



Kim Hebelstrup og Anders Vestergaard  
Forsøgsvej 1  
4200 Slagelse

J.nr. 2026-70895  
Ref. morsto  
Dato: 01-05-2026

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

Charlotte Frihauge  
AKV AmbA,  
Gravsholtvej 92,  
9310 Vodskov

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

### **Godkendelse af ansøgning om forsøgsudsætning af cisgene kartofler i sædskifteforsøg**

Den 19. marts 2026 modtog Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri en fuld-stændig ansøgning fra AU Flakkebjerg og AKV AmbA om tilladelse til forsøgsudsætning af cisgene kartofler i sædskifteforsøg på et areal ved AU Flakkebjerg (Slagelse Kommune) og AKV AmbA (Vodskov, Aalborg Kommune) i vækstperioden frem til hhv. 30. oktober 2028 og 30. oktober 2029, jf. bilag 1.

Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri vurderer, at ansøgningens oplysninger<sup>i</sup> er i overensstemmelse med direktiv 2001/18/EF<sup>ii</sup>, og at der ikke vil være uønskede miljø- og sundhedsmæssige konsekvenser forbundet med forsøgsudsætningen. Derfor vurderer Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, at udsætningen kan finde sted<sup>iii</sup>.

Godkendelsen gives på baggrund af ansøgningens oplysninger om forsøgsudsætningens gennemførelse og oplysninger om den genetisk modificerede plante, ansøgers risikovurdering og med de i denne afgørelse fastsatte vilkår<sup>iv</sup>. Bemærk særligt vilkår 1.4 om at afklippe blomster for at minimere risikoen for spredning af pollen.

Vilkårene i denne afgørelse kan påklages særskilt. Se nærmere herom i afsnittet ”Hvis I vil klage”.

Godkendelsen til forsøgsudsætningen gives for en periode fra dags dato indtil hhv. 30. oktober 2028 (Flakkebjerg) og 30. oktober 2029 (Vodskov). Herefter følger en periode, hvor tilladelsesarealet skal overvåges, jf. de i denne afgørelse fastsatte vilkår.

Forsøgsudsætningen er omfattet af reglerne i lov om miljø og genteknologi<sup>v</sup>.

Denne afgørelse fremsendes i øvrigt til Slagelse Kommune og Aalborg Kommune, da kommunalbestyrelserne, ifølge lov om miljø og genteknologi<sup>vi</sup>, er klageberettigede.

### **Forsøgsudsætningen**

Godkendelsen omfatter forsøgsudsætning af GM-kartofler, med to tilførte gener fra 2 *Solanum*-arter som er krydsningskompatible med *Solanum tuberosum*, Rpi-vnt1.1 fra *Solanum venturii*; Rpi-sto1 fra *Solanum stoloniferum*, samt deres promotorer er

indsat som én kontinuær insertion i kartoffelsorten Kuras. Begge gener er kendte racespecifikke resistensgener mod kartoffelskimmel forårsaget af *Phytophthora infestans* af typen NB-LRR-gener, som populært kaldes R-gener. De indsatte R-gener er kendte og velkarakteriserede resistensgener mod *P. infestans*. Derfor forventes kartoffellinjer, som indeholder og udtrykker disse gener, at være mere modstandsdygtige overfor kartoffelskimmel end deres baggrundsort (Kuras eller Atlantic). I alle andre aspekter forventes de rekombinante linjer at være fænotypisk identiske med baggrundssorten. Det er derfor også forventningen, at denne stacking af komplementære R-gener giver en betydeligt længerevarende effektiv resistens end hos sorter, som kun indeholder et enkelt R-gen. Det forventes at resistensgenerne udtrykkes i hele planten. Derfor er det forventningen, at de frembragte sorter har brug for betydeligt færre behandlinger med svampebekæmpelsesmidler og med mindre mængde aktivt stof.

Der er ikke fundet tegn på at uønskede dele af den anvendte plasmid-vektor er indsat i de anvendte linjer, og der er ikke tilføjet antibiotikaresistensmarkørgener.

Yderligere informationer om den påtænkte forsøgsudsætning findes i vedlagte ansøgning, jf. bilag 1.

Forsøgsudsætningen, som er registreret i Styrelsen for Grøn Arealomlægning og Vandmiljøets fællesskema (FS), skal foregå i bloknummer 651133-27 (Flakkebjerg) og markbloknummer 565332-85 (Vodskov, internet markkort), som ligger ved hhv. Slagelse og Vodskov, jf. bilag 1. Det samlede forsøgsareal, hvor der dyrkes GM kartofler, vil under hele markforsøget ikke overstige 7.200 m<sup>2</sup> for Flakkebjerg-lokationen og 9.415 m<sup>2</sup> for Vodskov-lokationen. Forsøgsarealet inklusive værn og stier vil udgøre ikke over 720 m<sup>2</sup> for Flakkebjerg-lokationen og 1.231 m<sup>2</sup> for Vodskov-lokationen. Forsøgsudsætningen vil foregå i fra 15. marts til 30. oktober i dyrkningssæsonerne i 2026 til 2028 (Flakkebjerg) og 15. marts til 30. oktober 2026 til 2029 (Vodskov).

Formålet med udsætningen i Flakkebjerg er at undersøge muligheden for at reducere anvendelse af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*) i kartoffel. Der bruges en blanding af lucerne og vikke i sædskiftet. Lucerne/vikke planterne i forsøget er ikke GMO. Forsøget vil bestå af behandlede og ubehandlede parceller.

Formålet med udsætningen i Vodskov er at undersøge reduceret anvendelse af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*).

Hele den forsøgsmæssige udsætning er afsluttet, når overvågningsperioden og virksomhedens egenkontrol er afsluttet (jf. Egenkontrol og logbog, vilkår 1.10- 1.11).

### **Begrundelse**

Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri har anmodet Danmarks Tekniske Universitet (DTU) og Aarhus Universitet (AU, Institut for Ecoscience) om at vurdere ansøgningsmaterialet i forhold til den gældende lovgivnings krav og at foretage en vurdering i forhold til påvirkninger af hhv. mennesker og dyrs sundhed, natur og miljø samt af den risikovurdering, som er fremlagt af ansøger.

AU har vurderet risikoen for, om GM-kartoflerne kan spredes til:

- Omgivelserne (dyrkningsfladen),
- Naturen,
- Vilde slægtninge (via pollen),
- Konventionelt dyrkede kartofler.

AU har desuden vurderet risikoen for effekter på naturen og miljøet i øvrigt. Endelig har AU vurderet behovet for overvågning, samt om ansøgers risikohåndtering er fyldestgørende.

AU har vurderet, at de af ansøger foreslåede tiltag for at hindre spredning af materiale fra de cisgene kartofler sikrer, at der er en negligerbar risiko for, at der sker spredning til omgivelserne, men at blomsterne skal afklippes for at forhindre frø og derved evt. spredning til omgivelserne. Den genetiske modificering forventes ikke at ændre de modificerede kartoflers påvirkning på natur og miljø i forhold til andre konventionelt dyrkede kartofler. AU oplyser desuden, at den af ansøger foreslåede overvågning vurderes at være tilstrækkelig.

DTU har foretaget en sundhedsmæssig risikovurdering af de cisgene kartofler, herunder af den genetiske ændring. DTU vurderer, at et 'worst case scenario', hvor de genmodificerede kartofler spredes til nabomarker via knolde og pollen, ikke vil udgøre et sundhedsmæssigt problem baseret på viden om konstruktionen. De forventede nye egenskaber er ikke forbundet med en sundhedsrisiko for kartoflerne og forårsager ikke dannelsen af nye indholdsstoffer.

Universiteternes vurderinger er vedhæftet denne afgørelse, jf. bilag 2, og er desuden tilgængelige på styrelsens hjemmeside.

Styrelsen har gennemført en høring blandt Europa-Kommissionen og EU-medlemsstaterne. Der er ikke kommet nogen høringssvar i denne høring. Styrelsen har endvidere gennemført en høring blandt myndigheder, organisationer og offentligheden i Danmark om forsøgsudsætningen<sup>vii</sup>. Et notat, der sammenfatter de indkomne høringssvar kan findes på Høringsportalen<sup>viii</sup>.

Det er på grundlag af oplysningerne i ansøgningen, universiteternes risikovurdering samt de modtagne høringssvar, styrelsens vurdering, at der ikke vil være uønskede miljø- og sundhedsmæssige konsekvenser forbundet med forsøgsudsætningen, hvis forsøgsudsætningen gennemføres som beskrevet i ansøgningen.

Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri finder dog, at det er nødvendigt bl.a. af hensyn til styrelsens tilsyn at fastsætte yderligere vilkår for forsøgsudsætningen. Forsøgsudsætningen skal derfor udføres i overensstemmelse med de nedenfor anførte vilkår.

## **Vilkår**

### **1. Vilkår for gennemførelse af forsøgsudsætningen**

I dette afsnit forstås ved

*Tilladelsesarealet*: Arealet, som godkendelsen omfatter (markblokken).

*Forsøgsarealet:* Det eller de arealer indenfor tilladelsesarealet, hvor der dyrkes genetisk modificerede planter og konventionelle planter, som indgår i forsøget (bruttoarealet).

*GMO-forsøgsarealet:* Det eller de arealer på forsøgsarealerne, hvor der alene dyrkes genetisk modificeret planter (netto-arealet).

*Sikkerhedsafstand:* Afstanden til andre afgrøder, målt i meter, fra ethvert punkt i forsøgsarealets afgrænsning.

### **Forberedelse af forsøget**

1.1 Forsøgsarealer skal markeres tydeligt, f.eks. med pinde, der afgrænser hhv. tilladelsesarealet og GMO-forsøgsarealet. En tegning eller foto af dette sendes til LFST på mail: planterogbiosikkerhed@fvst.dk, senest ved lægning af kartofler. Denne markering opretholdes, indtil egenkontrollen med tilladelsesområdet er ophørt, jf. Egenkontrol og logbog, vilkår 1.10-1.11. Årsagen til markeringen er, at de to arealer (tilladelsesarealet og GMO-forsøgsarealet) af hensyn til tilsynet skal kunne identificeres, mens GM-kartoflerne dyrkes samt i den efterfølgende overvågningsperiode.

1.2 Ansøger angiver i ansøgningen, at der vil være mindst 15 meter til nærmeste mark, uden angivelse af hvilken type kartoffelmark (spise- eller læggekartofler). Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri pålægger imidlertid ansøger, at sikkerhedsafstanden (se definitioner) til dyrkning af læggekartofler skal være mindst 20 meter. Sikkerhedsafstanden til dyrkning af kartofler til produktion af spisekartofler skal være mindst 10 meter. Disse sikkerhedsafstande er i overensstemmelse med sikkerhedsafstandene i bekendtgørelse om dyrkning m.v. af genetisk modificerede afgrøder (Bek. Nr. 745 af 30/05/2022) og er fastsat på baggrund af rådgivning fra eksperter fra Aarhus Universitet, jf. bestillingen fra 2015: 'Opdatering af viden og data der ligger til grund for dyrkningsvejledninger for dyrkning af visse genetisk modificerede afgrøder'<sup>ix</sup>.

### **Gennemførelse af forsøget**

1.3 Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal forud for lægningen underrettes om dato og tid for lægning. Denne underretning skal finde sted senest kl. 12:00 dagen før lægningen. Årsagen er, at Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal have mulighed for at føre tilsyn med lægningen og skal kunne være til stede ved lægningens påbegyndelse.

1.4 Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal underrettes om påbegyndt blomstring i GM-afgrøden. Denne underretning skal finde sted hurtigst muligt ved synlige blomster i GM-afgrøden. Årsagen er, at Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal have mulighed for at føre tilsyn med, at blomster afklippes for at minimere risikoen for spredning af pollen, jf. udtalelsen fra AU om, at blomsterne skal afklippes for at forhindre frø og derved evt. spredning til omgivelserne.

1.5 Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal forud for høst underrettes om dato og tid for høst. Denne underretning skal finde sted senest kl. 12:00 dagen før høsten. Årsagen er, at Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal have mulighed for at føre tilsyn med høsten og derfor skal kunne være til stede ved høstens påbegyndelse.

### **Overvågning af tilladelsesarealet efter høst**

1.6 Eventuelle fremspirende kartofler skal fjernes og testes med den i ansøgningen angivne metode. Resultatet af denne test meddeles Styrelsen for Fødevarer,

Landbrug og Fiskeri. Årsagen til dette vilkår er, at Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal føre tilsyn med de i ansøgningen godkendte oplysninger om tilsyn, overvågning og efterbehandling- og affaldshåndteringsplaner, jf. pkt. 4 i ansøgningen.

1.7 De pågældende områder, hvor forsøgsudsætningen er sket, overvåges i yderligere fire vækstsæsoner for eventuelle fremspirende kartofler. Dette krav er baseret på rådgivning fra eksperter fra Aarhus Universitet, jf. bestillingen fra 2021: 'Opdatering af det faglige bidrag vedrørende dyrkning af GM-afgrøder af raps, majs, kartofler, bederoer, hvede og byg'<sup>x</sup>.

1.8 Hvis der i overvågningsperioden fremspirer GM-kartofler på tilladelsesarealet, vil det medføre, at overvågningsperioden forlænges med fire vækstsæsoner, medmindre det kan påvises, at det ikke er en GM-kartoffel. Forlængelsen af overvågningsperioden er baseret på rådgivning fra eksperter fra Aarhus Universitet, jf. bestillingen fra 2021: 'Opdatering af det faglige bidrag vedrørende dyrkning af GM-afgrøder af raps, majs, kartofler, bederoer, hvede og byg'.

1.9 Hvis der i overvågningsperioden findes fremspirende kartofler, skal ansøger uden ugrundet ophold underrette Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, medmindre det kan påvises, at det ikke er en GMO-kartoffel.

### **Egenkontrol og logbog**

1.10 Gennemførelse af egenkontrollen skal dokumenteres i en logbog. Det skal af logbogen klart fremgå:

- Hvilke forhold, der er ført egenkontrol med.
- Hvornår egenkontrolaktiviteten er gennemført.
- Hvem der har gennemført egenkontrolaktiviteten.
- Resultaterne af egenkontrolaktiviteten.

Årsagen er, at egenkontrollen indgår i den endelige vurdering af, hvornår overvågningen er afsluttet, jf. afsnittet "Afslutning af forsøget".

1.11 Logbogen skal føres af den for forsøgsudsætningen ansvarlige eller en eller flere af denne udpegede medarbejdere, og Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri skal underrettes om, hvem der udpeges. Årsagen er, at Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri til hver en tid skal være bekendt med, hvem der er ansvarlige for forsøgsudsætningen.

### **Afslutning af forsøget**

1.12 Forsøgsudsætningen og egenkontrollen er afsluttet, når ansøger har dokumenteret, at der i fire vækstsæsoner i træk ikke har været fremspirende GM-kartofler på forsøgsarealet blandt andet på grundlag af dokumentationen i logbogen, jf. Egenkontrol og logbog, vilkår 1.10-1.11.

## **2.                   Vilkår for rapportering**

2.1 Hvis der sker personændringer i kredsene af ansvarlige for forsøgsudsætningen eller den daglige drift, skal dette uden ophold meddeles Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri. Årsagen er, at Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri til hver en tid skal være bekendt med, hvem der er ansvarlige for forsøgsudsætningen.

2.2 Ansøger skal en gang årligt afrapportere resultaterne af egenkontrollen (logbogen) til Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri. Afrapporteringen af egenkontrollen skal være Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri i hænde senest med udgangen af januar hvert år, frem til afslutningen af hele forsøgsudsætningen, jf.

afsnittet 'Afslutning af forsøget'. Årsagen er, at egenkontrollen indgår i den endelige vurdering af, hvornår overvågningen er afsluttet.

2.3 Ansøger indsender delrapporter efter endt overvågningsperiode for de i dyrkningsåret 2026, anvendte arealer samt en endelig rapport efter overvågningsperioden for dyrkningsårene 2028 (Flakkebjerg lokationen) og 2029 (AKV-lokationen) er afsluttet. Delrapporterne udarbejdes i overensstemmelse med skabelonen i bilaget til Kommissionens beslutning (2003/701/EF) af 29. september 2003, jf. beslutningens artikel 3, stk. 1. Kommissionens beslutning med tilhørende bilag er vedlagt denne afgørelse (bilag 3). Årsagen til delrapporteringerne er, at de enkelte dyrkningsarealer kan frigives løbende. Indsendelse af rapporter skal ske elektronisk.

2.4 Når forsøgsudsætningen og overvågningsperioden er endeligt afsluttet, skal ansøger udarbejde en endelig rapport om forsøget. Slutrapporten skal bl.a. bruges til at underrette Europa-Kommissionen og de øvrige medlemsstater i EU om, at forsøgsudsætningen er afsluttet.

2.5 Til den endelige afrapportering benyttes den rapporteringsmodel, der fremgår af bilaget til Kommissionens beslutning (2003/701/EF) af 29. september 2003 om fastlæggelse i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/18/EF af en model for fremlæggelse af resultatet af udsætning i miljøet af genetisk modificerede højerestående planter i andet øjemed end markedsføring.

2.6 Slutrapporten skal være Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri i hænde senest 30 dage efter forsøgsudsætningens endelige afslutningsdato.

### **Tilsyn og offentliggørelse**

Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri fører tilsyn med, at forsøgsudsætningen følger de i ansøgningen anførte foranstaltninger og med, at ovenstående vilkår overholdes<sup>xi</sup>. Tilsynet vil blive planlagt og varslet, så Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri har mulighed for at overvåge lægning af kartofler, høst og evt. et tilsyn i løbet af blomstringsperioden<sup>xii</sup>. Tilsynet koordineres med ansøger, så det foregår på et for planternes udvikling hensigtsmæssigt tidspunkt.

Manglende overholdelse af de i denne afgørelse fastsatte vilkår kan straffes med bøde<sup>xiii</sup>.

Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri har oprettet et register på styrelsens hjemmeside, [www.lfst.dk](http://www.lfst.dk), hvor følgende oplysninger om forsøgsudsætningen bliver offentliggjort<sup>xiv</sup>:

- 1) Ansøgers navn og adresse, beskrivelse af den eller de genetisk modificerede organismer, formålet med udsætningen og stedet for udsætningen.
- 2) Resumé af de miljø-, natur- og sundhedsmæssige risikovurderinger.
- 3) Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeris vurdering af sagen.
- 4) Vilkårene for gennemførelsen af forsøgsudsætningen (pkt. 1) samt vilkår om rapportering under og efter, at udsætningen er fuldført (pkt. 2).

### **Hvis I vil klage**

Hvis I er uenig i vores afgørelse med tilhørende vilkår, kan I klage over den. I skal sende klagen inden 4 uger fra den dag, hvor I fik dette brev.

I klager via klageportalen, som I finder på Nævnenes Hus' hjemmeside. Derinde kan I læse, hvordan I skal gøre, og se status på jeres sag. I logger på klageportalen med MitID.

Jeres klage bliver automatisk sendt til os i Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri. Hvis vi fastholder vores afgørelse, sender vi klagen videre til Miljø- og Fødevareklagenævnet via klageportalen. I får besked, hvis vi sender jeres klage videre.

Hvis I ikke sender jeres klage via klageportalen, afviser Miljø- og Fødevareklagenævnet jeres klage, medmindre I er fritaget for brug af klageportalen. I kan læse mere om fritagelse fra klageportalen på nævnets hjemmeside.

Venlig hilsen

Morten Storgaard / morsto@fvst.dk  
Chefkonsulent  
Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri

## Bilag

Bilag 1: Ansøgning med tilhørende bilag

Bilag 2: Universiteternes miljø- og sundhedsmæssige risikovurderinger

Bilag 3: Kommissionens beslutning (2003/701/EF) af 29. september 2003 om fastlæggelse i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/18/EF af en model for fremlæggelse af resultatet af udsætning i miljøet af genetisk modificerede højerestående planter i andet øjemed end markedsføring

---

<sup>i</sup> Jf. § 4, stk. 1, i BKG nr. 37 af 19. januar 2012 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

<sup>ii</sup> Direktiv 2001/18/EF af 9. marts 2001 om udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer

<sup>iii</sup> § 9, stk. 1, og stk. 2 nr. 1, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

<sup>iv</sup> Jf. § 16, stk. 1, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

<sup>v</sup> LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om miljø og genteknologi.

<sup>vi</sup> Jf. § 26, stk. 2, og § 30, stk. 1, nr. 3, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om miljø og genteknologi.

<sup>vii</sup> § 9 i BKG nr. 37 af 19. januar 2012 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

<sup>viii</sup> [www.hoeringsportalen.dk](http://www.hoeringsportalen.dk)

<sup>ix</sup> [https://pure.au.dk/portal/files/225933839/Levering\\_Opdatering\\_af\\_viden\\_og\\_data\\_der\\_ligger\\_til\\_grund\\_for\\_dyrkningsvejledninger\\_for\\_dyrkning\\_af\\_visse\\_GM\\_afgr\\_der.pdf](https://pure.au.dk/portal/files/225933839/Levering_Opdatering_af_viden_og_data_der_ligger_til_grund_for_dyrkningsvejledninger_for_dyrkning_af_visse_GM_afgr_der.pdf).

<sup>x</sup> [https://pure.au.dk/portal/files/101255558/Opdatering\\_af\\_det\\_faglige\\_bidrag\\_vedr\\_rende\\_dyrkning\\_af\\_GM\\_afgr\\_der\\_280915.pdf](https://pure.au.dk/portal/files/101255558/Opdatering_af_det_faglige_bidrag_vedr_rende_dyrkning_af_GM_afgr_der_280915.pdf).

<sup>xi</sup> Jf. § 20, stk. 1, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017 om miljø og genteknologi.

<sup>xii</sup> § 4, stk. 3, i BKG nr. 37 af 19. januar 2012 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

<sup>xiii</sup> Jf. § 36, stk. 1, nr. 3 og stk. 5, i LBK nr. 9 af 4. januar 2017.

<sup>xiv</sup> § 10, stk. 2, i BKG nr. 37 af 19. januar 2012 om godkendelse af udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer.

# Ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg

# Indhold

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

Underskrift .....

Bilag .....

Appendix: .....

## A. Generelle oplysninger

### A.1 Anmelderens navn og adresse

Kim Hebelstrup, Aarhus Universitet, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse

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

Anders Vestergaard, Aarhus Universitet, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse

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

Charlotte Frihauge, AKV AmbA, Gravsholtvej 92, 9310 Vodskov

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

### A.2 De ansvarligere forskeres navne

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

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

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

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

Hans Hansen

Thor Hougaard

Josefine Frost

Henrik Jespersen

Henrik Skydebjerg

Anders Vestergaard

Laborant der erhverver GMO kørekort:

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

Markforsøgs personale fra AKV der har erhvervet GMO kørekort:

Tommi Støttrup

Charlotte Frihauge

### A.3 Projektets titel

Udsætning af cisgene kartofler i sædskifteforsøg

### A.4 Udsætningen

#### A.4.A Formålet med udsætningen

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

For Flakkebjerg:

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

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

Forsøget vil bestå af behandlede og ubehandlede parceller.

For AKV:

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

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

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

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

#### A.4.C Udsætningsmetode

I Flakkebjerg:

Lucerne/vikke: Der udplantes fra frø i parceller

I både Flakkebjerg og AKV:

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

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

##### **Forår:**

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

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

Normal behandling mod ukrudt, skadedyr og sygdomsbekæmpelse.

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

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

##### **Høst (optagning):**

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

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

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

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

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

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

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

Kartofler: 3 - 6 planter per kvm.

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

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

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

For Flakkebjerg:

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

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

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

For AKV:

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

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

Udsætningsstedet er beliggende i et konventionelt dansk landbrugsareal.

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

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

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

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

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

§3 mose: 200 meter

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

§3 sø: 350 meter

§3 mose: 203 meter

§3 eng: 203 meter

## B. Videnskabelige oplysninger

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

#### B.1.a Fuldstændige navne

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

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

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

#### B.1.c Reproduktion

i)

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

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

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

ii)

I naturen sker der yderst sjældent spontant krydsning mellem kultivarer (sorter) af kartofler, hvorfor risiko for krydsbestøvning anses som værende ubetydelig så længe afstandskrav overholdes.

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

iii)

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

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

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

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

i)

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

Ikke høstede kartoffelknolde kan overleve i jorden hen over en mild vinter uden betydende frost.

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

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

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

ii)

Ingen særlige faktorer.

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

i)

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

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

ii)

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

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

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

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

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

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

Ikke relevant

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

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

## **B.2 Molekylær karakterisering**

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

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

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

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

Konstruktion af DNA sekvens i kartoffel:

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

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

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

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

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

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

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

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

#### Karakterisering af udvalgte kartoffellinjer:

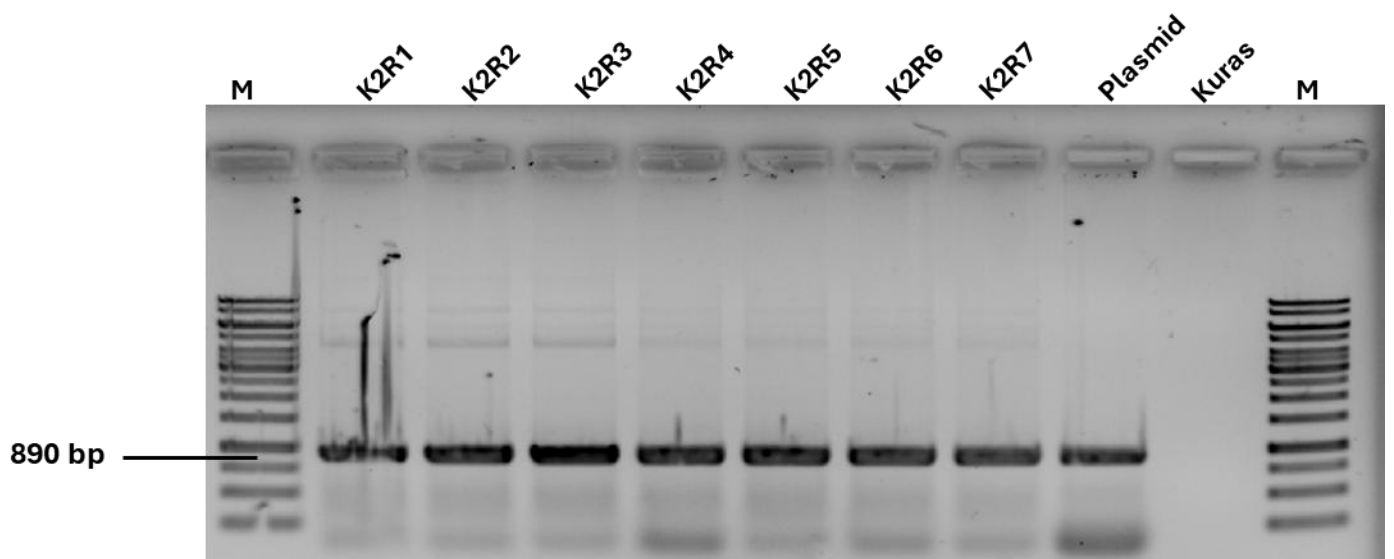
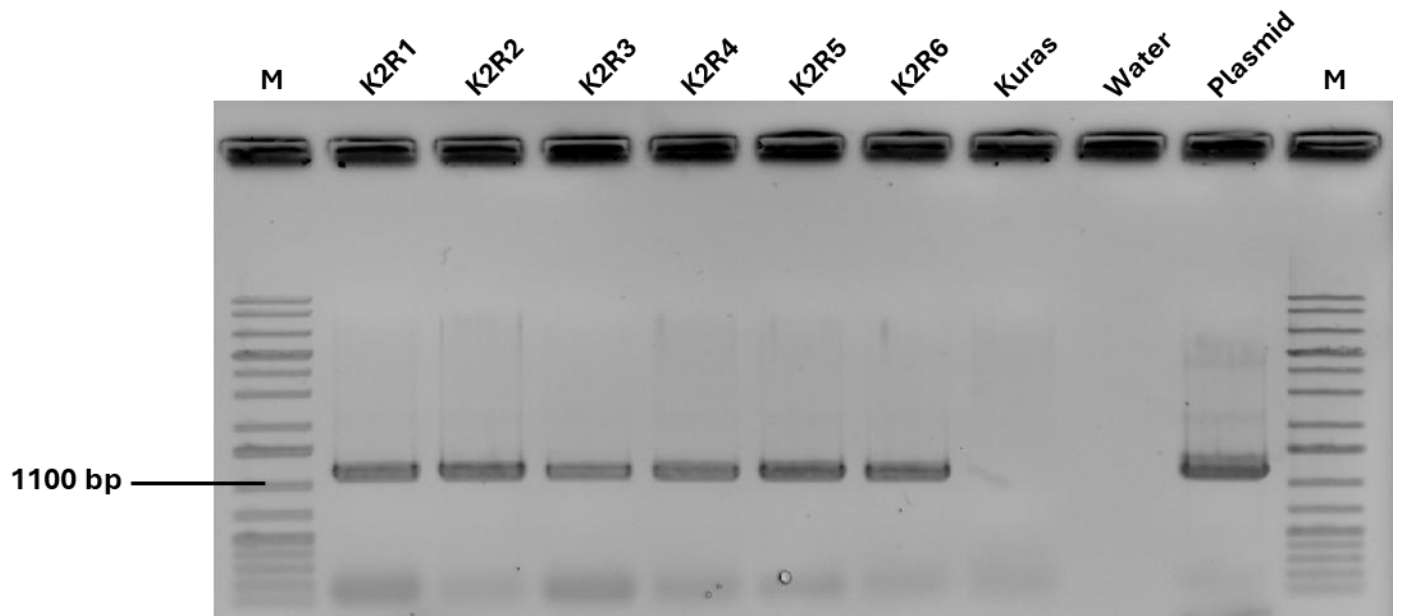
Molekylær detektion af insert ved Polymerase kædereaktion (PCR)

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

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

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

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

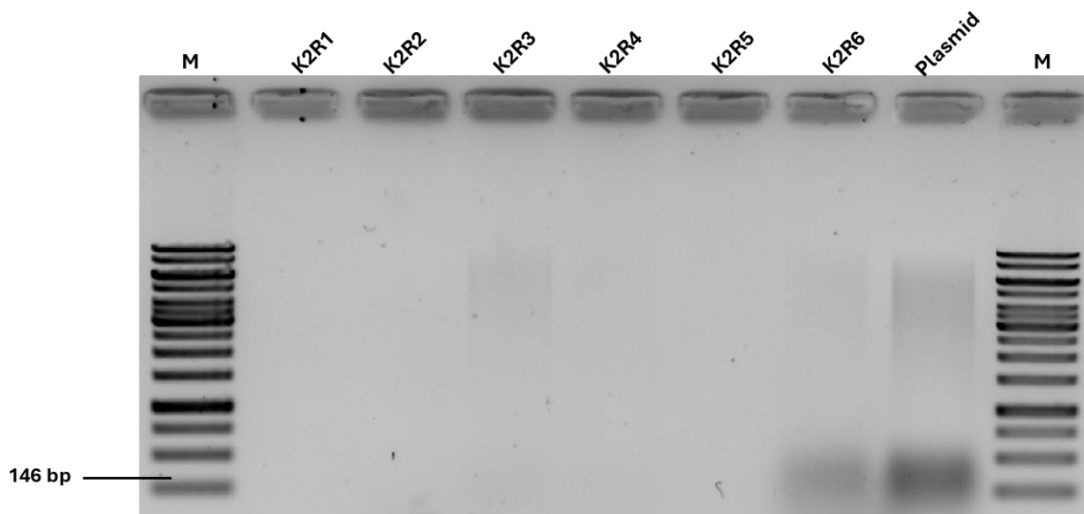


*Vector backbone analyse i kartoffel:*

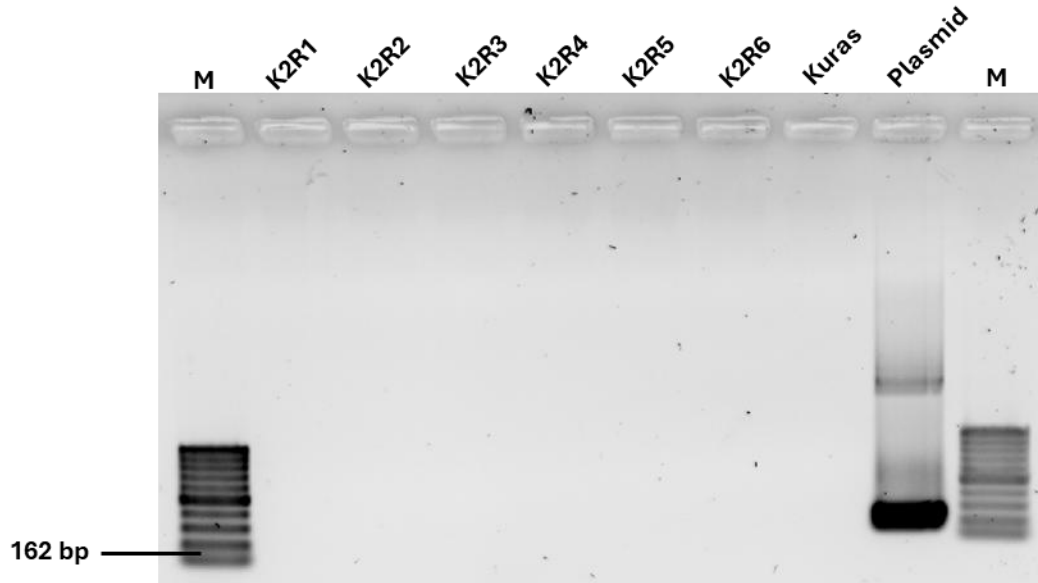
For at analysere om uønskede dele af vektoren (herunder et Kanamycin resistens gen, som bruges til selektion af *Agrobacterium* inden transformation af planter) skulle være indsat i genomet, blev der udført PCR analyser efter samme metode som beskrevet i Jo et al. 2014. Der blev for linjerne K2R1, K2R2,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

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

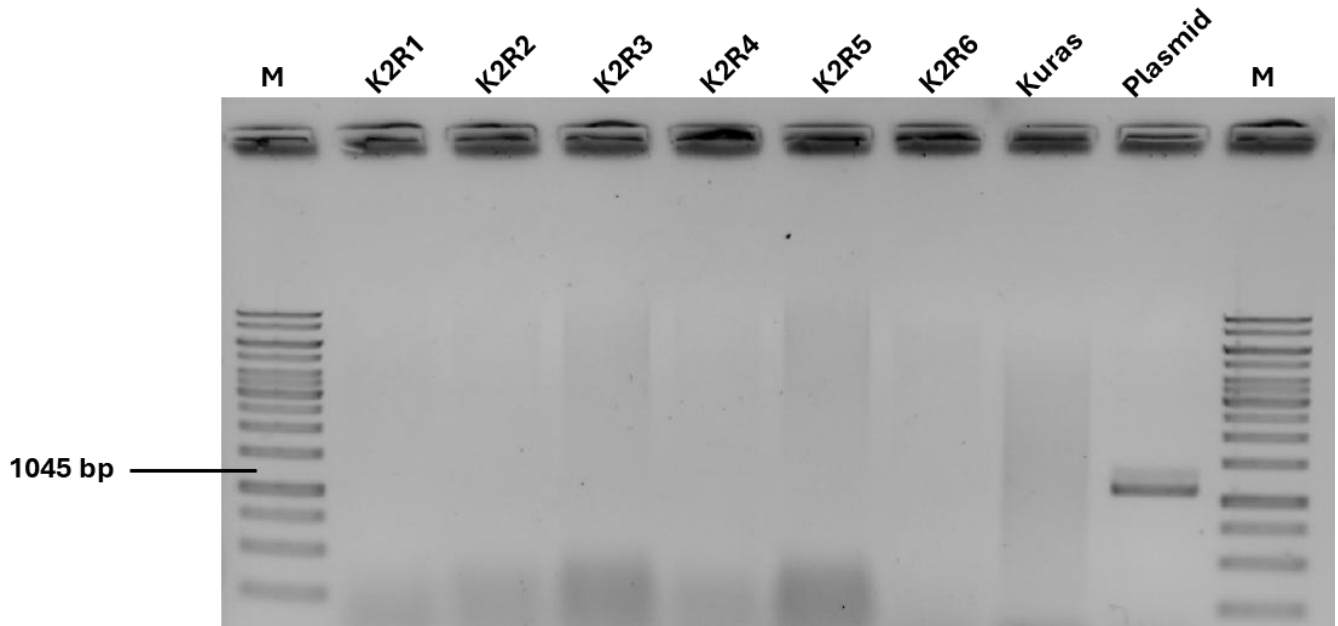
trfA:



NPTII:



oriV:



traJ:



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

ii) *Den anvendte vektors art og oprindelse*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

For kartofler:

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

iii) *Dele af Planten, hvori insertet udtrykkes*

Det forventes at resistensgenerne udtrykkes i hele planten.

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

For kartofler:

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

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

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

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

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

Litteratur med direkte relevans for linjerne

Kartoffel:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Der forventes ingen ændringer.

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

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

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

Der forventes ingen påvirkninger på de abiotiske miljøer.

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

For kartoffel gælder:

Det udsatte/reducerede skimmelangreb vil forventeligt give en mere jævn vækstrytme for planten, da angreb stresser planten og presser dens vækst. Dette antages at have en positiv effekt på plantens generelle vækst, hvilket bl.a. er kendt fra den praktiske avl.

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

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

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

*h) Konklusioner vedrørende de specifikke risikoområder*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Landbrugsstyrelsen ”Dyrkningsbestemmelser for GM kartofler” marts 2022).

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

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

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



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



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

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

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

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

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

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

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

Eventuelle planterester og knolde vil blive destrueret.

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

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

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

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

i)

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

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

ii)

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

iii)

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

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

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

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

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


## Underskrifter

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Kim Hebelstrup', written over a horizontal line.

Kim Hebelstrup, Aarhus Universitet

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Anders Vestergaard', written over a horizontal line.

Anders Vestergaard, Aarhus Universitet

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Charlotte Frhauge', written over a horizontal line.

Charlotte Frhauge, AKV

## **Bilag:**

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

## **Appendix:**

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

# Bilag 1

## Miljørisikovurdering

Ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg.

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

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

A)

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

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

B)

For kartofler:

Efterfølgende frost i vinterperioden og sort jord i året efter avl vil effektivt sikre at evt. overlevende knolde fra høst ikke vil overleve og spire året efter.

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

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

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

For begge lokaliteter (AKV og Flakkebjerg)) gælder:

Året efter forsøgenes afslutning vil arealerne ligge som sort jord med månedlige harvninger (april til september) og overvågning. Arealet vil blive overvåget i min. 4 år eller til der ikke findes spildplanter mere (jf. vejledning fra Landbrugsstyrelsen "Dyrkningsbestemmelser for GM kartofler" marts 2022).

Arealerne forventes udlagt med slåningsbrak fra 2029 i Flakkebjerg og 2030 ved AKV, som kan slås og overvåges. Det skal bemærkes, at erfaringer med opsamling af kartofler i mindre parceller er at der meget sjældent efterlades knolde i jorden.

#### 2. Genoverførsel fra plante til mikroorganismer

Vurderes som værende uden betydning og er ikke kendt i kartoffel. Dog understreges det at den i ansøgningen beskrevne PCR metode til detektion af indsæt af den cisgene gen kassette kan anvendes til detektion i enhver anden organisme.

#### 3. GMHPernes vekselvirkning med målorganismer

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

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

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

ubehandlede led.

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

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

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

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

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

De personer, som skal foretage de kritiske arbejdsopgaver, transport, lægning, høst og efterkontrol har alle taget GMO kørekort når forsøgene igangsættes, hvorfor alle er opdateret med nyeste viden om emnet.

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

Det forventes ikke at kartoffelskimmel populationerne vil ændre sig over en kortere tidshorizont, men kunne blive forsinket i deres udbredelse. Denne forsinkelse forventes at kunne reducere anvendelsen af fungicider væsentligt.

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

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

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

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

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

Aarhus Universitet  
Nordre Ringgade 1  
8000 Aarhus C

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

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

CVR 21481815

11. december 2023

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

P 1017874450

Side 1/2

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

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

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

### **Beskrivelse**

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

### **Vurdering**

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

### **Afgørelse**

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

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

**Vejledning**

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

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

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

**Klage**

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

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

Venlig hilsen

Rikke Kolding Hansen

Aarhus Universitet  
Nordre Ringgade 1  
8000 Aarhus C

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

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

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

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

### **Beskrivelse**

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

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

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

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

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

**Arbejdstilsynet**

Tilsynscenter Øst  
Landskronegade 33  
2100 København Ø

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

CVR 21481815

16. oktober 2019

**Sag**

20180028531/14

Ansvarlig:

Rikke Kolding Hansen

P 1017874450

Side 1/2

## **Vurdering**

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

## **Afgørelse**

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

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

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

## **Vejledning**

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

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

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

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

## **Klage**

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

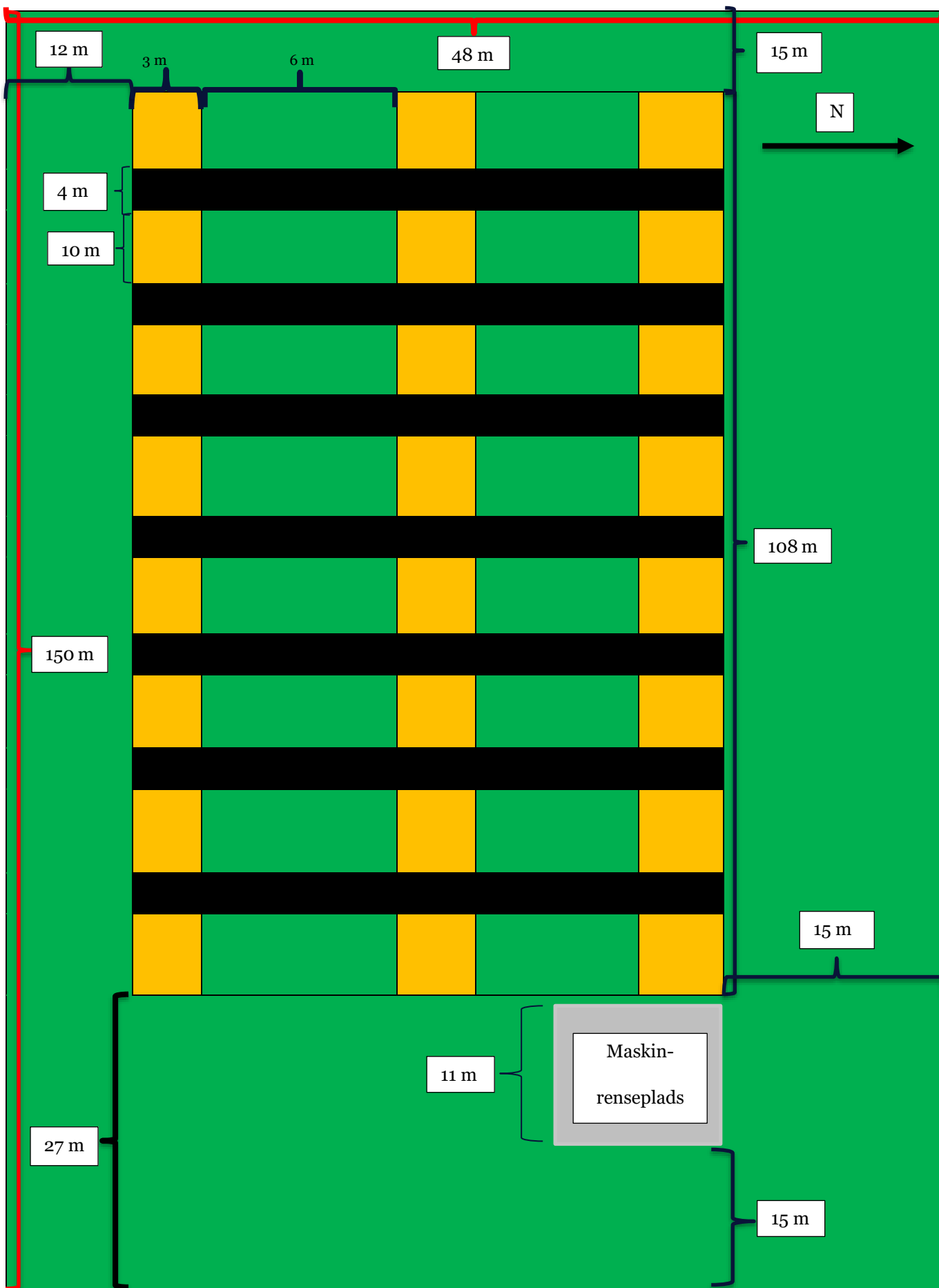
Kopi af dette brev er sendt til MILJØSTYRELSEN, Tolderlundsvej 5, 5000 Odense C.

Venlig hilsen

Rikke Kolding Hansen

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

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



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



# Øversigt af markblokke:

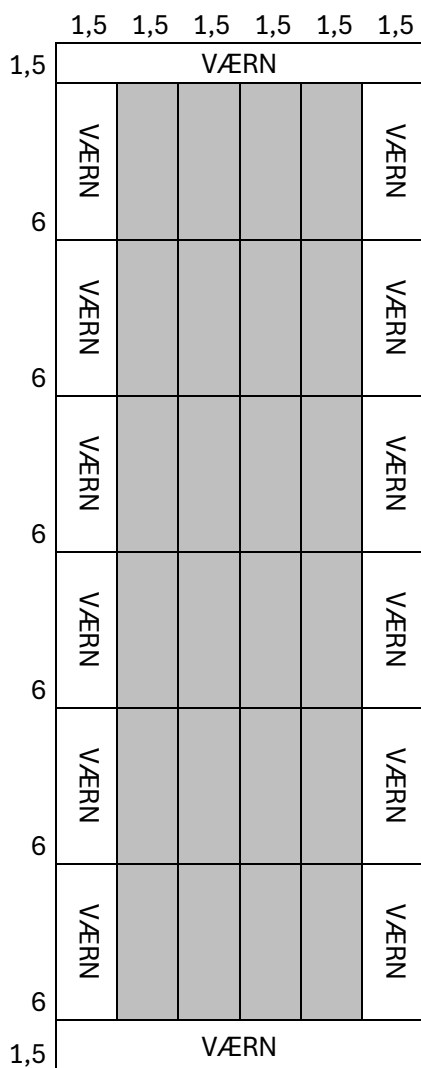


#### Bilag 4 - Foreløbig skitse til forsøgsplaner i marken samt oversigtskort af ansøgte område (AKV)

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

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

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



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



## Bilag 5 – Beskrivelse af maskiner (Flakkebjerg)

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

(billeder ikke vedlagt)

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



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



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



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



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



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

Efter frilægning vil kartoflerne blive samlet op med håndkraft.



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



Kvik-up

Anvendelse: Fritlæggelse af spildkartofler.



Agromet Pionier

Topknuser til kartoffeltoppe



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



Gødningsspreder til granuleret kemisk gødning



Scan agro – brakklipper til afpudsning af værnearealer og køregange



Horsch Terrano 3FX

Dybdeharve



Kongskilde Germinator

Forårsharve til forberedelse af såbed



Kaeser M26 Mobil kompressor

Bruges til at rense maskiner på det klassificerede område med trykluft



Tromle

Bruges kun ved behov



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

Bilag 6 – Beskrivelse af maskiner (AKV)

Til tildækning af håndlagte kartofler, anvendes denne hypper med bejdseanlæg



Mekanisk ukrudtsbekæmpelse med optiweeder



Optagning med Asa-lift



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



Traktor der er til rådighed til markarbejde



Opriller til rækkeafstand og gødnings placering



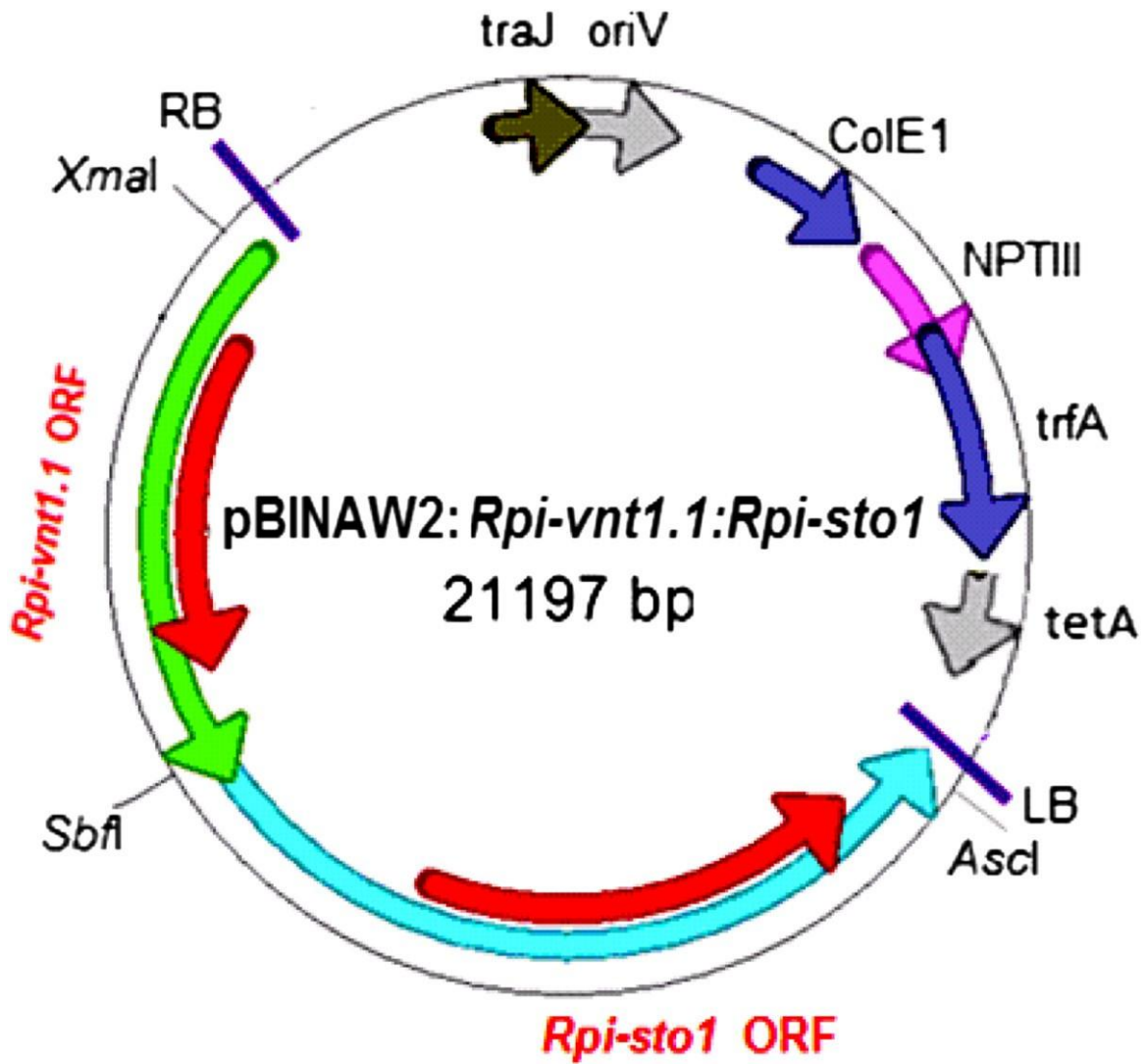
Cykelsprøjte ukrudts behandlinger skimmelbehandlinger mm



Rodunderskæringsmaskine, bruges før optagning/ opgravning



Appendix 1 – map af anvendte plasmid til kartoffeltransformation



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

attaacacctcgaggtcattatgatgatgtctcacgaccaaatacaaatcaaagttaaataaatatcgaaccgaacgccc  
actctgtatgagtatggcaaaaagatgagagaaatcaagttgcataaaaagcctaattttcatggaacatacaaattgagtc  
tcataatagcccaaaactcacagccatgaacccaaattgggtaaagtttgaagacgttcatcaaacagttaggaaaca  
taaaatggcgctagatatataataaatttttaacatatgggtgattgatagttatataactaaagatgttgcttagttacgta  
atTTTTcaaaaaaaaaagggtacattatcaatcatcagtcacaaaatattaaagttactgtttgttttaattccatgtcg  
aatttaattgaatgacacttaaattgggacgaacgggtgaatttctttgactattctactagtatctatccacagcacgtgtt  
gttcctttctttctgttttcatttacttgacattattaggagacttggccctgaactccaactattctaagctgaccttctt  
tcctttaccaattatcttcttcttcttaattcgttttacgctagtagtgcctgaattttctgactttcaacgtttgttattcatgct  
tgaaaacgaaataccagctaacaaaagatgaattattgtgtttacaagacttgggcccgttacttcttcccttctca  
tcctcacatttagaaaaaagaaathtaacgaaaaathtaaggagatggctgaaattctctcacagcagtcataataa  
tcaatagaaatagctggaaatgtactcttcaagaagggtacgcgtttatattgggtgaaagaggacatcgattggctccaga  
gagaaatgagacacattcgatcatatgtagacaatgcaaggcaagggaagtggaggcgattcaagggtgaaaaactt  
attaaaagatattcaacaactggcaggtgatgtggaggatctattagatgagtttctcaaaaaattcaacaatccaataa  
gttcatttgttccttaagacggtttctttgccgatgagttgctatggagattgagaagataaaaaagaagattgctgatatt  
gaccgtgaaggacaacttacagcatcacagatacaagtaacaataatgatgattgattccattggaccgggagaagat  
tgttccttcatgctgatgaaacagaggtcatcggcttggaaagatgacttcaatacactacaagccaaattacttgatcatg  
atgtgccttagtgagttgttcaatagttggcatgcccggttgggaaaaacaactcttgccaagaaactttagggcatgct  
tgtcatcaatgtgagttcgggactggctctatgtttcacaacagccaaggggcgggagaaatcttcatgacatagccaaa  
caagttggactgacggaagaggaaaggaaagaaaacttgagaacaacctacgatcactcttgaataaaaaaggat  
gttattctcttagatgacattgggatgttgaattgggatgatctaaaactgtccttctgaatgtgattcaaaaattggca  
gtaggataattataacctctcgaatagtaatgtaggcagatacataggaggggatttctcaatccacgtgttgcaacccc  
tagattcagagaaaaagctttgaaactttaccaagaaaactttaattttgtaataatggggccaatgcttcaccagac  
ttgtaaatattggtagatgtatagttgagagatgtggaggatataccgctagcaattgtggtgactgcaggcatgttaagggc  
aagaggaagaacagaacatgcatggaacagagtacttgagagtatggctcataaaattcaagatggatgtggtaaggta  
ttggctctgagttacaatgatttggccattgcattaaggccatgttctgtactttggtctttaccccgaggacctgaaatt  
cgtgctttgattgacaaatgtggattgctgagaagctgatagttgaaatactggcaatgggagagaggctgaaagttt  
ggcggatgatgtcctaaatgatttggttcaagaaacttgattcaagttgccaagggacatgatggaagaattcaagt  
tgtcgcatacatgacttgttacatagttgtgtggacttggctaaggaaagtaacttcttcacacggagcacaatgcatt  
tggatccttagcaatgttctaggggtgcgaaggattacattctactctgatgataatgccaatgaatgagttcttccattaa  
atcctaagcctatgaagcttcttcaactttctgtttcacaagaccgttgcataattttcctcaaatggctcatcttaactca  
aattattgcaagttgtggttagtcatgtctcaaaagggttatcagcatgttactttccccaaaaaattgggaacatgagt  
tgcctacgttatgtcgtgattggagggggcaattagagtaaaattgccaatagtagttgtcaagctcaaatgtctagagacc  
ctggatataattcatagctctagtaaaacttctttgggtgtttgggagtctaaaatattgagacatcttgttacacagaagaat  
gttactgtgtctctttgcaagctcattttgccgaatcatgcctcctaataatctcaaaactttgatgtgggtggatgataaatt  
ttgtgaaccaagattgtgcaccgattgataaatttaagaacattgtgtataatggatgtatccggttctaccattaagatatt  
atcagcattgagccctgtgcctagagcgttggagggtctgaagctcagatTTTcaagaacacgagtgagcaaaataaactt  
gtcgtcccacccaaatattgtcgagttgggtttgggtttctcagcaatgctcttgaacattgaagcattccctccaaatct  
tgtcaagcttaacttctgtcggcttgatggttagacgggtcatctattggcagtgcttaagaaattgccaataaggatactta  
tattgctttgggtgcagacatgatgcagaaaaatggatctctctggtgatagctttccgcaactgaagttttgatattgagg

atgcacaagggtgtctgaagtaacgtgcatggatgatagatgcctaaattgaaaaagctatcttgtacaaggccc  
aacattcccccaattagtctcagggctcggaacggcttgcaagttgagaatcacaggtactataaataattatta  
cgttaatatccatgatttttaattgtatttagttcatcaactaaatattccatgtctaataaattgcagggatgccttga  
aatgattctgtgtggagagaatcttctgatgcctgttggtattataactaataataagagaaaaagtttgattactgttc  
aagttaattgcttgattgtaaaaacaaattacttttatatttctctttgtttttttatgttttttatctttaattaatggagta  
ataaaataaaaatcttattttcaatagaaaaagtagaccttattgtggtgcatgtatggtatcttttgaaattttgatata  
ttgctcttgattcgaatttcttgcttatatgatgattgcataaataaaaatattatacaaatacctatgggttggaataata  
gaaatgccaatcaaatgtatacaaaaatcattaatagatagaatcgtaaaagatatcaaatgagaaatgcttgacta  
agaagcttctgcaacctctcacactgagcacaatgcatttggtgatctcggcactattgctgttacttgaagactacgtt  
cccaataagtcttccaaacggcttgcaagctgagaatgaaaatctcataggttagttgctgcgtaattatttacat  
ttaatatgctcgataagggtgattttaaaaaattgtactagttaattcatgaactaaatatttcattaactccataattct  
gaaatggaaaataaataatatttaataacaagaataaaatgataaattattcattgattttataaattggataaataatta  
aatattcttaataatataatgaacaagtgaagatgaacggaggagatgaagcctcttttcgccgggacactgcagg  
cttgctaattgagtgctgttataatcagtattaactctcaaggtaatagtatattccaacaaatttgtgttaccat  
aaatatatttctaaaactatctgaaagtagttaataacttttgagtgtgtatcatgttttaataaaaatattaaattaga  
tgaaattactttctagttaaattggtcaaagttgaaagaattcaagtgaaaaagttttaataatttgcttttatgctatatt  
ttaaagttgaacgacttttaataaaaaagaataaaaatttatgataattttataatacaatggccttttatatgatgaa  
aaaaagaaagaattagatgacaacaatgtccaaaaataatcttaagaattatgatttatataaaaattaaatttaa  
aattgatgaaaaatagagaaaagagggaagatgatgaagtgaatgattgggtgggtccatgtgacattaaaaaaaa  
caattctcttaataatccttcataactaatgataattttttttttttttttactaattgcgtattgagaaaaggaaaatggg  
gcggttaattacaagtagggaatcgaactttatcaagaagttgagagttcaagtaaccaaccaactaaactactaaaat  
tttctaattaatgataattgtaattcatttagcataaaaaattcattgcacttacttttagagtttgaaaacaatacttcac  
tattctatattaattaatttctatattaattaattgtgaggcaatacaaaacttattaagaaaaatatttaaggacataatt  
aatcatattttactattgtttttgtgaaatcataatataactttgtaaatagtgcaatttatctcctagaagcaaaactc  
actaaagaaaaggcgaagatggaaaagaaactaaatattcatcttaactttgaacaattcaatttttgaacaatga  
aaaaatctcaaaaattcaattaatgaatatttagaggcaaaaaattagtactccctccgttacttttattgtcatatt  
gcgcttttcgaaagtcaattgactaattttaaagatcaattagattactaattcaatattttaatagaaaaatagata  
ttcaaaaactatacaaaaaatattatacattgcaatttttgcatatcaatgatataaaaaatataatcgtaaaatattagtc  
aaaattttatagttgactctaataatgaaaagtataataatagttggacggaggaagattgtctttccagattgttgc  
cattttgggccaaggaccattagcagttctcttcttctactctgtctcatattagctgggcatcttactaaaaatattgt  
ctcatattacttgattttactaaatcaaaatagaattaattaatttttctcattttaccctccaattaatagtttgaaa  
gttttaacaaatttgaagaatcaaaatctttttgcaagagacttataatataaacaaggataaaaataaaaattg  
tcaattattgacgatcacttaataatcgtgtaaaaatagaaaatgtttatctaataatgagacggagaaaaatataatcctaaaat  
attttgatggatgtgatattctaaccattcactagactatattatgcatttttagccgcaatgacttatttcagcttaatt  
aattaggaaagaggaaactgccaatgaggaagagtaggggcgtagttgctgtcgacgaaaaaagataataactcactct  
tttcgattttattttatttatcacttttaacctatcatgtaaaaagataatattttttcatgctttatccttagtattaataatt  
aatagggatttttgaataatattatgaataattgtttcgaatgaattgtccagtcacaatgataaataaaaatg  
aacggagagagtagaaaacaaaacaaaagaacaagttgccaacttgagagattaaaagggacaaaacgccttggga  
tttgagattccatgtgaaattccatgaataattgaattgtattattacaatcaaaactttctatttcattccaactagc  
catcttggttcaaaaattacacattcattcattcacagatctaataattcttaatagtgattccacatatggctgaagctttcat  
tcaagttctgttagacaatctcacttcttctcaaaaggggaacttacattgcttttcggttttcaagatgagttccaaggct

ttcaagcatgttttctacaatccaagccgtccttgaagatgctcaggagaagcaactcaacaacaagcctctagaaaatt  
ggttgcaaaaactcaatgctgctacatacgaagtcgatgacatcttggatgaatataaaaaccaaggccacaagattctc  
ccagtctgaatatggccgttatcatccaaaggttatccctttccgtcacaaggtcgggaaaaggatggaccaagtatga  
aaaaactaaaggcaattgctgaggaaagaagaatcttattgcacgaaaaaattgtagagagacaagctgtagacg  
ggaaacaggtactcatctaaattagattacaacaactaagttatattcattttttggcaattatcaaatcagaaaagg  
gttaaatatactcatgtcctatcgtaaatagtgtaaatatacctctcgttgactttcgatctgaatatactgtcaaatctgg  
caagctcagaatcaaatatccacccaacttttaatactcgacatctttagaatccacctgtctaactcatccacta  
cccattcccttggcttgaattctttctttacctataaaacttggaaactcgcgatccgttttcttttaacaaagcagctca  
gagaaaagagggtttcttctattctgtttctgtgtgctgcacttgggtccttaatcccattaaaaacagggcatgtaatcc  
caacgacggtagcctttctgacagctgactgtaaattagtctaacaagaaaaaaagattagacatgttttcttg  
tcattgattaggctggatttcttcagagtggaaacataggggatattggaccaaaaatagaatgggtatataattaaagat  
ttctgatagaacaggagtattgtgcaaaaatcctctattttctgtgtctcctaagattgattgaataatattctcat  
gtggacattgcttgcaccaggttctgtattaaccgaaccgcaggttatggaaagagacaaagagaaagatgagatagtg  
aaatcctaataaacaatgtagtgatgcccacacctttcagtcctccaatacttggatggggggattaggaaaaacg  
actcttgcccaaatggtcttcaatgaccagagagttactgagcatttccattccaaaataggattgtgtctcggaaagatt  
tgatgagaagaggtaataaaggcaattgtagaatctattgaaggaaggccactacttggtagatggacttggctccact  
tcaaaagaagcttcaggagttgctgaatggaaaaagataacttgcctttagatgatgtttggaatgaagatcaacagaa  
gtgggcaaatthaagagcagcttgaaggttgagcaagtggtgcttctgttctaaccactactcgtcttgaaggttgat  
caattatgggaacattgcaaccatagaaactgtcaaatctgtctcaagaagattgttggttgttcatgcaacgtgcatt  
ggacaccaagaagaataaatccaaacttggcaatcggaaaggagattgtgaaaaaagtgggtgtgcctctag  
cagccaaaactcttggaggtattttgtgcttcaagagagaagaaagagcatgggaacatgtgagagacagtccgattgg  
aatttgctcaagatgaaagttctattctgcctgccctgaggcttagttaccatcaacttccacttgaattgaaacaatgctt  
tgcgtattgtcgggttcccaaaggatgccaaaatggaaaaagaaaagctaactctctcttggatggcgcagtggtttctt  
ttatcaaaaggaaacatggagctagaggatgtgggtgatgaagatggaaagaattataacttggaggtctttttccaagaga  
ttgaagttaaagatggtaaaacttattcaagatgcatgatctcatccatgatttggcaacatctctgttttcagcaaacaca  
tcaagcagcaatatccgtgaaataaataaacacagttacacacatatgatgtccattggttccgcaagtggtgtttttt  
acactcttcccccttggaaaagttatctcgttaagagtgttaacttaggtgattcgacatttaataagttaccatcttcc  
attggagatctagtagtattgaactgtatggcagtggtcatgtagtcttccaaagcagttatgcaagcttc  
aaaatctgcaactcttgcataatattgaccaagcttgttggtttgcaaaaagaaacaagtaacttggtagtctcc  
gaaatctttactttagtgtagcagtcattgacttgtatgccaccaaggataggatcattgacatgccttaagactctaggt  
caatttgttggaaaggaagaaaggttatcaacttggtagacttaggaaacctaaatctctatggctcaatataaatctcgc  
atcttgagagagtgaagaatgataaggacgcaaaagaagccaattatctgcaaaagggaatctgcattcttaagcatg  
agttggaataacttggaccacatatatgaatcagaagaagttaaagtgttgaagccctcaaccacactccaatct  
gacttcttaaaaaatctatggctcagaggaatccatctccagagtggatgaatcactcagttgaaaaatattgtctct  
attctaattagcaactcagaaaactgctcatgcttaccacccttgggtgatctgccttctagaaaagtctagagttactg  
ggggtctcggatgtggagtatgtgaagaagtgatattgatgttcattctggattcccacaagaataaggtttccatct  
tgaggaaacttgcataatgggacttggtagtctgaaaggattgctgaaaaaggaaggagaagagcaattccctgtgcttg  
aagagatgataattcatgagtccctttctgacccttcttaacttagggctcttacttccctcagaatttgcataataa  
agtagctacttccatccagaagagatgttcaaaaacttgcataatctcaatacttgacaatctctcggtgcaataatct  
caaaagctgcctaccagcttggctagtctgaatgcttgaagaaagcttaaaaattcaattgttgcgactagagagct  
ccctgaggaagggtggaaggttatcttactcacagagttattgttgaacactgtaacatgctaaaatgtttaccagag

ggattgcagcacctaacaaccctcacaagtttaaaaattcggggatgtccacaactgatcaagcgggtgtgagaagggga  
ataggagaagactggcacaaaatttctcacattcctaattggaatatataattaagttatttgctattgtttctttgtttgtga  
gtcttttggttcctgccattgtgattgcatgtaattttttctaggggtgtttgttgagtgctctctctcattggatgtaatttctt  
ttgtaacaaattaacaatctattgtattatacgtttcagaatctattacttattgtaattgttctttgtttgtaaattgtgagt  
atcttattgtatggaatttctgatttttttgaacaaatcaataagatccatctgtattatactcccttcgtctcattttatg  
tgacactttttggattcagattcaaacaaatctattttgatcttaattttcatagatcttttaaacattttgaaattacaatt  
attgtgatttttagtactttttatgtagtttacaatatataaaatttttttttaaaaaaagaagatttcatgcgcatattccc  
atcaaacctaaacttagactctcgaaaaatgaaaagtgtcacataaattgagactgaggggagacttgttaattgttgta  
attattggcgaacaataatgttggtgattatcactttctgaataaatgtgtgtcacgtggaaaaaacaccaaataagaagta  
ttcatgcttttttagtatataaacacgatttttaacttggtttcagcggatagtcatgaccttttactctgaatgtgcacaagt  
agatacttgataaaaattaaataattttataaaattatacaaatgacactgagagtaattgataccaattgcagtcggtgc  
tgcttttcgattctctgtcattctctagggcgcgccccgggtacgtgacaggatattggcgggtaaacctaagagaaaaga  
gcgtttattagaataatcggatatttaaaagggcgtgaaaagggttatccgcttcgtccattttgatgtgcatgccaaccacag  
ggttcccagatcaggaccgctgccggagcgcacaaccactcactacagcagagccatgtagacaacatcccctccc  
cctttccaccgcgtcagacgcccgtagcagcccgtacgggctttttcatgccctgcccctagcgtccaagcctcacggc  
cgcgctcggcctctctggcggccttctggcgtcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcgtcggctcgttcggctgcg  
gcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtg  
agcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgtttttcataggctccgccccctg  
acgagcatcacaacaaatcgacgctcaagtcaagggtggcgaaaccgacaggactataaagataaccaggcgtttccc  
cctggaagctccctcgtgcgtctctctgttccgacctgcccgttaccggatacctgtccgcctttctccttcgggaagc  
gtggcgttttccgctgcataaccctgcttcggggctcattatagcgtttttcggtatatccatccttttgcacgatataca  
ggattttgcaaaagggtctgttagactttccttggtgatccaacggcgtcagccggggcaggataggtgaagtagggcca  
cccgcgagcgggtgttcttcttactgtcccttattcgcacctggcgggtgtcaacgggaatcctgctctgcgaggctgg  
ccggctaccgcccggcgtaacagatgagggcaagcggatggctgatgaaaccaagccaaccaggaaggggcagccca  
cctatcaaggtgtactgccttccagacgaacgaagagcgttgaggaaaaggcggcggcggccggcatgagcctgtcg  
gcctacctgctggccgtcggccagggctacaaaatcacgggcgtcgtggactatgagcacgtccgcgagctggcccgc  
atcaatggcgacctgggcccgtggggcggcctgctgaaactctggctcaccgacgacccgcgcacggcgcgggtcgggt  
gatgccacgatcctcgcctgctggcgaagatcgaagagaagcaggacgagcttggcaaggtcatgatgggcgtggtc  
cgcccaggggcagagccatgacttttttagccgctaaaacggccggggggtgcgctgattgccaagcacgtcccctatg  
cgactcaccgggctggttgcctcgcgctgggctggcggcgtctatggccctgcaaacgcgcccagaaacgccgt  
cgaagccgtgtgcgagacaccgcggccgcccggcgttgggatacctcgcggaaaactggccctcactgacagatgag  
gggcccagcgttgacacttgaggggcccactcaccggcgcggcgttgacagatgagggggcaggctcgatttcggccgg  
cgactggagctggccagcctcgcaaatcgggcaaaaacgcctgattttacgcgagtttcccacagatgatgtggacaag  
cctgggggataagtgcctcgcggtattgacacttgaggggcccgactactgacagatgagggggcgcgatccttgacactg  
aggggacagagtgtgacagatgagggggcgcacctattgacatttgaggggctgtccacaggcagaaaaatccagcattg  
caagggtttccgcccgttttggccaccgctaacctgtctttaacctgtctttaaccaatattataaacctgtttttaa  
ccagggctgcgcccctgtgcgctgaccgcgcacgccgaaggggggtgcccccttctgaaccctcccggcccgt  
aacgcgggctccatccccaggggctgcgcccctggccgcgaacggcctacccccaaaaatggcagcgtgg  
cagtccttgccattgccgggatcggggcagtaacgggatgggcatcagcccagcgcgaccccggaagcattgacg  
tgccgcaggtgctggcatcgacattcagcgaccaggtgccgggagtgagggcgggcggcctgggtggcggcctgcctt

cacttcggccgtcggggcattcacggacttcatggcggggccggcaattttaccttgggcattcttggcatagtggtcgcg  
ggtgccgtgctcgtgttcgggggtgcgataaacccagcgaaccatttgaggtgataggttaagattataaccgaggtatgaa  
aacgagaattggacctttacagaatactctatgaagcgccatatttaaaaagctaccaagacgaagaggatgaagagg  
atgaggaggcagattgccttgaatatattgacaatactgataagataatataatctttatataagaagatatcgccgtatgtaa  
ggatttcagggggcaaggcataggcagcgcgcttatcaatataatctatagaatgggcaaagcataaaaacttgcattggac  
taatgcttgaaacccaggacaataaccttatagcttgaattctatcataattgggtaatgactccaacttattgatagtg  
tttatgttcagataatgccgatgactttgtcatgcagctccaccgattttgagaacgacagcagcttccgtcccagccgtg  
ccaggtgctgcctcagattcaggttatgccgctcaattcgtgcgtatatacgttgcgtgattacgtgcagcttcccttcagg  
cgggattcatacagcggccagccatccgtcatccatataccacgtcaaagggtgacagcaggctcataagacgccc  
cagcgtcgccatagtgcttaccgaatacgtgcgcaacaaccgtcttcggagactgtcatacgcgtaaaacagcca  
gcgctggcgcgatttagccccgacatagccccactgttcgtccattccgcgcagacgatgacgtcactgcccggctgt  
atgcgcgaggttaccgactgcggcctgagtttttaagtacgtaaaaatcgtgttgaggccaacgcccataatcggggctg  
ttcccggcatccaacgccattcatggccatataatgattttctgggtgcgtaccgggttgagaagcgggtgtaagtgaact  
gcagttgccatgttttacggcagtgagagcagagatagcgtgatgtccggcgggtgcttttgccgttacgcaccacccgt  
cagtagctgaacaggaggagcagctgatagacacagaagccactggagcacctcaaaaacaccatcatacactaaa  
tcagtaagtggcagcatcaccataattgtggtttcaaatcggctccgtcgatactatgttatacgccaactttgaaaac  
aactttgaaaaagctgttttctggtatttaaggttttagaatgcaaggaacagtgaattggagttcgtcttgttataaattagctt  
cttggggatctttaaatactgtagaaaagaggaaagaaataataatggctaaaaatgagaatatcaccggaattgaaaa  
aactgatcgaaaaataaccgctgcgtaaaaagatacggaaaggaatgtctcctgctaaggatataagctggtgggagaaaa  
tgaaaacctatatttaaaaatgacggacagccggataaaagggaccacctatgatgtggaacgggaaaaggacatgatg  
ctatggctggaaggaaagctgcctgttccaaaggtcctgcactttgaacggcatgatggctggagcaatctgctcatgagt  
gaggccgatggcgtccttgcctcggaaagagtatgaagatgaacaaagccctgaaaagattatcagactgatcgggagt  
catcaggctcttctactccatcgacatatacggattgtccctatacgaatagcttagacagccgcttagccgaattggatta  
cttactgaataacgatctggccgatgtggattgcgaaaactgggaagaagacactccattaaagatccgcgcgagctgt  
atgatttttaaaagacggaaaagcccgaagaggaaactgtcttttccacggcgacctgggagacagcaacatcttggg  
aaagatggcaaagtaagtggctttattgatcttgggagaagcggcagggcggacaagtggtatgacattgccttctgcgtc  
cggctgatcaggaggatatacggggaagaacagtatgtcagactatcttactggggatcaagcctgattgggag  
aaaataaaatattatatttactggatgaattgttttagtacctagatgtggcgaacgatgccggcgacaagcaggagcg  
caccgacttctccgatcaagtgtttggctctcaggccgaggcccacggcaagtatttgggcaaggggtcgtggtatt  
cgtgcagggcaagattcggaaataccaagtacgagaaggacggccagacggctctacgggaccgacttattgccgataa  
ggtggattatctggacaccaaggcaccagggcgggtcaaatcaggaataagggcacattgccccggcgtgagtcggggc  
aatcccgaaggagggtgaatgaatcggacgtttgaccggaaggcatacaggcaagaactgatcgacgcgggggtttcc  
gccgaggatgccgaaaccatcgcaagccgcaccgtcatgctgcgccccgcgaaacctccagtccgtcggctcgat  
ggtccagcaagctacggccaagatcgagcgcgacagcgtgcaactggctccccctgccctgcccgccatcggccc  
ccgtggagcgttcgctcgtctcgaacaggaggcggcaggtttggcgaagtcatgaccatcgacacgcgaggaactat  
gacgaccaagaagcgaaaaaccgccggcagggacctggcaaaaacaggtcagcagggccaagcaggccgcgttgct  
gaaacacacgaagcagcagatcaaggaaatgcagcttcttcttgcgatattgcgcccgtggccggacacgatcgagc  
gatgccaaacgacacggcccgtctgccctgttaccacgcgcaacaagaaaatcccgcgcgaggcgtgcaaaac  
aaggtcattttccacgtcaacaaggacgtgaagatcacctacaccggcgtcgagctcggggccgacgatgacgaactg  
gtgtggcagcaggtgttgagtagcgcgaagcgcacccctatcggcgagccgatcaccttccacgttctacgagctttgcca  
ggacctgggctggtcgatcaatggccggtattacacgaaggccgaggaatgcctgtcgcgcctacaggcgacggcgt

gggcttcacgtccgaccgcttggggcacctggaatcgggtgctgctgctgcaccgcttccgctcctggaccgtggcaag  
aaaacgtcccgttgcaggtcctgatcgacgaggaaatcgtcgtgctgttggctggcgaccactacacgaaattcatatg  
ggagaagtaccgcaagctgtcgcggacggcccgcaggatgttcgactattcagctcgcaccgggagccgtaccgct  
caagctggaaaccttccgctcatgtgcggatcggattccaccgctgaagaagtggcgcgagcaggtcggcgaagc  
ctgcgaagagttgcgaggcagcggcctgggtggaacacgcctgggtcaatgatgacctgggtgattgcaaacgctagggc  
cttgggggtcagttccggctgggggttcagcagccagcgtttactggcatttcaggaacaagcggggcactgctcgacg  
cattgcttcgctcagtatcgtcgggacgcacggcgcgctctacgaaactgccgataaacagaggattaaaattgacaa  
ttgtgattaaggctcagattcgacggcttggagcggccgacgtgcaggatttccgagatccgattgtcggccctgaaga  
aagctccagagatgttcgggtccgtttacgagcacgaggagaaaaagcccattggaggcgttcgctgaacgggttcgaga  
tgccgtggcattcggcgcctacatcgacggcgagatcattgggtgctcgggttcaaacaggaggacggccccaaggac  
gctcacaaggcgcacatctgtccggcgtttcgtggagcccgaacagcaggccgaggggtcgcgggtatgctgctcggg  
cgttccggcgggtttattgctcgtgatgacgtccgacagattccaacgggaatctgggtgatgcgcatcttcatcctgg  
cgcaactaatttcgctattctggagcttgtttatttcggctaccgctcggggcgggggtcgcggcgacggtagggc  
ctgtgcagccgctgatggctgtttcatctcctcgtcctgctaggttagcccgatacattgatggcggctcctgggggctatt  
tgcggaaactgcgggctggcgctgttgggttgacaccaaagcagcgcctagatcctgtcggcgtcgcagcgggctgg  
cgggggcggtttccatggcgttcggaaccgtgctgacccgcaagtggcaacctcccgtcctctgctcaccttaccgc  
ctggcaactggcggccggaggacttctgctcgttccagtagctttagtgttgatccgccaatcccgatgcctacaggaac  
caatgttctcggcctggcgtggctcggcctgatcggagcgggttaacctacttcttgggttcgggggatctcgcgactc  
gaaacctacagttgttcttactgggctttctcagccccagatctggggctgatcagccggggatgatcaggccgacagt  
cggaaactcgggtccccgacctgtaccattcgggtgagcaatggataggggagttgatcgtcaacggttacttctaaaga  
aatagcgcactcagcttctcagcggcttatccagcgatttctattatgtcggcatagttctcaagatcgacagcctgt  
cacggttaagcgagaaatgaataagaaggctgataattcggatctctgcgagggagatgatatttgatcacaggcagcaa  
cgctctgcatcgttacaatcaacatgctaccctccgcgagatcatccgtgttcaaacccggcagcttagttgccgttctt  
ccgaatagcatcggtaacatgagcaaatcgtccgccttacaacggctctcccgtgacgccgtcccggactgatggg  
ctgcctgtatcgagtggtgattttgtccgagctgccggctcggggagctgttggctggctgggtggcaggatattgtggt  
gtaaactctagaggatcctta

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

gtcattatgatgatgtctcagcaccacaaatcaaatcaagttaaataatcgaaccgaac-gcccactctgtatgagtatggcaaaagattttgaga-  
gaatcaagttgcataaaa-gcctaattttcatggaacatacaaatgagtcataa-tagcccaaacacagccatgaacccaattgggtaaagtttgcaa-  
gac-gttcatcaaacagtaggaaacataaaatggcgctagatatataataaatttttaacat-atggtgtgattgatgtatataactaaagatgtttgcttag-  
ttac-gtaatttttcaaaaaaaaaggtagcattatcaatcatcagtcacaaaa-tattaaagtactgtttgttttaaatccatgtcgaatttaatt-  
gaatgacac-ttaaattgggacgaacgggtgaattcttttactattctactagatctatccacagcac-gtgtttcctttctctttctttttcattactt-  
gacattataggagactt-ggccctgaactccaactattctaagctgacctttcttttctttac-caattatcttcttcttcttaattcgttttacgctag-  
tactgctgaattttctgactttcaacgtttgttattcatgcttgaacacgaaatac-cagctaacaaaagatgaattattgtgtttacaagacttggccggtt-  
gactcttcttccctcctcctcactcatttagaaaaagaaattaac-gaaaaataaaggagatggctgaaattcttctcacagcagcatcaaa-  
taaataatagaaa-tagctggaaatgactctttcaagaaggtagcgtttatattggtgaaagag-gacatcgattggctccagagagaaatgaga-  
cacattcgatcatatgtaga-caatgcaaaggcaaaggaagtggaggcgattcaagggtgaaaaacttattaaaga-tattcaacaactgg-  
caggtgatgtggaggatctattagatgag-tttcttcaaaaaattcaacaatccaataagttcattttgttccttaagacggtttctttt-gccgatgagtttgc-  
tatggagattgagaagataaaaagaagagtgtctgatattgacctg-taaggacaacttacagcatcacagatacaagtaacaa-  
taatgatgattgattccattggac-cggagaagattgttcttcatgctgatgaacagaggatcaggtctggaagatgacttcaa-tacactacaa-  
gccaaattactgatcatgatttgccttatggagttgttcaatagttgg-catgcccgtttgggaaaaacaactcttgccaa-  
gaaactttataggcatgtctgtcatcaattgagtggtcgggactggtc-tatgtttcacaacagccaaggcgggga-  
gaaacttcatgatagatagccaaacaagtt-ggactgacggaagaggaaaggaaagaaaacttggagaacaacctacgatcactcttgaaaa-  
taaaaaggatgttattctcttagatgacatttgggatgtgaaatttg-gatgatctaaaactgtccttctgaatgtattcaaaaattggcagtagga-  
taattataac-ctctcgaatagtaatgtaggcagatacataggaggggatttctcaatccacgtgtt-gcaaccctagattcagagaaaagcttt-  
gaacttttacaagaaaacttttaatttt-gttaatgataattggccaatgctcaccagacttgtaaatattggtagatgtatagtga-gagatgtg-  
gaggtataccgctagcaattgtgtgactgcaggcatgtaagggaagaggaa-gaacagaacatgcatggaacagagtacttgagag-  
tatggctataaaaattcaa-gatggatgtgtaaggtattggctctgagttacaatgattgccatt-gcattaaggccatgtttctgtacttt-  
ggctttaccccgaggaccatgaaattcgtgctttt-gatttgacaaatatgtggattgctgagaagctgatagttgtaaaactggcaatggcgca-  
gaggctgaaagtttggcgatgatgtcctaaatgattgtttcaagaaacttgat-tcaagttgcaaaaaggacatatgatggaagaattcaagttgtcgc-  
acatgactgttaca-tagttgtgtgacttggctaaggaaagtaacttcttccacaggagcaaatgcattt-ggtgatcctagcaatgtt-  
gctaggggtcgaaggattacttactctgatga-taatgcatgaatgagttcttccatttaaatcctaagcctatgaagcttcttccac-  
ttttctgtttcaaaaagaccgtt-gcatattttcctaaatggctcatcttaacttcaaatattgcaagttgtgttag-tcatgtctcaaaagggttatcag-  
catgttactttcccaaaaaaattgggaacatgagttgcc-tacgttatgtgagattggagggggcaattagagtaaaattgcaaatagattgtcaa-  
gctcaaatgtctagagaccctggatataatttcatagctctagtaaaactccttttgggtttt-gggagtctaaaatattgagacatctttgtcacagaa-  
gaatgttactgtgtctctttt-gcaagtcattttgccgaatcatgctccttaataatctacaaaactttgatgtgggtggatga-taaattttgtgaaccaagattgtt-  
gcaccgattgataaattagaacattgtg-tataatggatgtatccggttctaccattaagatattatcagcattgagccctgtgecta-gagcgtt-  
ggaggttctgaagctcagattttcaagaacacagagtgacaaataaactt-gtcgtccatccaaatattgtcagttgggttgggttctcag-  
caatgctctt-gaacattgaagcattcctccaaatctgtcaagcttaacttctgctgctttaggtagac-ggtcatctattggcagtgcttaagaaatt-  
gcccataaaggatacttattgctttgggtg-cagacatgatgcagaaaaatggatctctctggtatagctttccgcaactgaagtttt-gtatattgag-  
gatgcacaaggggtgtctgaagtaacgtgcatggatgatagag-tatgctaaattgaaaagctatttctgtacaaggcccaaacatttcccaattag-  
tctcaggtctcggaacggcttgaagattgagaatatcacaggtactataaa-taattattacgtttaatatcatgatttttaaaattgtatttag-  
ttcatcaactaaa-tattcatgtctataaattgcagggatgctttgaaaatgattctgtgtggaga-gaatcttctgatgctgttggattataataactaa-  
taataagagaaaaagttgat-tactgtttcaagtttaattgcttggatttgaaaaaacaattacttttatatttctt-

gTTTTTTTatgTTTatttctTTaattaatggagtaataaaataaaatcttattttcaa-tagaaaaagtagaccttatttgggtgcatgtatggtatctttt-  
gaaatttttgata-tatttgcctttgattcgaatttctgcttatatgatgattgcataaatataaaatattata-caaacctatgggttgaaaatagaaa-  
tatgccaatcaaatgtatacaaaaatcattaa-tagatagaatcgtaaaagatatcaaatgagaaatgcttgactaagaagcttcgtgcaac-ctctcacac-  
tgagcacaatgcatttgggtgatctcggcactattgctgttacttgaagac-tacgttcccaataagtctttccaaacggcttgcaaagctgagaa-  
tatgaaaatctcataggt-tagtttgcgcttaattattacatttaatatgctcgataaggtgatttataaaaaattt-gtactagttaattcatgaactaaa-  
tatttcattaatactccataaattctgaatatgaaaa-taaataatatttaataacaagaataaaatgataaattattcattgattttataaattgga-taaa-  
tattattaatattcttaataatataatgaacaagtgaagatgaacggaggag-tatgaagcctctttcggccggcacctgcaggcttgtaattgag-  
tgtctgtataatcag-tattaattactctcaaggaatagatatccaaacaaatttggttac-caaattaaatatttctaaaactatcttgaagtagtta-  
tatactttgagtgtt-gtatcatgttttaataataaaatattaaaatttagatgaaatttcttagttaaatt-ggtcaaagttgaaa-  
gaatttcaagtgaaaaagttttaataatttgcctttatgcta-tatttttaagttgaacgacttttaataaaaaagaataataaaattatataga-  
taattttataatacaatggcctttatgatgaaaaaaagaagaatt-agaatgacaacaatgtccaaaaataatcttaagaattatgattatataa-  
taaaattaaatttaaaattgatgaaaaaatagagaaaaggaa-  
gatgatgaagtgaatgattgggtgggtccatgtgacataaaaaaaacaattctcttaaa-taatctttcactactaatgataatttttttttttttttact-  
aattgcgtattga-gaaaaggaaaatggggcggttaattacaagtagggaatcgactttatcaagaagttgagag-ttcaagtaaccaaccaactaaac-  
tactaaaattttctaaatgataatt-gtaattcatttagcataaaaaattcattgcacttacttttagagtttgaaaacaa-tacttcatctattcta-  
tattaattaaattttctatattaattaaattt-gtgaggcaatacaaaacttattaagaaaaatattaaggacataattaaatcatattttcac-tattgttttt-  
gtgaaatcataatataactttgtaaatagtcaattatctcctagaa-gcaaaactcactaaagaaaaggcaagatggaagaaactaaa-  
tattcatcttaaaacttt-gaacaattcaatttttgaacaatgaaaaaatctcaaaaattcaattaatgaa-tatttttagaggcaaaaaattag-  
tactcctccttcaacttttatt-gtcatattgccttttcgaaagcaatttgaactaatttttaagatcaattagattcac-taattcaatattttaaa-  
tagaaaaattagatattcaaaaactatacaaaaaatattata-cattgcaatttttgcataatgataaaaaatataatctgtaaaatattag-  
tcaaaattttatagttgactctaaatgaaaagtataataatagtgacggag-gaagtattgtcttccagatttggccattttgggccaaggac-  
cattagcag-ttctcttatttctactctgtctcatattagctggcatctactaaaatattgtctca-tattacttgattattactaaatcaaaa-ta-  
gaattaattaatttttctatttaccctccaattaatagtttt-gaaagtttaacaaaatttgaagaatcaaaattcttttgcagagacttattaa-ta-  
taacaaaaggataaaataaaaaatttgcatttattgacgatcacttaataatcgtg-taaaaatagaaaatgtttatctaataatgagacgga-  
gaaaatatactcaaaaatatttt-ggatggatagtgatatttcaaccattcactagacta-tattatgcattttagccccaatgacttattcagcttaattaatt-  
aggaaagag-gaaactccaatgagggaagagtagggcgtagttgctgtcagcaaaaaagataa-tactcactctttcgattttattttattatcac-  
tttaacctatcatgtaaaaagataat-tatttttcatgctttatcttagtattaataatattagggatttttgaaaa-tatttatgaataattgtttgcg-  
taatgaatttgcagtcaacaatgataaa-taaaaatgaacggagagtagaaaacaaaacaaagaacaagttgccaactgagagat-  
taaaagggacaaaacgccttggattttgagattccatgtgaaatttccatgaaataatt-gaatttgtattattacaaatcaaaactttc-  
tatttcattccaactagccattt-ggtttcaaaattacacattcattcaccagatctaataattcttaatagtgatttccacat-atggctgaa-  
gctttcattcaagttctgttagacaatctcacttcttctcaaaagg-gaacttacattgcttttcggttttcaagatgagttcacaaggctttcaagcatgtttc-  
tacaatccaagccgtccttgaagatgctcaggagaagcaactcaacaacaagcctcta-gaaaattggttgcaaaaactcaatgctgctacat-  
acgaagtcgatgacatcttgatgaa-tataaaaccaaggccacaagatttctccagctgaa-  
tatggccgttatcatccaaagttatcctttccgtcacaaggtcgggaaaaggatggac-caagtgatgaaaaactaaaggcaattgctgaggaaagaaa-  
gaattttcattgac-gaaaaatttagagagacaagctgttagacgggaaacaggtactcatttaattag-tattacaacaactaagttta-  
tattcattttttgcaattatcaaaatcagaaaagggttaaa-tatactcatgtcctatcgtaaatagtgtaaatacctctcgttcttctgatctgaa-ta-  
tactgtcaaatctggcaagctcagaatcaaaatattccaccccaacttttaaa-tactcgacatctttagaaatccacctgtctaaactcaccac-  
taccattccctttgcttt-gaattcttttcttacctataaacttgaacactcgatccgttttcttttcttaacaaa-gcagctcagagaaaagggttttctt-

tattctgtttctctgtgtgctgcactt-gggtccttaateccattaaaaacagggcatgtaatcccaacgacgg-tagcctttcctgacagctgactgtaaatttag-  
tctaacaagaaaaaaaagattaga-catgttttccttgctcattgattaggctggattctttcagagtgaacataggggata-tattggaccaaaaa-  
tagaatgggtatataattaaagtatttctgatagaacaggag-tatattgtgcgaaaatacctctattttctgtgtctcctaatgagtttgatgaataa-  
tattctcatgtggacattgcttgcaccaggttctgtattaaccgaaccgcaggttatggaa-gagacaaagagaagatgagatagtgaaaatcctaa-  
taaacaatgtagtgatgcccaacac-ctttcagtcctcccaatacttggtatgggggattaggaacacgactctt-gcccaaatggtcttcaatgaccaga-  
gagttactgagcatttccattccaaaatattggattt-gtgtctcgggaagattttgatgagaagaggtaataaaggcaatt-  
gtagaatctattgaaggaaggccactacttggtgagatggacttggtcacttcaaaagaa-gcttcaggagtgtctgaatggaaaagatacttgctt-  
gtcttagatgatgttggaatgaa-gatcaacagaagtgaggcaaatataagagcagcttgaaggttgag-caagtggctctgttctaaccac-  
tactcgtcttgaaggttgatcaattatgg-gaacattgcaaccatataaactgtcaaatctgtctcaagaagattgttggtgtt-gttcatgcaacgtgcattt-  
ggacaccaagaagaaataatccaaaccttggtcaatcg-gaaaggagattgtgaaaaaagtggtggtgtgcctctagcagccaaaactctt-  
ggagggtattttgtctcaagagagaagaaagagcatgggaacatgtgagagacagtcctgat-ttggaaattgcctcaagatgaaagttc-  
tattctgcctgcctgaggcttagttac-catcaactccacttgatttgaacaatgctttgcg-tattgtcgggtgtcccaaggatgcaaaaatgaaaaa-  
gaaaagctaatctctctctg-gatggcgcatggttttttatcaaaaggaacatggagctagag-gatgtgggtgatgaagtatggaaagaattatactt-  
gaggctttttccaaga-gattgaagttaaagatggtaaaacttatttcaagatgcatgatctcatccatgatttgg-caacatctctgtttcag-  
caaacacatcaagcagcaaatccgtgaataaataaacacag-ttacacacatatgatgtccattggttccggaagtgtgttttttacac-  
tctcccccttggaaaagttatctcgtaagagtcttaacttaggtgattcgacatttaa-taagttaccatcttccattggagatctagtacatttaagatactt-  
gaacctgtatggcagtg-gatgcgtagtcttcaaaagcagttatcaagcttcaaaatctgcaaaactctgatctacaa-tattgcaccaagctttgttgtt-  
gcaaaaagaacaagtaaaacttgtag-tctccgaaacttttacttgatggttagccagtcattgacttgtatgccaccaagga-taggatcatt-  
gacatgccttaagactctaggcaattttgttggtaaggaa-gaaaggtatcaacttggtgaactaggaacctaataatctctatggctcaattaaaaatctcg-  
catcttgagagagtgaagaatgataaggacgcaaaagaagccaatttatctg-caaaaggaatctgcattcttaagcatgagttggaataactttggac-  
cacat-atatatgaatcagaagaagttaaagtgttgaagccctcaaacacac-tccaatctgacttcttaaaaatctatggcttcagag-  
gaatccatctccagagtg-gatgaatcactcagattgaaaaatattgtctctattctaattag-caacttcagaaactgctcatgcttaccaccctt-  
ggtgatctgcctgtctagaaagtcta-gagttacttgggggtctcggatgtggagtatgttgaagaagtgga-tattgatgttcattctggattcccccaa-  
gaataaggttccatcttgaggaaacttgata-tatgggactttgtagtctgaaaggattgctgaaaaaggaaggagaagag-caattccctgtgcttgaa-  
gagatgataattcatgag-tgcccccttctgacctttcttaacttagggcttacttccctcagaatttctataa-taaagtagctacttattccagaaga-  
gatgttcaaaaacttgcaaatctcaatactt-gacaatctctcggtgcaataatctcaagagctgcctaccagcttggtctagctgtaattgctt-  
gaaaagctaaaaattcaattgttgcactagagagctccctgaggaagggctg-gaaggttatcttcaactcacagagttatttggtaaacctg-  
taacatgctaaaatgtttac-cagagggattgcagcacctaacaacctcacaagttaaaaatcggg-gatgtccacaactgatcaagcgggtgga-  
gaagggatagagaagactgg-cacaaaattctcacattcctaatgtaatatataataaagtatttgc-tattgttcttggttgtgagcttttt-  
ggttctgccattgtgattgcatgtaattttttc-taggggtgtttgttgtagtctctctcattggatgtaattttcttttg-taacaataacaatctattt-  
gtattatacgtttcagaatctattacttatttgaatt-gtttcttggttgaaattgtgagatcttattgtatggaattttctgattttatttt-gaaaacaaatcaa-  
taagatccatctgtattatactccctctctcattttatgtgacac-ttttggatttcagattcaacaataatctttttgatcttaaaattttcata-  
gatcttttaaacattttgaattatcaattattgtgatttttagtactttttatgtag-tttacaaatataaaaatttttttttaaaaaagaagatttcatgag-  
catattccgatcaaaacttaataactagactctgaaaaatgaaagtgtcacataaattga-gactgagggagtagtcttgaattgtt-  
gtaattattggcgaacaataatgttggtgattatcac-tttctgaataaattgtgtcacgtggaaaaaacaccaatagaagatttcatgcttttttag-tata-  
tataaacacgatttttaacttggttcagcggatagtcacac-ctttactctgaatgtgcacaagtagatacttgtataaaattaaa-taaattttataaaattata-  
caatatgacactgagagtaattgataccaattgcagtcgttcttctgattctctgtcattcteta

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

### Copy number

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

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

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

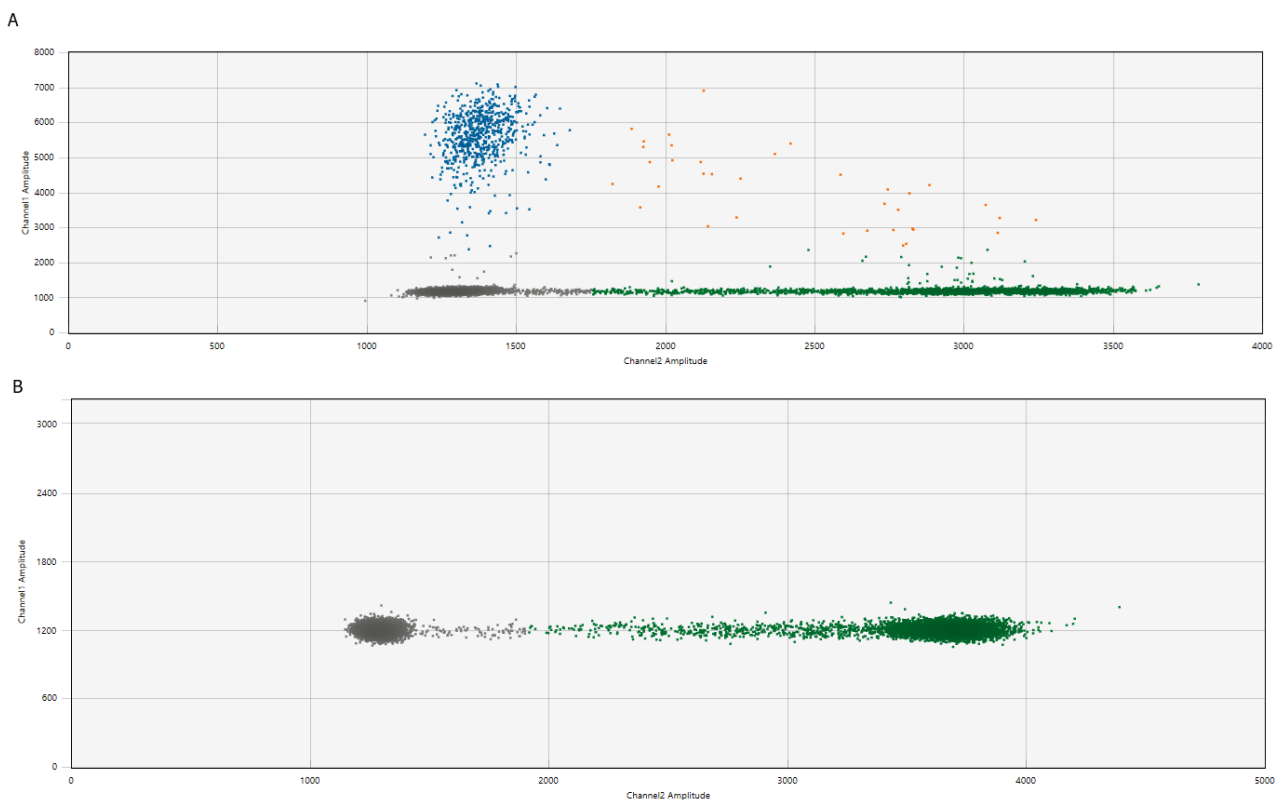
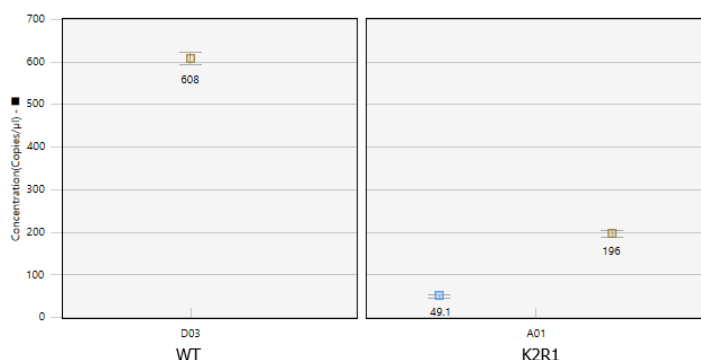


Figure 2. The concentrations (copies/ul) of the samples indicating copy number of the EF1a used as control (brown) and Vnt1 (blue).



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

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

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

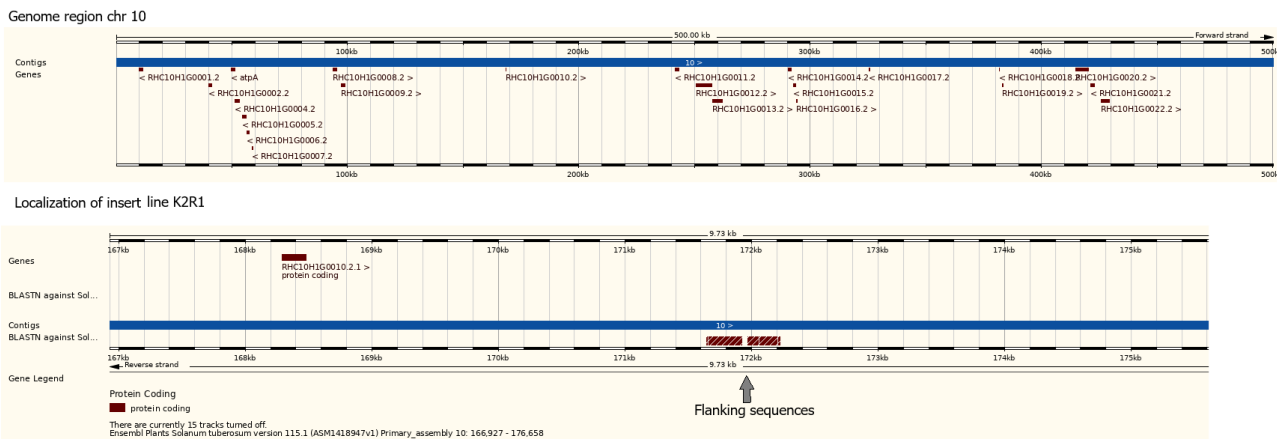
Steps:

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

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

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

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



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking

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

## Abstract

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

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

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

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

## Background

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

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

\* Correspondence: jack.vossen@wur.nl

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

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

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

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

## Results

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

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

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

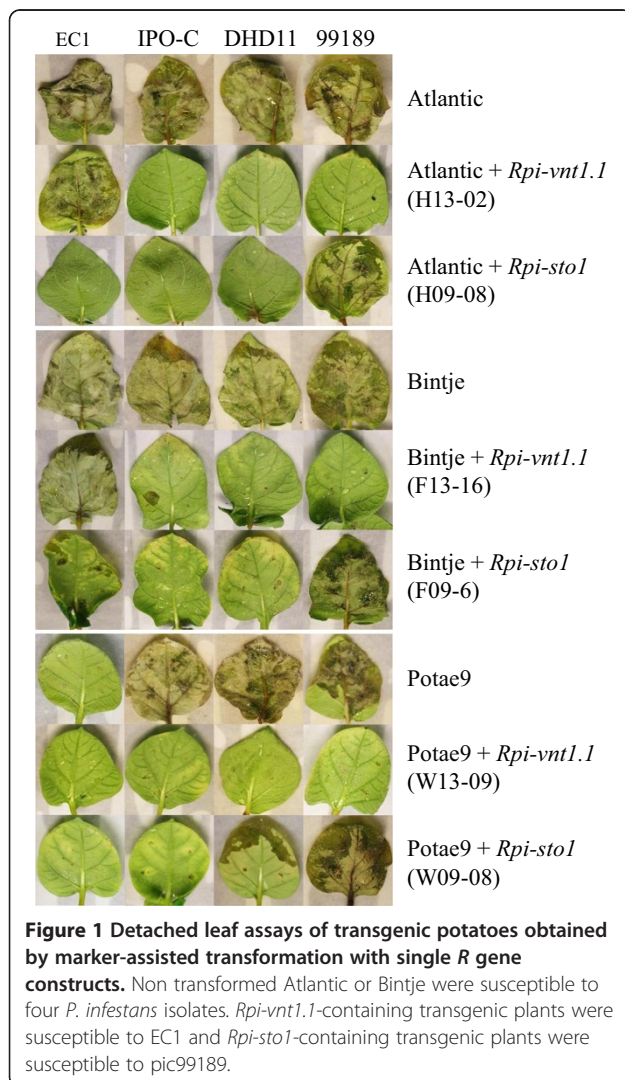
### Selection and validation of cisgenic potato plants with two late blight *R* genes

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

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

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

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

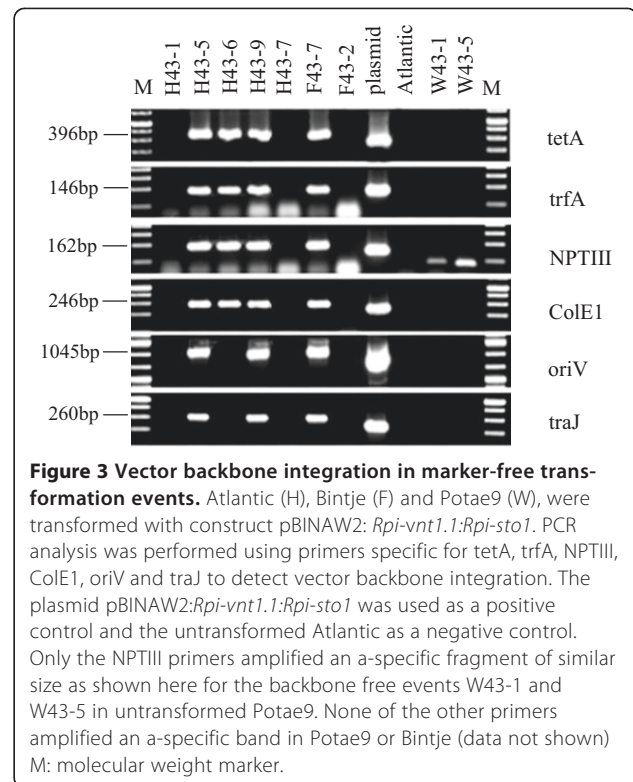
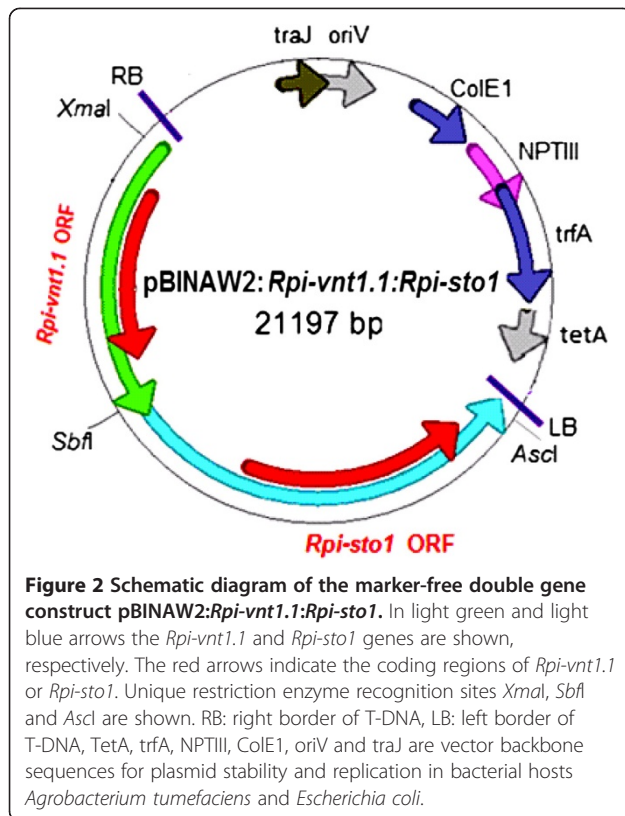


positive shoots were originating from different explants, indicating that they were independent transformation events. Two Bintje events only contained the *Rpi-vnt1* gene and were discarded. The remaining 25 events, containing both *Rpi-vnt1* and *Rpi-sto1*, were further tested using vector backbone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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

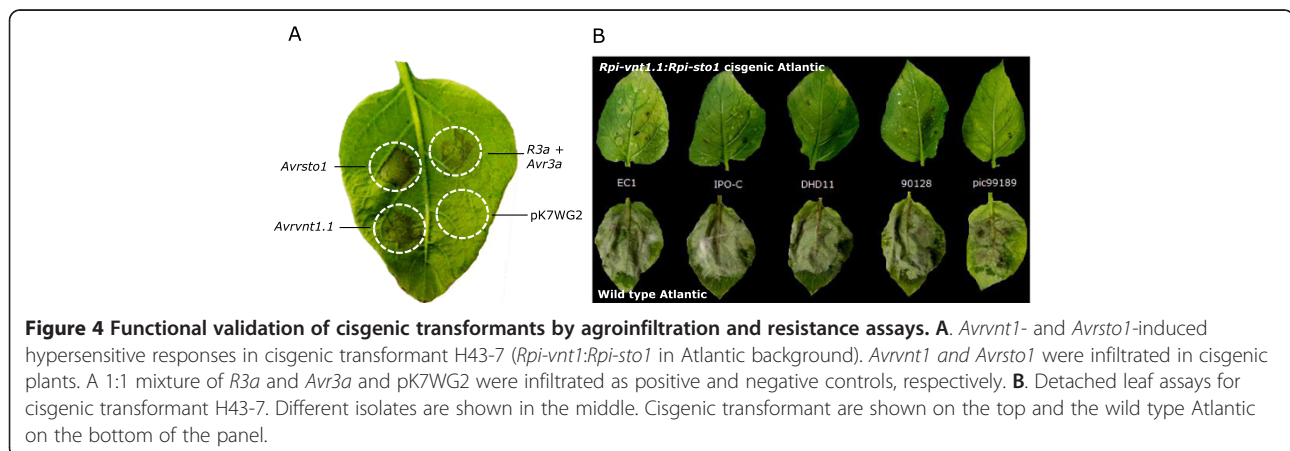
**Table 4 Phenotypic characterization of vector backbone free (cisgenic) events in different potato varieties carrying the *Rpi-vnt1* and *Rpi-sto1* genes**

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

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

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

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



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

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

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

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

## Discussion

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

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

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

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

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

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

\*null hypothesis: group 1 equals group 2.

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

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

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

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

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

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

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

## Conclusions

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

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

## Methods

### Plant material

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

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

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

### Vector construction

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

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

### Potato transformation

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

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

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

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

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

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

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

#### Statistical analysis

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

#### Additional files

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

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

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

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

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### Authors' contributions

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

#### Acknowledgements

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

#### Author details

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

Received: 1 February 2014 Accepted: 20 May 2014

Published: 29 May 2014

#### References

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

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

doi:10.1186/1472-6750-14-50

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

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

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

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



# Miljørisikovurdering af ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg

---

Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet

Bodil Ehlers & Marianne Bruus

Institut for Ecoscience

# Datablad

---

Titel:	Miljørisikovurdering af ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg
Forfatter(e):	Seniorforsker Bodil K. Ehlers, Seniorforsker Marianne Bruus, Institut for Ecoscience, AU
Fagfællebedømmelse:	Professor Christian F. Damgaard, Institut for Ecoscience, AU
Kvalitetssikring, DCA:	Chefkonsulent Louise Dybdahl Pedersen, DCA Centerenheden, AU
Rekvirent:	Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri, Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri
Dato for bestilling/levering:	27.03.2026 / 24.04.2024
Journalnummer:	2026-0933486
Finansiering:	Notatet er udarbejdet under "Kontrakt om ansøgning vedr. forsøgsudsætning, GMO" indgået februar 2026 mellem Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri og Aarhus Universitet som allonge til "Rammeaftale om forskningsbaseret myndighedsbetjening" mellem Miljøministeriet, Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri og Aarhus Universitet under ID nr. 1.20 i "Ydelsesaftale Planteproduktion 2026-2029".
Ekstern kommentering:	Nej
Eksterne bidrag:	Nej
Kommentarer til bestilling:	Aarhus Universitet er af Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri blevet bedt om at vurdere en ansøgning om godkendelse af forsøgsudsætning af genmodificerede kartofler indsendt af Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet, og AKV AmbA. For at sikre en uvildig og habil vurdering af ansøgningen er der gennemført en habilitetskontrol i overensstemmelse med gældende regler og interne procedurer for saglig og upartisk rådgivning. Ingen af de involverede i udarbejdelsen af nærværende notat har dermed været involveret i udarbejdelsen af ansøgningen eller har interesser eller relationer, der kan påvirke afgørelsen.
Kommentarer til besvarelse:	Notatet er dellevering 2 ud af 2 i "Kontrakt om ansøgning vedr. forsøgsudsætning, GMO" indgået februar 2026 mellem Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri og Aarhus Universitet. Notatet er udarbejdet på baggrund af ansøgningen "Ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg" i sin helhed inkl. bilag.
Citeres som:	Ehlers B & Bruus M. 2026. Miljørisikovurdering af ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskifteforsøg. Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet. 6 sider. Leveret: 24.04.2026.
Rådgivning fra DCA:	Læs mere på <a href="https://dca.au.dk/raadgivning/">https://dca.au.dk/raadgivning/</a>

# Baggrund

Styrelsen for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri har bedt AU om at foretage en miljømæssig risikovurdering af den foreslåede forsøgsudsætning (jf. udsætningsdirektivet), herunder en vurdering af de introducerede genetiske ændringer. Risikovurderingen skal tage udgangspunkt i det vedlagte materiale fra ansøgeren, herunder ansøgerens egen vurdering af virkningen på miljøet.

Ansøgningen om forsøgsudsætning er indsendt af Aarhus Universitet og AKV AmbA. Formålet med forsøgsudsætning er at reducere anvendelsen af kemiske plantebeskyttelsesmidler imod kartoffelskimmel (*Phytophthora infestans*). Forsøgene vil foregå på to lokaliteter: ved Aarhus Universitet, Flakkebjerg, Forsøgsvej 1, 4200 Slagelse, samt ved AKV AmbA, Gravholtvej 92, 9310 Vodskov. På lokaliteten ved Flakkebjerg vil sædskifte af ikke-GM-afgrøder i de genetisk modificerede kartofler også blive testet.

# Besvarelse

## Miljømæssig risikovurdering

Vurderingen omhandler forsøgsudsætning af genetisk modificerede kartofler af sorten Kuras som ved Agrobacterium-transformation har fået indsat to resistensgener mod kartoffelskimmel forårsaget af *Phytophthora infestans*.

AU's miljømæssige risikovurdering omfatter følgende punkter, som alle har til formål at identificere uønskede effekter af forsøgsudsætningen. Vurderingen er gældende for den ansøgte forsøgsudsætning.

1. Risiko for spredning af den genetisk modificerede kartoffel til omgivelserne
2. Risiko for spredning af den genetisk modificerede kartoffel til naturen
3. Risiko for spredning af de indsatte gener fra den genetisk modificerede kartoffel til vilde slægtninge i Danmark
4. Risiko for spredning af de indsatte gener fra den genetisk modificerede kartoffel til konventionelt dyrkede kartofler
5. Risiko for effekter på naturen og miljøet i øvrigt
6. Behov for overvågning
7. Vurdering af om ansøgers risikohåndtering er fyldestgørende

AU's vurdering:

1. Knolde fra kartofler, *Solanum tuberosum*, kan afhængigt af vinterens kuldegrader og varighed i varierende grad overleve milde danske vintre (OECD 1997, Kudsk 2012, Boelt & Kudsk 2021). Udsættes knolde for frostgrader lavere end  $-3^{\circ}\text{C}$ , er deres overlevelse dog ringe og afhænger af,

hvor dybt i jorden de ligger, og hvor tør jorden er (bedre overlevelse i tør end våd jord) (Boydston et al. 2006, Mustonen et al. 2009, Phelan et al. 2015). Knolde, der overlever milde vintre, ses som spirende kartofler i efterfølgende afgrøder, og selv efter fem år kan der forekomme kartofler i efterfølgende afgrøder (Schnipper 2019). Dette forventes ikke at være anderledes for den genetisk modificerede kartoffel, og der er således en sandsynlighed for, at der sporadisk vil forekomme overlevende genetisk modificerede kartofler på det pågældende forsøgsareal i årene efter dyrkningen. De genetiske ændringer i kartofflen, som udsætter angreb af skimmelsvamp, forventes ikke at ændre på dette. De af ansøger nævnte forholdsregler (hånd- og maskinopgravning af rodunderskårne knolde, gentagne harvninger og en manuel undersøgelse af spildkartofler efter hver høst samt overvågning af arealet i minimum 4 år efter forsøgets afslutning (begge forsøgslokaliteter) og, for Flakkebjerg, (herbicidesprøjtning i sædskiftet) forventes at være tilstrækkelige for at forhindre spredning af den genetisk modificerede kartoffel til omgivelserne via spildkartofler.

Kartoffelfrø kan overleve i jorden, også ved lavere temperaturer end knoldene (Mustonen et al. 2009), og ses som nye kimplanter det efterfølgende år. AU vurderer, at forsøget skal inkludere afklipning af kartofflernes blomster, når planterne begynder at blomstre. Dette vil blandt andet forhindre forekomsten af frø og derved forhindre eventuel spredning af den genetisk modificerede kartoffel til omgivelserne via frøspredning.

2. Der er ikke fundet oplysninger om permanente selvreproducerende bestande af kartoffelplanter i dansk natur. Kartoffelplanter optræder sporadisk flere steder som følge af tilfældig spredning fra spildkartofler (langs vejkanter, markkanter, jordbunker, tangvolde og strandbredder mv.) (Hartvig 2015). En sådan spredning til naturen sker typisk ved tab i forbindelse med transport og bortskaffelse af haveaffald. De af ansøgeren anførte forholdsregler om håndtering ved høst (destruktion af den genetisk modificerede kartoffel samt fragt af høstede kartofler efter godkendte forskrifter for GMO-plantemateriale til GMO-godkendte faciliteter (Flakkebjerg)) forventes at være tilstrækkelige til at undgå en sådan spredning.
3. I Europa er de nærmeste vilde slægtninge til kartoffel, *Solanum tuberosum*, arter i slægten natskygge, *Solanum*, som kartoffel også tilhører. I Danmark findes der to hovedarter af slægten, som er naturligt forekommende: sort natskygge og bittersød natskygge samt nogle underarter af bittersød natskygge (Hartvig 2015). Krydsninger mellem kartoffel og de europæiske natskyggearter forekommer ikke i naturen. I praksis må kartoffel således betragtes som en art, der ikke kan krydse med vilde europæiske arter af natskygge, *Solanum*, og selv hvis dette skulle ske, vil hændelsen resultere i sterilt afkom (Eijlander & Stiekema 1994). De indsatte resistensgener mod kartoffleskimmel forventes ikke at ændre på dette. Afklipning af blomster ved blomstring vil helt fjerne risikoen for pollenspredning af den genetisk modificerede kartoffel til vilde slægtninge i Danmark. Risikoen for natur og miljø forbundet med en sådan spredning vurderes på den baggrund at være negligerbar.
4. Spredning af gener fra de genetisk modificerede kartofler til konventionelt dyrkede kartofler kan ske ved spredning af pollen. Pollenspredning fra kartoffel kan ske ved insekters pollenindsamling, og nogle arter af humlebier er effektive fremmedbestøvere af kartofler (Batra 1993). Hybridisering mellem kartoffelsorter aftager hurtigt med afstanden mellem planterne. McPartlan og Dale (1994) fandt således, at nærtstående planter havde en hybridiseringsrate på 24%, mens der ved en afstand på 10 m var en hybridiseringsrate på 0,017%. Hvis afstanden var 20 m, blev der ikke fundet hybridfrø. Ansøger beskriver for begge lokaliteter, at afstanden fra de forsøgsudsatte GM-

kartofler til nærmeste nabomark med kartofler vil være mindst 20 meter. Desuden vil der omkring forsøgsudsætningen på lokaliteten AKV (ansøgers bilag 4) for at mindske randeffekter blive plantet et værn af ikke-genetisk modificerede kartofler omkring GM-kartofflen, som høstes og behandles på samme vis som GM-kartoflerne. Et sådant værn vil kunne fungere som pollenfanger og yderligere mindske risikoen for en potentiel spredning af GM-pollen til omgivende marker. Med afklipning af blomsterne fra GM-kartofler ved blomstring vurderes samlet, at risikoen for natur og miljø forbundet med genspredning fra de genetisk modificerede kartofler til dyrkede kartofler vil være negligerbar.

5. Påvirkningen af naturindholdet forventes ikke at adskille sig fra den påvirkning, der finder sted ved dyrkning af konventionelle kartofler. En reduceret anvendelse af kemiske bekæmpelsesmidler mod kartoffelskimmel forventes at være gavnlig for natur og miljø på markfladen og i omgivelserne. Risikoen for forøgede negative effekter på markfladens natur som følge af dyrkning af den genetisk modificerede kartoffel vurderes derfor at være negligerbar. Der er ikke fundet eksempler på studier, som viser horisontal genoverførsel fra kartofler til mikoroorgansimer. Risikoen for denne teoretisk mulige, men højst usandsynlige hændelse vurderes ligeledes negligerbar. Sandsynligheden for effekter på miljøet i øvrigt som følge af forsøgsudsætningen forventes således ikke at adskille sig fra dyrkning af konventionelle stivelseskartofler på et tilsvarende areal. Risikoen for en forøget negativ påvirkning af natur og miljø vurderes derfor at være negligerbar.
6. Overvågning i forbindelse med forsøgsudsætningen som foreslået af ansøgeren vurderes at være tilstrækkelig. Den foreslåede efterbehandling og overvågning af arealerne i 4 år efter forsøgsudsætningen efterlader en meget lille sandsynlighed for, at enkelte genetisk modificerede kartofler overlever på arealet ud over det første år. Det vurderes, at langt de fleste genetisk modificerede kartofler vil forsvinde i løbet af en kort årrække. Dog bør der ikke på arealet produceres læggekartofler eller andre kartofler i en længere årrække efter forsøgsudsætningens afslutning.
7. AU vurderer, at såfremt der sker en afklipning af blomster af de udsatte genetisk modificerede kartofler ved blomstring, vil de af ansøgeren beskrevne tiltag for at forhindre spredning af materiale fra de forsøgsudsatte genetisk modificerede kartofler til omgivelserne være tilstrækkelige til at forhindre uønskede effekter på natur og miljø.

## Konklusion

I forbindelse med den specifikke forsøgsudsætning vurderes det, *under forudsætning af, at ansøger afklipper blomsterne på GM-kartoflerne ved blomstring*, at de af ansøger foreslåede tiltag for at hindre spredning af materiale fra den genetisk modificerede kartoffel sikrer en meget lille sandsynlighed for, at der sker spredning til omgivelserne. Den genetiske modificering, som kan medføre en udsættelse af angreb af skimmelsvamp, forventes ikke at ændre den modificerede kartoffels påvirkning på natur og miljø i forhold til andre konventionelt dyrkede kartofler.

## Referencer

- Batra, SWT. 1993. Male-fertile Potato Flowers are Selectively Buzz-Pollinated only by *Bombus terrestris* Kirby in Upstate New York. *Journal of the Kansas Entomological Society* 66(2), 252-254.
- Boelt, B. & Kudsk, P. 2021. Opdatering af viden og data der ligger til grund for dyrkningsvejledning af visse genetisk modificerede afgrøder. Rådgivningsnotat fra DCA-- Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet. Leveret: 9. november 2021.
- Boydston, R.A., Seymour, M.D., Brown, C.R., & Alva, A.K. 2006. Freezing behaviour of potato (*Solanum tuberosum*) tubers in soil. *American Journal of Potato Research*, 83, 305-315.
- Eijlander, R., Stiekema, W.J. 1994. Biological containment of potato (*Solanum tuberosum*): outcrossing to the related wild species black nightshade (*Solanum nigrum*) and bittersweet (*Solanum dulcamara*). *Sex Plant Reprod* 7, 29-40.
- Hartvig, P. 2015. *Atlas Flora Danica*. Gyldendal, København.
- Kudsk, P. 2012. Notat vedrørende udarbejdelse af bekæmpelsesstrategi over for overvintrende genmodificerede kartofler. Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet. 3 sider. Leveret: 12. december 2012.
- McPartlan, H.C. Dale, P.J. 1994. An assessment of gene transfer by pollen from field-grown transgenic potatoes to non-transgenic potatoes and related species. *Transgenic Research* 3, 216-225.
- Mustonen, L., Peltonen-Sainio, P. & Pahlkala K. 2009: Risk assessment for volunteer and seedling GM potatoes in the northernmost European growing areas. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B – Soil and Plant Science*, 59, 552-558
- OECD 1997. Consensus document of the Biology of *Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum* (Potatoe). OECD Environmental Health and Safety Publication, Paris 1997.
- Phelan, S., Fitzgerald, T., Grant, J., Byrne, S., Meade, C., Mullins, E. 2015. Propensity for seed-mediated gene flow from potato crops and potential consequences for the coexistence of GM and non-GM potato systems. *European Journal of Agronomy* 67, 52-60. D
- Schnipper, S.O. 2019. Spildkartofler, pigæbler og andre ukrudtsudfordringer! <https://www.bj-agro.dk/media/1447/bj-agro-kartoffeldag-indlaeg-sos-uoensket-plantvaekst-feb2019.pdf>

The Danish Agency for Agriculture  
Nyropsgade 30  
1780 Copenhagen V  
Att. Morten Storgaard and Christine Gundelach Rannes

Dato: 29-04-2026  
J.nr. 26/1001909  
RK-JP/ risk assessment of cisgenic  
potatoes from AU and AKV  
2026\_LBST.docx

**Application for release of cisgenic potatoes in crop rotation trials with multiple complementary resistance genes conferring increased resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) from Aarhus University (AU) and AKV 2026-2029<sup>1</sup>**

*Order from the Danish Agency for Agriculture and Fisheries (LBST) for field trial release of GM potatoes.*

In connection with the above case, DTU Food has received a request from the Danish Agency for Agriculture and Fisheries (LBST) concerning an application for experimental release submitted by Aarhus University (AU) in collaboration with AKV. The application relates to the field release of cisgenic potato lines of the cultivar Kuras containing multiple complementary resistance (R) genes conferring increased resistance to late blight caused by *Phytophthora infestans*. The potatoes are intended for use in crop rotation field trials at designated sites for the period from March 15<sup>th</sup> to October 30<sup>th</sup> in the years 2026–2029.

*DTU-Food is requested to deliver the following (translated from Danish):*

*Health risk assessment of the proposed experimental release (cf. the release directive), including an assessment of the introduced genetic changes of the potato varieties. The risk assessment must be based on the material provided by the applicant, including the applicant's own assessment of the effect on human and animal health.*

---

<sup>1</sup> Ansøgning om brug af cisgene kartofler i sædskiftforsøg fra Aarhus University og AKV

The following assessment relates to cisgenic potatoes with increased resistance to potato late blight caused by *Phytophthora infestans*.

### *Brief description of the project.*

Cultivation of genetically modified potato plants for experimental field trial release, which takes place between March 15<sup>th</sup> and October 30<sup>th</sup> during the period 2026–2028 at Flakkebjerg and 2026–2029 at AKV. The field trial sites are located at Flakkebjerg, 4200 Slagelse, Aarhus University (field block number 651133-27) and Vodskov, 9310, AKV AmbA (field block number 565332-85).

At Flakkebjerg, the total area designated for cultivation is 7,200 m<sup>2</sup> (gross area), with 720 m<sup>2</sup> (net area) used for cultivation of GM lines. At AKV, the total area designated for potato cultivation is 9,415 m<sup>2</sup> (gross area), with 1,231 m<sup>2</sup> (net area) used for GM lines.

The application submitted by AU and AKV concerns the experimental field release of cisgenic potato plants of the cultivar Kuras, genetically modified to confer improved resistance to potato blight (*Phytophthora infestans*) through insertion of multiple complementary resistance (R) genes. The purpose of the genetic modification is to reduce yield losses due to late blight and to reduce or avoid the need for fungicide applications.

The purpose of the experimental release is to evaluate the performance and stability of the improved late blight resistance under field conditions, including its relevance for crop rotation systems. The potato plants to be released consist of one cisgenic line (K2R1) derived from the Kuras variety.

### *Construction*

The applicant describes that the genetically modified potato line (cisgenic potatoes with multiple complementary resistance genes) was developed using *Agrobacterium*-mediated transformation with the marker-free plasmid vector pBINAW2, carrying two cisgenes: *Rpi-vnt1.1* from *Solanum venturii* and *Rpi-sto1* from *Solanum stoloniferum*. Both genes, including their native promoters and 3' untranslated regions, were assembled into a single continuous T-DNA construct and introduced into the potato variety Kuras. No transgenic or cisgenic Atlantic potato lines are included in the experimental release.

PCR-based analyses confirmed the presence of both R genes, with DNA fragments of the expected size detected in the transformed potato line and absent in the non-transformed background variety. Based on the established biological function of the introduced genes, the modified potato line is expected to exhibit increased resistance to potato late blight (*Phytophthora infestans*). Expression of the introduced genes is expected to occur in relevant plant tissues under the control of their respective native promoters.

Detailed molecular characterization of the selected line includes copy number determination by digital droplet PCR (ddPCR) and characterization of the genome insertion site by inverse PCR. The outcome demonstrates the presence of a single copy of the inserted cisgenic cassette containing *Rpi-vnt1.1* and *Rpi-sto1*, integrated at a single genomic location in a non-coding region of the potato genome. No unintended integration of vector backbone sequences, including antibiotic resistance genes, was detected.

The molecular analyses were conducted on plants in the T<sub>0</sub> generation, which are propagated vegetatively via tubers. The integrity of the inserted sequences was confirmed in characterised material, and no evidence of rearrangements or recombination events was observed. On this basis, stable maintenance of the inserted sequences is expected in subsequent clonal propagation, although this will be further verified through continued cultivation.

DTU, National Food Institute, considers the description of the genetic modification and molecular characterisation to be sufficient to support an initial health risk assessment of the plants proposed to be released. The introduced genetic material originates from cross-compatible wild potato species (cisgenesis) and does not result in the introduction of a novel protein and/or biochemical pathways that are not already present within the potato gene pool. As with any plant produced using genetic modification techniques, it cannot be excluded that unintended genomic changes/mutations may have occurred elsewhere in the genome. However, based on current scientific knowledge and regulatory experience, such changes are considered to be within the range of variations observed in conventional breeding, including the occurrence of spontaneous mutations, and are therefore not expected to pose a higher risk to human or animal health than conventional breeding.

The application concerns the experimental release of one cisgenic potato line (K2R1), selected for field evaluation based on the presence and intended functionality of the introduced resistance genes.

Overall, DTU, National Food Institute, assesses that no indication of an increased risk to human or animal health has been identified based on the molecular characterization of the GM potato line. It is expected to be comparable in health and food safety to conventional bred potatoes.

### *Containment:*

The **biological containment** is assessed as good for potatoes based on their biology. Potatoes are primarily propagated vegetatively via tubers, and sexual reproduction through pollen and true seed formation plays a negligible role under experimental cultivation conditions. Potatoes are largely self-pollinating, and the likelihood of effective cross-pollination is considered very low. In Danish climatic conditions, potatoes are sensitive to frost and rarely overwinter. The applicant has described appropriate measures to manage potential volunteers, including post-harvest soil treatment and multi-year monitoring.

The **physical containment** for the current experimental release is assessed as appropriate with regard to access control and field layout. The experimental area is clearly demarcated with paths and border zones, and a buffer zone consisting of non-genetically modified potatoes is established surrounding the GM plots. According to the application, the distance to the nearest externally cultivated potato field is at least 20 metres, which is in accordance with Danish regulatory requirements.

Harvesting is primarily carried out by manual digging and collection, which is considered an effective measure to minimise the risk of leaving tubers in the soil. Procedures for handling and transport of harvested material, as described in the application, include containment measures that are assessed to ensure appropriate control of GM material during and after harvest.

To prevent pollen and seed dispersal, the applicant has stated that, if required as a condition for approval, flowers will be removed from the potato plants during the flowering period (typically from early July until flowering ceases). Removal of flowers is assessed to effectively prevent unintended pollen dispersal and true seed formation and thus further reduce the already low risk of gene flow via sexual reproduction. As the applicant failed to elaborate on the biology of potatoes in relation to their method(s) of pollination (e.g., wind, insects, etc.) (as requested by DTU) and to

make a full risk assessment of the risk of pollen dispersal, DTU concludes that removal of the flowers would be required.

In total, DTU, the National Food Institute, assesses that the combined biological and physical containment measures ensure a high level of containment during cultivation. On this basis, the likelihood of spread of the genetically modified potatoes to other potato fields or into the surrounding environment is considered very low. The planned post-harvest monitoring of the trial areas, including inspection and removal or destruction of any volunteer potato plants in subsequent years, is assessed to be sufficient to prevent temporal persistence or spread of GM material beyond the trial period.

In total, DTU, the National Food Institute, assesses that the overall containment of the potatoes during cultivation is high and that there will be no spread of GM material to other fields or potato plants.

*Overall assessment.*

It is the assessment of DTU, National Food Institute, that the combination of the physical and biological containment of the potatoes during the field trials will ensure that there will be no spread of GM material (potatoes/pollen/seeds).

It is the assessment of DTU, National Food Institute, that a “worst-case scenario” where the genetically modified potatoes are spread to potato fields via tubers or pollen (e.g. for consumption or propagation) will not constitute a health problem based on knowledge of the design. The expected new properties are not associated with a health risk of potatoes and do not cause the formation of new constituents other than intended.

Best regards,

Radhakrishna Shetty and Jan Pedersen

# KOMMISSIONEN

## KOMMISSIONENS BESLUTNING

af 29. september 2003

**om fastlæggelse, i henhold til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/18/EF af en model for fremlæggelse af resultatet af udsætning i miljøet af genetisk modificerede højerestående planter i andet øjemed end markedsføring**

(meddelt under nummer K(2003) 3405)

(EØS-relevant tekst)

(2003/701/EF)

KOMMISSIONEN FOR DE EUROPÆISKE FÆLLESSKABER HAR —

under henvisning til traktaten om oprettelse af Det Europæiske Fællesskab,

under henvisning til Europa-Parlamentets og Rådets direktiv 2001/18/EF af 12. marts 2001 om udsætning i miljøet af genetisk modificerede organismer og om ophævelse af Rådets direktiv 90/220/EØF<sup>(1)</sup>, særlig artikel 10, andet punktum, og

ud fra følgende betragtninger:

(1) I forbindelse med udsætning af genetisk modificerede organismer (GMO'er) i andet øjemed end markedsføring kræves det efter artikel 10 i direktiv 2001/18/EF, at anmelderen, når en udsætning er fuldført og derefter med de intervaller, der er fastsat i tilladelsen på grundlag af resultaterne af miljørisikovurderingen, meddeler den kompetente myndighed resultatet af udsætningen, hvad angår enhver risiko for menneskers sundhed eller miljøet, i givet fald med særlig henvisning til de typer produkter, som anmelderen agter at anmelde på et senere tidspunkt.

(2) Hidtil har de fleste GMO'er, som er udsat i Fællesskabet i overensstemmelse med del B i direktiv 2001/18/EF, været genetisk modificerede højerestående planter (GMHP). Det er derfor nødvendigt at fastsætte en model, som anmelderen af en sådan udsættelse skal anvende i forbindelse med fremlæggelsen af resultaterne af udsætningen af disse planter til den kompetente myndighed. Modellen bør afspejle behovet for at gøre udvekslingen af relevante oplysninger så fyldestgørende som muligt på en standardiseret og letforståelig måde. Modellen bør

gøres så generel som muligt, så den kan omfatte udsætninger i flere områder eller udsætninger over flere år og flere GMO'er i én og samme rapport.

(3) Da genteknologi ikke er begrænset til højerestående planter, er der behov for yderligere bestemmelser med henblik på at udarbejde modeller for andre typer af GMO'er, som f.eks. genetisk modificerede (GM) dyr (herunder GM insekter), veterinære og medicinske produkter (der indeholder eller består af GMO'er) eller for andre GM planter, som kan benyttes til at producere farmaceutiske produkter. Derudover kan det som følge af den fremtidige udvikling blive nødvendigt at tilpasse de allerede udarbejdede rapporteringsmodeller.

(4) De i denne beslutning fastsatte foranstaltninger er i overensstemmelse med udtalelse fra det i medfør af artikel 30 i direktiv 2001/18/EF nedsatte udvalg —

VEDTAGET FØLGENDE BESLUTNING:

### Artikel 1

Med henblik på at fremlægge resultaterne af udsætning i miljøet af genetisk modificerede højerestående planter (GMHP) for den kompetente myndighed i henhold til artikel 10 i direktiv 2001/18/EF skal anmelderen benytte modellen i bilaget til denne beslutning (i det følgende: »rapporteringsmodellen«).

### Artikel 2

En rapporteringsmodel kan højest være knyttet til én tilladelse udstedt af den kompetente myndighed, og den skal være identificeret med et enkelt anmeldelsesnummer.

<sup>(1)</sup> EFT L 106 af 17.4.2001, s. 1.

*Artikel 3*

1. Anmelderen indgiver en endelig rapport for hvert anmeldelsesnummer, og der indgives en endelig samt en eller flere delrapporter om overvågningen efter udsætningen, hvor dette er relevant. Begge typer af rapporter skal udfærdiges i overensstemmelse med rapporteringsmodellen.

2. Den endelige rapport indgives efter den sidste høst af de GMHP. Hvis der ikke kræves overvågning efter udsætningen i forbindelse med denne anmeldelse, skal der ikke indgives yderligere rapporter.

3. Den endelige rapport om overvågningen efter udsætningen indgives, når overvågningen efter udsætningen er afsluttet.

I de relevante tilfælde specificerer den kompetente myndighed i sin tilladelse varigheden af overvågningen efter udsætningen samt et tidsskema for, hvornår delrapporter over overvågningen efter udsætningen indgives.

4. Den kompetente myndighed opfordrer anmelderne til at fremlægge rapporten i elektronisk form.

*Artikel 4*

Den kompetente myndighed kan anmode anmelderen om yderligere oplysninger, navnlig i form af en logbog eller delrapporter, som skal indgives i løbet af forskningsprogrammet, før udsætningen er afsluttet.

*Artikel 5*

Denne beslutning er rettet til medlemsstaterne.

Udfærdiget i Bruxelles, den 29. september 2003.

*På Kommissionens vegne*

Margot WALLSTRÖM

*Medlem af Kommissionen*

## BILAG

MODEL TIL FREMLÆGGELSE AF RESULTATET AF UDSÆTNING I MILJØET AF GENETISK MODIFICEREDE HØJERESTÅENDE  
PLANTER I HENHOLD TIL ARTIKEL 10 I DIREKTIV 2001/18/EF

## VIRKSOMHEDENS ELLER FORSKNINGSINSTITUTTETS LOGO (VALGFRI)

Rapporteringsmodellen udfyldes af anmelderen.

Anmelderen udfylder rapporteringsmodellen i henhold til angivelserne (afkryds bokse og/eller, så vidt muligt, specifikke stikord, der benyttes i tekstfeltene).

Anmelderen illustrerer så vidt muligt de forelagte data med diagrammer, figurer og tabeller. Der kan også fremlægges statistiske data, hvor dette er relevant.

I forbindelse med udsætninger i flere områder, udsætning af flere genetisk modificerede organismer og/eller udsætninger over flere år fremlægger anmelderen en generel oversigt over de trufne foranstaltninger og de konstaterede virkninger i tilladelsens gyldighedsperiode.

Den plads, der er afsat til hvert punkt, er ikke udtryk for den detaljeringsgrad, der er påkrævet i forbindelse med oplysningerne i denne rapport.

1. **Generelle oplysninger**

1.1. **Europæisk anmeldelsesnummer:** B/XX/YY/ZZ

1.2. **Anmeldelsesmedlemsstat:** .....

1.3. --- **Dato og nummer for tilladelse:** .....

2. **Rapportstatus**

2.1. **Angiv venligst, om den foreliggende rapport i henhold til denne beslutnings artikel 3 er:**

— den endelige rapport

— en rapport om overvågningen efter udsætningen

—  Endelig rapport  Interimsrapport

3. **Nærmere oplysninger om udsætningen**

3.1. **Recipientorganismens videnskabelige navn:** .....

3.2. **Transformationshændelse(r) (akronym(er)) eller anvendte vektorer <sup>(1)</sup> (hvis transformationshændelsens identitet ikke er kendt).....**

3.3. **Entydig identifikator, hvis den er kendt:** .....

3.4. **Angiv venligst følgende oplysninger sammen med en skitse over området/områderne:**

Geografisk beliggenhed (administrativ enhed og i givet fald angivelse af kvadratnetsreference)	Aralet af udsætningsområder eller -områderne <sup>(1)</sup> (m <sup>2</sup> )	For hver hændelse angiv identifikation <sup>(2)</sup> og giv et overslag over antallet af genmodificerede højerestående planter, der udsættes (antal frø/planter pr. m <sup>2</sup> )	Udsætningens varighed: (fra...(dag/måned/år).....til... ...(d/m/å).....)

<sup>(1)</sup> Angiv størrelsen af GM-området og, hvis det er relevant, størrelsen af det GM-fri område (f.eks. GM-fri randområder).

<sup>(2)</sup> Benyttede vektorer.

<sup>(1)</sup> I forbindelse med små markforsøg, hvor der kan udføres forsøg med flere sorter, anføres de benyttede vektorer, som giver indsigt i de indførte egenskaber og/eller genetiske elementer. I forbindelse med større markforsøg begrænses antallet af anmeldte hændelser til én eller enkelte hændelser.

4. **Alle typer af produkter, som anmelderen påtænker at anmelde på et senere tidspunkt**

4.1. **Har anmelderen til hensigt på et senere tidspunkt at anmelde den eller de udsatte transformationshændelse(r) som et eller flere produkter til markedsføring under fællesskabslovgivningen**

Ja  Nej  Vides ikke p.t.

Hvis ja, angives anmeldelseslandet eller -landene: .....

Hvis ja, specificeres til hvilke(t) anvendelsesformål:

- Import
  - Avl (f.eks. produktion af frø/plantemateriale)
  - Fødevarer
  - Føder
  - Farmaceutisk anvendelse (eller forarbejdning med henblik på farmaceutisk anvendelse)
  - Forarbejdning med henblik på
    - videre anvendelse i fødevarer
    - videre anvendelse i foder
    - videre anvendelse i industrien
  - Andre (anfør hvilke)
- .....

5. **Type(r) af udsætning(er)**

Afkryds venligst den eller de væsentligste type(r) (i boksene) og undertype(r) i forbindelse med udsætningen eller udsætningerne. I forbindelse med udsætninger i flere områder, udsætning af flere genetisk modificerede organismer og/eller udsætninger over flere år fremlægges en generel oversigt over den eller de type(r) udsætning(er), der er gennemført i tilladelsens gyldighedsperiode. Afkryds venligst den eller de relevante type(r):

5.1. **Udsætning(er) med henblik på forskning**

5.2. **Udsætning(er) med henblik på udvikling**

- Screening af indsætningsbegivenheder
- Afprøvning af koncept <sup>(?)</sup>
- Agronomiske egenskaber (f.eks. plantebeskyttelsesmidlets effektivitet/selektivitet, udbytte, spireevne, afgrødens etableringsevne, plantens levedygtighed, plantens højde, følsomhed over for klimafaktorer/sygdomme osv.) (specificeres nærmere)
- Ændrede agronomiske egenskaber (f.eks. resistens over for sygdomme, skadedyr, tørke eller frost osv.) (specificeres nærmere)
- Ændrede kvalitative egenskaber (forlænget holdbarhed, forbedret næringsværdi, ændret sammensætning osv.) (specificeres nærmere)
- Ekspressionens stabilitet
- Opformering af linier
- Undersøgelse af hybriders levedygtighed
- Anvendelse af planten som en fabrik («molecular farming») <sup>(?)</sup>
- Phytoremediering
- Andre: ..... (beskriv nærmere): .....

5.3. **Officiel prøvning**

- Registrering af sorten på en national sortliste
  - SES (= Selvstændighed, Ensartethed og Stabilitet)
  - Værdiafprøvning (= værdi af dyrkning og anvendelse)
- Andre (anfør hvilke): .....

<sup>(?)</sup> F.eks. afprøvning af den nye egenskab under miljøforhold.

<sup>(?)</sup> «Molecular farming» står for produktion af stoffer (f.eks. proteiner og lægemidler) på grundlag af planter, som er genetisk modificeret med henblik på en særlig egenskab. «Molecular farming» kunne defineres som produktion af lægemidler ved syntetisering af planter, som lægemiddelproducerende planter, eller som plantebaseret produktion af proteiner o.s.v.

- 5.4. **Herbicidtiladelse**
- 5.5. **Udsætning(er) med henblik på demonstration**
- 5.6. **Opformering af frø**
- 5.7. **Udsætning(er) med henblik på forskning i biosikkerhed/risikovurdering**
- Undersøgelser af vertikal genoverførsel
- Krydsbestøvning med konventionelle afgrøder
- Krydsbestøvning med vilde slægtninge
- Undersøgelser af horisontal genoverførsel (overførsel af gener til mikroorganismer)
- Håndtering af selvsåede planter
- Potentielle ændringer i persistens eller spredning
- Potentiel invasionsevne
- Potentielle virkninger på målorganismer
- Potentielle virkninger på ikke-målorganismer
- Observation af resistente slægtninge
- Observation af resistente insekter
- Andre (beskriv nærmere): .....
- 5.8. **Anden/andre type(r) udsætning(er):**
- (Beskriv nærmere): .....
6. **Udsættens metode(r) og resultat(er) samt forvaltnings- og overvågningsforanstaltning(er) i relation til enhver risiko for menneskers sundhed eller miljøet**
- 6.1. **Risikostyringsforanstaltning(er)**
- Anfør venligst de risikostyringsforanstaltninger, der er anvendt for at undgå eller minimere spredningen af GMO'er uden for udsættensområdet eller -områderne, og navnlig de foranstaltninger
- som ikke er anmeldt i den oprindelige ansøgning
- som er anvendt ud over de i tilladelsen fastsatte betingelser
- som ifølge tilladelsen kun er krævet under særlige forhold (f.eks. tørkeperioder eller ved oversvømmelse)
- hvor anmelderen ifølge tilladelsen kunne vælge mellem flere foranstaltninger.
- Afkryds de relevante eksempler:
- 6.1.1. *Før såning/plantning:*
- De genetisk modificerede frø/plante partier mærkes tydeligt (så disse kan skelnes fra andre frø, rodknolde osv.) (beskriv nærmere).
- Adskilt forarbejdning og transport af frø og planter (beskriv den anvendte metode og giv et eller flere eksempler på indeslutningen med henblik på at undgå spild i forbindelse med forarbejdning og transport).
- Overfløede frø/planter destrueres (beskriv den anvendte metode).
- Midlertidig indeslutning (anfør nærmere).
- Sædskilte (angiv den eller de tidligere afgrøde(r)).
- Andre (anfør hvilke): .....
- 6.1.2. *I forbindelse med såningen/plantningen:*
- Metode anvendt til såning/plantning.
- Tømning og rensning af så- eller plantemaskiner i udsættensområdet.
- Adskilt såning/plantning (Giv et eller flere eksempler på indeslutningsforanstaltninger for at undgå udslip under såning/plantning).
- Andre (anfør hvilke): .....

6.1.3. *I løbet af udsætningsperioden:*

- Isolationsafstand(e) (× meter)
  - fra krydsningskompatible kommercielt dyrkede plantearter
  - fra krydsningskompatible beslægtede vilde plantearter
- Beplantning i randområder (med samme eller en anden afgrøde, med en ikke-transgen afgrøde, × meter osv.)
- Bur/net/hegn/skiltning (angiv nærmere)
- Pollenfælder (angiv nærmere)
- Fjernelse af GM blomsterstandene før blomstringen (angiv med hvilken hyppighed de fjernes)
- Fjernelse af stokløbere/slægtninge/hybridiseringspartnere (angiv med hvilken hyppighed de fjernes, × meter rundt om GM-området osv.)
- Andre (anfør hvilke): .....

6.1.4. *Ved udløbet af udsætningsperioden:*

- Høst/destruktionsmetoder (af afgrøden eller dele af denne)/andre foranstaltninger (f.eks. indsamling og analyse af sukkerroepulp) (beskriv nærmere)
- Høst/destruktion inden frømodning
- Effektiv fjernelse af plantedele
- Adskilt oplagring og transport af afgrøder/affald (angiv et eller flere eksempler på indeslutning for at forebygge spild af indsamlede frø/afgrøder/affald)
- Rensning af maskiner i udsætningsområdet
- Affaldets bestemmelse, håndtering af affald/overskudsudbytte/planterester (beskriv nærmere)
- Håndtering og dyrkningsforanstaltninger på udsætningsområdet efter høsten (beskriv metoden eller metoderne, som benyttes til at forberede og forvalte udsætningsområdet efter udsætningen, herunder dyrkningspraksis)
- Andre (beskriv nærmere): .....

6.1.5. *Foranstaltninger efter høsten*

Anfør, hvilke foranstaltninger der er truffet på udsætningsområdet efter høsten:

hyppighed af besøg (gennemsnit): .....

- efterfølgende afgrøde (angiv nærmere)
- sædskifte (angiv nærmere)
- brakjord/ingen afgrøde (angiv nærmere)
- overfladisk jordbehandling/pløjefri dyrkning
- falsk såbed
- bekæmpelse af selsåede planter (angiv intervaller og varighed)
- passende kemisk(e) behandling(er) (angiv nærmere)
- passende jordbehandling(er) (angiv nærmere)
- andre (anfør hvilke).

6.1.6. *Andre foranstaltninger (beskriv nærmere)*6.1.7. *Beredskabsplan(er)*

Angiv:

- a) om udsætningen forløb som planlagt
  - Ja
  - Nej (beskriv årsagerne til dette, f.eks. vandalisme, klimaforhold osv.): .....
- b) om det var nødvendigt at træffe foranstaltninger i henhold til en eller flere beredskabsplaner (artikel 6, stk. 2, litra a), nummer vi), og bilag III B i direktiv 2001/18/EF)
  - Nej
  - Ja (beskriv nærmere): .....

## 6.2. Overvågningsforanstaltninger efter udsætningen

Da den nuværende rapporteringsmodel kan anvendes til den endelige rapport og en eller flere rapporter om overvågningen efter udsætningen, anmodes anmelderen om tydeligt at skelne mellem disse rapporttyper ved udfyldelsen af dette afsnit 6.2. Anfør venligst, om

- **planen for overvågningen efter udsætningen vil blive iværksat** (hvis det drejer sig om en endelig rapport udarbejdet efter den sidste høst af de genetisk modificerede højerestående planter
- **planen for overvågningen efter udsætningen er iværksat** (hvis det drejer sig om en delrapport om overvågningen efter udsætningen)
- **planen for overvågningen efter udsætningen er afsluttet** (hvis det drejer sig om en endelig rapport om overvågningen efter udsætningen)
- **der ikke er krav om gennemførelse af en plan for overvågning efter udsætningen.**

Hensigten med resultaterne af denne overvågning er at få be- eller afkræftet tidligere antagelser i forbindelse med risikovurderingen.

Angiv venligst i henhold til ovennævnte tilfælde, hvilken eller hvilke overvågningsforanstaltning(er) der vil blive truffet, der træffes eller er blevet truffet (i udsætningsområdet/i nærheden af udsætningsområdet (f.eks. i udsætningsområdets randområder)). Bemærk venligst, at alle overvågningsforanstaltninger, der er truffet i hele perioden efter udsætningen, skal anføres her.

Angiv:

- overvågningsforanstaltninger inden for området  
varighed:  
hyppighed af besøg (gennemsnit):
  - observation af resistente slægtninge
  - observation af resistente insekter
  - bekæmpelse af selvsåede planter (angiv intervaller og varighed)
  - overvågning af genflow (angiv nærmere oplysninger)
  - passende kemisk(e) behandling(er) og/eller jordbehandling(er)
  - andre (anfør hvilke):
- overvågningsforanstaltninger i tilstødende områder  
varighed:  
hyppighed af besøg (gennemsnit):  
overvåget område:
  - observation af resistente slægtninge
  - observation af resistente insekter
  - bekæmpelse af selvsåede planter og/eller overvågning af forvildede populationer (angiv intervaller og varighed)
  - overvågning af genflow (angiv nærmere oplysninger)
  - passende kemisk(e) behandling(er) og/eller jordbehandling(er)
  - andre (anfør hvilke).

## 6.3. Plan og metode(r) for overvågningen

I dette afsnit redegøres for overvågningsplanen og de metoder, der er anvendt til at fastslå de påvirkninger, som skal rapporteres i det næste afsnit (afsnit 6.4). Der redegøres udførligt for eventuelle omformuleringer eller ændringer i planen, som blev fremlagt i ansøgningen og i SNIF <sup>(4)</sup> B.

I tidsrummet mellem anmeldelsen og fremlæggelsen af den endelige rapport kan der være udviklet ny videnskabelig viden eller videnskabelige metoder, hvilket medfører en ændring i de anvendte metoder. Det er særligt ændringer af den art, som skal anføres i dette afsnit.

## 6.4. Konstaterede påvirkninger

### 6.4.1. Forklarende note

Alle resultater af udsætningen eller udsætningerne i relation til enhver risiko for menneskers sundhed eller miljøet skal anføres, uanset om det af resultaterne fremgår, at en risiko er øget, mindsket eller uændret.

Hovedmålene med oplysningerne, der afgives i dette afsnit, er:

- at be- eller afkræfte antagelser i miljörisikovurderingen om forekomsten og konsekvenserne af potentielle påvirkninger fra GMO'erne
- at identificere påvirkninger fra GMO'erne, som ikke blev forudset i miljörisikovurderingen.

<sup>(4)</sup> Model til resumé af anmeldelser — Summary Notification Information Format (=SNIF).

**GMO'ernes konstaterede påvirkning(er)/vekselvirkning(er)**

- med hensyn til enhver risiko for menneskers sundhed
- med hensyn til enhver risiko for miljøet

skal rapporteres i dette afsnit

Der skal ofres særlig opmærksomhed på uventede og utilsigtede påvirkninger.

Nedenfor redegøres der for de påvirkninger, som anmelderen i givet fald må rapportere. Det er indlysende, at påvirkningerne skal betragtes på baggrund af afgrøden, den nye egenskab, recipientmiljøet samt konklusionerne i miljørisikovurderingen, der udføres i hver enkelt sag. For at strukturere oplysningerne og lette en effektiv søgning i de afgivne oplysninger skal anmelderen så vidt muligt anvende specifikke stikord ved udfyldelsen af tekstfelterne i kapitel 6, navnlig i afsnit 6.4.2, 6.4.3 og 6.4.4. Den nyeste ajourførte liste over disse stikord findes på følgende internet-adresse: <http://gmoinfo.jrc.it>

**6.4.2. Forventede påvirkninger**

Nærværende afsnit vedrører »forventede påvirkninger« dvs. potentielle påvirkninger, som blev identificeret allerede i anmeldelsens miljørisikovurdering, og som derfor kunne forudses.

Anmelderne bør fremlægge data fra den eller de udsætning(er), som bekræfter antagelserne i miljørisikovurderingen.

**6.4.3. Uventede påvirkninger <sup>(?)</sup>**

»Uventede påvirkninger« henviser til påvirkninger af menneskers sundhed eller miljøet, **som ikke blev forudset eller identificeret i anmeldelsens miljørisikovurdering**. Denne del af rapporten bør indeholde eventuelle oplysninger med hensyn til uventede påvirkninger eller observationer af relevans for den oprindelige miljørisikovurdering. Hvis der er konstateret uventede påvirkninger eller observationer, bør oplysningerne i dette afsnit være så udførlige som muligt for at muliggøre en korrekt fortolkning af dataene.

**6.4.4. Andre oplysninger**

Anmelderne opfordres til at fremlægge oplysninger, som kunne være relevante for de pågældende markforsøg, også selv om de ikke er omfattet af anmeldelsen. Dette kunne også omfatte konstaterede gavnlige påvirkninger.

**7. Konklusion**

I dette kapitel redegør anmelderen for sine konklusioner og de foranstaltninger, der er truffet eller bør træffes på grundlag af resultaterne af udsætningen, hvad angår yderligere udsætninger, og i givet fald anfører anmelderen oplysninger om ethvert produkt, som vedkommende har til hensigt at anmelde på et senere tidspunkt.

*Oplysninger, der er fremlagt i denne rapport, betragtes ikke som fortrolige i henhold til artikel 25 i direktiv 2001/18/EF.*

*Dette hindrer ikke den kompetente myndighed i at kræve yderligere fortrolige og ikke-fortrolige oplysninger fra anmelderen.*

*Fortrolige data bør fremlægges i et bilag til rapporteringsmodellen sammen med et ikke-fortroligt resumé eller generel beskrivelse af disse data, som vil blive stillet til rådighed for offentligheden.*

DATO:

<sup>(?)</sup> Medmindre andet fremgår af artikel 8 i direktiv 2001/18/EF hvad angår behandling af ændringer eller nye oplysninger.