

# Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber.

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

# Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber.

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

## A.1. Anmelderens navn og adresse

Forskningsleder Bent L. Petersen Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg

e-mail: blp@plen.ku.dk

Agrochef Christian Feder, KMC Amba, Herningvej 60, 7330 Brande

e-mail: cf@kmc.dk

## A.2. De ansvarligere forskeres navne

**Bent L. Petersen**, lektor, PhD, Gruppeleder, > 25 års erfaring i Plante genetik med anvendelsesområder omfattende forædling af kulhydrat polymerer, herunder stivelse, resistens forædling samt kulhydrater påsat terapeutiske proteiner for mhbp ny funktionalitet. Særligt fokus sidste 7 år: stivelses- og resistensforædling i kartofler ved brug af gen-saksen CRISPR-Cas.

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

## Christian Feder,

Cand.agro og Agrochef hos KMC A.m.b.a. Har arbejdet med udvikling, avl og forædling af kartofler siden 1990.

Erhvervede GMO- kørekort i 2021.

Markpersonalet er uddannede jordbrugsteknologer og har erhvervet GMO - kørekort på Bygholm Landbrugsskole i december 2021 eller marts 2023.

Forsøgsarbejdet vil blive udført i samarbejde med Ytteborg Forsøg, Hjernvej 94, 7560 Hjerm

## A.3. Projektets titel

CrisprCAS kartoffel med ændrede stivelsesegenskaber.

## Undertitel:

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

## A.4. Udsætningen

### A.4.a. Formålet med udsætningen

Teste den CrisprCAS ændrede kartoffels sammensætning af amylopektin og amylose med henblik på at erstatte kemisk modificeret stivelse.

Formålet er desuden at teste om egenskaben, de ændrede stivelseegenskaber, er konstante også når kartofflen dyrkes på friland.

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

Udsætning sker omkring 1. maj 2023 og høst i perioden 20 - 30. september 2023.

#### A.4.c. Udsætningsmetode

Kartoffelknolde håndlægges i jorden og dækkes med kartoffelkamme.

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

##### **Forår:**

Marken er pløjet og harvet op inden udsætning af planterne.

##### **Under (udsætningen)væksten:**

Normal behandling mod ukrudt, skadedyr og sygdomsbekæmpelse imod kendte svampesygdomme i kartoffel.

Planterne vil løbende blive vandet efter behov.

##### **Høst(optagning):**

Håndopgravning og opsamling. Vejning vil foregå i marken.

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

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

3 - 6 planter per kvm.

### A.5. Oplysninger om udsætningsstedet

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

Udsætningsstedet er beliggende i *bloknummer 500 207 – 20, IMK, totalareal = 0,5 ha.*

Området der vil blive tilplantet med den CrisprCAS modificerede kartoffel, vil være 180 m<sup>2</sup> brutto/60 m<sup>2</sup> netto.

Forskel mellem brutto/netto er værn og sti.

#### A.5.b. Beskrivelse af udsætningsstedets økosystem, herunder klima, flora og fauna.

Udsætningsstedet er beliggende i et konventionelt dansk landbrugsareal.

#### A.5.c. Forekomsten af krydsningskompatible beslægtede vilde eller dyrkede plantearter.

Kartoffel krydser ikke spontant med vilde arter af kartoffel eller andre dyrkede *Solanum* arter.

Der er ingen historik for at den dyrkede kartoffel i Danmark har krydset med vilde arter i naturen.

Ved blomstringen i begyndelsen af juli vil vi, som ekstra sikkerhed, klippe blomsterne af planterne. Dette vil sikre, at der ikke vil kunne ske nogen form for krydsning.

Afklipping af blomsterne anvendes bl.a. også ved SLU (Sveriges Lantbruks Universitet).

#### A.5.d. Afstanden til officielt anerkendte biotoper eller beskyttede områder, som vil påvirkes.

Afstande

§3 Hede: 230 meter

§3 Overdrev: 470 meter

§3 Eng: 550 meter

Fredskov: min. 15 meter



### **B.1. Videnskabelige oplysninger**

<b>Taxonomi</b>	<b>Latinske navn</b>
Familie	<i>Solanaceae</i>
Slægt	<i>Solanum</i>
Art	<i>Solanum tuberosum</i>
Underart	<i>Tuberosum</i>
Kultivar	Wotan
Almindeligt navn	Kartoffel (stivelse) "Wotan"

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

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

#### **B.1.c. Reproduktion**

i)

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

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

ii)

I naturen sker den yderst sjældent spontant krydsning mellem kultivarer (sorter) af kartofler, hvorfor risiko for krydsbestøvning anses som værende teoretisk og ubetydelig.

For at eliminere selv den mindste risiko vil vi klippe blomsterne af, når planterne begynder at blomstre – typisk primo juli.

iii)

Kartofler er 1. årige.

#### **B.1.d. Krydsningskompatibilitet med andre dyrkede eller vilde plantearter, herunder udbredelsen i Europa af de kompatible arter.**

Der kendes ikke til krydsninger mellem kartofler og andre dyrkede eller vilde arter i Europa. Krydsningskompatibiliteten må derfor anses for at være ikke eksisterende.

### **B.1.e. Overlevelsessevne:**

i)

Evne til at danne strukturer, der fremmer overlevelse eller vækstdvale:

Ikke høstede knolde kan overleve i jorden hen over en mild vinter uden betydende frost. Almindeligt vintervejr med gentagen nat og dagsfrost vil slå eventuelle overskydende knolde i jorden ihjel, de fryser væk.

Alle kartoffelknolde i forsøget på udsætningsstedet vil blive håndopgravet, hvorfor sandsynligheden for at der skal være knolde i jorden efter høst er ubetydelig.

ii)

Ingen særlige faktorer.

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

i)

Maskinoptagning vil i nogle tilfælde spilde små knolde, som kan give ny vækst året efter. Derfor vælger vi den manuelle håndoptagning, som er et effektivt værn imod knolde der ikke bliver høstet.

ii)

Ingen særlige faktorer

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

Ikke relevant

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

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

## **2. Molekylær karakterisering.**

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

Den Crispr-Cas modificerede kartoffel, Waxy Wotan, Linje K33, herefter 'Waxy Wotan (K33)', er fremstillet på Københavns Universitet, Thorvaldsensvej 40, 1871 Frederiksberg C.

Der er ved brug af Crispr-Cas frembragt små målrettede mutationer i genet Granular Bound Starch Synthase (*StGBSS*) 1 i kartoffelsorten Wotan.

*StGBSS1* genet udtrykker *GBSS1* enzymet, som danner amylosekomponenten i stivelse. I Waxy Wotan (K33) er genfunktion af *StGBSS1* genet (i alle 4 alleler) ødelagt/ikke-funktionelt, hvorved planten ikke kan producere amylose og derfor indeholder stivelse med udelukkende amylopektin.

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

Protoplaster blev isoleret fra 5 uger gamle vildtype *in vitro* planter ved enzymatisk fordøjelse af cellevæggen. De isolerede protoplaster blev mixet med P9P10 plasmid (se figur) og transformation udført ved hjælp af 12% polyethylene glycol (PEG). De transformerede/editerede protoplaster blev regenereret over 3-4 måneder på forskellige medier indeholdende en eller flere af følgende hormoner i varierende koncentrationer: 6-Benzylaminopurine, 1-Naphthaleneacetic acid, Gibberellic acid and Zeatin (se endv. Andreasson et al 2022).

De regenererede planter blev efterfølgende flyttet til et hormonfrit Murashige and Skoog medium. Screeningen af planterne blev udført ved IDA Analyse (IDAA) med fluorescens mærket PCR produkter, amplificeret på ekstraheret gDNA fra planterne og separeret på baggrund af størrelse (detektions opløsning +/- 1 bp) via kapillær elektroforese.

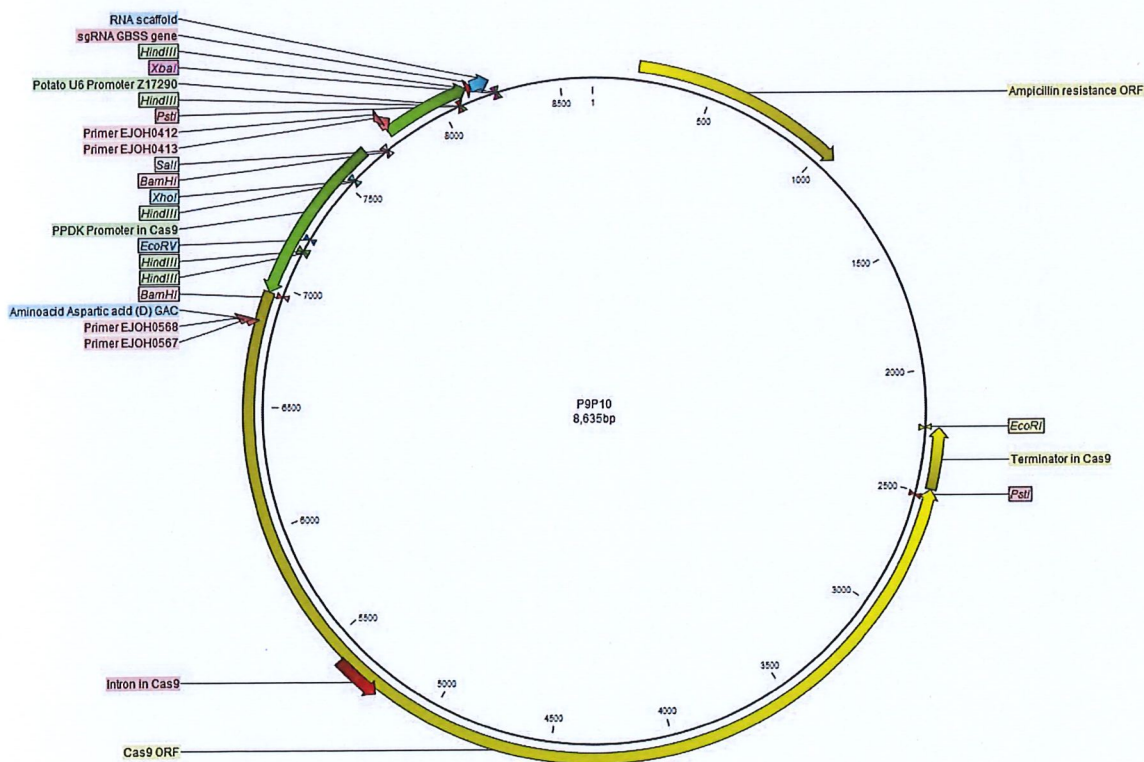
Da der kun er anvendt et enkelt gRNA/Cas9 kompleks, transient fremstillet via konstruktet P9P10 i portoplastcellen, er der ikke tale om multiplexing i transformation / editerings processen.

Yderligere detaljer om genereringen af Waxy Wotan kan findes i følgende:

Johansen IE, Liu Y, Jørgensen B, Nielsen KL, Andreasson E, Bennett EP, Nielsen KL, Blennow A, Petersen BL (2019) High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato (2019) *Sci Rep* **9**, 17715. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>

Andreasson E, Kieu NP, Zahid MA, Carlsen FM, Lenman M, Sandgrind S, Petersen BL, Zhu Li-Hua (2022) Schemes for in vitro shoot regeneration from tissues and protoplasts of potato and rapeseed: implications for bioengineering such as gene editing of broad leaved plants. Invited Mini-review/Research. Research topic title: Utilization of Protoplasts to Facilitate Gene-Editing in Plants. *Frontiers in Genome Editing*, doi: 10.3389/fgeed.2022.780004

ii) den anvendte vektors art og oprindelse



Guide RNA brugt: GGTCCTTGAGCAAACTGG

Det plasmid-baserede CRISPR/SpCas9 konstrukt, P9P10, er designet til at mutere Exon 1 i *StGBSS1*. P9P10 er ikke-integrativt, dvs at det ikke indeholder elementer, der fx ved Agrobacterium medieret transformation, kan foranledige integration i genomet som led i transformationen / mutagenesen.

Det skal endvidere fremhæves, at P9P10 ikke indeholder en selektions markør, der ville kunne anvendes i planter. Derfor er Waxy Wotan linjen fuldt sekventeret og screenet for alle insert relateret til P9P10 plasmidet. Denne screening viste, at der ikke er indsat plasmid elementer i genomet.

Allele specific characterization + primer design

Figuren til venstre viser sgRNA designet, de fire alleler og placeringen af sgRNA i GBSS genen (baren i toppen, exon i hvide kasser. Stjerner symbolisere allel forskelle naturligt forekommende mellem de fire alleler.



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

- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke-integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

## b) Oplysning om GMHP'erne

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

Der er ved brug af CrisprCAS teknologien frembragt små målrettede mutationer i genet Granular Bound Starch Synthase (*StGBSS*) 1 i kartoffel sorten Wotan, der normalt producerer GBSS1 enzymet, som danner amylose komponenten i stivelse. I Waxy Wotan (K33) er genfunktion af *StGBSS1* genet (i alle 4 alleler) ødelagt/ikke-funktionelt, hvorved planten ikke kan producere amylose og derfor indeholder stivelse med udelukkende amylopektin.

### Waxy mutationen

- et begrænset antal 'waxy' mutanter, der har tab af Granular Bound Starch Synthase (GBSS) gen funktion, findes naturligt forekommende i flere arter i naturen og 'waxy' fænotypen, der giver en mere klistret stivelses tekstur, er derfor ikke en ukendt variation i naturen.
- den stærkt begrænsede forekomst af naturligt forekommende 'waxy' mutanter, gør, at den 'waxy' egenskaben ikke anses for at have en selektiv fordel i naturen.
- Der er desuden ingen rapporter om produktion af giftige forbindelser som følge af 'waxy' mutationen.

Plante resistens markør(er) indgår ikke i det anvendte CRISPR/Cas konstrukt (P9P10), der endvidere er ikke-integrativt. K33 mutationerne er INDELS og dermed af Site Directed Nuclease 1 (SDN1) typen, idet homolog integrations template ikke har indgået i transformations/editerings processen.

ii) Oplysninger om faktisk indsatte/deleterede sekvenser

- Størrelse og antal kopier af enhver/alle insert(er), de metoder der er anvendt
- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke-integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

- I tilfælde af deletion angives den eller de deleterede regioner størrelse og funktion  
I K33 (*StGBSS1* exon 1) har de fire alleler følgende mutationer: I (6 bp deletion); II (5 bp deletion); III (1 bp addition); IV (4 bp deletion).
- Insertets/-ernes subcellulære placering(er) i plantecellerne (integreret i kernen, kloroplaster, mitokondrier, eller bevaret i en ikke integreret form) samt metoder til bestemmelse af den/dem  
- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke- integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

iii) Dele af Planten, hvori insertet udtrykkes

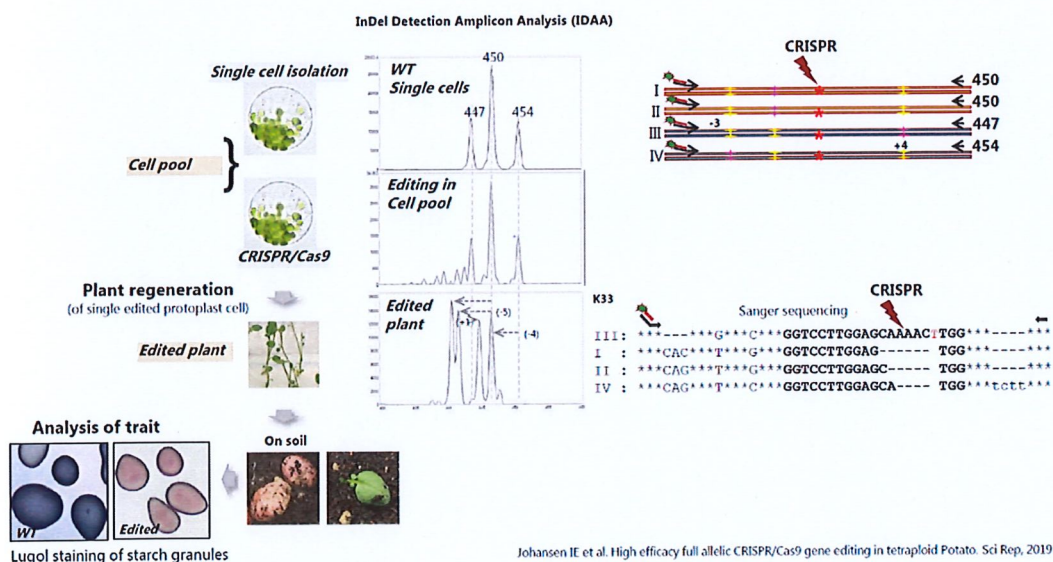
- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke- integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

iv) Insertets genetiske stabilitet og GMHP'ernes fænotypiske stabilitet

- Ikke relevant, da der er anvendt et ikke- integrativt plasmid/konstrukt. Herudover henvises til IDAA analyse af og sekventering af K33 nedenfor.

### c) konklusioner af den molekylære karakterisering

Herunder ses en IDAA og sekventeringsanalyse, der viser mutationer i cut sitet for K33.



PCR til IDAA er udført på UCPH-PLEN mens IDAA prøverne er analyseret af Taq Copenhagen (TAG Copenhagen A/S).

IDAA har for WT (ikke editerede) identificeret alle 4 alleler i det amplificerede område med længderne I & II (450 bp, dobbelt højde), III (347 bp), IV (454 bp). I K33 er alle positioner/toppe flyttet (I (6 bp deletion); II (5 bp deletion); III (1 bp addition); IV (4 bp deletion)). Som det ses er der fuld korrelation mellem IDAA profil



og sekventeringen (Sanger sekventering, som beskrevet i Johansen et al 2019). Mutationerne i K33 er i tråd med CRISPR/SpCas9-medierede mutationer rapporteret i kartofler og i andre planter.

Pga. det enorme molekylære overskud af plasmid kopier pr protoplastcelle, vil nogle protoplastceller, og dermed også de afledte editerede eks-planter, få indsat mindre plasmid fragmenter. Disse fragmenter er som oftest fragmenter på op til 10 basepar, i brud stedet. Dette er velkendt i litteraturen og udførligt dokumenteret også i Johansen et al 2019. K33 linjen er udvalgt, fordi den i brud-stedet (mutagenese målstedet) har brudt læseramme i alle 4 alleler (fuld allel knock out), og ikke indeholder plasmid fragment(er).

Herudover er genomet af hhv Waxy Wotan (K33) og ikke-editeret Wotan er blevet fuldt sekventeret i alle fire alleler vha. Illumina sekvenserings teknikken. K33 genomet er, ved sekvens afsøgning, undersøgt for potentielle indsatte konstrukt afledte fragmenter. Vi konkluderer, jvf. denne undersøgelse, at K33 genomet ikke indeholder plasmid-konstrukt DNA, der blev anvendt under Crispr-Cas mutagenesen.

#### *Teamets publicerede litteratur, der ligger til grund for generering og molekylær analyse af K33*

Johansen IE, Liu Y, Jørgensen B, Nielsen KL, Andreasson E, Bennett EP, Nielsen KL, Blennow A, Petersen BL (2019) High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato (2019) *Sci Rep* **9**, 17715. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>

Bennett EP, **Petersen BL**, Johansen IE, Niu Y, Yang Z, Chamberlain CA, Met Ö, Wandall HH, Frödin M (2020) INDEL detection, the 'Achilles heel' of precise genome editing: a survey of methods for accurate profiling of gene editing induced indels. *Nuc Acids Res*, 48 (21), 11958–11981, <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa975>

Andreasson E, Kieu NP, Zahid MA, **Carlsen FM**, Lenman M, Sandgrind S, **Petersen BL**, Zhu Li-Hua (2022) Schemes for in vitro shoot regeneration from tissues and protoplasts of potato and rapeseed: implications for bioengineering such as gene editing of broad leaved plants. Invited Mini-review/Research. Research topic title: Utilization of Protoplasts to Facilitate Gene-Editing in Plants. *Frontiers in Genome Editing*, doi: 10.3389/fgeed.2022.780004

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

- a)  
Der forventes ingen ændringer i hverken persistens eller invasionsevne, ej heller i evnen til at overføre genetisk materiale til beslægtede plantearter.
- b)  
Der forventes ingen ændringer i evnen til at overføre genetisk materiale til mikroorganismer.
- c)  
Ikke relevant. De ændrede stivelsesegenskaber forventes at reducere forbruget af kemisk modificeret stivelse.
- d)  
Der forventes ingen ændringer.

e)

Ændringen af stivelsesegenskaberne forventes ikke at ville påvirke den almindelige landbrugspraksis, hvad angår dyrkningen, såsom gødsning, vanding, sprøjtning imod sygdomme, ukrudt, skadedyr osv.

De ændrede stivelsesegenskaber vil kunne forbedre produktionen af plantebaserede fødevarer og øge mængden af "Clean Label" stivelsestyper til fødevarerproduktion.

Stivelsen vil desuden erstatte en del af de i dag anvendte kemisk modificerede stivelser.

f)

Der forventes ingen påvirkninger på de abiotiske miljøer.

g)

Der forventes ingen toksisk, allergenisk eller anden skadelig påvirkning på menneskers eller dyrs sundhed. Der er ingen forventning om, at ændringerne i stivelsessyntesen og den heraf udvundne ændrede stivelse, vil have indflydelse på menneskers eller dyrs sundhed.

Der findes allerede i dag en såkaldt "waxy-kartoffelstivelse" på markedet. Denne stivelse sælges allerede kommercielt til forskellige fødevarer formål rundt om i EU og resten af Verden.

Vi har ikke modtaget meldinger om, at denne specifikke stivelse har haft skadelige påvirkninger på hverken mennesker eller dyr.

Generelt er kartoffelstivelse netop kendt for hverken at være toksisk, allergenisk eller have anden skadelig påvirkning på menneskers eller dyrs sundhed.

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

h)

Der forventes ingen øget risiko for miljøpåvirkning hverken på mennesker, dyr eller omkringliggende natur.

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

##### Trufne forholdsregler

- a. *Afstand fra krydsningskompatible plantearter, både beslægtede vilde plantearter og afgrøder.*

Der vil være 15 m til nærmeste kartoffelmark.

Udsætningsstedet for den CrisprCAS modificerede kartoffel vil desuden blive omgivet af et bælte af ikke-CrisprCAS modificerede kartofler.

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

Som ekstra sikkerhed afklippes blomster, primo juli i forbindelse med blomstringen.

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

Udsætningsstedet for den CrisprCAS modificerede kartoffel vil blive omgivet af et 3 m bredt bælte af ikke-CrisprCAS modificerede kartofler, der vil fungere som pollenfanger, og derved reducere pollenspredning.

Dette bælte vil blive høstet og alt plantemateriale vil blive destrueret ved høst, som beskrevet nedenfor.

Som ekstra sikkerhed afklippes blomster primo juli i forbindelse med blomstringen.

Spande, kurve og øvrige redskaber anvendt ved udplantningen vil blive grundigt rengjorte og eftersat for læggeknolde. Kartoffelknolde vil ved høst blive taget op med hånden for at sikre at der ikke efterlades knolde i jorden.

Alt øvrigt plantemateriale vil blive opsamlet i sække og kørt til forbrænding/deponi.

Høstede knolde vil blive opsamlet i sække og transporteret i kasser til bestemmelse af

stivelsesindhold på indendørs stivelsesvægt.

Test af stivelsen vil ske på KMCs laboratorie, som allerede er godkendte til at håndtere GMO kartofler.

For at udvinde stivelsen af knoldene skal knoldene knuses og de mister derved muligheden for at kunne spire hvorfor risikoen for spredning elimineres.

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

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

1. harvning vil ske kort efter høst, så evt. knolde kan frilægges og fjernes. Henover vinteren vil marken blive harvet efter frostperioder eller mindst 2 gange.

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

Året efter udsætningen vil arealet ligge som sort brak med månedlige harvninger (april til september) og overvågning.

Arealet vil blive overvåget i min. 4 år eller til der ikke findes spildplanter mere (jf. vejledning fra Landbrugsstyrelsen "Dyrkningsbestemmelser for GM kartofler" marts 2022).

Arealet forventes udlagt med såkaldt blomsterbrak fra 2025 som kan slås og overvåges.

Det skal bemærkes, at erfaringen med håndoptagning af kartofler er at der meget sjældent efterlades knolde i jorden.

#### 4.c. Behandlingsmetoder, efter udsætning, herunder affald.

Under dyrkningen: normal plantebeskyttelse imod ukrudt, skadedyr og sygdomme.

Høst: Håndoptagning/høst. Ved håndoptagningen(høst) er risikoen for spild meget lille. Høstede knolde vil blive opsamlet i plastiksække og transporteret i dobbelt GMO mærkede plastposer, og kørt til KMCs GMO godkendte laboratorium for forarbejdning til stivelse/kartoffelmel (se vedlagte bilag 4).

Plantematerialet vil blive opsamlet i plastiksække og brændt/destrueret.

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

Efter brug vil vægten og kasser blive rengjort og desinficeret og sække vil blive kørt til forbrænding/deponeret.

#### 4.d. Overvågningsplaner og teknikker.

Udsætningsmarken vil blive observeret hver uge og væksten vil blive noteret og beskrevet.

Efter høst vil udsætningsmarken blive nøje overvåget for knolde og eventuelle planter.

Eventuelle planterester og knolde vil blive destrueret.

#### 4.e. Beredskabsplaner

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

Lokaliteten vil blive overvåget med jævne mellemrum. Der vil blive opsat skilte forskellige steder ved marken, der beskriver forsøget samt navne og telefonnumre på de ansvarlige for forsøget: Bent L.

Pedersen, Frida Meijer Carlsen og Christian Feder.

#### 4.f. Metoder og procedurer til beskyttelse af stedet.

i)

Alt arbejde med planter, knolde i marken og efterfølgende håndtering vil ske som håndarbejde, hvorfor den mekaniske spredningsrisiko betragtes som minimal.

Al transport til og fra mark vil ske i lukkede enheder (dobbelt GMO mærkede plastposer placeret i kasser), hvorfor risiko for spredning under transport også betragtes som minimal.

ii)

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

iii)

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

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

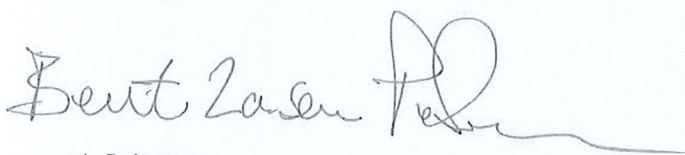
Den ovenfor beskrevne målrettede mutations analyse vil påvise, hvorvidt mutationen forefindes i det analyserede materiale.

Waxy Wotan (K33) er fuldt karakteriseret (i alle fire alleler) vha IDAA og sekvensering analyse, som beskrevet ovenfor, og vil blive anvendt til entydig mutant/line identifikation i indhentet materiale, der evt. ift. en usandsynlig spredning, kunne påtænkes analyseret.

#### 6. Oplysninger om tidligere udsætninger af GMPH erne.

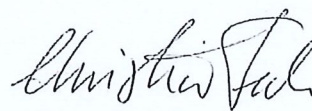
Ikke relevant.

Dato: 21. marts 2023



Bent L. Petersen

Københavns Universitet



Christian Feder

KMC

Bilag 1. Miljørisikovurdering

Bilag 2. Artikel

Bilag 3. Kort beskrivelse af GUDP-projekt og hovedansøgning til GUDP.

Bilag 4. KMCs GMO godkendelse af laboratorie.

## **Miljørisikovurdering**

Ansøgning udsætning af CrisprCAS modificeret kartoffel til kartoffelstivelsesproduktion, med ændrede stivelsesegenskaber.

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

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

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

A)

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

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

B)

Håndopgravning af knolde vil sikre, at risikoen for overlevende knolde i jorden er ubetydelig. Efterfølgende frost i vinterperioden og sort jord i året efter avl vil effektivt sikre at evt. overlevende knolde fra høst vil overleve og spire året efter.

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

1. harvning vil ske kort efter høst således at evt. knolde kan frilægges og fjernes. Den over vinteren vil marken blive harvet efter frostperioder eller mindst 2 gange.

Efter hver harvning vil marken blive kontrolleret for evt. fritlagte knolde, som vil blive destrueret. Året efter udsætningen vil arealet ligge som sort jord med månedlige harvninger (april til september) og overvågning. Arealet vil blive overvåget i min. 4 år eller til der ikke findes spildplanter mere (jf. vejledning fra Landbrugsstyrelsen "Dyrkningsbestemmelser for GM kartofler" marts 2022).

Arealet forventes udlagt med såkaldt blomsterbrak fra 2025 som kan slås og overvåges. Det skal bemærkes, at erfaringer med håndopgravning af kartofler er at der meget sjældent efterlades knolde i jorden.

### **2. Genoverførsel fra plante til mikroorganismer**

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

### **3. GMHPernes vekselvirkning med målorganismer**

Det vurderes ikke at de udsatte planter vil have påvirkning på målorganismer.

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

Det vurderes ikke at de udsatte planter vil have påvirkning på ikke - målorganismer

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

Det vurderes, at alt arbejde i forbindelse med lægning og optagning gøres manuelt, sikrer en meget høj grad sikkerhed for at der ikke efterlades knolde og planterester i/på jorden.

Afklipning af blomster i forbindelse med blomstringen i begyndelsen af juli vil garantere, at selv den teoretiske risiko for pollen overførsel er elimineret.

Vi ved fra svenske kollegaer på Sveriges Lantbruks Universitet (SLU) at dette er praktiseret de seneste år ved udsætninger i Skåne.

Transport til og fra mark vil foregå i dobbelt lukkede enheder. Al transport og håndtering vil foregå med de relevante personer, altså ingen eksterne transportører.

De personer som skal foretage de kritiske arbejdsopgaver, transport, lægning, høst og efterkontrol er alle uddannet med GMO - kørekort i 2021 eller 2023, hvorfor alle er opdateret med nyeste viden om emnet.

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

Den ændrede stivelsessyntese forventes ikke at være relevant eller at have indflydelse på biogeokemiske processer.

## **7. Virkninger på menneskers og dyrs sundhed**

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

Den ændrede egenskab i planten er en mutation, som ville kunne forekomme under naturlige forhold, hvorfor virkningen ikke vurderes som væsentlig.

Erfaringerne fra den traditionelle forædling af kartoffel er, at *når* disse typer mutationer er sket "naturligt", har det ikke haft betydning på hverken mennesker eller dyrs sundhed.

Der findes i dag en kommerciel kartoffelsort med samme egenskaber som dyrkes i Tyskland. Mutationen er her fremkommet via bestråling.

Den kommercielle kartoffelstivelse fra denne sort sælges i hele verden, og der er ikke indmeldt virkninger på hverken mennesker eller dyr.

Langt den største andel af denne stivelse anvendes til human ernæring bl.a. vegetar vingummi, vegetar-ost mm., uden det har givet anledning til indmeldinger om det har påvirket de forbrugere, der har indtaget det.

Hvorvidt selve mutationen med CrisprCAS kan gøre noget andet ved vi ikke 100 %, men det er bl.a. et af formålene med udsætningen.

Stivelsen der udvindes fra disse CrisprCAS knolde vil udelukkende blive anvendt til forskning og udvikling. Resultaterne af dette vil herefter afdække, om der kan være risici for mennesker eller dyr.

OPEN

# High efficacy full allelic CRISPR/Cas9 gene editing in tetraploid potato

Ida Elisabeth Johansen<sup>1</sup>, Ying Liu<sup>1</sup>, Bodil Jørgensen<sup>1</sup>, Eric Paul Bennett<sup>2</sup>, Erik Andreasson<sup>3</sup>, Kåre L. Nielsen<sup>4</sup>, Andreas Blennow<sup>1</sup> & Bent Larsen Petersen<sup>1\*</sup>

CRISPR/Cas9 editing efficacies in tetraploid potato were highly improved through the use of endogenous potato *U6* promoters. Highly increased editing efficiencies in the Granular Bound Starch Synthase gene at the protoplast level were obtained by replacement of the Arabidopsis *U6* promoter, driving expression of the CRISPR component, with endogenous potato *U6* promoters. This translated at the ex-plant level into 35% full allelic gene editing. Indel Detection Amplicon Analysis was established as an efficient tool for fast assessment of gene editing in complex genomes, such as potato. Together, this warrants significant reduction of laborious cell culturing, ex-plant regeneration and screening procedures of plants with high complexity genomes.

Genome editing provides an efficient route of translating genetic knowledge into improved crop varieties in the field. In contrast to many breeding techniques, CRISPR-Cas genome editing minimizes introduction of undesired mutations<sup>1</sup>, which requires backcrossing and/or extensive selection to identify vigorous offspring. This becomes important in outbreeding crops and especially in those with complex genomes, where genome editing enables breeding of desired traits in existing elite cultivars, without compromising existing good agronomic performance<sup>2</sup>. Elite cultivars of tetraploid potato, *Solanum tuberosum*, are known to be extremely genetically diverse with a very high Small Nucleotide Polymorphism (SNP) frequency<sup>3,4</sup>, and are thus propagated clonally to maintain agronomic traits that are the result of balancing such overwhelming genetic diversity. Many traits can be improved by loss of function alleles, for example generated through CRISPR/Cas9 induction of the Non Homologous End Joining (NHEJ) pathway<sup>5</sup>. The most famous example is mlo-based resistance to powdery mildew<sup>6,7</sup>.

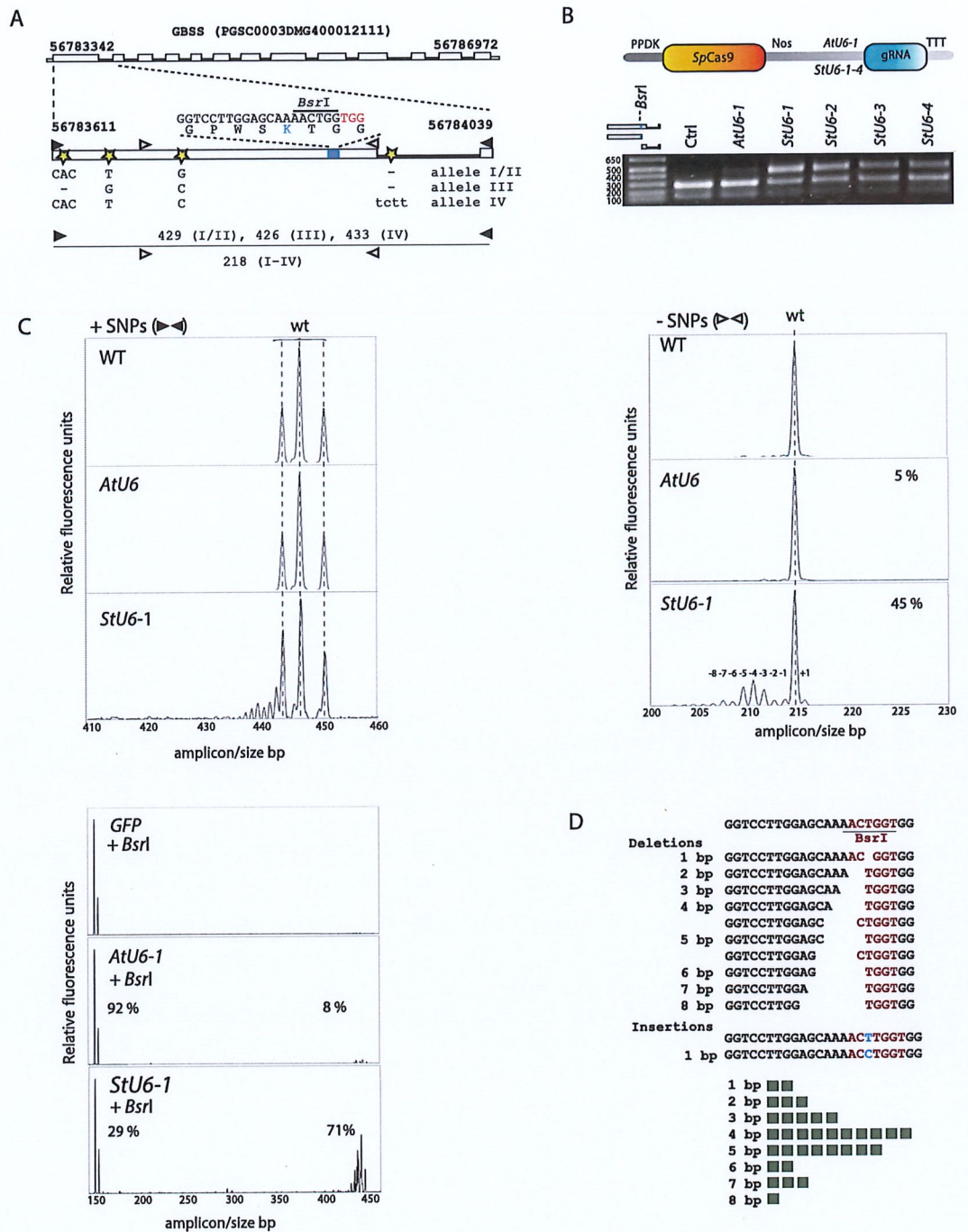
High efficient CRISPR/Cas9 editing are in many plants complicated by the presence of complex and high ploidy genomes and inefficient or poorly controlled delivery of the CRISPR/Cas9 components to cells with regenerative potential. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) of cells expressing GFP tagged CRISPR/Cas9 is regularly used for enrichment of edited cell populations in mammalian cell systems<sup>8</sup> and more recently also expanded to plant protoplast cells<sup>9</sup>. The Indel Amplicon Analysis (IDAA)<sup>10</sup> technique allows for fast and direct assessment of insertions/deletions (indels), with a sensitivity down to +/−1 bp, without the need for in depth Sanger sequencing<sup>11</sup>. IDAA was recently used for editing scoring of protoplast cell populations<sup>9</sup>, and in the present study the use of IDAA was expanded and adapted to plants with complex genomes, such as potato, where it proved an efficient and fast tool for editing assessment.

Genome editing has been applied to several gene targets in potato albeit with moderate editing frequencies in protoplasts and subsequent regenerated ex-plant shoots. In one study TALENs were targeted to the acetolactate synthase gene resulting in 7–8%, 11–13%, 10% editing at the protoplast, calli, and regenerated shoot/ex-plant levels, respectively; but full allelic edited ex-plants were not obtained<sup>12</sup>. In another study an vacuolar invertase gene was targeted by CRISPR/Cas9. Here 18 of 600 shoots displayed editing and 5 (0.8%) had editing in all four alleles<sup>13</sup>. A recent study where the potato granule bound starch synthase (GBSS) gene was targeted by CRISPR/Cas9, showed that replacement of the standard *Arabidopsis thaliana U6-1 (AtU6-1)* promoter, driving expression of the guide RNA, with an endogenous potato *U6* promoter resulted in a doubling in editing frequency from ca. 5%

<sup>1</sup>Department of Plant and Environmental Sciences, University of Copenhagen, DK-1871, Frederiksberg C, Denmark.

<sup>2</sup>Copenhagen Center for Glycomics, Departments of Cellular and Molecular Medicine and Odontology, Faculty of Health Sciences, University of Copenhagen, DK-2200, Copenhagen N, Denmark. <sup>3</sup>Resistance Biology, Plant Protection Biology, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp, Sweden. <sup>4</sup>Department of Chemistry and Bioscience, Aalborg University, Aalborg, Denmark. \*email: [blp@plen.ku.dk](mailto:blp@plen.ku.dk)





**Figure 1.** U6 promoter efficacy analysis at the protoplast level. *StU6* promoters were here defined as 350 nt upstream of the transcription start site (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Fig. 2D), and the 257 bp *AtU6-1* promoter of *Arabidopsis thaliana* was obtained from the vector pHBT-pcoCas9<sup>27</sup>. (A) Structure of the Granular Bound Starch Synthase (GBSS) gene<sup>3</sup> with the guide RNA (gRNA1) targeting part of the conserved motif and proposed active site KTGGL<sup>23</sup>. gRNA1 includes a diagnostic *BsrI* restriction enzyme site spanning the *SpCas9* cleavage site<sup>28</sup>, -3 bp upstream of the Photospacer Adjacent Motif (PAM) (red), which upon digestion yields the allele specific fragments: allele III (286, 140), allele I and II (289, 140) and allele IV (289, 144). The outer most primer set includes the SNPs (+SNPs) and gives rise to PCR amplicons of 426 (allele III), 429 (alleles I and II) and 433 bp (allele IV), and the innermost (-SNPs) to a PCR amplicon of 218 bp (all alleles). These length SNPs were conserved between the cultivars Desirée and Wotan. (B) Construct design and *StU6-1-4* versus *AtU6-1* promoter analysis at the cell pool (protoplast) level as evidenced by the presence of indel mediated destruction of the *BsrI* site (*BsrI* resistant band). (C) Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA) chromatograms for the + SNP and -SNP PCR amplicons of WT and *AtU6-1* and *StU6-1* derived indels. + SNP IDAA reveals allele complexity, while -SNP and *BsrI* digested + SNP amplicons permit estimation of editing efficacy. (D) Sequence analysis of 34 individual clones of the *BsrI* resistant band of *StU6-1* (B) isolated and cloned into the pJet vector, confirmed the indel distribution of the IDAA (Fig. 1C, panel: *StU6-1*, -SNP)

also peaking at  $-4$  bp deletions. WT peak positions are indicated by dotted lines. PPK and NOS designate Pyruvate phosphate dikinase promoter and nopaline synthase terminator, respectively. All experiments were done in Desirée, except for panel C (upper right side) and D, which were done in the cultivar Wotan.

to 10% in regenerated ex-plant lines of which 2% displayed full allelic editing<sup>14</sup>. The presence of a single wild-type allele was sufficient for conferring significant amounts of the GBSS gene product amylose thus demonstrating that KO of all four alleles is necessary for producing amylopectin (waxy) potato starch devoid of amylose<sup>14</sup>. Similarly, the endogenous cotton (*Gossypium hirsutum*) *GhU6.3* promoter also resulted in increased CRISPR/Cas9 editing as compared to the *AtU6-29* promoter in a transient reporter expression system in cotton<sup>15</sup>.

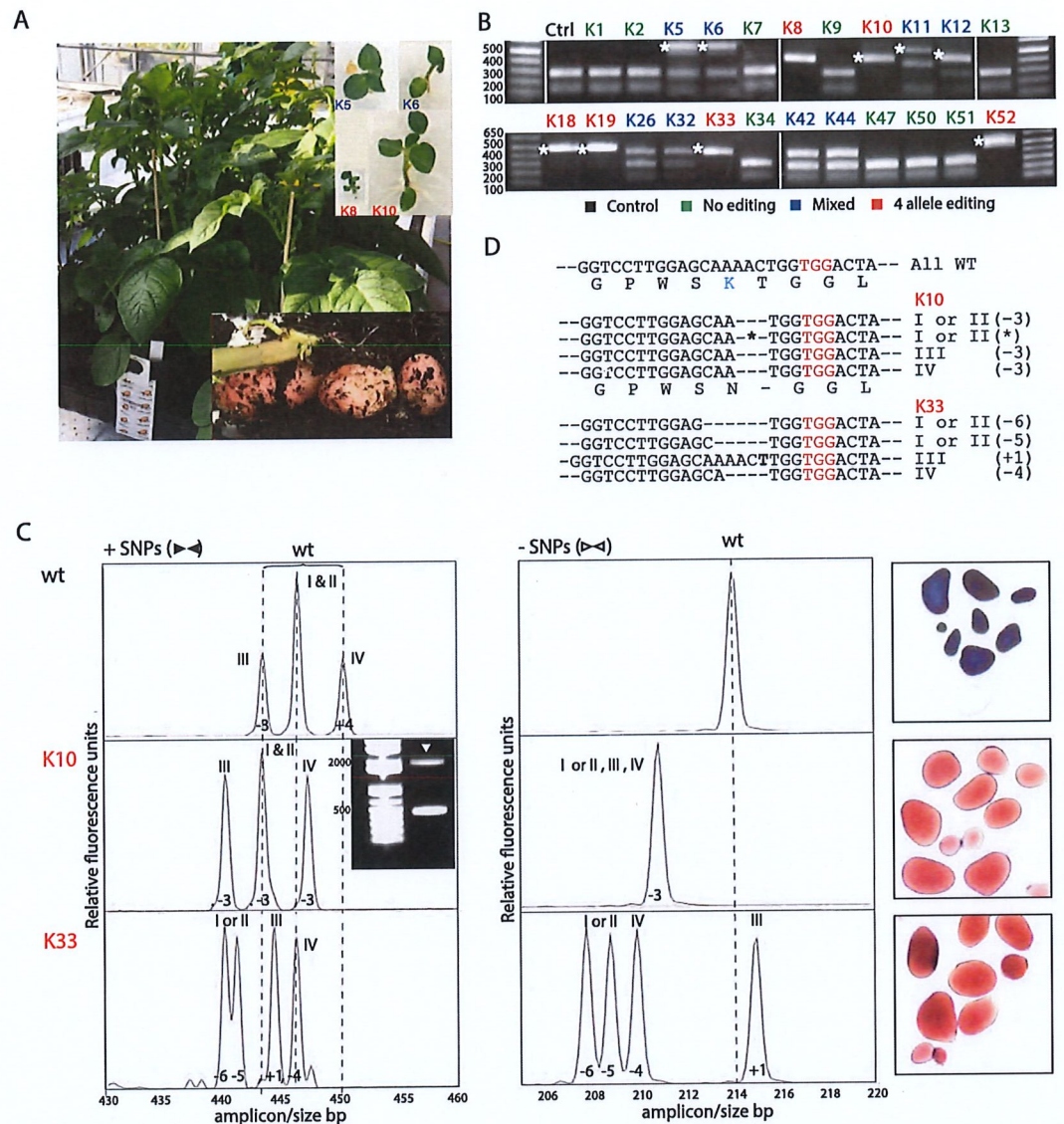
In this study, we significantly improved CRISPR/Cas9 editing efficacy by applying endogenous potato *StU6* promoters for driving the CRISPR component of the CRISPR/Cas system, and demonstrate that this optimization has a dramatic effect on editing frequencies at both the protoplast and shoot/ex-plant level.

## Results

**Retrieval of endogenous U6 promoters and editing analysis at the protoplast level.** To identify and retrieve *StU6* promoters, we used sequences described in<sup>16–18</sup> to search the potato genome. Upstream 5' flanking sequences of the *StU6* promoters were retrieved and used to PCR amplify the promoter regions from the cultivars Desirée and Wotan. Four promoter sequences were identified of which two were hitherto unannotated (*StU6-2* and *StU6-3*) and one (*StU6-4*) displayed size polymorphism (*StU6-4a* and *StU6-4b*). An alignment of the retrieved *U6* promoter sequences displays an overall high heterogeneity with respect to length and composition (Supplementary Fig. 1). The four potato *StU6-1-4* promoters, defined as 350 bp upstream of the *U6* gene start, were cloned to replace the *Arabidopsis thaliana AtU6-1* promoter, thus driving expression of the target GBSS gRNA1 and gRNA2 in constructs also expressing the *SpCas9* enzyme (Fig. 1A, Supplementary Fig. 2). In our initial designs we selected gRNAs targeting exon 1 of GBSS with diagnostic restriction sites for scoring editing. Potato leaf-derived protoplasts were isolated and the CRISPR/Cas9 expressing constructs (Supplementary Fig. 2) were delivered by polyethylene glycol (PEG) transformation as earlier described<sup>12</sup>. Indels were initially scored by PCR amplification of the targeted region from pools of protoplasts harvested 24 hrs after transformation followed by restriction enzyme digestion. This revealed a significant increase in editing for the endogenous *StU6-1-4* promoters when compared to the *AtU6-1* promoter as judged by restriction enzyme resistant band intensities (Fig. 1B). The experiment was repeated three times with overall similar results (data not shown). High resolution assessment of indel formation and distribution at the cell pool level was carried out through the use of the Indel Amplicon Analysis (IDAA) technique (Fig. 1C, Supplementary Fig. 3) and analyzed in detail by sequencing (Fig. 1D). When applied on the cultivar Wotan similar increases in editing were observed albeit at lower absolute editing frequencies (Supplementary Fig. 3). We speculate that subtle differences in chromatin structure, such as methylation status or packaging, or other factors between the two cultivars may explain these differences.

We expanded IDAA by restriction enzyme digestion of the IDAA samples, thus separating WT and indel peaks and allowing for direct assessment and quantification of only the indel derived peaks. Peak quantification revealed complete removal of the WT peaks in the Ctrl sample and a ca. 9 fold increase, from 8% to 71%, of edited alleles upon replacement of the *AtU6-1* promoter with the *StU6-1* (Fig. 1C) or *StU6-2* (data not shown) promoter in protoplasts of the cultivar Desirée. The restriction enzyme resistant band of the *StU6-1* experiment (Fig. 1B) was cloned, sequenced and the indels scored, showing a distribution of deletions peaking at  $-4$  bp, a few 1 nt additions (Fig. 1D) as well as large insertions (data not shown). IDAA and sequence analysis were consistent. The same analysis was applied on a second target in exon 1 of GBSS, gRNA2, which also showed higher efficacy using the *StU6* promoters compared to the *AtU6-1* promoter, albeit with GBSS-gRNA2 having lower general editing efficacy (Supplementary Fig. 4). The indel distribution of these two gRNA target sites, i.e. the high prevalence of  $-4$  and  $-1$  deletions, respectively, is in agreement with a recent study, where Cas9 editing of a vast number of gRNAs/targets showed that each gRNA conferred individual cell-line-dependent bias toward particular Cas9 editing outcomes<sup>19</sup>. When exon 1 of GBSS was subjected to five selected *in silico* gRNA prediction servers<sup>19</sup>, the highly *in vivo* efficient GBSS-gRNA1 (Fig. 1) was ranked highest by the efficiency score in three of the predictors, but with a specificity score ranking it as #23 or #24 of 36 possible gRNAs in the two predictors that allowed off-target assessment (Supplementary Fig. 5). The non-trivial weighting of gRNA efficiency and specificity ranking when selecting gRNA targets may be augmented by unreliable or inadequate genome sequence information. While traditional breeding techniques that use mutagenic chemicals or irradiation result in mutation frequencies of  $0.2-5 \times 10^{-320}$ , only four off-target mutations could be attributed to CRISPR/Cas9 activity in tetraploid cotton analysed by whole genome sequencing<sup>1</sup>. This is less than 1% of the 466 SNPs and 77 indels identified as spontaneous mutations and in agreement with the recently reported none or very low off-target mutation frequencies in mammalian cells<sup>21</sup>.

**Ex-plant molecular and phenotypic characterization.** Protoplast isolation, transformation, alginate embedment, shoot and ex-plant generation and transfer to soil for phenotypic scoring of starch composition in the tubers is outlined in Supplementary Fig. 6. Twenty three shoots/ex-plants were randomly selected and analyzed and out of these eight (35%) displayed full allelic editing, six appeared to have editing in 1–3 alleles, and nine were un-edited as evidenced by restriction enzyme analysis. Eleven out of the 23 shoots/ex-plants had plasmid derived insertions (Fig. 2B, left panel) and one displayed a dwarfed phenotype (Fig. 2B, right panel, plantlet K8). The high frequency of insertion mutants is in agreement with a recent study in potato, where CRISPR/Cas nucleoproteins were assembled *in vitro*. Here, an unexpected high frequency of insertions of both potato genomic DNA and fragments derived from the plasmid used for *in vitro* transcription of the gRNA was observed<sup>22</sup>. Molecular and phenotypic analyses of shoots/ex-plants initially selected for further analysis are outlined in Supplementary Fig. 7.



**Figure 2.** Amylopectin only potato: Geno- and phenotypic analysis of GBSS loss of function ex-plants. (A) Regenerated ex-plants from tissue culture with resulting potato tubers. (B) In total, 23 randomly selected shoots/ex-plants were screened to identify indels using the *BsrI* restriction enzyme digestion. K8, K10, K18, K19, K33 & K52 appeared to have editing in all four alleles (fully *BsrI* resistant), K11, K12, K26, K32 & K42 displayed a mixture of WT type and edited alleles, while K1, K2, K7, K9, K13, K34, K47, K50 & K51 appeared to be unedited. \* denotes insertions. K5 and K6 appear at a first glance to be mixed, but sequence analysis revealed that the *BsrI* digestion bands were derived from plasmid insertions comprising the gRNA1 sequence, which reintroduced the *BsrI* site and that K5 and K6 in fact had full allelic editing. (C) WT and the full allelic edited ex-plants, K10 and K33, were corroborated by IDAA of the larger (+SNP) region and the inner smaller (-SNP) region without length SNPs (Fig. 1C). WT peak positions are indicated by dotted lines. Lugol staining was used to analyse tuber starch from greenhouse grown plants (Supplementary Fig. 6). The presence of amylose gives rise to the dark blue colour (WT) tubers, while amylose free/amylopectin only yields the red-brownish color. Additional shoots/ex-plants selected for IDAA analysis of which a subset was propagated to set tubers were also stained with lugol<sup>29</sup> (Supplementary Fig. 7). (D) Sequence analysis confirmed that both K10 and K33 were full allelic edited. K10 had a 3 bp deletion in allele III, IV and in one of the alleles I or II and a 990 bp insertion (denoted ‘\*’ left to the sequence, see also arrow on gel insertion (Fig. 2C)) in the other as also evident in the IDAA analysis displaying 1:1:1 ratio of the three chromatographic peaks. K33 had 6 bp and 5 bp deletions in allele I and II, a 4 bp deletion in allele IV and a 1 bp insertion in allele III.

It was previously shown that full allelic knock-out of the GBSS gene is necessary for obtaining amylose-free starch<sup>14</sup>. Interestingly, two of the plants with four allele editing and amylose free starch, K10 and K33 (Fig. 2C), displayed three or six nucleotide in frame deletions in three or one allele, respectively (Fig. 2C,D), which resulted in elimination of the K-codon of the proposed ADPG binding site in the KTGGL motif<sup>23</sup>. The lack of amylose in K10 and K33 thus confirmed the importance of this amino acid for GBSS activity.

Noteworthy, our initial sequencing based characterization of the target region of the single copy GBSS gene having an expected maximum of four alleles, revealed a seemingly implausible complexity of up to 15 alleles. More detailed analysis, using combinations of different PCR amplifications to increase robustness of the analysis revealed that the observed hyper diversity was likely due to chimera formation caused by priming with incompletely extended PCR products from previous cycles (Supplementary Fig. 8) as has been previously observed for simultaneous amplification of highly homologous templates<sup>24</sup>.

## Discussion

Most agronomic traits are influenced by multiple loci and obtaining individuals harboring the desired alleles at these loci are very unlikely. In hybrid breeding crops, such as most cereals, genetic diversity at important loci is frequently fixed in inbreds that are then combined to provide homogenous and vigorous offspring thus blocking further breeding improvement. Outbreeding crops, such as tetraploid potato, harbor numerous allelic variants at important loci and agronomic performance of single individuals, propagated as clones (seed potato), is the result of a complex balance of alleles at a multitude of loci, which is perturbed by further crossing. In both instances, crop development may be accelerated by targeted genetic mutations in already existing elite varieties<sup>25</sup> using genome editing technology, such as CRISPR/Cas9. In outbreeding crops, the opportunity for altering specific traits in existing elite cultivars holds the promise of increasing performance of specific traits, without compromising good agronomic performance. Potato is tetraploid and elite germplasms are extremely genetically diverse with observed SNP frequency between two individuals of 1 per 29 bp<sup>3</sup>. Thus, genome editing is particularly attractive in potato where good agronomic performance is the result of balancing such overwhelming genetic diversity.

In the present study, we devised schemes for efficient editing and editing assessment of high ploidy complex genomes, here in potato, which are characterised by a high SNP prevalence between alleles but also between different cultivars.

We performed a survey for assessing the endogenous U6 promoter repertoire in potato and retrieved both published and hitherto unpublished potato U6 promoter sequences, and assessed their conferred editing performance in protoplasts as a first readout. Replacement of the regularly used Arabidopsis *AtU6-1* promoter with endogenous potato *StU6* promoters resulted in a dramatic increased editing efficiency of the target GBSS gene. Editing frequencies of 30–70% in protoplasts, corresponding to an up to a ca. 9 fold increased editing, were obtained as evidenced by IDAA. Theoretically 50% editing in protoplasts would translate into 6.25% (0.5<sup>4</sup>) ex-plants with full allelic editing. However, in agreement with earlier CRISPR/Cas editing in potato<sup>13,14</sup>, we observed full allelic editing in 35% of the ex-plants/shoots analysed, thus suggesting that in transformed protoplasts there is an increased likelihood that multiple alleles will undergo editing.

Our implementation of the IDAA technique permits fast and high throughput assessment of editing in organisms with high ploidy and complex genomes, such as potato, as evidenced here where all peak positions of the WT chromatogram were shifted in full allelic knock out of explants (Fig. 2). Editing may be scored at both the protoplast and ex-plant level, without the need for comprehensive sequence analysis, which, however, is still needed for full characterization at the ex-plant level.

Somaclonal variation has been reported to be a concern in relation to ex-plant regeneration from callus/shoots, including potato<sup>26</sup>. The present study did not include a comprehensive survey in regard hereto, but the regenerated first generation ex-plants displayed vigorous growth *in vitro* when scored ca 2 month after first visible shoot formation and later in pots in the greenhouse (Fig. 2A). Both the full allele GBSS edited ex-plants, such as K10 and K33, and un-edited GBSS but regenerated plants, such as K34, for example, displayed the same vigorous growth under the growth and culturing conditions applied here. One ex-plant, K8 (depicted in insert to Fig. 2A), displayed a major growth phenotype, but further genotyping of this ex-plant was not pursued. Although somaclonal/phenotypic variation was generally not encountered in the present limited explant material, additional explant lines and propagation generations are needed for proper assessment of the extent of genetic as well as non-genetic derived somaclonal/phenotypic variation.

In conclusion, this study demonstrates that *i*) use of endogenous U6 promoters has a great impact on editing efficiencies, *ii*) in complex tetraploids an exhaustive molecular characterization of WT alleles is required to avoid SNP's at gRNA targets and recombinant PCR derived erroneous allele assignment, *iii*) plasmid derived insertions were prevalent prompting for the use of purified DNA free nucleoprotein (RNP) to at least reduce the insertion prevalence, and *iv*) IDAA provides a simple qualitative and quantitative means of editing analysis at the cell pool and ex-plant level in the complex potato genome. The obtained highly improved editing efficacy may significantly reduce downstream cell culturing and ex-plant re-generation in particular where full allelic and heritable transmitted gene editing is desired.

## Methods

Methods and any associated references are available in the online version of the paper. Note: Any Supplementary Information and Source Data files are available in the online version of the paper.

**Online methods.** *Plant material.* Sterile *in vitro* grown plantlets of Desirée and Wotan were obtained from Vitroform (Årsløv, Denmark) and propagated in a Fitotron growth cabinet with 16/8 h, 24°C/20°C, 70% humidity, at 65µE light intensity as described in<sup>12</sup>. Regenerated plants were transferred to soil by rooting on peat under a white plastic cover. After rooting, plants were transferred to 25 cm pots and grown in the greenhouse to set tubers.

*StU6 promoter sequence and cloning.* *StU6* promoter sequences were retrieved by BLAST searches in the reference genome (DM1-3 516 R44)<sup>3</sup> with the sequences Z17290, Z17292, Z17293, Z17301 from the cultivar Record<sup>18</sup> as baits. Z17290, Z17292, Z17293 and Z17301 were mapped to the reference genome using CLC Genomics Workbench (Qiagen). 5' flanking sequences AGCAAGATGCAATGTATCAACTCA (Z17290),

ACCACTTAAACTGAGAACAGTCAA (Z17292), TTCACTTAGTTCAGTTGCATTATGTC (Z17293), GATAAATCTTAAAGTTGAGTAACC (Z17301) were used to amplify and sequence *U6* upstream regions from cultivars Desirée and Wotan of 421 bp (Z17290), 433 bp (Z17292), 372 bp (Z17293) and 374 bp, 321 bp and 318 bp (Z17301) using the common RV primer GCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG that anneals to nt 33–55 of the *U6* sequence. These sequences were used to define *StU6-1* (Z17290), *StU6-2* (Z17292), *StU6-3* (Z17293) and *StU6-4*, *StU6-4a* and *StU6-4b* (Z17301), which were cloned to drive the gRNA expression using Nebuilder assisted Gibson assembly (Supplementary Fig. 2C).

**In silico prediction analysis of GBSS-gRNA1 and 2 targets.** Exon 1 of GBSS, which includes 36 potential gRNA targets, was used as input for evaluation of the ranking of gRNA1 and gRNA2. The *in silico* assisted gRNA selection tools<sup>30</sup> amenable for plants and included in the survey were CHOPCHOP v2 (<http://chopchop.cbu.uib.no/>)<sup>31</sup>, CRISPR-P 2.0 (<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>)<sup>32</sup>, SSC (<http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/>)<sup>33</sup>, CRISPRater (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de/>)<sup>34,35</sup>, and CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>)<sup>36</sup>.

**Protoplast isolation, transformation, editing, ex-plant regeneration.** Protoplast isolation, transformation, editing and ex-plant regeneration were essentially done as described in<sup>12</sup>.

**DNA extraction.** Plant gDNA template for PCR and IDAA was purified with GenElute Plant genomic DNA miniprep kit from Sigma and quantified using nanodrop. gDNA from harvested protoplasts was obtained by suspending the cells in H<sub>2</sub>O, snap freezing in liquid nitrogen followed incubation at 96 °C for 15'.

**Genotyping.** To characterize the target region, different combinations of FW primers ttagaccacacatcacATG, ttagaccacacatcacATGG, GCAAGCATCACAGCTTCACACC, AGCATCACAGCTTCACACCACT and, + SNP FW, and RV primers atcatttagGCCCCGCGACA, AAACGTGGGGTTGATCGTGT, ATGGCCCCAAAGCTGGACTAG and + SNP RV, were used for PCR amplification with CloneAmp™ HiFi PCR Premix (Clontech) in total reaction volumes of 25 µl with 0.25 µM primers and 0.4–0.8 ng/µl gDNA according to the manufacturers recommendations with the PCR parameters of 35 cycles: 98 °C 10", 64 °C 15", 72 °C (60" per 1000 bases, extension). In the attempts to reduce PCR derived chimeras, extension time was doubled and the primer concentration increased twofold. For genotyping of edited plants and protoplasts, the edited region was amplified with + SNP FW and + SNP RV. Gel purified PCR products were cloned using the CloneJet PCR cloning Kit (Thermo Scientific), sequenced by Sanger sequencing at Macrogen and analyzed on the CLC Main Workbench.

**Screening by Indel Detection by Amplicon Analysis (IDAA).** Tri-primer PCR amplicons for IDAA<sup>10</sup> were obtained using the primers + SNP FW, IDAA + SNP RV and Fluorescein Amidite (FAM) labelled FAME, while primers – SNP FW and FAM-labelled –SNP RV were used for di-primer PCR. PCR reactions of 25 µl using CloneAmp™ HiFi PCR Premix (Clontech) with 0.25 µM primers except IDAA + SNP RV at 0.025 µM on a template of 0.4–0.8 ng/µl gDNA or 2.5 µl protoplast cell pool suspension were run with PCR parameters: 98 °C 10", 64 °C 15", 72 °C (60" per 1000 bases, extension) 35 cycles for gDNA, 40 cycles for protoplast suspensions. The PCR product was analysed on a 3500xL Genetic analyzer (Applied Biosystems) as previously described<sup>10</sup>.

**Phenotypic analysis.** Lugol staining was done as described in<sup>29</sup>.

Received: 28 March 2019; Accepted: 29 August 2019;

Published online: 27 November 2019

## References

- Li, J. *et al.* Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J* (2018).
- Nadakuduti, S. S., Buell, C. R., Voytas, D. F., Starker, C. G. & Douches, D. S. Genome Editing for Crop Improvement - Applications in Clonally Propagated Polyploids With a Focus on Potato (*Solanum tuberosum* L.). *Front Plant Sci* **9**, 1607 (2018).
- Potato Genome Sequencing, C. *et al.* Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* **475**, 189–195 (2011).
- D'Hoop B, B. *et al.* Identification of agronomically important QTL in tetraploid potato cultivars using a marker-trait association analysis. *Theor Appl Genet* **127**, 731–748 (2014).
- Puchta, H. The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J Exp Bot* **56**, 1–14 (2005).
- Wang, Y. *et al.* Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* **32**, 947–951 (2014).
- Kusch, S. & Panstruga, R. mlo-Based Resistance: An Apparently Universal "Weapon" to Defeat Powdery Mildew Disease. *Mol Plant Microbe Interact* **30**, 179–189 (2017).
- Lonowski, L. A. *et al.* Genome editing using FACS enrichment of nuclease-expressing cells and indel detection by amplicon analysis. *Nat Protoc* **12**, 581–603 (2017).
- Petersen, B. L. *et al.* Improved CRISPR/Cas9 gene editing by fluorescence activated cell sorting of green fluorescence protein tagged protoplasts. *BMC Biotechnol* **19**, 36 (2019).
- Yang, Z. *et al.* Fast and sensitive detection of indels induced by precise gene targeting. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8 (2015).
- Yang, Z. *et al.* Fast and sensitive detection of indels induced by precise gene targeting. *Nucleic Acids Res* **43**, e59 (2015).
- Nicolia, A. *et al.* Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *J Biotechnol* **204**, 17–24 (2015).
- Clasen, B. M. *et al.* Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J* **14**, 169–176 (2016).
- Andersson, M. *et al.* Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep* **36**, 117–128 (2017).
- Long, L. *et al.* Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing in cotton by improved sgRNA expression. *Plant Methods* **14**, 85 (2018).

16. Wang, S. *et al.* Efficient targeted mutagenesis in potato by the CRISPR/Cas9 system. *Plant Cell Rep* **34**, 1473–1476 (2015).
17. Hu, Y. Q., Brown, J. W., Waugh, R. & Turner, P. C. Cloning and characterisation of a U6 small nuclear RNA gene from potato. *Biochim Biophys Acta* **1129**, 90–92 (1991).
18. Guerineau, F. & Waugh, R. The U6 small nuclear RNA gene family of potato. *Plant Mol Biol* **22**, 807–818 (1993).
19. Allen, F. *et al.* Predicting the mutations generated by repair of Cas9-induced double-strand breaks. *Nat Biotechnol* (2018).
20. Koornneef, M., Dellaert, L. W. & van der Veen, J. H. EMS- and radiation-induced mutation frequencies at individual loci in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Mutat Res* **93**, 109–123 (1982).
21. Wang, S. *et al.* No off-target mutations in functional genome regions of a CRISPR/Cas9-generated monkey model of muscular dystrophy. *The Journal of biological chemistry* **293**, 11654–11658 (2018).
22. Andersson, M. *et al.* Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. *Physiol Plant* **164**, 378–384 (2018).
23. Ainsworth, C., Clark, J. & Balsdon, J. Expression, organisation and structure of the genes encoding the waxy protein (granule-bound starch synthase) in wheat. *Plant Mol Biol* **22**, 67–82 (1993).
24. Smyth, R. P. *et al.* Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene* **469**, 45–51 (2010).
25. Gao, C. The future of CRISPR technologies in agriculture. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 275–276 (2018).
26. Barrell, P. J., Meiyalaghan, S., Jacobs, J. M. & Conner, A. J. Applications of biotechnology and genomics in potato improvement. *Plant Biotechnol J* **11**, 907–920 (2013).
27. Li, J. F. *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* **31**, 688–691 (2013).
28. Nishimasu, H. *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell* **156**, 935–949 (2014).
29. Heilersig, H. J., Loonen, A., Bergervoet, M., Wolters, A. M. & Visser, R. G. Post-transcriptional gene silencing of GBSSI in potato: effects of size and sequence of the inverted repeats. *Plant Mol Biol* **60**, 647–662 (2006).
30. Chuai, G. H., Wang, Q. L. & Liu, Q. In Silico Meets In Vivo: Towards Computational CRISPR-Based sgRNA Design. *Trends Biotechnol* **35**, 12–21 (2017).
31. Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B. & Valen, E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res* **44**, W272–276 (2016).
32. Liu, H. *et al.* CRISPR-P 2.0: An Improved CRISPR-Cas9 Tool for Genome Editing in Plants. *Mol Plant* **10**, 530–532 (2017).
33. Xu, H. *et al.* Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design. *Genome Res* **25**, 1147–1157 (2015).
34. Stemmer, M., Thumberger, T., Del Sol Keyer, M., Wittbrodt, J. & Mateo, J. L. CCTop: An Intuitive, Flexible and Reliable CRISPR/Cas9 Target Prediction Tool. *PLoS One* **10**, e0124633 (2015).
35. Labuhn, M. *et al.* Refined sgRNA efficacy prediction improves large- and small-scale CRISPR-Cas9 applications. *Nucleic Acids Res* **46**, 1375–1385 (2018).
36. Prykhodzij, S. V., Rajan, V., Gaston, D. & Berman, J. N. CRISPR multitargeter: a web tool to find common and unique CRISPR single guide RNA targets in a set of similar sequences. *PLoS One* **10**, e0119372 (2015).

## Acknowledgements

This work was supported by Kartoffelafgiftsfonden, The Danish Councils for Strategic and Independent Research (12–125709, 12–131859), The Danish National Research Foundation (DNRF107), the Copenhagen University Excellence Program for Interdisciplinary Research (CDO2016) and National Science Foundation (NSF) (1755482).

## Author contributions

I.E.J., B.L.P. and E.A. designed the experiments; K.L.N. performed U6 sequence retrieval and associated analysis, I.E.J. performed the experiments and Y.L. IDAA analysis; B.J. advised on potato tissue culture work; A.B. advised on starch analyses; E.P.B. advised on IDAA analysis. B.L.P., I.E.J., K.L. and A.B. wrote the manuscript.

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

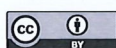
## Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54126-w>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to B.L.P.

Reprints and permissions information is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

### **Bilag 3.**

#### **Baggrund**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# Skema A: Hovedansøgningskema

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

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

Ansøger



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

### Ansøgers bekræftelse


#### A16. Ansøgers bekræftelse:

Ved enkeltvirksomhedsprojekter underskrives hovedansøgningsskemaet af virksomhedens/institutionens økonomiansvarlige. Ved samarbejdsprojekter underskrives ansøgningsskemaet af hovedansøgers økonomiansvarlige eller projektleder.

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

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

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

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

### Projektform og virksomhedsstørrelse

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

### Nøglepersoner

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

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

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

--	--	--	--

## Ansøgninger med forskningsandel

### A20. Forskningsfaglig vurdering:

OBS! Hvis projektet er søgt med forskningsandel skal skema E udfyldes.

## Detaljeret beskrivelse af projektet

### A21. Projektets baggrund, formål og arbejdsplaner: (maks. 5.000 tegn)

#### Baggrund

På verdensplan er kartoffel den fjerdestørste afgrøde og Danmark er førende indenfor produktion af læggekartofler og stivelse. Produktionen står overfor nye udfordringer med hensyn til miljø og folkesundhed og ønsket om bedre kvalitet. I de seneste år er forbruget af pesticider blevet en større økonomisk belastning for erhvervet og står samtidig i vejen for en miljøvenlig produktion. Desuden udgør pesticidforbruget en trussel mod grundvandet og en helbredsrisiko for befolkningen.

Kartoffelbladplet (*Alternaria solani* og *A. alternata*) er et stigende problem, mens kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) udgør den største trussel, og efter introduktionen af kønnede stadier tidligt i 1970'erne har kartoffelskimmelen hurtigt udviklet nye smitteracer, som har overvundet R-gen betinget resistens. Desuden kan et varmere klima og mere regn i vækstsæsonen forværre sygdomsangrebene. For at bekæmpe rettidigt overvåges sygdomsudbredelsen nøje, men i praksis sprøjter mange landmænd ugentlig. Derfor udgør bekæmpelse af kartoffelskimmel mindst 20% af landbrugets samlede fungicidforbrug. Økonomisk betyder det en estimeret omkostning på 4000 kr/ha/år til forebyggelse af skimmel og bladplet, hvilket på landsplan med 30.000 ha, hvor der dyrkes stivelseskartofler i Danmark, giver en årlig omkostning på over 120 mill. kr.

Forsinkelse af sygdomsudbredelsen kan mindske behovet for sprøjtning væsentligt, og derfor er sorter med forøget resistens en attraktiv mulighed. Mens R-gen betinget resistens har begrænset varighed, anses susceptibilitets gener (S-gener) for at have en bedre mulighed for at give varig beskyttelse. S-gener er nødvendige for skimmels etablering og vækst i planten, og hvis de slås ud, opnås en mindre modtagelighed og i nogen tilfælde også beskyttelse mod flere sygdomme. På SLU har Erik Andreasson opnået gode resultater med flere gener med op til 50% reduktion af skimmelinfektionen. For at drage nytte af disse forskningsresultater i danske elitesorter, er der brug for en forædlingsteknologi, som ikke påvirker de øvrige dyrkningsegenskaber og kvaliteter. Forædling har traditionelt benyttet sig af krydsning, kemisk behandling eller betråling. Fælles for disse er, at de ikke giver mulighed for at bevare elitesorterne, fordi de skaber nye genkombinationer eller mange uønskede mutationer. En ny biologisk baseret metode, bedre kendt som CRISPR teknologi, benytter sig af et enzym (Cas9), som ved hjælp af et lille stykke guideRNA (gRNA), bliver dirigeret til præcist det gen, der ønskes slukket for. Både enzymet og gRNA molekylet nedbrydes hurtigt herefter, så man ender med en mutation, som ikke er anderledes, end hvad der kan opstå naturligt, eller som opnås med traditionelle forædlingsmetoder – dog med den store fordel, at der ikke sker andre ændringer. På KU-PLEN har vi opnået betydelig ekspertise på området, og har med præcis forædling fremstillet en variant af elitesorten Wotan med amylosefri stivelse.

#### Status ved projektstart:

- Effektivt genkonstrukt til produktion af amylosefri og lav sukker stivelse i knolden
- Knolde af CRISPR forædlet amylosefri (GBSS) linjer klar til AP4
- 1. generation kartofler-planter med CRISPR-forædlet lav-sukker (GWD) forventes klar til AP4
- Et antal S-gen kandidater, som SLU har vist mindsker skimmelangreb, klar til AP1

#### Formål

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

#### Arbejdspakker

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

#### AP1: gRNA selektion

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

#### AP2: DNA-fri CRISPR

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

#### AP3: Resistens analyse

Analyse af sygdomsresistens med "detached leaf assays".

#### AP4: Stivelses kvalitet

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

#### AP5: Markforsøg

Opformering og dyrkningstest.

#### AP6: Projektledelse

### A22. Projektets nyhedsværdi: (maks. 1.500 tegn)

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

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

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

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

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

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

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

Effektskema 1 – Grøn bæredygtighed						
Parameter		Effekt (husk enhed)	Udbredelse (husk enhed)	Total effekt (effekt x udbredelse)	Forventes opnået år	Kildehenvisning
Begrænset påvirkning af miljøet fra næringsstoffer (N og P), pesticider og klimagasser	Kvælstof (N)					
	Fosfor (P)					
	Pesticider	5 sprøjtninger	30.000 ha/år	150.000 s x ha/år	2030	PI DS
	Klimagasser (CO <sub>2</sub> -ækv.)					

Effektskema 2 – Grøn bæredygtighed		
Parameter	Kort beskrivelse (maks. 240 tegn)	
Bæredygtig ressourceanvendelse		
Fødevaresikkerhed, fødevarekvalitet, human sundhed og ernæring	Fødevaresikkerhed	
	Fødevarekvalitet	

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

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

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

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

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

**Effektskema - Projektets provenu**

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


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

### Effektskema – Projektets videre økonomiske effekt

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

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

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

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

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

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

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

genomanalyse.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

#### **A28. Kommunikationsplan:** (maks. 2.500 tegn)

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

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

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

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

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

#### **A29. Forretningsplan**

#### **A30. Angiv hvilken deltager forretningsplanen vedrører:**

KMC

OBS! Skal ikke udfyldes af netværksprojekter

#### **A31. Projektets output:** (maks. 2.500 tegn)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### A33. Forretningsgrundlag: (maks. 2.500 tegn)

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

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

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

#### A34. Forretningsmodel: (max 2.500 tegn)

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

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

#### A35. Risikoanalyse: (max 2.500 tegn)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## Persondata

### A36. Offentliggørelse af persondata på internettet.

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

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

## Tjekliste

### A37. Tjekliste inden du indsender ansøgningsmaterialet:

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

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

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

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



Arbejdstilsynet

KMC, KARTOFFELMELCENTRALEN, AMBA  
Herningvej 60  
7330 Brande

Arbejdstilsynet  
Tilsynscenter Øst  
Landskronagade 33  
2100 København Ø

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

CVR 21481815

6. marts 2020

Sag  
20200006235/4  
Ansvarlig:  
Rikke Kolding Hansen

P 1000884898

Side 1/2

### Afgørelse om klassifikation til genteknologisk arbejde klasse planter (genetiske modificerede kartofler)

Ole Bandsholm har med henvendelse af den 6. februar 2020 søgt om klassifikation til genteknologisk arbejde klasse planter (genetiske modificerede kartofler) i støvlaboratorium 215 beliggende Herningvej 60, 7330 Brande.

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".

Yderligere bilag:

- Oversigt KMC's Arbejdsmiljøorganisation.
- Plantegning.

Ansøgningen har været forelagt Miljøstyrelsen (MST j. nr. 2020-7984), som den 6. marts 2020 har fremsendt følgende bemærkninger:

*"Miljøstyrelsen har den 4. marts 2020 foretaget besigtigelse af lokalerne.*

*Miljøstyrelsen har lagt følgende forhold, som fremgår af anmodningen og besigtigelsen, til grund for vurderingen af den fysiske indeslutning:*

- Døre og vinduer holdes lukket når der arbejdes med genetisk modificerede kartofler.
- Der er udarbejdet forskrifter for transport af GMO kartofler.
- Affald der kan indeholde rester af GMO opsamles og autoklaveres og bortskaffes herefter
- Der er ikke gulvafløb i lokalet.

*Miljøstyrelsen vurderer, at oplyste sikkerhedsrutiner og etablerede indeslutningsforanstaltninger forebygger, at genetiske modificerede kartofler kan sprede sig fra lokalet til omgivelserne.*

*Miljøstyrelsen har på det foreliggende grundlag ingen indvendinger mod en klassifikation af lokalet til arbejde med genetisk modificerede kartofler.”*

### **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 planter (genetiske modificerede kartofler).

### **Afgørelse**

På baggrund af ovenstående meddeler Arbejdstilsynet hermed klassifikation til genteknologisk arbejde klasse planter (genetiske modificerede kartofler) i støvlaboratorium 215 beliggende KMC, KARTOFFELMELCENTRALEN, AMBA, Herningvej 60, 7330 Brande, jf. § 7, stk. 1, til Arbejdstilsynets bekendtgørelse om genteknologi og arbejdsmiljø nr. 910 af 11. september 2008.

**Lokalerne har fået tildelt lab. id. nr.: 230 582**

### **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





**Arbejdstilsynet**

KMC, KARTOFFELMELCENTRALEN, AMBA  
Herningvej 60  
7330 Brande

Arbejdstilsynet  
Tilsynscenter Øst  
Landskronagade 33  
2100 København Ø

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

CVR 21481815

9. marts 2020

**Sag**

20200014678/4

Ansvarlig:

Rikke Kolding Hansen

CVR 15230614

P 1000884898

Side 1/2

### **Afgørelse om genteknologisk forskningsprojekt klasse planter "KRISPS"**

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

Ansøgningen har været forelagt Miljøstyrelsen, der ingen indvendinger har.

### **Vurdering**

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

### **Afgørelse**

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

### **Vejledning**

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

### **Klage**

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

Venlig hilsen

Rikke Kolding Hansen