties are preferred by farmers, processors and consumers.

Addition of stacks of cloned *R* genes [10-17] to existing varieties (resistant or susceptible) through genetic modification (GM) technology is therefore an attractive alternative. Moreover, GM technology circumvents the problem of linkage drag and can speed up the introgression of the *R* gene [18,19]. GM technology has, however, met various types of opposition and a major point of criticism concerns the introduction of “foreign” genes into the food chain and environment. However, within the framework provided by cisgenesis only natural genes from the same or crossable species are used [20,21]. Cisgenes are, therefore, already present in the natural gene pool of the crop plant and cisgenesis only facilitates their introduction into crops. Indeed a majority of a broad panel of European consumers find cisgenic apples safe and not harmful for the environment [22].

Recently, the transformation of three broad spectrum potato late blight resistance genes (*Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-blb3*) was described in potato [23]. *Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-blb3* are native genes from crossable species and are therefore considered as cisgenes for potato. However, the plants in the study from Zhu et al. [23] are “transgenic” as the selectable marker gene, NPTII, was of bacterial origin. Also beyond the cisgenesis framework it is not desired to introduce antibiotic resistance genes into the environment and in this study, we established a pipeline for *Agrobacterium*-mediated transformation of potato in the absence of a selectable marker gene (marker-free transformation). After the absence of vector backbone integration was confirmed, these potatoes were designated as “cisgenic” because of the absence of any foreign (non-potato) genes. This is the first scientific report on the production and functional evaluation of cisgenic *R* gene stacking in different potato varieties.

## Results

### Transformation and functional expression of single late blight *R* genes in potato varieties

The resistance spectra of three potato varieties (the American variety Atlantic, the Dutch variety Bintje and the Korean variety Potae9) were tested with five *P. infestans* isolates with variable virulence spectra and

aggressiveness. Atlantic and Bintje were susceptible to all tested isolates while Potae9 was resistant to two isolates (EC1 and 90128; Table 1). These two isolates are a-virulent on plants carrying *R2* type of resistance genes. The presence of *R2* or a functional homolog in Potae9 was confirmed using AVR2 response experiments (data not shown). In order to make Atlantic and Bintje resistant to late blight and to broaden the resistance spectrum of Potae9, these three varieties were transformed with two constructs (pBINPLUS:*Rpi-vnt1.1* and pBINPLUS:*Rpi-sto1* harbouring the kanamycin resistance gene *NPTII*), each containing a single late blight *R* gene. The transgenic events were collected using selection for kanamycin resistance and, successively, the functional expression of the introduced *R* genes was tested using agroinfiltration of the cognate a-virulence (*Avr*) genes. Also the transgenic events were subjected to *P. infestans* inoculation using a detached leaf assay (DLA; Table 1). As an example, the interactions of a representative set of transgenic events with the selected isolates are shown in Figure 1. As expected, the majority of the transgenic events showed resistance to at least four of the five tested *P. infestans* isolates. EC1 and pic99189 were described previously to break the *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-sto1* mediated resistances, respectively [13,24]. Indeed, transgenic Atlantic and Bintje events harbouring the *Rpi-vnt1.1* gene were susceptible to isolate EC1. The Potae9 transgenic events containing *Rpi-vnt1.1* were resistant to EC1, due to the presence of *R2* or a functional homolog in Potae9. The *Rpi-sto1*-containing events were susceptible to isolate pic99189. It is concluded that both *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-sto1* were able to confer resistance in the selected varieties and these two genes may, therefore, be combined as a cisgenic *R* gene stack in the selected varieties.

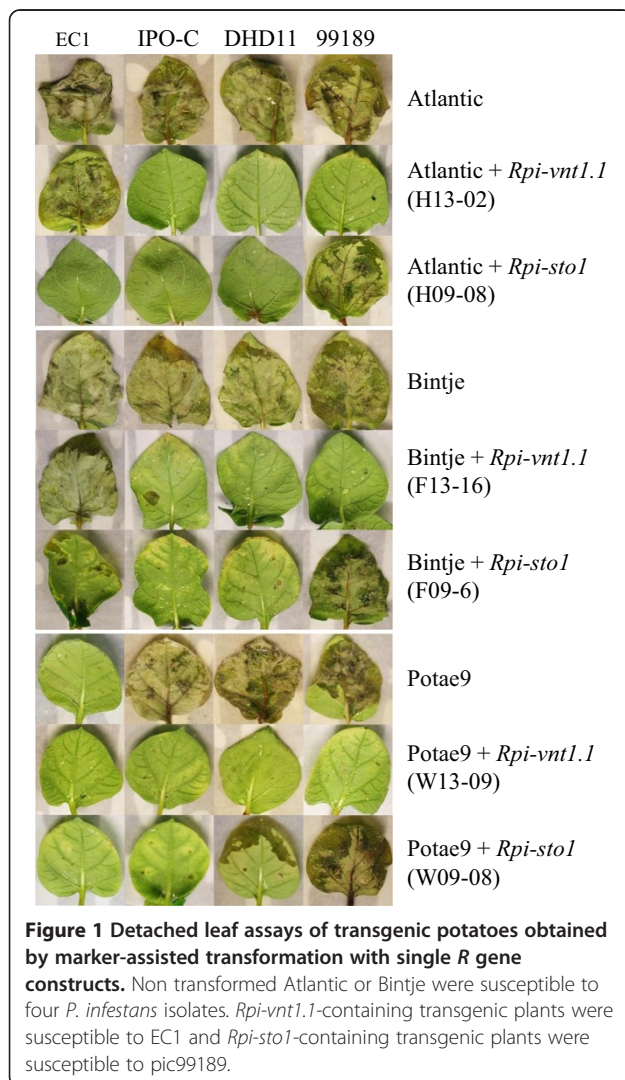
### Selection and validation of cisgenic potato plants with two late blight *R* genes

Cisgenesis excludes antibiotic resistance marker-assisted transformation since the genes encoding the selection markers are derived from non-crossable species. We, therefore, pursued marker-free transformation of the cisgenes *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-sto1* in combination with PCR selection (Table 2). Two hundred stem explants from each of the three selected varieties were prepared and co-cultivated with an *A. tumefaciens* strain carrying only the cisgenic late blight *R* genes *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-sto1* between the T-DNA borders of a binary plasmid (Figure 2). Between 31 and -110 days after transformation, over 1515 shoots were collected in five rounds of harvesting (Table 3). During the experiment, the shoot regeneration potential of the callus gradually dropped and at 130 days after transformation no more shoots could be harvested. These 1515 shoots were screened by PCR with *Rpi-vnt1* and *Rpi-sto1* primers and 27 PCR positive shoots were selected (Table 2). All PCR

**Table 1 List of transgenic reference plants obtained by single R gene transformation**

Variety	Introduced R gene	Plant ID	PCR		Agroinfiltration		DLA				
			<i>vnt1.1</i>	<i>sto1</i>	<i>Avrvnt1</i>	<i>Avrsto1</i>	EC1	IPO-C	DHD11	90128	pic99189
Atlantic	n	H	-	-	-	-	S	S	S	S	S
	<i>Rpi-vnt1.1</i>	H13-2	+	-	+	-	S	R	R	R	R
	<i>Rpi-sto1</i>	H9-10	-	+	-	+	R	R	R	R	S
Bintje	n	F	-	-	-	-	S	S	S	S	S
	<i>Rpi-vnt1.1</i>	F13-10	+	-	+	-	S	R	R	R	R
	<i>Rpi-sto1</i>	F9-4	-	+	-	+	R	R	R	R	S
Potae9	n	W	-	-	-	-	R	S	S	R	S
	<i>Rpi-vnt1.1</i>	W13-8	+	-	+	-	R	R	R	R	R
	<i>Rpi-sto1</i>	W9-1	-	+	-	+	R	R	R	R	S

n, no transformation; - = not detected or not responsive to agroinfiltration; + = PCR positive or responsive to agroinfiltration; R, resistant; S, susceptible; DLA: detached leaf assays with the indicated *P. infestans* isolates.



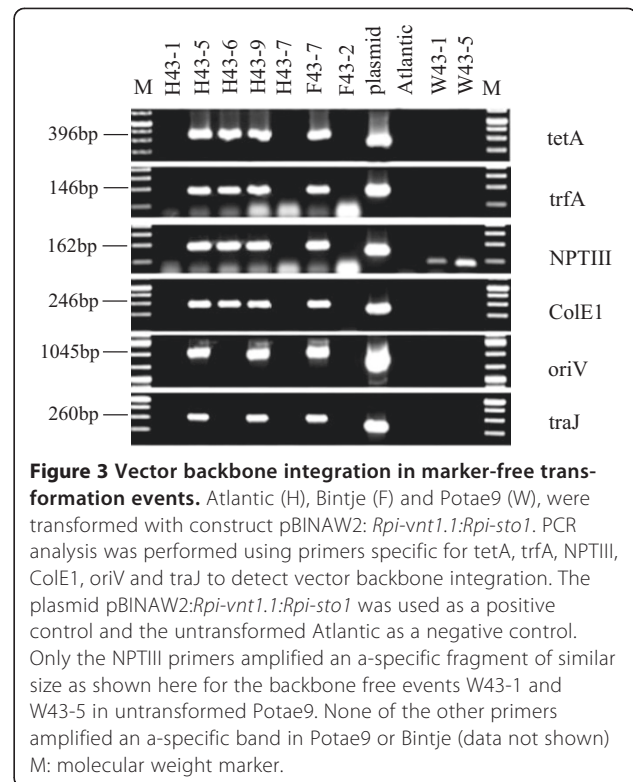
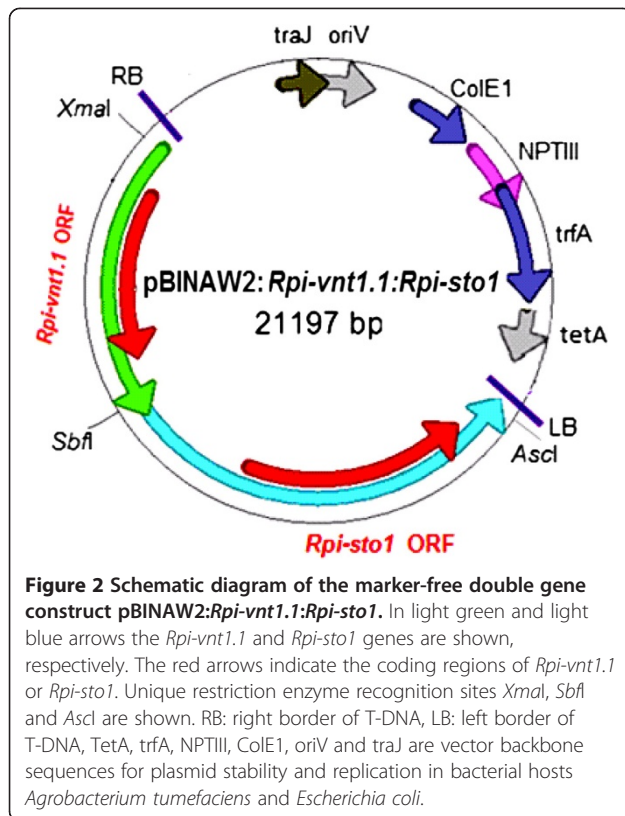
**Figure 1 Detached leaf assays of transgenic potatoes obtained by marker-assisted transformation with single R gene constructs.** Non transformed Atlantic or Bintje were susceptible to four *P. infestans* isolates. *Rpi-vnt1.1*-containing transgenic plants were susceptible to EC1 and *Rpi-sto1*-containing transgenic plants were susceptible to pic99189.

positive shoots were originating from different explants, indicating that they were independent transformation events. Two Bintje events only contained the *Rpi-vnt1* gene and were discarded. The remaining 25 events, containing both *Rpi-vnt1* and *Rpi-sto1*, were further tested using vector backbone gene-specific PCR analysis (Figure 3). We found that six events contained vector backbone sequences (Table 2). The remaining 19 events were vector backbone free and are therefore designated as cisgenic events. The 19 cisgenic events were transferred to the greenhouse for phenotypic characterisation. Three weeks after transfer to the greenhouse, five events displayed abnormal plant morphology that consisted of curly leaves and dwarfed growth (Additional file 1), a phenomenon that is commonly observed after regeneration [25]. The five events with these aberrant phenotypes were disregarded for further studies and the remaining 14 events were tested for their responsiveness to *Avrvnt1* and *Avrsto1* after agroinfiltration. Five events responded only to *Avrvnt1* and not to *Avrsto1*. Eight events responded to both *Avrvnt1* and *Avrsto1* infiltration, showing that both *Rpi-vnt1* and *Rpi-sto1* were functionally expressed (Table 4). The latter eight plants also displayed resistance in DLA to all *P. infestans*

**Table 2 Marker-free transformation of two R genes (*Rpi-vnt1.1*:*Rpi-sto1*) to different potato varieties; Marker-free transformation frequencies**

Variety	explants #	shoots #	PCR+ #	frequency %	bbf #	bbf %
Atlantic	200	497	0/0/12	2.4	9	75
Bintje	200	590	2/0/6	1.0	5	83
Potae9	200	428	0/0/7	1.6	5	71
total	600	1515	2/0/25	1.7	19	76

#explants; number of explants; #shoots: number of shoots tested; #PCR+: the number of shoots containing *Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.1*, or both genes, respectively, as detected by PCR; % frequency: transformation frequency, as percentage of PCR + shoots, carrying both *Rpi-sto1* and *Rpi-vnt1.1*, over the number of tested shoots; #bbf: number of vector backbone free events; % bb: percentage of vector backbone containing PCR + shoots, carrying both *Rpi-sto1* and *Rpi-vnt1.1*.



isolates tested. Figure 4 shows an example of the validation of functional expression for both transferred *R* genes in event H43-7 (Atlantic background) by agroinfiltration and resistance assays in the DLA. Using the single gene-containing transgenic plants as reference it was demonstrated that stacking of *R* genes with different resistance spectra leads to complementary broad spectrum resistance (Table 1). Interestingly, the two introduced *R* genes are complementing the resistance spectrum that was already present in Potae9 plants. Using the pursued experimental setup we were able to select two cisgenic events in Atlantic, five cisgenic events in Bintje and one cisgenic event in Potae9 containing and functionally expressing a stack of two late blight *R* genes.

**Table 3 Marker-free transformation of two *R* genes (*Rpi-vnt1.1:Rpi-sto1*) to different potato varieties; Identification of PCR-positive shoots in different time ranges after marker-free transformation**

Variety	31-50 days	51-70 days	71-90 days	91-110 days	111-130 days	Total
Atlantic	4/197	4/174	4/111	0/15	0/0	12/497
Bintje	2/199	3/194	1/165	0/32	0/0	6/590
Potae9	4/183	2/143	1/78	0/24	0/0	7/428

Number of PCR-positive shoots carrying both *Rpi-sto1* and *Rpi-vnt1.1* over the number of tested shoots.

### Comparison of marker-assisted- and marker-free transformation efficiencies

Kanamycin resistance assisted selection is routinely used for plant transformation. It is, therefore, interesting to compare the efficiency of marker-free transformation in the cisgenesis pipeline to marker-assisted transformation. Marker-assisted transformation efficiency was 100% when expressed as the percentage of rooting shoots being PCR positive for the gene of interest (Table 5). In this definition, marker-free transformation efficiency ranged from 1 to 2.4% over the three varieties.

For a better comparison of marker-assisted and marker-free transformation, it was essential to use a different definition for transformation efficiency that also takes shoot regeneration efficiency into account. We define marker-assisted transformation frequency as the percentage of PCR positive events among the number of explants used for transformation. Marker-free transformation frequency is defined as the percentage of shoots that is PCR positive. In variety Atlantic a high marker-assisted transformation frequency (71%) was observed whereas the other two varieties, Bintje and Potae9, had significantly lower marker-assisted transformation frequencies (10-13%) (Tables 5 and 6). In marker-free transformation, variety dependent differences in transformation frequencies were less dramatic (2.4, 1.0 and 1.6% in Atlantic, Bintje and Potae-9, respectively) and statistically insignificant (Table 6). Not only the frequency

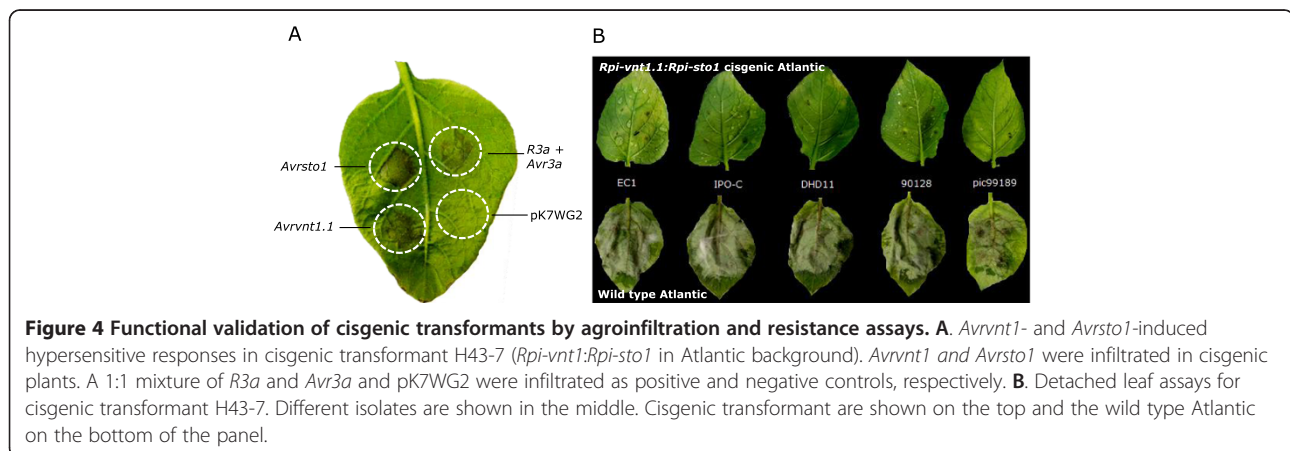
**Table 4 Phenotypic characterization of vector backbone free (cisgenic) events in different potato varieties carrying the *Rpi-vnt1* and *Rpi-sto1* genes**

Cisgenic event	Variety	Plant morphology	Agroinfiltration		DLA				
			<i>Avrvnt1</i>	<i>Avrsto1</i>	EC1	IPO-C	DHD11	90128	PIC99189
H43-1	Atlantic		+	-	S	R	R	R	R
H43-2	Atlantic	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
H43-3	Atlantic	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
H43-4	Atlantic		-	-	S	S	S	S	S
<b>H43-7</b>	Atlantic		+	+	R	R	R	R	R
<b>H43-8</b>	Atlantic		+	+	R	R	R	R	R
H43-10	Atlantic		+	-	S	R	R	R	R
H43-11	Atlantic	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
H43-12	Atlantic		+	-	S	S	S	S	S
F43-1	Bintje		+	-	S	R	R	R	R
<b>F43-2</b>	Bintje		+	+	R	R	R	R	R
<b>F43-3</b>	Bintje		+	+	R	R	R	R	R
<b>F43-4</b>	Bintje		+	+	R	R	R	R	R
<b>F43-5</b>	Bintje		+	+	R	R	R	R	R
<b>W43-1</b>	Potae9		+	+	R	R	R	R	R
W43-2	Potae9	curly leaf	n	n	n	n	n	n	n
W43-3	Potae9		+	-	S	R	R	R	R
W43-4	Potae9	dwarf	n	n	n	n	n	n	n
<b>W43-5</b>	Potae9		+	+	R	R	R	R	R

Cisgenic events functionally expressing both R genes were highlighted by bold font. n: no data, +: responsive to infiltration with the indicated Avr gene; -: not responsive to infiltration with the indicated Avr gene R: resistant to the indicated isolate in detached leaf assays (DLA). S: susceptible to the indicated isolate in DLA.

of transformation, also the timing of transformation was different between marker-free and marker-assisted transformation. In the marker-free transformation experiments, the majority of the PCR-positive shoots was obtained between 1 and 3 months after co-cultivation (Table 3). This was quicker than marker-assisted transformation of the *Rpi-vnt1* and *Rpi-sto1* genes individually, which took 2-4 months (Table 5). Finally, we compared vector backbone integration frequencies among the different marker-free and

marker-assisted transformation experiments. We did not find significant differences in vector backbone integrations frequency when the different varieties or both of the marker-assisted transformation constructs were compared (Table 7). Only when vector backbone integration frequency was compared between the marker-free (24%; Table 2) and marker-assisted transformation experiments (57%; Table 5) we found that marker-free transformation was associated with less vector backbone integration.



**Figure 4 Functional validation of cisgenic transformants by agroinfiltration and resistance assays. A.** *Avrvnt1*- and *Avrsto1*-induced hypersensitive responses in cisgenic transformant H43-7 (*Rpi-vnt1*:*Rpi-sto1* in Atlantic background). *Avrvnt1* and *Avrsto1* were infiltrated in cisgenic plants. A 1:1 mixture of *R3a* and *Avr3a* and pK7WG2 were infiltrated as positive and negative controls, respectively. **B.** Detached leaf assays for cisgenic transformant H43-7. Different isolates are shown in the middle. Cisgenic transformant are shown on the top and the wild type Atlantic on the bottom of the panel.

**Table 5 Marker-assisted transformations of single R genes to different varieties**

Inserted R gene	Variety	Plant ID	Explants #	Regeneration time (days)	shoots %	shoots #	rooting %	PCR + %	frequency %	vbf %	vbf in DLA #	vbf and R in DLA #
<i>Rpi-vnt1.1</i>	Atlantic	H13	200	60-120	76	30 <sup>a</sup>	100	100	76	40	12	12
<i>Rpi-sto1</i>		H09	200	60-120	66	30 <sup>a</sup>	100	100	66	50	15	15
<i>Rpi-vnt1.1</i>	Bintje	F13	200	60-120	13	26 <sup>b</sup>	77	100	10	40	8	8
<i>Rpi-sto1</i>		F09	200	60-120	10	20 <sup>b</sup>	100	100	10	45	9	9
<i>Rpi-vnt1.1</i>	Potae9	W13	200	60-120	16	31 <sup>b</sup>	84	100	13	47	12	12
<i>Rpi-sto1</i>		W09	200	60-120	19	37 <sup>b</sup>	61	100	11	39	9	9

#exp; number of explants, % sht; percentage of number of shoots over number of explants, % rt; percentage of number of rooted shoots over the number of shoots, % PCR+; percentage of PCR positive shoots over the number of shoots, % freq; transformation frequency, calculated by % sht × % rt × % PCR+, a Among regenerated shoots, 30 plants were tested. b All regenerated shoots were tested. % vbf; percentage of backbone free plants out of plants tested. #vbf plants DLA: number of vector backbone free plants tested in detached leaf assays. #vbf R plants DLA: number of vector backbone free resistant plants in detached leaf assay.

## Discussion

Cisgenesis, is a new approach for traditional plant breeding that uses genetic modification technology to introduce natural genes from within a plant species or from crossable plant species, into varieties [26]. Therefore, any gene “alien” to the breeder’s gene pool can be avoided in the end product which is causal to many environmental and consumers’ concerns about GM food crops [22]. Not only can widely used susceptible varieties, like Bintje and Atlantic, be converted into resistant varieties, also resistant varieties, like Potae9, can be complemented with additional resistance genes to avoid or delay future resistance breakdown. In order to complement existing varieties with stacks of cisgenic R genes, two choices must be made: 1. The method to introduce the R gene stack and 2. The method to exclude sequences of foreign origin from transformation events. With respect to the introduction method, in this study we chose transformation by marker-free binary vectors and subsequent regeneration in medium without selective antibiotics followed by PCR-based selection of transformation events [27]. Alternatives involving the removal of a selectable marker gene by site specific recombination pose disadvantages because of remnant sequences of foreign origin [28].

The average marker-free transformation frequency was 1.3% and seems to be genotype independent. In a previous

marker-free transformation study in potato [27] a T-DNA of 6 kb was transformed with a frequency of 3.5% when *A. tumefaciens* strain AGL0 was used, and 0.4% when *A. tumefaciens* strain LB4404 was used. It can not be concluded that AGL1 + virG, which was used in this study, was less efficient in transferring the T-DNA than AGL0 in the study from de Vetten et al. [27]. From unpublished experiments in our laboratory it is known that regeneration time increases with the size of the T-DNA. We, therefore, assume that the lower transformation frequency in our study is rather related to the larger T-DNA size (11 kb) of the *Rpi-vnt1:Rpi-sto1* construct. Therefore, for stacking of more than two genes in cisgenic transformation, the effect of an increased insert size (e.g. >11 kb) on transformation frequency remains to be tested. It is known that marker-assisted transformation frequency is highly genotype dependent in potato [29]. Also here we found that transformation frequencies ranged from 10-71% in different varieties (Table 5). This variation was remarkably less (1-2.4%) in marker-free transformation experiments (Table 2). It must be noted that transformation frequencies can vary between different experiments and that we here only performed a limited number of experiments. However, the currently presented experiments show that marker-free transformation is less prone to varietal differences than marker assisted transformation. This could be caused by

**Table 6 Pairwise comparisons of transformation frequencies in groups of transformation experiments**

Group 1	Group 2		Pearson analysis*				
	Non transformed	Transformed	Non transformed	Transformed			
Atlantic (MF)	497	12	Bintje (MF)	590	8	1.6	0.2
Atlantic (MF)	497	12	Potae9 (MF)	428	7	0.7	0.7
Potae9 (MF)	428	7	Bintje (MF)	590	8	0.1	0.7
Atlantic (MA)	15	35	Bintje (MA)	45	5	38	0
Atlantic (MA)	15	35	Potae9 (MA)	44	6	35	0
Potae 9 (MA)	44	6	Bintje (MA)	45	5	0.1	0.7

Transformation frequencies in marker-free transformations (MF) are derived from the number of transformed shoots (transformed) and the total number of shoots minus the number of transformed shoots (non-transformed). Transformation frequencies in marker-assisted transformations (MA) are derived from the number of rooting shoots (transformed) and the number of explants used minus the number of rooting shoots (non-transformed).

\*null hypothesis: group 1 equals group 2.

**Table 7 Pairwise comparisons of vector backbone integration frequencies in groups of transformation experiments**

Group 1	Experiments	Group 2		Experiments	bb	bbf	Pearson analysis*		
		bb	bbf				Chi square	P (2-tailed)	
Atlantic	H09 + H13	28	28	Potae9	W09 + W13	29	20	0.88	0.34
Atlantic	H09 + H13	28	28	Bintje	F09 + F13	22	18	0.23	0.6
Potae9	W09 + W13	29	20	Bintje	F09 + F13	22	18	0.16	0.69
<i>Rpi-sto1</i>	H09 + F09 + W09	42	36	<i>Rpi-vnt1</i>	H13 + F13 + W13	37	30	0.028	0.86
Markerfree	H43 + F43 + W43	6	21	Marker	H09	13	15	3.560	0.059
Markerfree	H43 + F43 + W43	6	21	Marker	H13	15	13	5.72	0.017

\*null hypothesis: group 1 equals group 2; bb: vector backbone containing event; bbf: vector backbone free event. In the experiments columns, H, F, W represent the varieties Atlantic, Bintje and Potae9 respectively. Extensions 09, 13 and 43 represent the constructs pBINPLUS:*Rpi-sto1*, pBINPLUS:*Rpi-vnt1.1*, pBINAW2:*Rpi-vnt1.1*:*Rpi-sto1*, respectively.

differences in antibiotic tolerance between the varieties that provides transformed cells different abilities to develop into a shoot.

In terms of vector backbone integration, marker-free transformation apparently produces a lower percentage (24%) of vector backbone integrations compared to marker-assisted transformation (40-50%). Again, the number of experiments is limited and firm conclusions cannot be drawn. The vector backbone and border sequences in pBINPLUS and pBINAW2 are highly similar and we do not expect that these differences affect vector backbone integration. A potential explanation could be that the presence of the NPTII gene directly next to the left border of the T-DNA would stimulate selection of higher levels of backbone integration. As it is known that left border recognition is inaccurate in *Solanaceae*, [30], especially when agrobacterium strain AGL1 is used [31], positioning of NPTII near the left border would force the integration of the complete T-DNA. So, it might also lead to higher levels of vector backbone integration. In marker-free transformation, six plants out of 14 tested cisgenic plants did not appropriately express *Rpi-sto1* as observed using agroinfiltration of the corresponding *Avr* genes (like H43-1, -10, -12; Table 4). An obvious explanation could be that T-DNA insertion did not proceed all the way to the left border resulting in 3' truncations of *Rpi-sto1*. These non-functional cisgenic events and the corresponding DNA samples were discarded in an early phase during the selection and, unfortunately, this hypothesis could not be confirmed. We observed and described some cisgenic plants differing morphologically from wild type varieties in the greenhouse (Table 4, Additional file 1). This is a generally observed phenomenon and in tissue culture-based breeding schemes it should be considered that aberrant plant phenotypes must be selected against [29].

According to the established experimental scheme, it takes less than one year to obtain potato plants with cisgenic *R* gene stacks from the *R* gene construct preparation to the functional validation of the resulting cisgenic plants by performing DLAs. As 2-3 shoots per explant can be

collected and 30 independent transformed plants are required considering backbone integration and expression, it is recommended that between 1000-1500 explants are to be treated in a marker-free-transformation experiment of potato. The efficiency of PCR analysis can be improved by a factor 10 by pooling ten shoots, so that the labour intensity of the selection of marker-free transformation events is considered reasonable as compared to the marker-assisted transformations. Considering 2-3 years' field trials, it takes totally 3-4 years to produce late blight resistant cisgenic events in established potato varieties, which can be released for seed tuber multiplication. This time span is remarkably short compared to the conventional breeding scheme. The cisgenic potatoes selected in this study will be further tested for several years to evaluate whether the transferred *R* genes are stably expressed over many vegetative cycles. Chimeras and epigenetic silencing are issues that could affect stability of resistance. Also agronomic performance needs to be assessed and confirmed in multiple growing seasons.

## Conclusions

We have set up and pursued an effective cisgenic marker-free transformation strategy for commercial potato varieties. It was found that marker-free transformation frequency was much less genotype dependent than marker-assisted transformation. Also the frequency of vector backbone integration tended to be lower in the marker-free transformations as compared to the marker-assisted transformations. The susceptibility or the narrow late blight resistance spectra of the selected varieties were upgraded to broad spectrum resistance after the successful introduction of two cisgenic late blight *R* genes. According to the recent conclusion of the European Food Safety Authority GMO Panel, cisgenic plants have a risk level similar to conventionally bred plants [32]. The cisgenic potatoes, generated in this study, will offer a safe, environmentally friendly, alternative to the current agricultural practice which is highly dependent on the use of chemical late blight control agents. For developing countries, where

chemical control agents are unaffordable, cisgenic upgrades of local potato varieties might even ensure food security.

## Methods

### Plant material

The potato varieties Atlantic, Desiree, Bintje, and Potae9 were clonally maintained *in vitro* using Murashige and Skoog medium [33] supplemented with 3% (w/v) sucrose at 20°C at Wageningen UR Plant Breeding, Wageningen, The Netherlands. The varieties Potae9 from DPR Korea, which is resistant to late blight, was used for testing its reaction to certain late blight isolates and for transformation experiments to broaden its resistance spectrum.

### *Phytophthora infestans* isolates and late blight resistance tests

Five *P. infestans* isolates (Additional file 2) were used in Detached Leaf Assays (DLAs); The European isolates IPO-C (race 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11) and 90128 (race 1, 3, 4, 7, 8, 10, 11); the American isolates, EC1 (race 1, 3, 4, 7, 10, 11) and pic99189 (race 1, 2, 5, 7, 10, 11) and the Korean isolate DHD11 (race 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11). The DLAs were performed as described previously [34].

### Vector construction

The single *R* gene constructs used in our study have been described before. Genomic DNA fragments from *S. venturii*, and *S. stoloniferum*, encompassing the *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-sto1* genes, respectively, are cloned in the pBINPLUS binary vector [13,16]. The genomic fragments comprise the entire genes including their native promoters and terminators. In order to combine *Rpi-sto1* and *Rpi-vnt1.1* into one markerfree transformation vector, first the *AscI* and *SbfI* fragment from the pBINPLUS:*Rpi-sto1* vector, encompassing the *Rpi-sto1* gene, was ligated into the corresponding restriction sites of pBINAW2 [35]. pBINAW2 is a modified version of pBINPLUS where the entire T-DNA, including the NPTII gene, and the adjacent TetR gene from the vector backbone was removed and replaced by a minimal T-DNA containing only left and right border and a small multiple cloning site. To the pBINAW2:*Rpi-sto1* construct, the *Rpi-vnt1.1* gene was added using a *SbfI* fragment, encompassing the *Rpi-vnt1.1* gene from the pBINPLUS:*Rpi-blb3*:*Rpi-vnt1.1*:*Rpi-sto1* described by Zhu et al. [23]. The clone with the desired *Rpi-vnt1.1* insert orientation, in tandem with *Rpi-sto1* (pBINAW2:*Rpi-vnt1.1*:*Rpi-sto1*, Figure 2; Additional file 3) was selected using restriction analysis. All ligation mixtures was transformed to ElectroMAX *E.coli* DH10b competent cells (Life technologies). Subsequently, the stability of the *R* gene constructs in *Agrobacterium* strain AGL-1 + VirG and functionality of the *R* genes in *N. benthamiana* were carried out using PCR and co-agroinfiltration with

corresponding *Avr* genes, respectively. These tests confirmed the stability and activity of the constructs.

### Potato transformation

Marker assisted transformation performed as described previously [36]. Marker-free transformations are derived from this protocol but kanamycin was omitted as a selection agent. Briefly, internodes of 2-5 mm in length were cut from thick stems of 4-week-old *in vitro*-grown plants and were used as explants in transformation experiments. After pre-culture on R3B medium (MS + 3% sucrose + 0.8% agar + 4 mg/ml NAA + 1 mg/ml BAP, pH5.8) supplemented with PACM (MS + 3% sucrose + 0.2% casein hydrolysate + 1 mg/ml 2,4-D + 1 mg/ml kinetin, pH6.5) for two days, explants were inoculated with *Agrobacterium* strain AGL1 + VirG + binary plasmid resuspended in LB medium to an OD<sub>600</sub> of 0.2. After 2 days cocultivation, the explants were transferred to ZCVK medium (MS + 2% sucrose + 0.8% agar + 1 mg/ml zeatin + 200 mg/ml cefotaxim + 200 mg/ml vancomycin, pH5.8) for regeneration of shoots. Explants were transferred to fresh medium every two weeks. Shoots were transferred to CK medium (MS + 2% sucrose + 0.8% agar + 200 mg/ml cefotaxim + 200 mg/ml vancomycin, pH5.8) to induce root formation. To guarantee that regenerated plants were derived from independent transformation events, only shoots from physically separated positions on each explant were collected. Three weeks later, the rooted plantlets were analysed by PCR to determine the presence of the desired *R* genes. The transformation frequency was calculated as a percentage of the number of *R* gene-PCR positive shoots over the number of tested shoots.

For marker-assisted transformation, 100 mg/ml Kanamycin was added to ZCVK medium and CK medium for selection of transgenic shoots.

### Functional tests of resistance (*R*) genes

Agroinfiltration was performed as previously described [37]. Two leaves per plant from three copies of each of the transformants were infiltrated with the following constructs: two effectors (*Avrvnt1* and *IpiO = Avrsto1*) [13,24], *R3a* [38] and *Avr3a* [39] as the positive control and empty pK7WG2 [40] as the negative control. *Agrobacterium tumefaciens* strain from glycerol stocks was grown in 3 ml of LB medium supplemented with appropriate antibiotics at 28°C overnight. The next day, the cultures were transferred to 15 ml of YEB medium (5 g beef extract, 5 g bacteriological peptone, 5 g sucrose, 1 g yeast extract, 2 ml 1 M MgSO<sub>4</sub> in 1 litre of milli-Q water) supplemented with antibiotics, 10 µl of 200 mM acetosyringone and 1000 µl of 1 M MES. On the third day, the cells were harvested and resuspended in MMA solution (20 g sucrose, 5 g MS salts and 1.95 g MES in 1 litre of distilled water, adjusted to pH5.6) supplemented

with 1 ml of 200 mM acetosyringone to a final OD<sub>600</sub> of 0.3. Leaves of 4- to 5-weeks old, greenhouse-grown, plants were infiltrated with this suspension. Responses were scored 3 to 4 days after infiltration.

#### DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR)

Total genomic DNA was isolated from young leaves as described by Fulton et al. [41]. The Retsch machine (RETSCH Inc., Hannover, Germany) was used to grind young plant materials frozen in liquid nitrogen. Primers used for analysis of *R* genes, vector backbone integration are listed in Additional file 4. A pooled sampling method was exploited for PCR analysis of shoots in marker-free transformation. DNA extraction was carried out first by pooling one small leaf from each of ten shoots. If in this first round pools were found which were PCR-positive for both *R* genes and PCR-negative for backbone integration, a second round of PCR was carried out on genomic DNA of individual shoots within the pools. PCR reactions for *Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.1*, NPTIII, trfA, ColE1, oriV and traJ were performed using DreamTaq™ polymerase (Fermentas) in a standard PCR program (94°C for 60 s followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 58°C for 60 s, 72°C for 90 s and a final extension time of 5 min at 72°C).

#### Statistical analysis

Transformation and vector backbone integrations frequencies are binary data and, therefore, the Pearson Chi-square test was chosen to compare the independent samplings of transformation events in the different transformation experiments. Calculations were performed using the IBM SPSS Statistics 22 software pack. Groupwise comparisons with one degree of freedom were applied.

#### Additional files

**Additional file 1:** Aberrant plant morphologies after transformation and regeneration.

**Additional file 2:** Characteristics of *P. infestans* isolates used in this study.

**Additional file 3:** Sequence of the pBINAW2:*Rpi-vnt:1.1*:*Rpi-sto1* construct.

**Additional file 4:** Primers used for PCR analysis of transformants.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

JKR wrote the manuscript and was involved in the experimental guidance of KCJ, KTY and MJ established the collaboration between the P-Y and the Wageningen institutes. KTY designed and cloned the marker-free transformation construct. MJ designed the integrated pest management strategy as pursued in the "EuropeAid" and "International Cooperation" projects and he, thereby, provided the scientific blueprint for this study. KCJ, MB and KSJ performed the transformations, PCRs, and late blight resistance assays. RV was involved in manuscript writing. EJ and JV provided the experimental design and supervised the manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

pBINAW2 was kindly provided by Dr Annemarie Wolters, Wageningen UR plant Breeding. KRJ, TYK, CJK, SJK and MJ were financially supported by the European Commission (EuropeAid project DCI-FOOD/2009/218-671), and the Dutch Ministry of Agriculture, Nature and Fisheries (International Cooperation project BO-10-010-112 and BO-10-001-200). JHV was supported by the DuRPh program, financed by the Dutch Ministry of Economic affairs, formerly the Ministry of Agriculture, Nature and Fisheries.

#### Author details

<sup>1</sup>Wageningen UR Plant Breeding, Wageningen University & Research Centre, P.O. Box 386, 6700 AJ Wageningen, The Netherlands. <sup>2</sup>Graduate School Experimental Plant Sciences, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. <sup>3</sup>Research Institute of Agrobiological Sciences, Academy of Agricultural Sciences, Pyongyang, DPR Korea. <sup>4</sup>Plant Research International, Wageningen University and Research Centre, Wageningen, The Netherlands.

Received: 1 February 2014 Accepted: 20 May 2014

Published: 29 May 2014

#### References

1. Muller KO, Black W: Potato breeding for resistance to blight and virus diseases during the last hundred years. *Z Pflanzenzuchtg* 1951, **31**:305–318.
2. Malcolmsen JF, Black W: New *R* genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica* 1966, **15**:199–203.
3. Malcolmsen JF: Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain. *Trans Br Mycol Soc* 1969, **53**:417–423.
4. Bradshaw JE, Bryan GJ, Lees AK, McLean K, Solomon-Blackburn RM: Mapping the *R10* and *R11* genes for resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) present in the potato (*Solanum tuberosum*) *R* gene differentials of Black. *Theor Appl Genet* 2006, **112**:744–751.
5. Wastie RL: Breeding for resistance. *Adv Plant Pathol* 1991, **7**:193–224.
6. Que Q, Chilton MDM, Fontes CM D, He C, Nuccio M, Zhu T, Wu Y, Chen JS, Shi L: Trait stacking in transgenic crops: the challenges and opportunities. *GM Crops* 2010, **1**:220–229.
7. Strange RN, Scott PR: PLANT DISEASE: a threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol* 2005, **43**:83–116.
8. Tomczynska I, Stefanczyk E, Chmielarz M, Karasiewicz B, Kaminski P, Jones JD, Lees AK, Sliwka J: A locus conferring effective late blight resistance in potato cultivar Sarpo Mira maps to chromosome XI. *Theor Appl Genet* 2014, **127**(3):647–657.
9. Rietman H, Bijsterbosch G, Cano LM, Lee HR, Vossen JH, Jacobsen E, Visser RGF, Kamoun S, Vleeshouwers VGAA: Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol Plant Microbe Interact* 2012, **25**(7):910–919.
10. Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SW, Haberlach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP, Jiang J: Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**:9128–9133.
11. van der Vossen EAG, Sikkema A, te Lintel HB, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema WJ, Allefs S: An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J* 2003, **36**:867–882.
12. van der Vossen EAG, Gros JE, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A, Allefs S: The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J* 2005, **44**:208–222.
13. Vleeshouwers VGAA, Rietman H, Krenke P, Champouret N, Young C, Oh SK, Wang M, Bouwmeester K, Vosman B, Visser RGF, Jacobsen E, Govers F, Kamoun S, van der Vossen EAG: Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE* 2008, **3**:e2875.
14. Lokossou AA, Park TH, Van Arkel G, Arens M, Ruyter-Spira C, Morales J, Whisson SC, Birch PRJ, Visser RGF, Jacobsen E, van der Vossen EAG: Exploiting knowledge of *R/Avr* genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV. *Mol Plant Microbe Interact* 2009, **22**:630–641.

15. Vossen JH, Nijenhuis M, Arens de Reuver MJB, Van der Vossen EAG, Jacobsen E, Visser RGF: **Cloning and exploitation of a functional R gene from *Solanum chacoense***. Patent application, published by: IPO: PCT/NL2010/050612.
16. Pel MA, Foster SJ, Park TH, Rietman H, Van Arkel G, Jones JDG, Eck HJ V, Jacobsen E, Visser RGF, Vossen EAG Van D: **Mapping and cloning of late blight resistance genes from *Solanum venturii* using an interspecific candidate gene approach**. *Mol Plant Microbe Interact* 2009, **22**:601–615.
17. Foster SJ, Park TH, Pel MA, Brigneti G, Sliwka J, Jagger L, van der Vossen EAG, Jones JDG: ***Rpi-vnt1.1*, a *Tm-2* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight**. *Mol Plant Microbe Interact* 2009, **22**:589–600.
18. Mullins E, Milbourne D, Petti C, Doyle-Prestwich BM, Meade C: **Potato in the age of biotechnology**. *Trends Plant Sci* 2006, **11**(5):254–260.
19. Barrell PJ, Meiyalaghan S, Jacobs JM, Conner AJ: **Applications of biotechnology and genomics in potato improvement**. *Plant Biotechnol J* 2013, **11**(8):907–920.
20. Jacobsen E, Schouten HJ: **Cisgenesis strongly improves introgression breeding and induced translocation breeding of plants**. *Trends Biotechnol* 2007, **25**:219–223.
21. Jacobsen E: **Cisgenesis: a modern way of domesticating traits of the breeders' gene pool**. *CAB Reviews* 2013, **8**:56.
22. Eurobarometer: **Europeans and Biotechnology in 2010; Winds of change?** [http://ec.europa.eu/research/science-society/document\\_library/pdf\\_06/europeans-biotechnology-in-2010\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/research/science-society/document_library/pdf_06/europeans-biotechnology-in-2010_en.pdf) accessed March 13, 2014.
23. Zhu SX, Li Y, Vossen JH, Visser RGF, Jacobsen E: **Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato**. *Transgenic Res* 2012, **21**:89–99.
24. Pel MA: **Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato**. In *PhD thesis*. Wageningen University; 2010.
25. Wheeler VA, Evans NE, Foulger D, Webb KJ, Karp A, Franklin J, Bright SWJ: **Shoot formation from explant cultures of fourteen potato cultivars and studies of the cytology and morphology of regenerated plants**. *Ann Bot* 1985, **55**(3):309–320.
26. Jacobsen E, Schouten HJ: **Cisgenesis, a new tool for traditional plant breeding, should be exempted from the regulation on genetically modified organisms in a step by step approach**. *Potato Res* 2008, **51**:75–88.
27. de Vetten NCM, Wolters AMA, Raemakers K, van der Meer I, ter Stege R, Heeres E, Heeres P, Visser RGF: **A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop**. *Nat Biotechnol* 2003, **21**:439–442.
28. Joshi SG: **Towards durable resistance to apple scab using cisgenes**. In *PhD thesis*. Wageningen University; 2010.
29. Heeres P, Schippers-Rozenboom M, Jacobsen E, Visser RGF: **Transformation of a large number of potato varieties: genotype-dependent variation in efficiency and somaclonal variability**. *Euphytica* 2002, **124**:13–22.
30. Thomas CM, Jones JDG: **Molecular analysis of *Agrobacterium* T-DNA integration in tomato reveals a role for left border sequence homology in most integration events**. *Mol Genet Genomics* 2007, **278**(4):411–420.
31. Petti C, Wendt T, Meade C, Mullins E: **Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic *Phytophthora infestans*-tolerant potato**. *J Biosci Bioeng* 2009, **107**(3):301–306.
32. EFSA: **Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis**. *EFSA J* 2012, **10**:2561.
33. Murashige T, Skoog F: **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures**. *Physiol Plant* 1962, **15**:473–497.
34. Vleeshouwers VGAA, Van DW, Keizer LC P, Sijpkens L, Govers F, Colon LT: **A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation**. *Eur J Plant Pathol* 1999, **105**:241–250.
35. de Vetten NCM, Visser RGF, Jacobsen E, van der Vossen EAG, Wolters AMA: **Use of R-genes as a selection marker in plant transformation and use of cisgenes in plant transformation**. patent application, published by: IPO: WO 2008091154 A1.
36. Visser RGF: **Regeneration and transformation of potato by *Agrobacterium tumefaciens***. In *Plant Tissue Culture Manual*. Edited by Lindsey K. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers; 1991:1–9.
37. Vleeshouwers VGAA, Rietman H: **In planta expression systems**. In *Oomycete Genetics and Genomics*. Edited by Lamour KH, Kamoun S. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2009:455–475.
38. Huang S, van der Vossen EAG, Kuang H, Vleeshouwers VGAA, Zhang N, Borm TJA, van Eck HJ, Baker B, Jacobsen E, Visser RGF: **Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato**. *Plant J* 2005, **42**:251–261.
39. Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JIB, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Bohme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail MA, Churcher C, Hall N, Berriman M, Huang S, Kamoun S, Beynon JL, Birch PRJ: **An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm**. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:7766–7777.
40. Karimi M, Inze D, Depicker A: **GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation**. *Trends Plant Sci* 2002, **7**:193–195.
41. Fulton T, Chunwongse J, Tanksley S: **Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants**. *Plant Mol Biol Rep* 1995, **13**:207–209.

doi:10.1186/1472-6750-14-50

Cite this article as: Jo et al.: Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. *BMC Biotechnology* 2014 14:50.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)

