



VIDENSYNTESE OM NYE PLANTEFORÆDLINGSTEKNIKKER OG DERES EFFEKT PÅ DANSK LANDBRUG

HENRIK BRINCH-PEDERSEN, PER L. GREGERSEN, INGER BÆKSTED HOLME, KIM HEBELSTRUP, LOTTE HOUGS, BIRTE BOELT, KAREN KOEFOED PETERSEN OG MORTEN GYLLING

DCA RAPPORT NR. 127 - AUGUST 2018



AARHUS
UNIVERSITET

DCA - NATIONALT CENTER FOR FØDEVARER OG JORDBRUG



VIDENSYNTSE OM NYE PLANTEFORÆDLINGSTEKNIKKER OG DERES EFFEKT PÅ DANSK LANDBRUG

DCA RAPPORT NR. 127 - AUGUST 2018



Henrik Brinch-Pedersen¹⁾, Per L. Gregersen¹⁾, Inger Bæksted Holme¹⁾, Kim Hebelstrup¹⁾,
Lotte Hougs¹⁾, Birte Boelt²⁾, Karen Koefoed Petersen³⁾ og Morten Gylling⁴⁾

Aarhus Universitet
Institut for Molekylærbiologi og Genetik¹⁾
Forsøgsvej 1
4200 Slagelse

Institut for Husdyrvidenskab²⁾
Institut for Agroøkologi³⁾
Blichers Allé 20
Postboks 50
8830 Tjele

Københavns Universitet⁴⁾
Institut for Fødevare- og Ressourceøkonomi
Rolighedsvej 25
1958 Frederiksberg C

PROFESSIONALISERING OG ØGET TVÆRFAGLIGHED I SAMARBEJDET OMKRING MAD OG MÅLTIDER I DAGTILBUD

Serietitel:	DCA rapport
Nr.:	127
Forfattere:	Henrik Brinch-Pedersen, Per L. Gregersen, Inger Bæksted Holme, Kim Hebelstrup, Lotte Hougs, Birte Boelt, Karen Koefoed Petersen og Morten Gylling
Udgiver:	DCA - Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Blichers Allé 20, postboks 50, 8830 Tjele. Tlf. 8715 1248, e-mail: dca@au.dk hjemmeside: www.dca.au.dk
Rekvirent:	Miljø- og Fødevareministeriet
Fotograf:	Forsidefoto: Colourbox
Tryk:	www.digisource.dk
Udgivelsesår:	2018 Gengivelse er tilladt med kildeangivelse
ISBN:	Trykt version 978-87-93643-70-3, elektronisk version 978-87-93643-73-4
ISSN:	2245-1684

Rapporterne kan hentes gratis på www.dca.au.dk

Rapport

Rapporterne indeholder hovedsageligt afrapportering fra forskningsprojekter, oversigtsrapporter over faglige emner, vidensynteser, rapporter og redegørelser til myndigheder, tekniske afprøvninger, vejledninger osv.

Forord

Nærværende vidensyntese er udarbejdet på baggrund af en bestilling fra Landbrugsstyrelsen som en del af "Aftale mellem Aarhus Universitet og Miljø- og Fødevarerministeriet om udførelse af forskningsbaseret myndighedsbetjening m.v. ved Aarhus Universitet, DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, 2018-2021".

Landbrugsstyrelsen har ønsket en vidensyntese ud fra en dansk vinkel om anvendelse af nye planteforædlingsteknikkers effekt på dansk landbrug. Baggrunden for bestillingen er at det er uafklaret i EU, hvilken status de nye planteforædlingsteknikker har i forhold til EU's GMO-lovgivning. Spørgsmålet er, om teknikkerne skal omfattes af den fulde GMO-regulering og derved ikke være tilgængelig for små og mellemstore forædlingsvirksomheder. Fra GMO-situationen ved vi, at med den fulde GMO-regulering er det kun de multinationale virksomheder der har ressourcerne til at udnytte teknikkerne. Forskere og erhvervet ser store muligheder for landbruget og presser på for at få en afklaring. Det er et spørgsmål om innovation og udvikling af nye og bedre plantesorter til et dansk marked. Spørgsmålet om den fremtidige regulering af de nye teknikker er imidlertid komplekst. Det er også politisk kontroversielt og følsomt, bl.a. fordi det er koblet til GMO-debatten.

Landbrugsstyrelsen har deltaget i diskussion af disposition for vidensyntesen og fastlæggelse af strukturen. Desuden har Landbrugsstyrelsen, på foranledning af AU, bedt Fødevarestyrelsens Enhed for Fødevarer kemi og Plantesundhed, som er ansvarlig for myndighedernes analytiske kontrol med GMO, om at bidrage til rapporten med et kapitel om kontrolmuligheder (kapitel 5. Detektion af planter lavet ved NBT. Kan det detekteres?). Lotte Hougs fra Fødevarestyrelsen står desuden som medforfatter på kapitel 6, hvor hendes bidrag har været at sikre, at tekst der handler om kemisk analyser er formuleret korrekt. DCA takker for bidraget, som har sikret at vidensyntesen også er *state-of-the-art* på kontrolområdet.

Niels Halberg

Direktør DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug

Forfatterne



Henrik Brinch-Pedersen, Professor MSO
Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet
Redaktør
Sammenfatning, kapitel 1 og kapitel 6. Fagfællebedømt kapitel 2, 3, 4



Per L. Gregersen, seniorforsker
Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet
Sammenfatning, kapitel 2 og kapitel 6. Fagfællebedømt kapitel 1, 3, 4



Inger Bæksted Holme, forsker
Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet
Kapitel 3 og kapitel 6. Fagfællebedømt kapitel 1



Kim Hebelstrup, lektor
Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet
Kapitel 4 og kapitel 6. Fagfællebedømt kapitel 5



Lotte Hougs, molekylærbiolog
Enhed for Fødevarekemi og Plantesundhed, Fødevarestyrelsen
Kapitel 5 og kapitel 6



Birte Boelt, seniorforsker
Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet
Kapitel 7 og kapitel 10. Fagfællebedømt kapitel 8



Karen Koefoed Petersen, seniorforsker
Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet
Kapitel 8 og kapitel 10. Fagfællebedømt kapitel 7



Morten Gylling, seniorrådgiver
Institut for Fødevare- og Ressourceøkonomi, Københavns Universitet
Kapitel 9 og kapitel 10. Kapitel 9 er fagfællebedømt af seniorrådgiver
Henning Otte Hansen, Institut for Fødevare- og Ressourceøkonomi,
Københavns Universitet

Indholdsfortegnelse

Forfatterne.....	4
Indholdsfortegnelse.....	5
Sammenfatning.....	9
Centrale begreber.....	12
1. Planteforædling og ny variation ved konventionelle teknikker.....	13
1.1. Indledning.....	13
1.2. Planteforædling og planteforædlingens mål.....	13
1.3. Klassiske forædlingsmetoder.....	14
1.3.1. Simpel selektion.....	14
1.3.2. Kontrollerede krydsninger.....	14
1.4. Planteforædling og genetisk variation.....	15
1.5. Ny variation og præforædling.....	15
1.5.1. Eksempler på præforædling.....	15
1.5.1.1 Høj fytase i hvede.....	15
1.5.1.2 Syntetiske hexaploider.....	16
1.5.1.3 Translokationsforædling i hvede.....	17
1.5.1.4 Ny variation i byg.....	17
1.5.1.5 Sygdomsresistens i kartofler.....	17
1.5.1.6 Somatisk hybridisering, ikke GMO.....	17
1.6. Andre teknikker i klassisk planteforædling.....	18
1.6.1. Dobbelt haploider.....	18
1.6.2. Hybridsorter.....	18
1.7. Uplanlagte mutationer opstået ved konventionel planteforædling, plantens formering og dens almindelige vækst.....	18
1.8. Konklusion.....	19
2. Mutationsforædling har skabt ny genetisk variation de sidste 100 år.....	21
2.1. Indledning: Mutationsforædling i forhold til NBT.....	21
2.2. Mutationsforædling historisk.....	21
2.3. Mutationstyper og mutationers rolle i evolution og planteforædling.....	23
2.4. Metoder til at lave mutanter og de inducerede genotyper.....	23
2.5. Eksempler på naturligt forekommende mutationer i danske afgrøder.....	24
2.6. Database for sorter baseret på mutanter.....	26
2.7. TILLING: fra forward til reverse genetik.....	26
2.8. Uønskede sideeffekter og begrænsninger ved konventionel mutationsforædling.....	27
2.9. Forholdsregler imod uønskede sideeffekter.....	28
2.10. Risici ved konventionelle mutationsteknikker.....	28
2.11. Konklusion.....	28

3. New Breeding Techniques (NBT).....	32
3.1. Introduktion	32
3.2. SDN-værktøjer	32
3.2.1. SDN-induktion af dobbeltstrengt kromosombud på forudbestemte præcise steder i plantens kromosomer.....	32
3.2.2. Detaljeret beskrivelse af CRISPR/Cas9 værktøjet og Cas9-varianter	34
3.2.3. CRISPR-Cpf1 systemet.....	35
3.2.4. Multiplexing	36
3.2.5. Beskrivelse af de forskellige former for mutationer, der kan opnås ved reparation af et dobbeltstrengt DNA-brud.....	36
3.2.5.1 Non-homologous End-Joining (SDN1).....	36
3.2.5.2 Homolog rekombination (SDN2).....	38
3.2.5.3 Værktøjernes potentielle anvendelse til indsættelse af længere DNA fragmenter på forudbestemte steder i plantegenomet (SDN3)	39
3.2.6. Base-editering	40
3.3. Overførsel af værktøjerne til enkeltceller med efterfølgende regenerering af planter fra enkeltceller	41
3.3.1. Stabil integration af værktøjerne med efterfølgende udspaltning af værktøjerne i næste generation	42
3.3.2. Transient ekspression af værktøjerne.....	42
3.4. Oligonucleotide directed mutagenese (ODM).....	43
3.5. Cisgenese og intragenese	44
3.6. Podning på GM-grundstamme	46
3.7. RNA-afhængig DNA-metylering	47
3.8. Agro-infiltration 'sensu stricto'	48
3.9. Reverse Breeding.....	49
3.10. Potentiel risici og uønskede effekter af NBT.....	50
3.11. Forholdsregler imod off-target mutationer.....	51
3.12. Konklusion.....	52
4. Precision breeding (på dansk: præcisionsforædling).....	56
4.1. Indledning	56
4.2. Sammenligning af klassisk mutationsforædling og præcisionsforædling i konkrete eksempler.....	56
4.3. Brug af præcisionsforædling – et overblik	56
4.4. Eksempler på præcisionsforædling der relaterer til afgrøde kvalitet og sundhed.....	58
4.4.1. Gluten	58
4.4.2. Kulhydrater	61
4.4.3. Fedtstoffer og omega-3.....	65
4.4.4. Frugtmodning.....	65
4.5. Eksempler på præcisionsforædling der relaterer til nitrogengødsning, udbytte og vækst af afgrøder, herunder potentiale for reduceret behov for brug af plantebeskyttelsesmidler	65
4.5.1. Sygdomsresistens og reduceret brug af fungicider og pesticider.....	65
4.5.2. Dynamik af sygdomme i afgrøder og brug af plantebeskyttelsesmidler	69
4.5.3. Meldugresistens i hvede	69

4.5.4. Sygdomme i ris.....	70
4.5.5. Andre sygdomme.....	70
4.6. Tilpasning til klimabegivenheder.....	71
4.7. Brug af præcisionsforædling til optimering af nitrogenoptagelse og afgrøders evne til at optage nitrogen.....	71
4.8. Udbytteparametre.....	74
4.9. Konklusion.....	74
5. Detektion af planter lavet ved NBT. Kan det detekteres?.....	77
5.1. Detektion af traditionel genetisk modificerede organismer (GMO) i dag.....	77
5.2. I hvilket omfang kan SDN detekteres?.....	80
5.3. Kan SDN-planter adskilles fra traditionelt forædlede planter, herunder muterede planter. Muligheder og konsekvenser.....	81
5.4. Konklusion.....	81
6. Sammenligning af præcisionsforædling med konventionelle forædlingsteknologier.....	83
6.1. Hvordan ser slutproduktet ud?.....	83
6.2. Uønskede effekter.....	83
6.3. Hastighed og omkostning.....	84
6.4. Sporbarhed.....	84
6.5. Teknologiernes parathed og implementerbarhed.....	85
6.6. Konklusion.....	86
7. Udfordringer i danske landbrugsafgrøder. Kan NBT bidrage?.....	87
7.1. Aktuelle dyrkningsudfordringer i de fire største afgrøder i dansk landbrug.....	87
7.1.1. Hvede.....	88
7.1.2. Byg.....	92
7.1.3. Græs og kløver.....	93
7.1.4. Raps.....	95
7.1.5. Generelle dyrkningsudfordringer.....	96
7.2. Danske forædlingsaktiviteter og sortsafprøvning inden for landbrugsafgrøderne.....	96
7.3. Hvor står vi, hvis vi bruger/ikke bruger præcisionsforædling på kort og lang sigt.....	98
8. Udfordringer i dansk gartneri, skovbrug (juletræer). Kan NBT bidrage?.....	100
8.1. Aktuelle dyrkningsudfordringer og forædlingsmål i danske havebrugsafgrøder.....	100
8.1.1. Frilandsgrøntsager.....	101
8.1.2. Væksthusgrøntsager.....	101
8.1.3. Frugt og bær.....	101
8.1.4. Prydplanter.....	102
8.1.5. Skovbrug og juletræer.....	103
8.2. Danske forædlingsaktiviteter inden for havebrugsafgrøder.....	110
8.3. Hvor står vi, hvis vi bruger/ikke bruger NBT på kort og lang sigt.....	112
9. Økonomiske forhold vedrørende NBT.....	116
9.1. Eksisterende markedsconcentration inden for udsæd.....	116
9.2. Strukturen for den danske forædlingssektor.....	116

9.3. Betydningen af valg af regulering	117
9.4. Korn til udsæd.....	118
9.5. Miljømæssig og økonomisk gevinst ved udvikling af total resistens mod meldug i vinterhvede.....	120
9.6. Optimal tildeling med nuværende modtagelighed.....	121
9.7. Udvikling af total resistens	121
9.8. Behandlingshyppighed og pesticidbelastning	122
9.9. Sammendrag	122
10. Sammendrag for den landbrugs-, gartneri- og skovbrugsfaglige del	123
Ordliste	125

Sammenfatning

Videnssynthesen om nye planteforædlingsteknikker (NBT), præcisionsforædling og mulighederne i dansk landbrug er opdelt i en teknisk del (kapitlerne 1-5) med baggrund om planteforædling, mutationer, teknologi inden for mutationsforædling før og nu, konkrete eksempler på præcisionsforædling ved NBT i afgrøder og mulighederne for detektion af præcisionsforædlede afgrøder, hvis det besluttes, at de skal reguleres som en GM afgrøde. Herefter kommer en jordbrugsfaglig del (kapitlerne 7-9), hvor der fokuseres på konkrete udfordringer i danske landbrugsafgrøder, gartneri og skovbrug og på, om NBT potentielt vil kunne bidrage. Til sidst i afsnittet kigges på økonomiske forhold vedrørende et dansk landbrug med og uden NBT. I kapitel 6 sammenfattes den tekniske del og der gives en sammenligning af præcisionsforædling med konventionelle forædlingsteknologier og i kapitel 10 gives en sammenfattende analyse af potentialerne for NBT for den jordbrugs-faglige del.

Planteforædling er en disciplin til målrettet og løbende frembringelse af nye plantesorter. Den udnytter den genetiske variationen imellem individer inden for en planteart og kombinerer ønskede egenskaber til nye og forbedrede sorter. Planteforædling er afhængig af genetisk variation, og NBT kan bruges til at øge denne variation.

Men det at introducere ny variation i en planteart er ikke en ny opfindelse. De nye planteforædlingsteknikker ligger i forlængelse af en gammel praksis, hvor planteforædlingen har søgt at øge den genetiske variation ved at introducere eller inducere nye egenskaber i vores afgrøder. Som grundlag for forståelsen af mutationer i planteforædlingen gennemgås derfor, hvordan ny variation er blevet indført i planteforædlingsmateriale ved f.eks. kemiske eller fysiske behandlinger, translokationsforædling, syntetiske hexaploider mm. Teknikker der medfører omfattende ændringer i planternes genom.

Nye planteforædlingsteknikker og præcisionsforædling af vores afgrøder er relativt nye begreber inden for planteforædling. I virkeligheden omfatter nye planteforædlingsteknikker en række teknologier, som er fremkommet over de sidste årtier. Europa-Kommissionen nedsatte på anmodning fra medlemsstaterne i 2007 en arbejdsgruppe, som skulle vurdere om forskellige nye forædlings-teknikker skulle være omfattet af GMO-lovgivningen. Arbejdsgruppen udarbejdede en liste med syv nye planteforædlingsteknikker, som inkluderede: *Zinc finger nuclease (ZFN) technology*, *Oligonucleotide directed mutagenesis (ODM)*, *Cisgenesis and Intragenesis*, *Grafting on GM-rootstock*, *RNA-dependent DNA methylation*, *Agro-infiltration 'sensu stricto'* og *Reverse breeding*. ZFN teknikken er et Site Directed Nuclease (SDN)-værktøj, der kan fremkalde en mutation på et forudbestemt sted i plantens genom, og ikke en række tilfældige steder i genomet, hvor mutationer potentielt kan være skadelige. Heraf betegnelsen præcisionsforædling. Siden 2007 er fremkommet en række nye teknikker i samme kategori som ZFN, såsom TALENs og CRISPR/Cas teknikkerne, hvor i særdeleshed sidstnævnte har sat skub i udviklingen. Der er i rapporten derfor et særligt fokus på netop SDN-teknikkerne og i særdeleshed på de teknikker, der betegnes SDN-1, dvs. hvor SDN-værktøjet laver et brud på DNA-strengen, og cellen selv reparerer bruddet, som den også ville gøre, hvis det var forårsaget af f.eks. solens UV-stråler. Mutationer kan så opstå, hvis denne reparation ikke forløber perfekt.

Selvom SDN-teknikkerne er nye, findes der allerede en række eksempler på deres anvendelse i afgrøder. Blandt andet afgrøder, der via SDN-1 har opnået højere naturlig sygdomsresistens, bedre kvalitet i form af

sundhedsfremmende indholdsstoffer, lavt glutenindhold og bedre udnyttelse af kvælstof – særligt under dyrkningsforhold med begrænset kvælstofadgang.

Hvad angår sporbarhed, vil man ikke kunne adskille mutationerne fremkommet ved SDN-1 fra mutationer fremkommet på traditionel vis med mindre man har fået oplyst deres gensekvenser. Dette komplicerer kontrol af afgrøder importeret fra lande, der ikke kræver mærkning af NBT af-grøder.

SDN-1 vurderes i forhold til traditionelle mutationsteknikker at besidde meget få potentielle risici for f.eks. uønskede mutationer. Både mutationsforædling og de nye præcisionsteknologier kan ses som ekstra muligheder for en allerede meget effektiv og optimeret planteforædling af vores af-grødeplanter baseret på krydsninger. Især præcisionsforædlingen vurderes at have et stort fremtidigt potentiale, fordi den er præcis i forhold til placering af introducerede mutationer, og fordi antallet af off-target mutationer kan minimeres. Præcisionsforædlingens potentiale forudses endvidere at kunne stige kraftigt, når den kobles med den fortsatte udvikling i viden om basale molekyllære reguleringsprocesser i planter til at kunne udpege velegnede kandidatgener.

Med hensyn til de udfordringer, som dansk planteavl står overfor, vil udviklingen af robuste og højtstående nye sorter vedvarende spille en rolle for at kunne opretholde og øge udbytte og kvalitet af danske afgrøder. Hver afgrøde har sine specifikke forædlingsmål, f.eks. proteinindhold eller fordøjelighed, men på tværs af stort set alle arter går udfordringerne med sygdomme og i stigende grad robusthed over for klimatiske forhold igen. Både for de specifikke mål og for de store udfordringer ift. modstandsdygtige planter har præcisionsforædlingen nogle muligheder for at bidrage med store kvalitative spring i nyttige egenskaber hos nye sorter. Selvom Danmark arealmæssigt er lille, kendetegnes plantedyrkingen i høj grad ved brugen af sorter specielt tilpasset danske forhold, hvor tilpasningen af kornsorter til begrænsningerne i brug af kvælstofgødning er et eklatant eksempel. Præcisionsforædlingen har det særlige potentiale, at nye egenskaber forholdsvis nemt vil kunne tilføjes eksisterende elitesorter. Dette ville på længere sigt være til stor fordel, både for danske planteforædlere og for dansk planteavl generelt, fordi sorter, som allerede er tilpasset danske forhold, kan gøres endnu bedre. Desuden vil NBT have stort potentiale inden for afgrøder der er vegetativt formerede og/eller flerårige (frugtkulturer og mange prydblplanter), fordi både mutationsforædling og krydsninger medfører et langvarigt efterfølgende tilbagekrydsnings- og selektionsarbejde.

Den danske planteforædling er koncentreret inden for særlige arter, af stor betydning for jordbrugserhvervene i Danmark. Inden for landbrugsområdet er det de store afgrøder hvede, byg, kartofler, foder- og sukkerroer, græsser og kløver, mens det inden for have-/skovbrugsområdet især gælder specielle slægter af prydblplanter og nåletræer til juletræs- og pyntegrønproduktion. For nogle af de mindre/mellemstore afgrøder, som dyrkes i Danmark, f.eks. rug, majs og grøntsags-afgrøder er forædling af nye sorter stort set ophørt, og dyrkning er således baseret på sorter forædlet i nabolande. Dog foregår der for visse arter en vis nicheforædling. Planteforædlingen i Danmark befinder sig således i høj grad i en international konkurrencesituation, hvor det er væsentligt, at de danske virksomheder har de samme tekniske muligheder for at udvikle forædlingsaktiviteter som konkurrenterne. På globalt plan gør det samme sig gældende mellem europæiske og internationale aktiviteter. Det må forventes, at NBT teknologierne kommer til at spille en væsentlig rolle i at udvikle nye sorter i fremtiden, og for at kunne klare sig i en international konkurrence vurderes det, at de danske virksomheder på længere sigt kun kan klare sig, hvis de har adgang til de samme tekniske muligheder som udenlandske

konkurrenter og mulighed for at markedsføre nye sorter på samme betingelser. Et væsentligt forhold i denne sammenhæng er eventuelle forskelle mht. den offentlige regulering af sorter udviklet ved NBT, som vil have afgørende betydning for omkostningerne ved markedsføring af nye sorter.

Hvis præcisionsforædlingen bliver friholdt fra GMO-lovgivningens krav om godkendelse, vurderes den at kunne anvendes bredt af selv mindre forædlingsvirksomheder til at introducere nye egen-skaber i plantesoerterne, fordi den ikke er omkostningstung eller kræver store investeringer. Reguleres planter fremstillet med de nye teknologier efter den fulde EU GMO regulering, vurderes det, at kun de allerstørste internationale forædlingsvirksomheder vil kunne bære omkostningerne ved at udvikle nye sorter med disse teknologier. I så fald vil det ikke være realistisk for danske forædlingsvirksomheder, og dermed også i vid udstrækning for dansk landbrug, at drage nytte af de nye teknologier. Det vil samtidigt stille danske landmænd i en problematisk situation hvis de vil dyrke afgrødesorter fra lande hvor NBT ikke reguleres som GMO.

Centrale begreber

Precision breeding (på dansk: præcisionsforædling)

Forædling hvor der gøres brug af metoder til at inducere få naturlige mutationer på præcise steder i et DNA. Mutationer i DNA er udgangspunktet for al forædling. Men ved præcisionsforædling induceres der væsentligt færre mutationer end ved klassisk mutationsforædling, i mange tilfælde kun én enkelt mutation i ét bestemt gen i en plantes DNA. Hvorimod der ved klassisk mutationsforædling typisk induceres > 10.000 vilkårlige mutationer i en plantes DNA.

Præcis mutation

En præcis mutation er en enkelt naturlig mutation der introduceres et valgt sted i et DNA. Modsat vilkårlig mutation som bruges ved mutationsforædling.

Vilkårlig mutation

Vilkårlige mutationer er ændringer i DNA som forekommer naturligt, f.eks. enkelt-base substitutioner eller deletioner eller indsæt i DNA på flere tusinde baser. Det er dog også muligt at inducere vilkårlige mutationer ved mutagenese, som f.eks. ved brug af kemiske mutagene stoffer eller fysiske metoder såsom højenergi partikel- eller elektromagnetisk stråling. Vilkårlige mutationer opstår tilfældige steder i et DNA.

Mutationsforædling

Ved klassisk mutationsforædling benytter man sig af inducerede vilkårlige mutationer ved kemiske og/eller fysiske metoder, f.eks. ved brug af kemiske mutagene stoffer eller fysiske metoder såsom højenergi partikel- eller elektromagnetisk stråling. Disse metoder har været kendt og anvendt i sammenhæng med traditionel forædling siden begyndelsen af det 20. århundrede. Ved denne metode introduceres typisk mere end 10.000 mutationer vilkårlige steder i én plantes DNA.

Genome editing (på dansk: genredigering)

Teknologier hvor der anvendes biomolekyler (almindeligvis enzymer) til at redigere i et specifikt sted i et DNA. Metoderne har fundet anvendelse i mange forskellige organismer. Nogle metoder inden for genredigering giver udelukkende naturlige mutationer som enkelt-base substitutioner eller små deletioner eller indsæt af størrelsen 1-10 baser i DNA. Metoder af denne type betegnes SDN1 (se kapitel 3). Der findes flere eksempler på teknologier som kan anvendes til genredigering. F.eks. CRISPR/Cas9 eller TALENs.

1. Planteforædling og ny variation ved konventionelle teknikker

Henrik Brinch-Pedersen, Professor MSO, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet

1.1. Indledning

Som oplæg til afsnittene om præcisionsforædling ved nye planteforædlingsteknikker beskriver dette kapitel kort de mest grundlæggende principper for klassisk/konventionel planteforædling, hvilke udfordringer planteforædlingen står over for, og hvordan man fra før, de nye planteforædlingsteknikker kom frem, har udnyttet og øget den genetiske variation. Vigtigheden af genetisk variation for at kunne fremstille nye sorter demonstreres, og det vil fremgå, at det at øge den genetiske variation i forbindelse med planteforædling ikke er en ny opfindelse. Der gives eksempler på, hvordan den genetiske variation er blevet øget f.eks. ved krydsning med landracesorter, mutanter, ved at fremstille syntetisk hexaploid hvede eller ved translokationsforædling. Induktion af mutationer ved klassiske fysiske og kemiske behandlinger er en meget udbredt teknik og bliver behandlet i et særskilt kapitel. Fysisk og kemisk inducerede mutationer ligner ofte de mutationer, der fremkommer ved præcisionsforædling med nye planteforædlingsteknikker.

1.2. Planteforædling og planteforædlingens mål

Planteforædling er en disciplin til målrettet og løbende frembringelse af nye plantesorter. Den udnytter variationen imellem eksemplarer inden for en planteart og kombinerer ønskede egenskaber til en ny og forbedret sort. Formålene kan være mange, fra de rent æstetiske ændringer hos prydplanterne til f.eks. udbyttefremgang, sygdomsresistens og kvalitetsforbedringer i vores landbrugsafgrøder. For et moderne landbrug er det en væsentlig forudsætning, at der er adgang til sorter med stabilt højt udbytte, resistens over for skadevoldere, men også med specifikke kvalitetsegenskaber. Sidstnævnte kan f.eks. vedrøre maltningsegenskaber for byg eller bageevne for hvede.

Planteforædling skal ind imellem også opfylde en række andre krav. Det kan f.eks. være specielle politiske ønsker til landbruget såsom særlige krav om miljøsønsyn til jordbrugsproduktionen, som kræver at der udvikles sorter, der lever op til netop de danske betingelser. I Danmark stilles der til sammenligning med mange andre lande f.eks. specifikke krav om mindre brug af gødning og pesticider, og de danske kornforædlerne har derfor igennem de sidste cirka 20 år tilpasset sig restriktionerne på forbruget af pesticider og kvælstof og udviklet kornsorter, som er bedre at dyrke med mindre input end deres konkurrenter i nabolandene. Det betyder, at kornsorter forædlet i udlandet ikke nødvendigvis kan dyrkes med succes i Danmark, da miljø og dyrkningsbetingelser ofte er meget forskellige imellem landene.

Globalt set udfordres planteforædlingen i høj grad af de globale klimænderinger og af befolkningstilvæksten. Gennemsnitstemperaturen forventes over de næste 50 år at blive hævet med 1-1½ grad. Dette forventes i Danmark at ville forlænge dyrkningssæsonen, samtidig med at der sker ændringer i nedbørsmønstret. Andre steder forkortes dyrkningssæsonen. Begge dele forventes at føre til øget stresspåvirkning af afgrøderne i form af varme, tørke og pres fra sygdomme og skadedyr. Befolkningstilvæksten, som forudser at mindst 9 mia. skal brødfødes i 2050, stiller meget store krav ikke mindst til forædlingen af nye sorter med et højt og sikkert udbytte. Produktionen af afgrødeplanter forventes at skulle stige med mindst 60% i perioden fra 2010 til 2050 for at holde trit med befolkningstilvæksten. På verdensplan er den relative udbyttefremgang desværre faldende, fra at være 3,4% per år i 1961 til kun at være 1,25% i 2010 (Fischer et al., 2014). På samme tid anvendes plantebiomasse i stigende grad til bioenergi og nye produkter, og der er et stærkt ønske om bevare naturlige habitater.

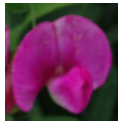
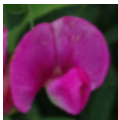
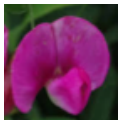



1.3. Klassiske forædlingsmetoder

1.3.1. Sempel selektion

Den simpleste form for planteforædling består i at udnytte den genetiske variation ved at udvælge ønskede planter med bestemte egenskaber frem for planter af samme art, som ikke besidder de ønskede egenskaber. Man kalder det simpel selektion, og teknikken blev anvendt allerede af vores forfædre, der ud fra iagttagelser udvalgte de afgrøder, der fungerede bedst. Udvælgelsen var baseret på plantens fænotype, dvs. kort sagt dens fremtoning, og hvad der kan måles og vejes. En plantes fænotype fremkommer som en sum af den miljøpåvirkning, den er udsat for, og dens genotype (den information som ligger i plantens gener). Sempel selektion af ønskede planter og efterfølgende formering af udvalgte planter har en progressiv effekt på plantens genotype (dens gener). De udvalgte egenskaber fremelskes og kommer til at dominere i populationen af planter.

1.3.2. Kontrollerede krydsninger

Forædlingshastigheden for planter kan accelereres, hvis forædleren foretager kontrollerede krydsninger af planter med ønskede egenskaber. Teknikken er den mest anvendte planteforædlingsteknik der findes, og den er baseret på Mendels love om nedarving af egenskaber (figur 1.1). Egenskaber kombineres ved at forædleren krydser udvalgte planter med hinanden. Genetisk variation vil, afhængig af gendominans, give planter, som er fænotypisk forskellige, og som indeholder nye genkombinationer.

Han		
Hun	R	r
R	RR 	Rr 
r 	rR 	rr 

Figur 1.1. Mendels genetiske love blev først testet på ærteplanter. Mendel krydsede først planter med farvede og hvide blomster med hinanden og fik kun farvede blomster. Da han krydsede disse planter med hinanden, fik han, som demonstreret ovenfor, planter med både farvede og hvide blomster. Herved viste han, at krydsede planter får egenskaber fra begge forældre og at nogle egenskaber er dominante (R) og andre er recessive (r).

1.4. Planteforædling og genetisk variation

Som beskrevet ovenfor er en forudsætning for, at man kan lave planteforædling, at der er genetisk variation inden for den art, man vil forædle. Som eksempel kan tages sygdomsresistens i hvede: hvis hvede A har et gen, som giver sygdomsresistens over for angreb af meldugsvampen, og hvede B har et gen der giver sygdomsresistens over for angreb af septoriasvampen, så kan man ved at krydse hvede A med hvede B opnå en hvede C, som både indeholder generne for resistens over for meldug og over for septoria og som derfor vil være resistent over for begge svampesygdomme. Omvendt, hvis teoretisk set alle hvedeplanter var genetisk nøjagtig helt ens hele tiden, ville man ikke kunne krydse sig til en ny forbedret sort. Endvidere vil en meget begrænset genetisk variation også begrænse mulighederne for at forædle nye forbedrede sorter.

Men planter udsættes ligesom alle andre levende organismer for ændringer i deres genetiske materiale (generne). Det kan ske via molekulære processer såsom ved fejl i replikationen (kopieringen) af cellens genom eller ved mutationer som kan opstå spontant eller på grund af stressfaktorer (f.eks. solens UV-stråler eller menneskelig behandling med mutagener). Fejl i en celledes genetiske materiale opstår hver gang, en celle kopierer sit DNA under celledelingen. [De genetiske ændringer, der opstår i enkelte planter bidrager til den genetiske diversificering af en population og er afgørende for evolutionen og for at man kan forædle nye sorter.](#)

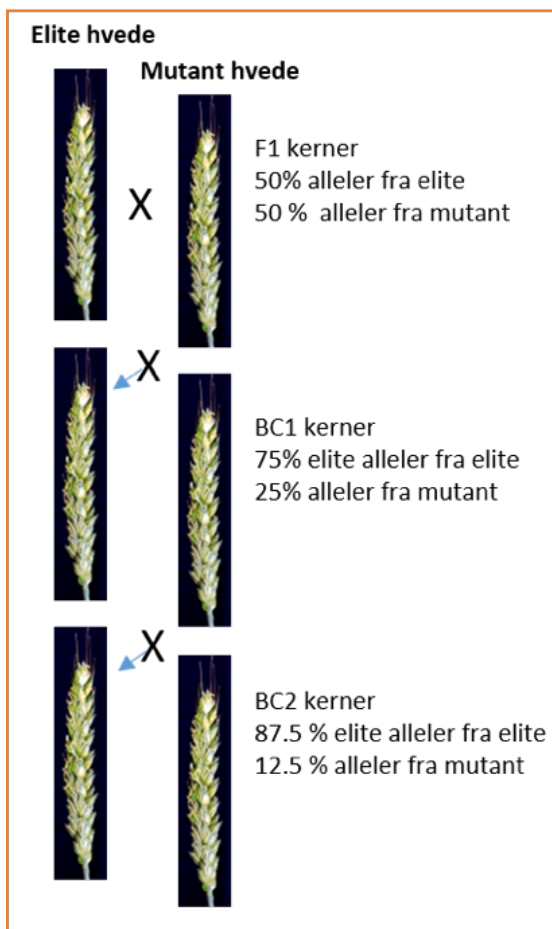
1.5. Ny variation og præforædling

I nogle tilfælde er en ønskelig genetisk variation til indkrydsning ikke umiddelbart tilgængelig. Her vil det være nødvendigt at bringe ny variation ind i forædlingsarbejdet. Man kalder det præforædling og det omfatter forædlingsaktiviteter, som indfører ny variation og som ikke direkte fører til nye sorter. Præforædling er ofte en meget langsigtet proces, som f.eks. kan bestå i at krydse nye gener for resistens, udbytte eller kvalitet fra fremmed materiale ind i en moderne tilpasset afgrøde og derefter udvikle den til en egentlig sort efter gentagne krydsninger med elitemateriale. Præforædlingsaktiviteter kan omfatte indførelse af variation fra arter, som umiddelbart er krydsningskompatible, f.eks. landracer og mutanter. Men det kan også omfatte teknikker til indførelse af egenskaber fra arter, der ikke umiddelbart er krydsningskompatible, f.eks. translokationsforædling, somatiske hybridisering m.m. Eksempler herpå gives nedenfor.

1.5.1. Eksempler på præforædling

1.5.1.1. Høj fytase i hvede

Et eksempel på præforædling er HIGHPHY hveden, en mutant, der giver høj aktivitet af enzymet fytase i kernen og som derved øger fordøjeligheden af fosfor og mikronæringsstoffer, når den anvendes til foder og fødevarer (Scholey et al., 2017). HIGHPHY mutationen er baseret på en enkelt DNA-baseændring i den region af fytasegenet, der styrer udtrykkelsen af fytasegenet. Ændringen (mutationen) gør, at der bliver lavet mere fytase. Da man i forædlingssammenhæng kun ønsker at beholde HIGHPHY mutationen og ikke resten af mutantens genom må man foretage såkaldte tilbagekrydsninger til elitesorten for at slippe af med så mange som muligt af mutantplantens andre uønskede gener. Tilbagekrydsning er en tidskrævende proces, hvor man langsomt og gradvis erstatter en mutants procentvise genomandel i en plante med genomet fra en ønsket elitesort (se figur 1.2). I tilfældet HIGHPHY kendes gensækvensen for det muterede gen og man kan derfor med molekylærbiologiske metoder følge mutationen under tilbagekrydsningerne. HIGHPHY mutationen udgør en markør, og man kalder det derfor markør assisteret selektion. Præforædling er ressource- og tidskrævende, og den udføres undertiden i samarbejde med forskningsinstitutioner, men kan have stor betydning for landbruget, miljøet og samfundet, fordi den bringer nye gener ind i sortsmaterialet.



Figur 1.2. Tilbagekrydningskema for en elitehvede krydset med en mutanthvede. Igennem gentagne tilbagekrydsninger med elitehveden erstatter man mutanthvedens genomandel med elitehvedens genom.

1.5.1.2. Syntetiske hexaploider

Det er langt fra altid, at man i detaljer kender til enkeltgener, der giver en ønsket egenskab. Udvidelse af den genetiske variation kan også foregå langt mere uspecifikt. En langsigtet strategi hvor der i dag stadig gøres et stort arbejde, er ved fremstillingen af syntetisk hexaploid hvede, som gennemføres for at bringe nye gunstige gener ind i brødhvede fra dens slægtninge (se f.eks. King et al., 2017, 2018; Grewal et al., 2018). Brødhvede (*Triticum aestivum*) er et resultat af tre forskellige hvedearter, som er blevet krydset sammen. Den er derfor hexaploid og består af tre genomer kaldet A, B og D. Men der findes også tetraploid hvede (med A og B genomerne) som f.eks. emmer (*Triticum dicoccum*), som er en krydsning mellem to vilde græsser (*Triticum urartu* og *Aegilops*). Et andet eksempel på tetraploid hvede er durum hvede (*Triticum durum*), som dyrkes intensivt til anvendelse i pasta. Ved at krydse tetraploid hvede (AABB) med den vilde diploide *Aegilops tauschii*, som indeholder DD genomet, kan man skabe en såkaldt syntetisk hexaploid (AABBDD) hvede, som kan være en nyttig kilde til nye egenskaber som f.eks. sygdomsresistens. Hvis den syntetiske hexaploide hvede har egenskaber, der ønskes indkrydset i en moderne elitesort, venter der et meget omfattende tilbagekrydsningsarbejde for at slippe af med uønskede egenskaber fra de di- og tetraploide ophavsplanter (se figur 1.2)

1.5.1.3. Translokationsforædling i hvede

Ved translokationsforædling indføres dele af en donorplantes kromosom i modtagerplantens ge-nom. Et klassisk eksempel på translokationsforædling blev udført af E. R. Sears i 1950'erne (Sears, 1956). Han flyttede et gen for bladrustresistens fra den vilde græs *Aegilops umbellulata* til brød-hvede. Det første problem bestod i, at de to arter *Triticum aestivum* og *A. umbellulata* ikke umiddelbart kan krydses. Sears løste problemet ved at foretage et såkaldt brokryds, hvor han først krydsede *A. umbellulata* med emmer. *A. umbellulata* er diploid og indeholder kromosomsættet (CC), og emmer er tetraploid og indeholder kromosomsættene AABB. Fra krydset opnåede Sears den sterile hybrid ABC, som blev kromosomfordoblet til en fertil AABBCC. Denne blev krydset med brødhvede, som fik afkommet AABBCCD, der desværre var næsten fulkommen sterilt, formentlig pga. af irregulær parring af CD kromosomerne. Ved tilbagekrydsning til brødhvede fandt han enkelte kerner, som spirede og gav rustresistente planter. Desværre indeholdt det ekstra kromosom C for mange uønskede gener, som skulle fjernes for at få en konkurrencedygtig sort. Sears gjorde det ved at bestråle pollenet fra planten og bruge det til at bestøve brødhvede med. Herefter fandt han en brødhvede med et enkelt lille *A. umbellulata* kromosomstykke (en translokation), som gav rustresistens, og hvor planten lignede almindelig brødhvede.

1.5.1.4. Ny variation i byg

I byg er ny variation blevet indført ved krydsninger til vilde slægtninge. Den vilde byg *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* vokser vidt udbredt i Mellemøsten (Thormann et al., 2016). Vild byg indeholder rigtig mange sygdomsresistensgener, som kan indføres i vores dyrkede byg ved almindelig krydsning (f.eks. Jahoor and Fischbeck, 1993; Ivandic et al., 1998; Backes et al., 2003). Efter krydsning imellem vild og dyrket byg venter der et omfattende tilbagekrydsningsprogram for at slippe af med uønskede egenskaber fra den vilde byg.

1.5.1.5. Sygdomsresistens i kartofler

Kartofflen har groft sagt dannet præcedens for overførelse af gener fra vilde slægtninge til den dyrkede form af en afgrøde. I det centrale og sydlige Amerika findes en lang række arter som er tæt beslægtede med den dyrkede kartoffel (*Solanum tuberosum*) og som udgør en ressource for præforædling i kartofler. Kartofflen blev indført til dyrkning i Europa, Asien og Nordamerika i det 16. og 17. århundrede, men de fleste sorter blev ødelagt af en opfattende epidemi af kartoffelskimmel i midten af det 19. århundrede. Kartoffelskimmel-epidemien havde voldsomme konsekvenser, men efterfølgende overførelse af resistensgener til den dyrkede kartoffel fra den vilde slægtning *Solanum demissum* muliggjorde derefter igen dyrkning af kartofler. De fleste dyrkede kartofler er tetraploide, men omkring 75% af de vilde arter er diploide, og det fører til store krydsningsbarrierer imellem arterne (Bethke et al., 2017). Såkaldt ploidimanipulation såsom kromosomfordobling i somatiske celler anvendes til at overkomme sådanne ploidibaserede krydsningsbarrierer (MAINE and SIMPSON, 1999; Bethke et al., 2017).

1.5.1.6. Somatisk hybridisering, ikke GMO

Somatisk hybridisering anvendes til at kombinere generne fra to celler fra arter, som kan krydse naturligt. Cellevæggen fjernes fra somatiske celler, så der kun er cellens protoplast tilbage. Protoplasten kan fusioneres ved forskellige kemiske behandlinger med f.eks. polyethylenglycol (PEG) eller ved elektrofusion (elektrisk stød). Efter fusionen indeholder hybridgenetisk materiale fra begge planteceller, altså et sæt kromosomer fra hver af forældrene. Teknikken anvendes f.eks. til at indføre cytoplasmatiske hansterilitet til brug i forædlingen af hybridarter. Somatisk hybridisering er ikke en udbredt teknik.

1.6. Andre teknikker i klassisk planteforædling

1.6.1. Dobbelt haploider

De fleste arter har to sæt homologe kromosomer i deres cellekerner. Som tidligere beskrevet findes der variation imellem de homologe kromosomer, såkaldt allel variation. Under den seksuelle reproduktion dannes en haploid gamet (i pollen og æg), som kun indeholder det ene sæt af kromosomerne. Man kan ud fra haploide planteceller dyrket in vitro fremstille haploide planter. Det ene tilstedeværende sæt kromosomer i den haploide plante kan efterfølgende kromosomfordobles med f.eks. kemikaliet colchicin. Der dannes herved en eksakt kopi af kromosomerne og man opnår derved hurtigt en homozygotisk plante. Forædleren ser derved med det samme, hvilke alleler han har i sit materiale. Dobbelt haploid teknik er yderst udbredt i planteforædlingen og kan anvendes til en hurtig frembringelse af rene linjer og til frembringelse af forældreplanter til hybridsorter.

1.6.2. Hybridsorter

Hybridsorter er særligt udbredt i majs, rug samt i gartneriafgrøder som f.eks. tomat og agurk. Der findes også hybridbyg og -hvede og der arbejdes på at udbrede disse, ligesom det vurderes ønskeligt at udvikle hybridsorter inden for arter som f.eks. rajgræs (Pembleton et al., 2015). Såsæden i forbindelse med hybridsorter fremkommer ved at krydse to indavlede linjer. Den første generation herefter kan føre til øget udbytte pga. såkaldt krydsningsfrodighed. I såsædsproduktionen skal krydsningen imellem de indavlede linjer foretages kontrolleret.

Flaskehalsen i hybrid frøproduktion er at kontrollere pollen fra moderplanten, så man undgår uønsket selvbestøvning. Der findes en række teknologier til at kontrollere dette, fra manuel emaskulering (fjernelse af støvdragerne), sprøjtning med kemiske midler kendt som gametocider, pollen-undertrykkere eller kemiske hybridiseringsmidler og til genetisk styret sterilitet (Colombo and Galmarini, 2017). Især den genetiske kontrol er ønsket og er yderst udbredt i f.eks. majs. Genetisk hansterilitet skyldes enten mutationer i cellekernens DNA (genic hansterilitet) eller mitokondriernes DNA (cytoplasmatisk hansterilitet, CMS). Der findes en række mutationer, der giver hansterilitet, og de fleste af disse er recessive. Fertiliteten kan genoprettes ved at krydse med en plante, som har et dominant såkaldt restaurerings- (restorer) gen.

1.7. Uplanlagte mutationer opstået ved konventionel planteforædling, plantens formering og dens almindelige vækst

I forbindelse med krydsning af planter samt ved plantens almindelige vækst sker der en række mutationer, som øger den genetiske variation. Omfanget og placeringen af mutationerne kontrolleres ikke af forædleren, men kommer fra forskellige cellulære processer.

Ved krydsning af to planter blandes generne fra de to forældreplanter. Det er altså ikke kun de ønskede egenskaber, der flyttes. Forældrenes haploide genomer blandes, så både ønskelige og ikke ønskelige egenskaber kommer til udtryk. Hvor der umiddelbart kan identificeres uønskede effekter kasseres krydsningsplanterne. Kun de bedste går videre i forædlingsarbejdet.

Når kønscellerne (pollen og æg) dannes ved meiosen, sker der en overkrydsning imellem kromosomerne, og der opstår nye allelkombinationer (se f.eks. Wijnker et al., 2013). Det betyder, at de efterfølgende generationer af krydsningsplanter udviser en større variation i egenskaber end hvad kunne forudses. De ønskede egenskaber kan fremelskes ved tilbagekrydsninger som beskrevet ovenfor.

Spontane mutationer i plantens genom foregår hele tiden. I et studie i modelplanten *Arabidopsis thaliana* kiggede forskerne efter nye spontane mutationer i en enkelt plantelinie over 30 generationer (Ossowski et al., 2010). De fandt 99 baseændringer i DNA'et og 17 små eller store indsættelser i plantens genom. Set i forhold til *Arabidopsis* plantens genomstørrelse vil der i gennemsnit ske en ændring af én base i plantens DNA per vækstgeneration.

De mutationer, der er fremkommet som beskrevet ovenfor i dette afsnit, er ikke planlagte og mange af dem vil ikke føre til ændringer i plantens fænotype. Andre mutationer vil derimod ændre plantens fænotype, og nogle gange på gavnlig vis. Et eksempel på det sidste gælder for de dværggener i hvede og ris, som spillede en stor rolle under den grønne revolution. De bemærkelsesværdige stigninger i hvede- og risudbytter under den grønne revolution blev blandt andet muliggjort af indførelsen af dværggener, som oprindeligt blev opdaget som en mutation i hvede i Japan. I dag viser identifikation af de gener, som er ansvarlige for dværgegenskaben, at de påvirker aktiviteten eller produktionen af plantehormonet gibberelinsyre, som påvirker bl.a. stængelvæksten (Hedden, 2003).

1.8. Konklusion

Der stilles løbende nye krav til moderne plantesorter. Planteforædling udnytter den genetiske variation til at fremelske nye forbedrede sorter. Hvis der ikke er genetisk variation, kan man ikke forædle nye sorter. Genetisk variation opstår naturligt i arten under dens formering og vækst. I tilfælde hvor man har ønsket at øge den genetiske variation yderligere, har planteforædlere igennem årtier gennemført en række indgreb for derved at skabe den nødvendige variation til at opnå deres forædlingsmål. Indførelse af ny genetisk variation har haft stor og ofte essentiel betydning for vores afgrøder.

Referencer

Backes G, Madsen L, Jaiser H, Stougaard J, Herz M, Mohler V, Jahoor A. 2003. Localisation of genes for resistance against *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* and *Puccinia graminis* in a cross between a barley cultivar and a wild barley (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum*) line. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 353–362.

Bethke PC, Halterman DA, Jansky S. 2017. Are We Getting Better at Using Wild Potato Species in Light of New Tools? *Crop Science* **57**, 1241.

Colombo N, Galmarini CR. 2017. The use of genetic, manual and chemical methods to control pollination in vegetable hybrid seed production: a review (M Havey, Ed.). *Plant Breeding* **136**, 287–299.

Fischer T, Byerle D, Edmeades G (Eds.). 2014. Crop yields and global food security: Will yield increase continue to feed the world? ACIAR.

Grewal S, Yang C, Edwards SH, Scholefield D, Ashling S, BurrIDGE AJ, King IP, King J. 2018. Characterisation of *Thinopyrum bessarabicum* chromosomes through genome-wide introgressions into wheat. *Theoretical and Applied Genetics* **131**, 389–406.

Hedden P. 2003. The genes of the Green Revolution. *Trends in Genetics* **19**, 5–9.

- Ivandić V, Walther U, Graner A.** 1998. Molecular mapping of a new gene in wild barley conferring complete resistance to leaf rust (*Puccinia hordei* Otth). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **97**, 1235–1239.
- Jahoor A, Fischbeck G.** 1993. Identification of New Genes for Mildew Resistance of Barley at the Mia Locus in Lines Derived from *Hordeum spontaneum*. *Plant Breeding* **110**, 116–122.
- King J, Grewal S, Yang C, et al.** 2017. A step change in the transfer of interspecific variation into wheat from *Amblyopyrum muticum*. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 217–226.
- King J, Grewal S, Yang C, et al.** 2018. Introgression of *Aegilops speltoides* segments in *Triticum aestivum* and the effect of the gametocidal genes. *Annals of Botany* **121**, 229–240.
- Maine MJ DE, Simpson G.** 1999. Somatic chromosome number doubling of selected potato genotypes using callus culture or the colchicine treatment of shoot nodes in vitro. *Annals of Applied Biology* **134**, 125–130.
- Ossowski S, Schneeberger K, Lucas-Lledo JI, Warthmann N, Clark RM, Shaw RG, Weigel D, Lynch M.** 2010. The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **327**, 92–94.
- Pembleton L, Shinozuka H, Wang J, Spangenberg G, Forster J, Cogan N.** 2015. Design of an F1 hybrid breeding strategy for ryegrasses based on selection of self-incompatibility locus- specific alleles. *Frontiers in Plant Science* **6**, Article 764.
- Scholey D, Burton E, Morgan N, Sanni C, Madsen CK, Dionisio G, Brinch-Pedersen H.** 2017. P and Ca digestibility is increased in broiler diets supplemented with the high-phytase HIGHPHY wheat. *animal* **11**, 1457–1463.
- Sears E.** 1956. the Transfer of Leaf Rust Resistance *Aegilops Umbellulata* To Wheat.Pdf. *Brookhaven Symposia in Biology* **9**, 1–21.
- Thormann I, Reeves P, Reilley A, Engels JMM, Lohwasser U, Börner A, Pillen K, Richards CM.** 2016. Geography of Genetic Structure in Barley Wild Relative *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* in Jordan (D Perovic, Ed.). *PLOS ONE* **11**, e0160745.
- Wijnker E, Velikkakam James G, Ding J, et al.** 2013. The genomic landscape of meiotic crossovers and gene conversions in *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **2**.

2. Mutationsforædling har skabt ny genetisk variation de sidste 100 år

Per L. Gregersen, seniorforsker, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet

2.1. Indledning: Mutationsforædling i forhold til NBT

Diskussionen om præcisionsforædlingen og de præcise mutationer, som kan opnås med NBT, handler ofte om, hvorvidt denne teknik, når den anvendes uden indsættelse af fremmed DNA, kan ligestilles med metoder i konventionel mutationsforædling, hvor mutationer induceres i forædlede plantesorter ved hjælp af fysiske eller kemiske metoder. Dette skyldes blandt andet, at sorter fremstillet ved hjælp af disse konventionelle mutationsmetoder (blot benævnt som "mutagenese") eksplicit er undtaget bestemmelserne i EU's GMO-direktiv under bemærkningerne i bilag I B. Dette gør, ift. denne vidensyntese, en detaljeret gennemgang af den klassiske mutationsforædling relevant for at klarlægge principperne i og de biologiske implikationer af de metoder, der anvendes her.

2.2. Mutationsforædling historisk

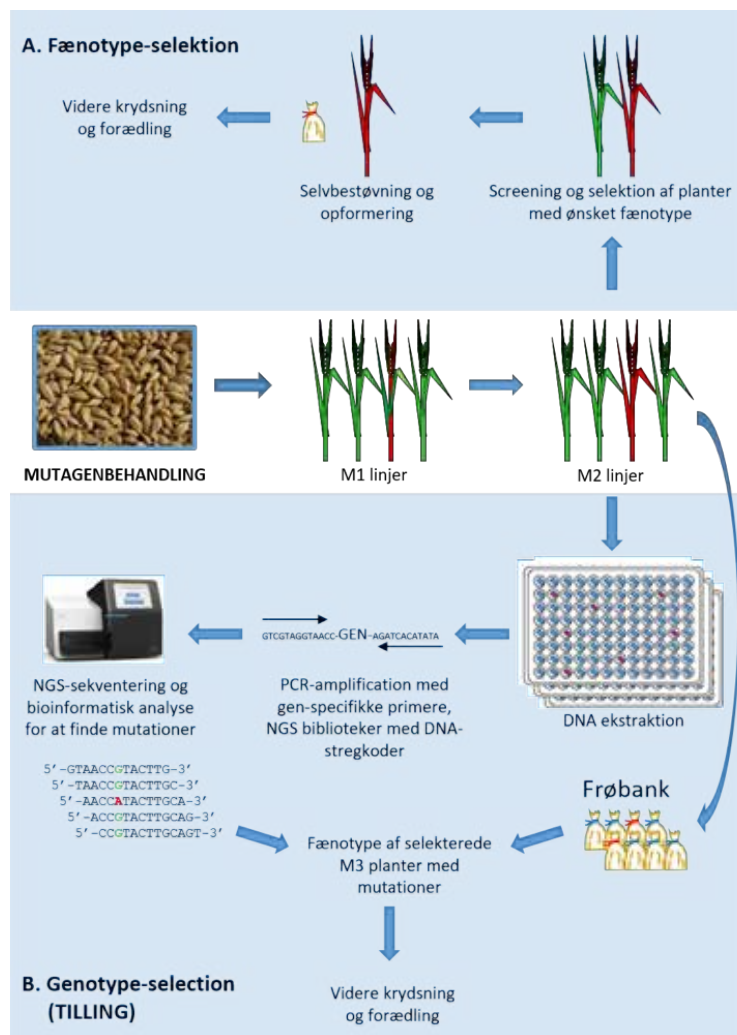
Starten på mutationsforædling går næsten 100 år tilbage til kort efter, at det blev klart, at mutationer kunne induceres i levende organismer (først i *Drosophila*) ved hjælp af røntgenstråler (Muller, 1927). De første mutationer i afgrødeplanter, majs og byg, blev lavet med røntgenstråler i USA (Stadler, 1928). En særlig skandinavisk vinkel er, at arbejde med mutationer i byg startede tidligt, allerede i slutningen af 1920'erne i Sverige og også ved røntgenbestråling af planten. Fra midten af 1900-tallet blev der her genereret et stort antal bygmutantpopulationer (Lundqvist, 2014). Genetisk materiale herfra indgik i mange populære nordiske og danske bygsorter (f.eks. 'Pallas', 'Mari' og 'Mona') fra 1960'erne til 80'erne, hvor planternes egenskaber især var ændret mht. strållængde og tidspunkt for blomstring (Lundqvist, 2014). Også i Danmark, på Forskningscenter Risø i 1960-70'erne, var der aktiviteter på mutanter i byg, især mht. proteinkvalitet af bygkernen og sygdomsresistens (Ingversen et al., 1973; Jørgensen, 1992).

Mht. metoder blev røntgenstrålingen efterhånden afløst af den mere effektive gammastråling som fysisk mutagenesemetode, bl.a. fremmet af det internationale atom- og energiagentur (IA-EA, Wien) (Kharkwal, 2011). Samtidig udvikledes de kemiske mutagenesemetoder fra 1940'erne og frem (Gustafsson and Mackey, 1948), og disse blev efterhånden de dominerende, idet de er bedre egnet til at lave store, såkaldt mættede mutantpopulationer, hvor alle gener forventes at være ramt af en mutation på tværs af populationen (Kharkwal, 2011; Lundqvist, 2014).

Forhåbningerne til mutationsforædlingen var høje i midten af 1900-tallet (f.eks. i H.J. Mullers No-belforedrag 1946 (Muller, 1946)). Forhåbningerne relaterede sig både til, at man formodede at kunne introducere nye egenskaber i planterne, som ikke ellers kunne fremkomme naturligt, og at man kunne gøre det hurtigt i allerede tilpassede sorter. Succeshistorier har der dog også været, men disse har først og fremmest været "lavt-hængende frugter" på den måde, at de repræsenterede egenskaber, som var lette at inducere og screene for i mutantpopulationer, f.eks. plantehøjde og blomstringstidspunkt. Dette afspejler den vigtige pointe, at mutationsforædling helt frem til århundredskiftet udelukkende var såkaldt forward genetik, dvs. at selektionen af ønskede genotyper i mutationspopulationer kun var baseret på fænotypen (figur 2.1A). Dette betyder også, at det primært har været tydelige og markante morfologiske og farvemæssige ændringer, der er blevet selekteret for. Fysiologiske/biokemiske og mere komplekse egenskaber har været vanskeligere at selektere for, selv om udviklingen i analysemetoder, f.eks. massespektrometri, har øget mulighederne her også (Sikora et al.,

2011). I takt med udviklingen i den molekylære genetik fra 1970'erne og frem blev det muligt at identificere og karakterisere gener for bestemte mutationer på basis af genetisk kortlægning (map-based cloning). Det var dog først med udviklingen af den såkaldte TILLING-metode (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) (McCallum et al., 2000), at det blev muligt målrettet og effektivt at finde mutationer i forudbestemte gener, for hvilke DNA-sekvensen var kendt (figur 2.1B). Dette har gjort såkaldt reverse genetik muligt i et omfang, som ikke tidligere var muligt, dvs. at mutationer i bestemte gener kan identificeres, og deres effekt på plantens fænotype kan derefter karakteriseres. Dette uddybes nedenfor.

Siden starten af 80'erne er interessen for at anvende mutationer i praktisk planteforædling faldet, måske pga. en øget interesse for i stedet at anvende genteknologiske metoder og pga. besværligheder med at håndtere uønskede mutationer, som kan følge de ønskede mutationer (Mba, 2013). Mutagenbehandling har dog i samme periode været anvendt intensivt til at inducere mutationer i gener til studier af genfunktioner i grundlæggende molekylærbiologisk forskning. Udviklingen i TILLING-metoderne har desuden i det seneste årti genskabt en interesse for at anvende inducerede mutationer mere direkte i planteforædlingen.



Figur 2.1. Mutationsforædling baseret på (A) konventionel fænotype-selektion af muterede planter med ønskede egenskaber eller (B) genotype-selektion baseret på molekylærgenetisk analyse af mutationer i et gen, som ønskes muteret med en forventning om gunstige ændringer i fænoty-pen/egenskaber. PCR: Polymerase Chain Reaction; NGS: Next Generation Sequencing.

2.3. Mutationstyper og mutationers rolle i evolution og planteforædling

Mutationer kan ud fra ændringerne i det genomiske DNA opdeles i hhv. punktmutationer, insertioner/deletioner/inversioner, translokationer og spredning af transposoner og retrovirus i genomer. Transposoner og retrovirus er selvspredende genetiske elementer i plantens genom. Derudover kan man overordnet opdele mutationer i kromosom- og genmutationer, hvor den første påvirker kromosomstrukturer eller -antal, mens den sidste kun påvirker enkeltgener (Lundqvist et al., 2011). Ved kromosommutationer omarrangeres store stykker af kromosomerne, f.eks. ved translokationer mellem to forskellige kromosomer. Sammen med bestråling er dette bl.a. blevet udnyttet til at fremme overførsel af kromosomfragmenter mellem arter, som kan krydses (Lundqvist et al., 2011). De hyppigste mutationer er genmutationer, hvor ændringerne kun påvirker DNA-sekvensen for et enkelt gen, hvilket omfatter både den protein-kodende del af genet og regulerende områder. Især punktmutationer er hyppige, dvs. ændringer i enkelte baser i DNA-strengen, men genmutationer kan også indebære fjernelse (deletion) eller indsættelse (insertion) af en til flere baser i DNA-strengen. Alle disse typer af mutationer kan have større eller mindre effekt på genet og det afkodede protein. Ingen effekt (silent mutation) ses f.eks. ved en baseændring, som ikke eller ubetydeligt ændrer aminosyresammensætningen i det kodede protein, mens stærke effekter f.eks. vil forekomme, hvis en baseændring introducerer et såkaldt stop-codon, hvor det kodede protein bliver afkortet. En anden typisk stærk effekt er, hvis en fjernelse/indsættelse af baser ændrer den såkaldte læseramme, hvor afkodningen fra DNA til proteinsekvens bliver forstyrret.

I princippet er der ikke forskel på typen af mutationer, som induceres ved mutagenbehandling, og mutationer, som opstår naturligt, bortset fra transposon- og virusspredning, der potentielt kan tilføre en plante fremmed DNA. Både naturlige og inducerede mutationer leder til større eller mindre ændringer i DNA-sekvensen eller i kromosomstrukturer, og forskellen mellem dem beror først og fremmest på mutationsraten. Naturlige mutationer, opstået gennem millioner af år, har skabt den genetiske variation, som gennem evolutionen fører til udvælgelse/fremme af nye geno-typer i populationer, helt i tråd med Darwins teorier om naturlig selektion. Klassisk planteforædling har systematiseret denne udvælgelse blandt naturlige varianter, sammen med en målrettet kombination af de bedste genotyper gennem krydsninger (se afsnit X). Mutationsforædlingen har taget skridtet videre og skabt yderligere genetisk variation ved at inducere mutationer og derved potentielt skabt mulighed for at accelerere den naturlige proces betydeligt.

2.4. Metoder til at lave mutanter og de inducerede genotyper

Naturlige mutationer opstår pga. fysiske og kemiske påvirkninger (stråling, mutagene kemikalier), af virus og ved transposonspredning, som direkte påvirker og ændrer DNA i cellerne. Hvis dette sker i kønsceller, kan ændringerne overføres til næste generation, hvorved mutationerne fastholdes i efterfølgende generationer – hvis de er gunstige for arten. Udover fysiske/kemiske påvirkninger kan tilfældige fejl under celledelinger også introducere mutationer. Mutationsforædling anvender metoder, som svarer til naturlige mutagener, men med en øget dosis for at forøge mutationsraten. Især er radioaktiv stråling og mutagene kemikalier blevet anvendt. Tabel 2.1 giver en oversigt over de historisk mest anvendte metoder (Leitao, 2011; Mba et al., 2011) sammen med de typer af DNA-ændringer, som de forårsager. Ud over de i tabel 2.1 nævnte metoder er en lang række andre fysiske og kemiske metoder gennem de sidste 100 års udvikling af mutationsforædlingen blevet afprøvet og anvendt (Kharkwal, 2011).

Tabel 2.1. De hyppigst anvendte mutationsmetoder og deres effekter på DNA i kromosomerne.
Typisk vil behandlingen foregå på tørre eller opblødte frø, hvorefter M1 planter fremspires.

Kategori	Mutagenbehandling	Mutationstype	Genotype
Fysisk	Røntgen-stråling (x-rays) Gamma-stråling	Afhænger af dosis: blanding af genmutationer og kromosommutationer	Punktmutationer. Deletioner/inversioner af meget forskellig størrelse. Translokationer.
Kemisk	Alkylerende mutagener: • MNU • EMS • ENU	Genmutationer	Alkylerede baser vil parre forkert, typisk med G/C → A/T transition til følge. Få InDels
	NaN ₃	Genmutationer	Både G/C → A/T og A/T → G/C transitioner. Få InDels.

EMS: ethyl methanesulphonate, MNU: N-methyl-N-nitrosourea; ENU: 1-ethyl-1-nitrosourea; NaN₃: natriumazid; InDel: insertion/deletion.

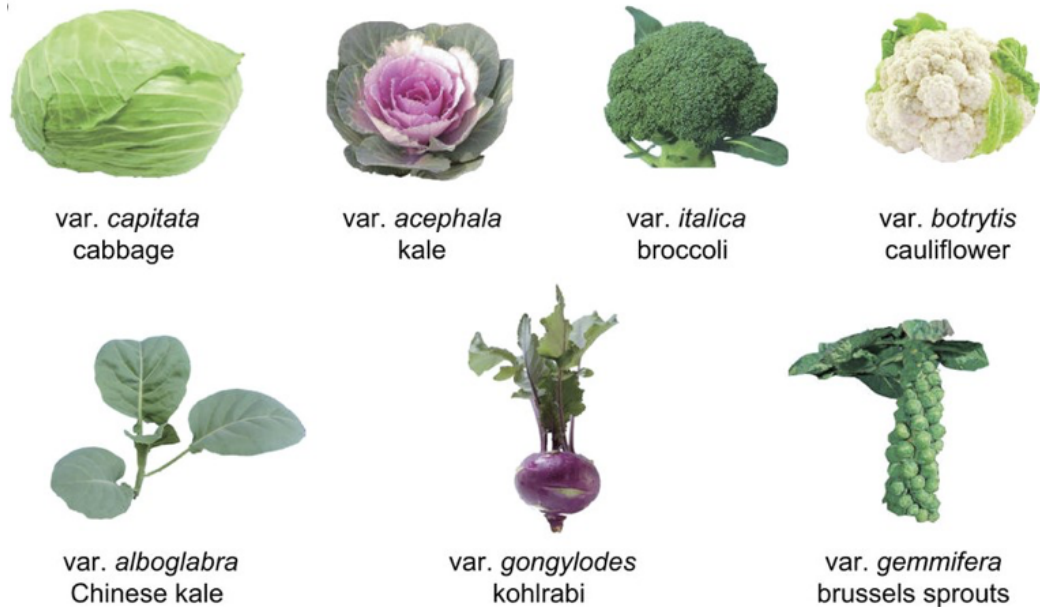
Som det fremgår af tabel 2.1, er der en vis sammenhæng mellem genotypen for en induceret mutation og mutationsmetoden, idet de kemiske metoder (f.eks. EMS, NaN₃) som regel giver enkelt-base substitutioner (transitive, dvs. fra G/C til A/T), mens de forskellige bestrålingsmetoder, alt afhængig af dosis, giver en blanding af punktmutationer og større eller mindre deletioner, samt translokationer. Selv for de kemiske metoder kan der være forskelle, og derfor kan det være nyttigt at anvende kombinationer af behandlinger for at opnå størst mulig variation i en mutantpopulation. En grund til at de kemiske mutagener nu er de mest anvendte er, at disse, fordi de primært fremkalder punktmutationer, egner sig bedst til sammen med TILLING-metoderne at finde mutationer i bestemte gener (se nedenfor) (Szarejko et al., 2017).

2.5. Eksempler på naturligt forekommende mutationer i danske afgrøder

Den herskende forståelse af evolutionære processer bygger på, at naturlige mutationer sammen med krydsninger bidrager til diversificering inden for arter og også til udvikling af nye arter. Tre eksempler fra danske afgrøder på, hvordan mutationer har formet afgrødearter på forskellige niveauer, skal nævnes her:

Eksempel 1. Et ekstremt eksempel på, hvordan mutationer har formet udviklingen af dyrkede planter, findes i kålslægten (Brassica) i korsblomstfamilien. Der findes et stort antal dyrkede arter/underarter inden for denne planteslægt, bl.a. raps, blomkål, broccoli, sennep osv. Basalt set formodes alle disse arter at have den samme diploide stamfader tilfælles. Cheng et al. (2016) undersøgte den genetiske variation blandt et stort antal underarter/varianter inden for de to arter *B. rapa* ('turnips') og *B. oleraceae* ('kål'). Den store fænotypiske variation er vist i figur 2.2 for syv varianter af *B. oleraceae*. Cheng et al. (2016) fandt ved DNA-sekventering af genomerne for de syv varianter i figur 2.2 grundlæggende den samme genomstruktur og store ligheder mht. kromosomstruktur og DNA-sekvens, men også mange genmutationer (>350.000 punktmutationer og >15.000 deletioner/

insertioner). Teorien er, at alle disse mange mutationer tilsammen har bevirket den store fænotypiske variation, selvom det umiddelbart er vanskeligt at pege på enkelte gener, som har afgørende betydning på forskellige egenskaber.



Figur 2.2. Naturlig fænotypisk variation blandt underarter/varianter af *B. oleracea* ('kål') (Uddrag af billeder fra Cheng et al., 2016). Variationen er fremkommet ved forædling af og selektion i arter/underarter, som allerede har haft en naturlig variation.

Eksempel 2. Sygdomsresistens er en af de egenskaber, man gerne ser indført i dyrkede afgrøder, og én succeshistorie mht. dette er mlo-resistensen i byg over for angreb af bygmeldug, en alvorlig sygdom i byg under danske forhold. Denne resistens blev fundet som en naturlig mutation i en byglinje fra Etiopien i 1930'erne og har efter indkrydsningen i elitesorter vist sig at være holdbar i dyrkningen (Jørgensen, 1992). Genet, mlo-11, er recessivt, og kloning og sekventering af genet viste, mutationen i genet fandtes i de regulerende dele, hvor en duplikation (insertion) tilsyneladende forstyrrer gen-transkriptionen (Büschges et al., 1997). Dette forårsager meget nedsat mængde af det funktionelle protein, hvilket giver planten resistens over for meldugangreb. Nu om dage forekommer mlo-genet i næsten alle elitebygsorter, enten i form af den naturligt forekommende mutation eller i form af inducerede mutationer. (Se mere om Mlo-genet i kapitel 4).

Eksempel 3. I vild emmer-hvede findes et gen, Gpc-B1 ("grain protein content"), som ved indkrydsning i dyrket hvede giver et forhøjet proteinindhold i kernerne (Joppa and Cantrell, 1990). Kloning af dette gen viste, at almindelig dyrket hvede indeholder en gen-mutation i det pågældende gen (deletion af en enkelt base), som giver "frame shift" i translationen til protein, så der ikke dannes det korrekte protein. Mutationen opstod allerede tidligt under udvikling af brødhvede og giver let nedsat proteinindhold i kernen hos brødhvede, men større kerner og mere udbytte (Dubcovsky and Dvorak, 2007), især under mellemeuropæiske tempererede forhold, fordi genet også er forbundet med en langsommere modning og dermed en længere vækstsæson. Pga. de større kerner er det muterede Gpc-B1-gen blevet foreslået at være et såkaldt domesticeringsgen, som har været udsat for positiv selektion under domesticeringen af hvede og spredningen af hvededyrkning til tempererede egne med længere vækstsæson.

2.6. Database for sorter baseret på mutanter

Fordi bestråling, især med gamma- og røntgen-stråler, har været en central mutationsmetode, har det internationale atom- og energibureau (IAEA, Wien) de seneste 50 år været en væsentlig international faktor i at fremme mutationsforædling og i at dokumentere dens resultater. Hos IAEA i Wien findes således en database over markedsførte plantesorter siden 1950, hvis udvikling har involveret mutagenese både med fysiske og kemiske mutationsmetoder (<https://mvd.iaea.org>). I marts 2018 omfattede listen i databasen 3243 sorter, strækkende sig over alle typer af afgrøder fra prydplanter til de store afgrøder som hvede, ris og majs. Man må formode, at ikke alle markedsførte sorter er registreret i IAEAs database. F.eks. er det velkendt, at de såkaldte null-LOX bygsorter (Skadhauge et al., 2011), som Carlsberg-bryggerierne anvender i deres kontrakt dyrkning af maltbyg, er fremstillet ved hjælp af mutagenese, og disse sorter er ikke opført i IAEAs database. Grunde til ikke at være registreret kan være flere. Forster and Shu (2011) nævner bl.a. uvidenhed om databasens eksistens; at mutation som kilde til en egenskab kan fortabe sig efter krydsninger; at der kan være uklarhed om f.eks. patentrettigheder; at der er bekymring for at blive forbundet med GM-diskussioner; eller at 'mutation' ikke er en oplagt positiv mærkat i reklamesammenhæng. Man må således regne med, at antallet af sorter, hvis udvikling har involveret mutagenese, på verdensplan er væsentligt større end de 3243 i databasen.

Eksempler fra listen er især karakteriseret ved typisk at have fænotyper baseret på selektion af makroskopiske, letgenkendelige egenskaber, såsom højde (mange ris-, byg og hvedesorter) og farver (f.eks. frugtfarven hos grapefrugtsorten 'Red Rio'). Historisk har listen sit toppunkt i 1980'erne, men der tilføjes dog stadig nye sorter, omkring 10 om året de seneste år, mens det var >100 om året før årtusindskiftet. Dette afspejler det allerede nævnte fald, som er set siden 1980'erne, i interessen for at anvende mutationsforædling i praktisk planteforædling.

2.7. TILLING: fra forward til reverse genetik

Som pointeret ovenfor har mutationsforædlingen historisk involveret selektion af planter på basis af fænotypen, hvilket har givet begrænsninger i anvendeligheden, fordi mere subtile/kvantitative forskelle, f.eks. i udbytte, er vanskelige at screene for på enkeltplanteniveau i en mutantpopulation. I fænotypescreeningen af en mutationspopulation efter mutagen-behandling screenes der for tydelige morfologiske eller farvemæssige egenskaber (fænotyper), og planter med ønskede egenskaber bliver udvalgt og anvendt, enten direkte som nye sorter af en afgrøde, eller indirekte gennem krydsninger med andre sorter (Figur 2.1A). De seneste årtiers udvikling i molekylærbiologi og kendskabet til de gener, som styrer bestemte egenskaber, har imidlertid betydet, at reverse genetik i en forædlingssammenhæng er blevet muligt. Med reverse menes, at udgangspunktet tages i generne (udvalgte kandidatgener), som muteres, hvorefter man observerer eventuelle effekter på fænotypen. Hvis den forventede effekt opnås, kan man gå videre og udnytte mutationen i forædlingsarbejdet.

Den første hurdle i dette er at finde mutationer i specifikke gener, og det er, hvad man kan opnå med TILLING (McCallum et al., 2000). Den nyeste og mest omfattende måde at lave TILLING på er at sekventere genomet, eller de kodende dele af det (exomet), fra et større antal individer fra mutant-populationen og derefter lede efter mutationer i de ønskede gener. Et nyere eksempel på dette er en database for mutationer i hvede (<http://www.wheat-tilling.com/>, JIC, UK), hvor man online kan identificere mutationer i bestemte gener og derefter rekvirere kerner fra de muterede planter til videre karakterisering og krydsninger (Krasileva et al., 2017). I standardudgaven af TILLING-metoden amplificeres DNA fra specifikke gener med PCR fra en mutantpopulation. Mutationer hos enkeltindivider kan efterfølgende detekteres ved forskellige metoder (f.eks. sekventering, gel-elektroforese eller high-resolution-melting), som er i stand til at skelne mellem DNA-sekvenser fra mutanter

og vildtype planter (McCallum et al., 2000). Figur 2.1B viser dette med sekventeringsmetoden (NGS – New Generation Sequencing). Når mutationerne er fundet for et bestemt gen, normalt flere forskellige mutationer i forskellige områder af genet, skal man efterfølgende undersøge, om de som formodet reelt har effekt på fænotypen. Dette afhænger først og fremmest af mutationstypen og effekten på DNA'et, dvs. om der er sket baseændringer af stor betydning for proteinfunktionen, eller om der er sket ændringer i læserammen af betydning for længden af proteinets aminosyresekvens. I sidste ende skal fænotypen/egenskaberne testes under dyrkningsforhold for at afgøre, om den aktuelle mutation har en betydning for egenskaben af linjen, så den er værd at gå videre med i et forædlingsprogram.

TILLING-metoderne er efterhånden blevet så effektive, at man stort set kan finde mutationer i hvilket som helst gen, man måtte ønske. Dog kan man ikke helt præcist forudse, hvor mutationen vil være i selve genet, og derudover vil der i en mutantplante, som besidder den ønskede mutation, altid forekomme et større antal ukendte mutationer i andre gener end det, som er målet for TILLING-screeningen.

2.8. Uønskede sideeffekter og begrænsninger ved konventionel mutationsforædling

Den væsentligste sideeffekt ved konventionel mutagenese i planteforædlingen knytter sig til, at en induceret mutation, som nævnt ovenfor, ledsages af et større antal ukendte og uønskede mutationer i de udvalgte planter, ved både forward og reverse metoder (Mba, 2013). Dette problem er størst i diploide, selvbestøvende arter såsom byg, fordi effekten af de ukendte mutationer, f.eks. nedsat udbytte, her lettere slår igennem end i polyploide arter såsom hexaploid brødhvede, *Triticum aestivum*, hvor de tre sub-genomer fungerer som en buffer ift. ukendte mutationer. Szarejko et al. (2017) angiver, at antallet af mutationer i en enkelt bygplante i en typisk mutantpopulation kan være helt op til 10.000. De fleste af disse vil ikke have ramt gener, men nogle vil og kan altså, ud over at ramme det ønskede gen, forårsage uønskede ændringer i andre gener.

En vigtig begrænsning ved mutagenesemetoderne er, at mutationerne af natur er tilfældige, hvilket dog også positivt betyder, at man kan opnå mutationer stort set jævnt fordelt overalt i genomet (Forster and Shu, 2011). Men man kan ikke vælge helt præcist, ned på DNA-baseniveau, hvor mutationen skal være. Ved TILLING kan man finde relevante mutationer i bestemte afgrænsede DNA sekvenser, men disse vil stadig være induceret tilfældigt og kan således ikke "placeres" helt præcist.

Der gælder særlige begrænsninger mht. vegetativt formerede planter, idet der her efter mutationsbehandling ofte fremkommer kimcæriske planter, og recessive mutationer vil ikke have nogen effekt. Tilsvarende er polyploide planter vanskelige at lave mutationsforædling i, fordi gener i disse ofte findes i flere kopier på de forskellige sub-genomer, som har en buffereffekt i forhold til hinanden mht. gavnlige recessive mutationer. Trods dette er der, f.eks. i hexaploid brødhvede, eksempler på succesfuld mutationsforædling, hvor nye egenskaber mht. plantehøjde, blomstringstidspunkt og sygdomsresistens er opnået (Konzak, 1987).

En basal begrænsning i mutationsforædling er, at man i langt de fleste tilfælde opnår fjernelse af et gen-produkt, hvilket knytter sig til, at man ikke kan inducere mutationerne helt præcist i DNA-sekvensen. I nogle tilfælde kunne man ønske sig at opnå f.eks. en forøgelse i mængden af et enzym eller bestemte proteiner for at fremme en egenskab. Med mutationer kan dette kun opnås i særlige tilfælde, hvor man slår negative regulatorer ud med mutation. Dette kræver dog kendskab til komplekse reguleringsmekanismer.

Udover uønskede mutationer, som følger den ønskede mutation pga. såkaldt linkage drag, kan den ønskede mutation i sig selv også have ugunstige pleiotrope effekter, f.eks. øget modtagelighed over for sygdomme, som ikke umiddelbart har noget at gøre med den egenskab, man gerne vil introducere med en mutation. Denne situation er dog ikke for mutationsforædlingen væsensforskellig fra konventionel forædling, hvor nye gener krydses ind i forædlingsmateriale.

2.9. Forholdsregler imod uønskede sideeffekter

Forholdsreglen mod, at ukendte/uønskede mutationer (såkaldte off-target gener) følger med ønskede mutationer i et mutationsforædlingsprogram, er først og fremmest tidskrævende tilbagekrydsninger til eksisterende elitesorter (se kapitel 1), hvor mutationen følges i afkommet, mens de medfølgende mutationer i gener, der kan give uønskede effekter, forsøges luget væk. Hvor let eller vanskeligt dette vil være, afhænger helt af den genetiske kobling mellem ønskede og uønskede mutationer (linkage drag).

Ugunstige pleiotrope effekter må håndteres, som man gør i traditionel krydsningsforædling, primært ved at forsøge at afkoble eller mindske den pleiotrope effekt. Et succesfuldt eksempel på dette er mlo-mutationen i byg, der, som tidligere nævnt, giver resistens over for meldugangreb. I de første sorter med mlo-resistens, så man også en uheldig pleiotrop forekomst af nekrotiske pletter på bladene med udbyttetab til følge (Jørgensen, 1992). I den efterfølgende forædlingsproces er det lykkedes at reducere denne effekt til et acceptabelt niveau, således at mlo-mutationen nu kan anvendes uden de store problemer.

2.10. Risici ved konventionelle mutationsteknikker

Da mutationsforædling involverer arbejde med mutagener, er der en sundhedsrisiko ved selve teknikken, idet disse stoffer eller behandlinger ifølge sagens natur som oftest er kræftfremkaldende. Der skal derfor tages de nødvendige forholdsregler under mutagenbehandlingen. Efter behandlingen og fjernelse af mutagenet er der ingen forøget helbredsrisici ift. traditionelt forædlingsarbejde.

Et hundrede års brug af mutagenese i planteforædlingen, med introduktion af et meget stort antal mutationer i dyrkede sorter, har ikke vist alvorlige eksempler på uønskede sideeffekter, som er slået igennem som uventede effekter i de endelige sorter. Man må formode, at sådanne er luget væk i forædlingsprocessen. Dette knytter sig væsentligst til, at mutationer som regel fjerner et gen-produkt fremfor at opregulere det. Det betyder også, at de fleste sideeffekter vil være negative pga. uønskede ekstra mutationer, og at de vil bevirke, at planter, som besidder dem, vil blive bortselekteret. En sammenligning til forøgelse af den genetiske variation ved krydsning til vilde arter med ønskede egenskaber er relevant her. Ved en sådan indkrydsning vil der højst sandsynlig også følge uønskede egenskaber med sammen med den ønskede egenskab, og der findes eksempler på f.eks. et uheldigt højt toksinindhold i kartofler (Zitnak and Johnston, 1970), som er fremkommet på denne måde. Man må vurdere, at risikoen for sådanne situationer er mindre ved mutationsforædling, fordi denne som oftest vil basere sig på moderne, allerede tilpassede sorter, hvor f.eks. højt toksinindhold ikke vil forekomme.

2.11. Konklusion

Mutationsforædling havde sin storhedstid fra midten af forrige århundrede, hvor der blev opnået positive resultater med egenskaber, som var lette at inducere efter mutagenbehandling. Siden 1980'erne er der sket et fald i interessen mht. til at anvende mutationsforædling som et værktøj i den praktiske planteforædling, sandsynligvis pga. besværligheden med at arbejde med de uønskede mutationer, som uvilkårligt er en del af en mutationsbehandling. Samtidig har der været store forventninger til bioteknologiske metoder, som alternativ

til mutationsforædling. Det seneste årti har mutationsforædlingen dog mødt bioteknologien på en ny frugtbar måde i form af TILLING-metoderne, hvilket betyder, at man nu målrettet kan finde mutationer i stort set hvilket som helst gen, man måtte ønske. Dette gør, at mutationsforædlingen igen har fået aktualitet og formodentlig vil opleve en genskabt interesse, også i praktisk planteforædling, indtil NBT-teknologierne formentlig tager over.

Referencer

- Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F, Schulze-Lefert P.** 1997. The Barley Mlo Gene: A Novel Control Element of Plant Pathogen Resistance. *Cell* **88**, 695-705.
- Cheng F, Wu J, Cai C, Fu L, Liang J, Borm T, Zhuang M, Zhang Y, Zhang F, Bonnema G, Wang X.** 2016. Genome resequencing and comparative variome analysis in a Brassica rapa and Brassica oleracea collection. *Scientific Data* **3**, 160119.
- Dubcovsky J, Dvorak J.** 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science* **316**.
- Forster BP, Shu QY.** 2011. Plant Mutagenesis in Crop Improvement: Basic Terms and Applications. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, eds. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford: CABI, 7-20.
- Gustafsson Å, Mackey J.** 1948. The genetical effects of mustard gas substances and neutrons. *Hereditas* **34**, 371-386.
- Ingversen J, Kjøie B, Doll H.** 1973. Induced seed protein mutant of barley. *Experientia* **29**, 1151-1152.
- Joppa LR, Cantrell RG.** 1990. Chromosomal Location of Genes for Grain Protein Content of Wild Tetraploid Wheat. *Crop Science* **30**, 1059-1064.
- Jørgensen IH.** 1992. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**, 141-152.
- Kharkwal MC.** 2011. A Brief History of Plant Mutagenesis. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, eds. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford: CABI, 21-30.
- Konzak CF.** 1987. Mutations and Mutation Breeding. *Wheat and Wheat Improvement-Agronomy Monograph no. 13. (2nd Edition)*. Madison, USA: ASA-CSSA-SSSA, 428-443.
- Krasileva KV, Vasquez-Gross HA, Howell T, Bailey P, Paraiso F, Clissold L, Simmonds J, Ramirez-Gonzalez RH, Wang X, Borrill P, Fosker C, Ayling S, Phillips AL, Uauy C, Dubcovsky J.** 2017. Uncovering hidden variation in polyploid wheat. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E913-E921.
- Leitao JM.** 2011. Chemical mutagenesis. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, eds. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford: CABI, 135-158.
- Lundqvist U.** 2014. Scandinavian mutation research in barley – a historical review. *Hereditas* **151**, 123-131.

- Lundqvist U, Franckowiak JD, Forster BP.** 2011. Mutation categories. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, eds. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford: CABI, 47-56.
- Mba C.** 2013. Induced Mutations Unleash the Potentials of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. *Agronomy* **3**, 200.
- Mba C, Afza R, Shu QY.** 2011. Mutagenic radiations: X-rays, ionizing particles and ultraviolet. In: Shu QY, Forster BP, Nakagawa H, eds. *Plant mutation breeding and biotechnology*. Wallingford: CABI, 83-90.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S.** 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol* **123**, 439-442.
- Muller HJ.** 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* **66**, 84-87.
- Muller HJ.** 1946. The production of mutations, Nobel Lecture. From: Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962. Amsterdam: Elsevier Publishing Company.
- Sikora P, Chawade A, Larsson M, Olsson J, Olsson O.** 2011. Mutagenesis as a Tool in Plant Genetics, Functional Genomics, and Breeding. *International Journal of Plant Genomics* **2011**, 13.
- Skadhauge B, Lok F, Breddam K, Olsen O, Bech LM, Knudsen S.** 2011. Barley with reduced lipoxygenase activity and beverage prepared therefrom. Google Patents.
- Stadler LJ.** 1928. Genetic Effects of X-Rays in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **14**, 69-75.
- Szarejko I, Szurman-Zubrzycka M, Nawrot M, Marzec M, Gruszka D, Kurowska M, Chmielewska B, Zbieszczak J, Jelonek J, Maluszynski M.** 2017. Creation of a TILLING Population in Barley After Chemical Mutagenesis with Sodium Azide and MNU. In: Jankowicz-Cieslak J, Tai TH, Kumlehn J, Till BJ, eds. *Biotechnologies for Plant Mutation Breeding: Protocols*. Cham: Springer International Publishing, 91-111.
- Zitnak A, Johnston GR.** 1970. Glycoalkaloid content of B5141-6 potatoes. *American Potato Journal* **47**, 256-260.

3. New Breeding Techniques (NBT)

Inger Bæksted Holme, forsker, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet

3.1. Introduktion

Europa-Kommissionen nedsatte på anmodning fra medlemsstaterne i 2007 en arbejdsgruppe [New Techniques Working Group (NTWG)], som skulle vurdere om forskellige nye forædlingsteknikker skulle være omfattet af GMO-lovgivningen. Arbejdsgruppen, som var sammensat af nationalt udpegede eksperter, udarbejdede en liste på syv nye planteforædlingsteknikker. Disse inkluderede : Zinc finger nuclease (ZFN) technology, Oligo-nucleotide directed mutagenesis (ODM), Cisgenesis and Intragenesis, Grafting on GM-rootstock, RNA-dependent DNA methylation, Agro-infiltration 'sensu stricto' og Reverse breeding. I dette kapitel beskrives ZFN-værktøjet som én blandt flere Site Directed Nuclease (SDN)-værktøjer, idet der i dag er udviklet flere nye effektive værktøjer med samme funktion som ZFN, især teknologier baseret på CRISPR/Cas9. Alle NBT-teknikkerne er beskrevet nedenfor, dog er der lagt særlig vægt på SDN-værktøjerne.

3.2. SDN-værktøjer

SDN er enzymer, der kan udformes således, at de kan genkende og binde sig til præcise steder i plantens kromosomer, bestemt af DNA-sekvensen. Her klipper enzymerne DNA-dobbelstrengen over og skaber et dobbeltstrengt brud. Kromosombruddet repareres herefter ved hjælp af plantens egne reparationsenzymer. Ved denne reparation kan der opstå mutationer præcist det sted, som enzymerne er designet til at genkende.

3.2.1. SDN-induktion af dobbeltstrengt kromosombrud på forudbestemte præcise steder i plantens kromosomer

På nuværende tidspunkt er der udviklet fire forskellige enzym-baserede SDN-værktøjer. Disse omfatter Zinc Finger Nukleaser (ZFN), Meganukleaser, Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) og Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR/Cas9). Det først udviklede SDN-redskab var ZFN. ZFN består af proteiner, som kan designes til at binde sig til en specifik DNA-sekvens samt en nuklease, som kan inducere et dobbeltstrengt kromosombrud (Figur 3.1). ZFN blev udviklet i 2003 (Bibikova et al., 2003). Dernæst fulgte meganukleaser. Selvom meganukleaser er naturligt forekommende enzymer, som har været kendt i mange år, og som kan inducere dobbeltstrengt brud i kromosomer, så var det først i 2006, at man fandt ud af, hvordan man kunne ændre dem, således at de kunne designes til at genkende forudbestemte specifikke sekvenser i en organismes kromosomer og derfor inducere et dobbeltstrengt kromosombrud på præcist dette sted (Smith et al., 2006). Det har dog senere vist sig vanskeligt at opnå en høj aktivitet af designede meganukleaser, og anvendelsen af meganukleaser er derfor på nuværende tidspunkt ikke særligt udbredt. Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) blev udviklet i 2011 (Bogdanove and Voytas, 2011). Det DNA-bindende protein i TALENs er designet ud fra proteiner, der produceres af plantepatogenet *Xanthomonas* og overføres til planteceller ved infektion. I plantecellen binder proteinerne sig til specifikke DNA-sekvenser af gener, som er meget vigtige for *Xanthomonas*-infektionen. Herved aktiveres generne, og dette gør planterne modtagelige over for *Xanthomonas*-angrebet. Man arbejdede i flere år hårdt på at identificere den mekanisme, som gjorde det muligt for disse proteiner at binde sig til specifikke DNA-sekvenser i planter. Da man fik løst gåden, blev man meget hurtigt klar over, at disse proteiner kunne designes til at binde sig til specifikke DNA-sekvenser i et plantegenom og fusioneres med en nuklease og dermed på lignende måde som ZFN anvendes til at inducere et dobbeltstrengt brud på det udvalgte sted (Figur 3.1). CRISPR/Cas9-systemet, som blev udviklet i 2012, er det nyeste system, der er udviklet til at inducere dobbeltstrengt DNA-brud (Jinek et

al., 2012). CRISPR/Cas9-systemet blev først opdaget som en forsvarsmekanisme i bakterier imod virusangreb. Siden da er man blevet meget klogere på mekanismen, således at det nu kan designes til specifikke sekvenser i en organismes genom og inducere et dobbeltstrengt brud. I dette system er det ikke et protein, men et RNA, der skal designes til at binde sig til specifikke DNA-sekvenser. Dette værktøj er nemmere, hurtigere og billigere at designe til specifikke sekvenser end de andre værktøjer, og derfor er **CRISPR/Cas9** hurtigt blevet det mest foretrukne værktøj. Dette værktøj er derfor mere detaljeret beskrevet i afsnit 3.2.2. De andre tre redskaber er kort beskrevet i figur 3.1.



Zinc Finger Nucleases (ZFN) binder DNA gennem en række af zinkfingerproteiner, som kan designes til at genkende specifikke DNA-sekvenser. Hvert zinkfingerprotein designes til at genkende 3 nukleotider, og man sammensætter typisk 3 zinkfingerproteiner, således at de tilsammen kan genkende og binde sig til en sekvens bestående af 9 nukleotider (vist i gråt). Rækken af zinkfingerproteinerne er fusioneret til et nukleaseenzym kaldet FokI (vist i rødt). FokI er en monomer, som kun kan overklippe DNA dobbeltstrengen, når to FokI monomerer danner en dimer. Man designer derfor to rækker af zinkfingerproteiner, som kan binde på hver side af det sted i genomet, hvor man ønsker et dobbeltstrengt brud. Afstanden mellem de to ZFN-rækker er som regel 5-7 nukleotider. Når begge rækker af zinkfingerproteiner binder til deres mål bringes de to FokI-monomerer i kontakt med hinanden (vist i rødt) og danner en dimer. Dimeren overklipper efterfølgende DNA dobbeltstrengen mellem de to ZFN-rækker.



Meganukleaser er enzymer, der kan designes til at genkende og binde sig til lange DNA-sekvenser (fra 12 til 40 bp). Her overklipper de DNA-dobbeltstrengen. Meganuclease domænet, som også bestemmer den DNA-sekvens, hvortil enzymet er designet til at binde DNA'et, er vist i rødt. Overklippingen af DNA dobbeltstrengen sker på et specifikt sted i dette område.

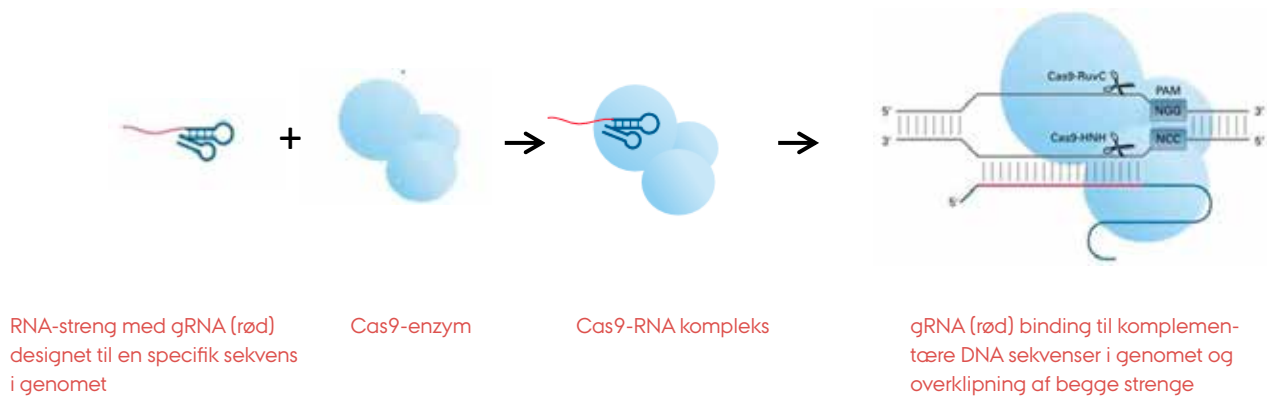


Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) består ligesom ZFN af to DNA-bindende proteiner fusioneret til en FokI nuklease monomer. Hvert TALEN protein designes til at binde sig til omkring 20 nukleotider på hver side af det sted, hvor et dobbeltstrengt brud ønskes (vist i gråt). Afstanden mellem de to TALEN proteiner er som regel 15 til 20 nukleotider og FokI dimeren (vist i rødt) overklipper det dobbeltstrengede DNA inden for disse 15-20 nukleotider.

Figur 3.1. Kort beskrivelse af de tre først udviklede SDN-værktøjer: ZFN, Meganucleaser og TALENs. Billede er fra Voytas (2013).

3.2.2. Detaljeret beskrivelse af CRISPR/Cas9 værktøjet og Cas9-varianter

CRISPR/Cas9-værktøjet består af en RNA-streng og et enzym kaldet Cas9 (Figur 3.2). De første 20 nukleotider af RNA-strengen kaldes guide RNA (gRNA). Disse 20 nukleotider kan laves komplementære til en tilsvarende 20 nukleotid DNA-sekvens i en celleds genom. Når RNA-strengen og Cas9-enzymet overføres til en celle vil de danne et kompleks og sammen vil de finde de komplementære 20 nukleotider i cellens genom og binde sig til disse DNA-sekvenser. Her vil Cas9 klippe DNA-dobbeltstrengen over (Figur 3.2). Cas9-enzymet besidder to nukleasedomæner (Cas9-RuvC og Cas9-HNH), som klipper hver sin DNA-streng (Figur 3.2). En forudsætning for at Cas9-enzymet vil klippe er dog, at der i cellens DNA findes en såkaldt PAM-sekvens lige foran den komplementære DNA-sekvens. Her binder Cas9-enzymet sig og overlapper DNA-dobbeltstrengen mellem det tredje og fjerde nukleotid, der følger efter PAM-sekvensen. Det Cas9-enzym, som for tiden er mest anvendt i planter, er SpCas9-enzymet, som stammer fra bakterien *Streptococcus pyogenes*. SpCas9-enzymet kræver en PAM-sekvens (NGG), som består af to guaniner (G) efterfulgt af et hvilken som helst af de fire nukleotider (G, C, A, T) (Figur 3.2).

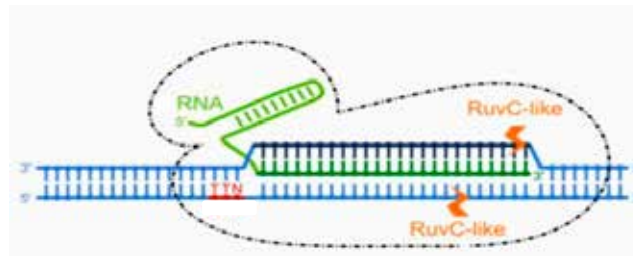


Figur 3.2. CRISPR/Cas9-værktøjet. RNA-strengen og Cas9-enzymet danner et kompleks i cellen, og de 20 nukleotider i gRNA'et guider komplekset til de komplementære 20 nukleotider i genomet, hvortil komplekset binder sig. Cas9-enzymet vil her klippe DNA-dobbeltstrengen, hvis der findes en såkaldt PAM-sekvens (NGG) lige foran den komplementære sekvens. Cas9-enzymet besidder to nuklease-domæner (Cas9-RuvC og Cas9-HNH), som klipper hver sin DNA-streng. Billedet er anvendt med tilladelse fra ATUM.

Selvom NGG sekvensen findes i rigt mål i plantegenomer, så giver kravet om en bestemt PAM-sekvens nogle restriktioner på, hvor i genomet man kan inducere et dobbeltstrengt kromosombrud. Man har derfor identificeret andre Cas9-enzym, som kræver andre PAM-sekvenser, og som kan anvendes i tilfælde af, at der ikke findes en SpCas9 PAM-sekvens i nærheden af det sted, hvor man ønsker at inducere et dobbeltstrengt kromosombrud. Nogle af disse Cas9-enzym er SpCas9-mutanter, som er identificeret i bakteriekulturer af *S. pyogenes* (Kleinstiver *et al.*, 2015a). Derudover har man også identificeret Cas9-enzym, som kræver andre PAM-sekvenser fra andre bakterier så som *Staphylococcus aureus* (Ran *et al.*, 2015), *Staphylococcus thermophilus* (Kleinstiver *et al.*, 2015b), *Campylobacter jejuni* (Kim *et al.*, 2017) og *Neisseria meningitidis* (Amrani *et al.*, 2017). Eksempler på PAM-sekvenser fra Cas9-varianter er NGAN, NGNG, NGAG og NGCG. Mange af disse Cas9-varianter er endnu ikke afprøvet i planter. Dog har *S. aureus* Cas9 (Kaya *et al.*, 2016; Steinert *et al.*, 2015) og *S. thermophilus* Cas9 (Steinert *et al.*, 2015) været anvendt i planter og vist samme mutationsfrekvenser, som dem der opnås med *S. pyogenes* Cas9.

3.2.3. CRISPR-Cpf1 systemet

CRISPR-Cpf1 systemet er en nyere variant af CRISPR/Cas9-systemet (Zetsche *et al.*, 2015, 2017). Systemet er indtil nu blevet fundet i bakterier fra *Francisella novicida*, *Acidaminococcus sp.* og *Lachnospiraceae bacterium*. Systemet er noget forskellig fra CRISPR/Cas9. Først og fremmest er PAM-sekvensen for Cpf1 TTN. Desuden er gRNA-genkendelsessekvensen 23-25 nukleotider i modsætning til 20 nukleotider for CRISPR/Cas9. Cpf1-enzymet besidder kun RuvC nukleatedomænet og mangler altså HNH nukleatedomænet tilstede i Cas9 nukleasen. RuvC nukleatedomænet klipper derfor begge DNA-strengene. Overklipninger sker dog i modsætning til CRISPR/Cas9-systemet først 23 og 18 nukleotider efter PAM-sekvensen (Figur 3.3).



Figur 3.3. CRISPR-Cpf1-systemet. PAM-sekvensen TTN i plantens DNA er vist i rødt. CRISPR/Cpf1-systemet binder DNA ved nukleotid paring mellem DNA-sekvenser i planten og RNAet. Cpf1 nukleasen har et nukleatedomæne (vist med røde pilespidser), som overklipper begge DNA strengene. Overklipninger sker i modsætning til CRISPR/Cas9-systemet først 23 og 18 nukleotider efter PAM-sekvensen. Billede er fra Murovec *et al.*, 2017.

Systemet, som er udviklet til humane celler, har vist sig også at være anvendeligt i planter dog med mindre mutationsfrekvenser end CRISPR/Cas9 systemet (Endo *et al.*, 2016; Tang *et al.*, 2017; Hu *et al.*, 2017). En stor fordel ved dette system er, at der fremkommer langt færre *off-target* mutationer ved anvendelsen CRISPR-Cpf1 end ved anvendelsen af CRISPR/Cas9 (se afsnit 3.11).

3.2.4. Multiplexing

En stor fordel ved både CRISPR/Cas9 og CRISPR-Cpf1-værktøjerne er, at man kan introducere flere forskellige gRNA'er samtidig og derfor på én gang inducere dobbeltstrengt brud i forskellige DNA-sekvenser i plantens genom. Disse gRNA'er kan designes til at binde sig til forskellige DNA-sekvenser, som for eksempel er tæt kobbede som vist i Figur 3.4 eller beliggende på forskellige kromosomer.



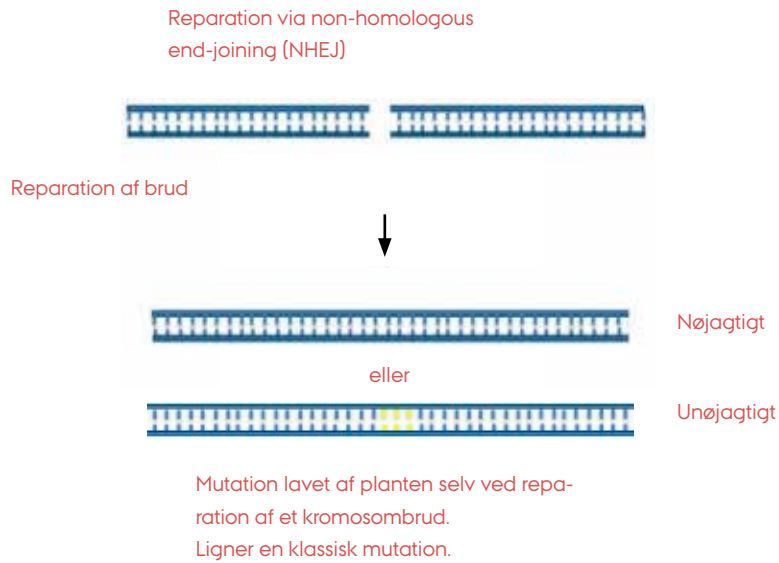
Figur 3.4. Multiplexing. CRISPR/Cas9-værktøj med tre forskellige gRNA (rød, orange og gul) designet til specifikt at binde sig og ved hjælp af Cas9-nukleasen (blå) at inducere dobbeltstrengt brud i tre forskellige DNA-sekvenser i plantens genom. Billede er fra Schaeffer og Nakata (2015).

3.2.5. Beskrivelse af de forskellige former for mutationer, der kan opnås ved reparation af et dobbeltstrengt DNA-brud

Ved den risikovurdering som Den Europæiske Fødevarerikkerhedsautoritet (EFSA) foretog af SDN-værktøjerne i 2012 (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), 2012b), benævnte EFSA de mutationer, der kan opnås ved reparation af et dobbeltstrengt DNA-brud som SDN1, SDN2 og SDN3 (se afsnit 3.10). Disse refererede til mutationer opnået ved henholdsvis Non-homologous End-Joining, Homolog rekombination samt værktøjernes potentielle anvendelse til at indsætte længere DNA-fragmenter for eksempel hele gener på præcise steder i plantegenomet. Forkortelserne er i det følgende inkluderet i beskrivelserne af de mutationer, der kan opnås ved reparation af dobbeltstrengede kromosombrud.

3.2.5.1. Non-homologous End-Joining (SDN1)

Som tidligere nævnt kan der opstå mutationer, når et kromosombrud bliver repareret igen. Dette sker ved hjælp af organismens egne reparationsenzymmer. Ved normale celledelinger opstår der ofte brud på kromosomerne, og celler besidder derfor enzymer, som kan reparere disse brud. Den mest almindelige reparation sker via en mekanisme, som kaldes NHEJ (non-homologous end-joining), hvor DNA-strengene splejses sammen igen. Dette sker ofte unøjagtigt, så der tabes eller indsættes ekstra nukleotider i kromosombruddet (Figur 3.5).



Figur 3.5. Reparation af dobbeltstrengt kromosombrud via non-homologous end-joining. Sammensplejsningen mellem DNA-strengene kan ske enten nøjagtigt eller unøjagtigt. Når sammensplejsningen er unøjagtig, så opstår der mutationer ved tab eller indsættelse af ekstra nukleotider i kromosombruddet (SDN1).

Hvis gRNA'et er designet til at binde sig til en sekvens i et gen, så kan mutationen for eksempel forårsage inaktivering af genet ved at ødelægge læserammen for aminosyre-rækkefølgen. Det er netop denne form for mutation, som også kaldes præcis mutagenese og som danner grundlaget for præcisionsforædling.

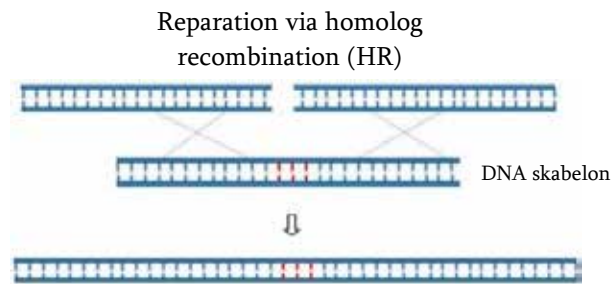
Hvor mange nukleotider, der tabes eller indsættes ved NHEJ-reparationen, er mere eller mindre tilfældigt. De ekstra nukleotider, der nogle gange indsættes, stammer dog fra planten selv og altså ikke fra andre organismer. De indsatte nukleotider kaldes også for 'filler DNA', og 'filler DNA' ses også ofte efter reparation af spontane kromosombrud og fremkalder derved naturlige mutationer. 'Filler DNA' stammer fra plantens eget DNA og ofte fra mitokondrier eller kloroplast DNA (Gorbunova og Levy, 1997). Et eksempel på NHEJ-mutationer induceret med den samme gRNA i 15 forskellige bygplanter er vist i Figur 3.6.

WT	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCTCATGCATGGCTCATGTTCTACA	WT
a	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCTCATTGCATGGCTCATGTTCTACA	+1 filler
b	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCTCA-GCATGGCTCATGTTCTACA	-1
c	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCTC-TGCATGGCTCATGTTCTACA	-1
d	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCT----CATGGCTCATGTTCTACA	-4
e	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCTCA-----GGCTCATGTTCTACA	-5
f	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCT-----GCATGGCTCATGTTCTACA	-9
g	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACG-----GCTCATGTTCTACA	-11
h	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCTC-----ATGTTCTACA	-11
i	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACGTCT-----TCTACA	-16
j	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGAC-----A	-31
k	-----	-503
l	CAGCTGCGCTAGCCAAAGTTTGGACGCCTACAAGGCACCAAA-GCTCATGTTCTACA	-12,+11 filler
m	CAGCTGCGCTAGCCAAAGCGCTAGCCTCGT-----ATGGCTCATGTTCTACA	-22,+13 filler
n	AGCCAAAGTTTGGACGCCTAACGTGTTGAAAAAAAAAACC CGGCTCATGTTCTACA	-24,+24 filler

Figur 3.6. Eksempel på NHEJ-mutationer induceret i forskellige bygplanter med den samme gRNA (a-n). Til højre er vist antallet af nukleotider, der er ændret ved mutationen (-: deletioner; +: filler DNA indsat). WT: Den ikke-muterede sekvens, hvor de 20 nukleotider fra gRNA er fremhævet med fed og understreget. PAM-sekvensen TGG er i kursiv. a: indsættelse af en ekstra nukleotid mellem det tredje og fjerde nukleotid efter PAM-sekvensen. b-j: deletioner af forskellig længde. k: stor deletion på 503 nukleotider. l-m: deletioner med filler-sekvenser.

3.2.5.2. Homolog rekombination (SDN2)

Kromosombrud kan også repareres ved homolog rekombination. Denne reparation kræver tilstedeværelsen af en DNA-streng med komplementære DNA-sekvenser, som kan anvendes som skabelon for reparationen. Ved homolog rekombination kan små specifikke ændringer i DNA-sekvenser induceres ved at designe en DNA-streng med komplementære sekvenser på hver side af kromosombruddet, men med små specifikke ændringer nær kromosombruddet (Figur 3.7). Når denne DNA-streng overføres til cellen sammen med SDN-værktøjet, vil de specifikke ændringer blive inkorporeret i kromosomet under reparationen af kromosombruddet, og herved kan der specifikt ændres nogle få nukleotider til de nukleotider, man ønsker i stedet (SDN2). Da tre sammenhængende nukleotider i et gen koder for en aminosyre, kan man ved at udskifte bare et enkelt nukleotid ændre den genetiske kode for en aminosyre til koden for en anden aminosyre. Udskiftning af en enkel aminosyre eksempelvis i et enzym kan ofte ændre enzymets aktivitet eller specificitet. Hvis man i forvejen har kendskab til hvilken aminosyre, der skal udskiftes for at opnå en forbedring, kan man derfor anvende SDN2 til at inducere den tilsvarende specifikke nukleotid-ændring

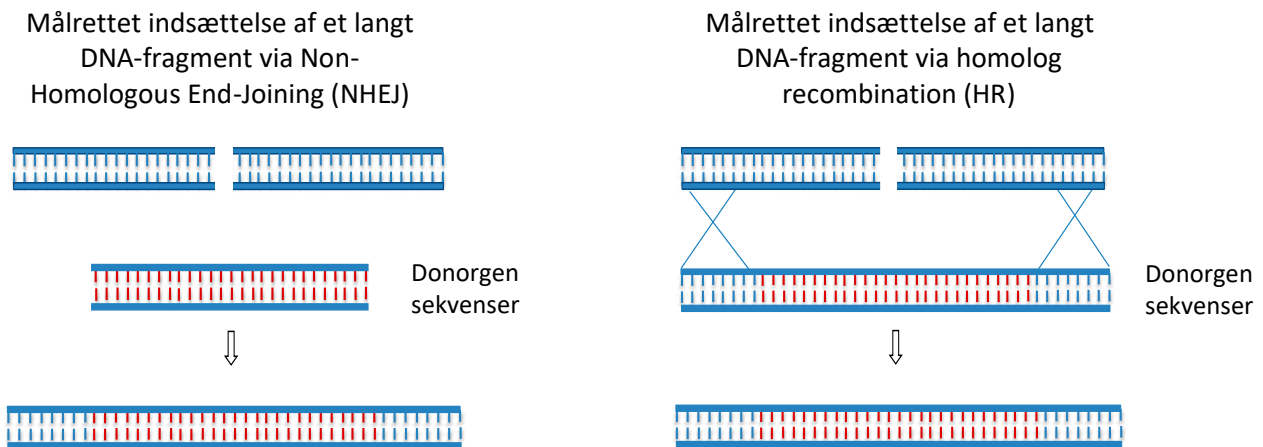


Specifik ændring i en DNA-sekvens.
Cellen hjælpes til at reparere DNA-
dobbeltstrengen på en bestemt måde.

Figur 3.7. Homolog rekombinationsmutationer (SDN2) induceret i cellen ved reparation af dobbeltstrengsbruddet. Ved denne reparation kan man specifikt ændre nogle få nukleotider til de nukleotider, man ønsker i stedet. Dette kræver dog tilstedeværelsen af en DNA-streng, som kan anvendes som skabelon for reparationen.

3.2.5.3. Værktøjernes potentielle anvendelse til indsættelse af længere DNA fragmenter på forudbestemte steder i plantegenomet (SDN3)

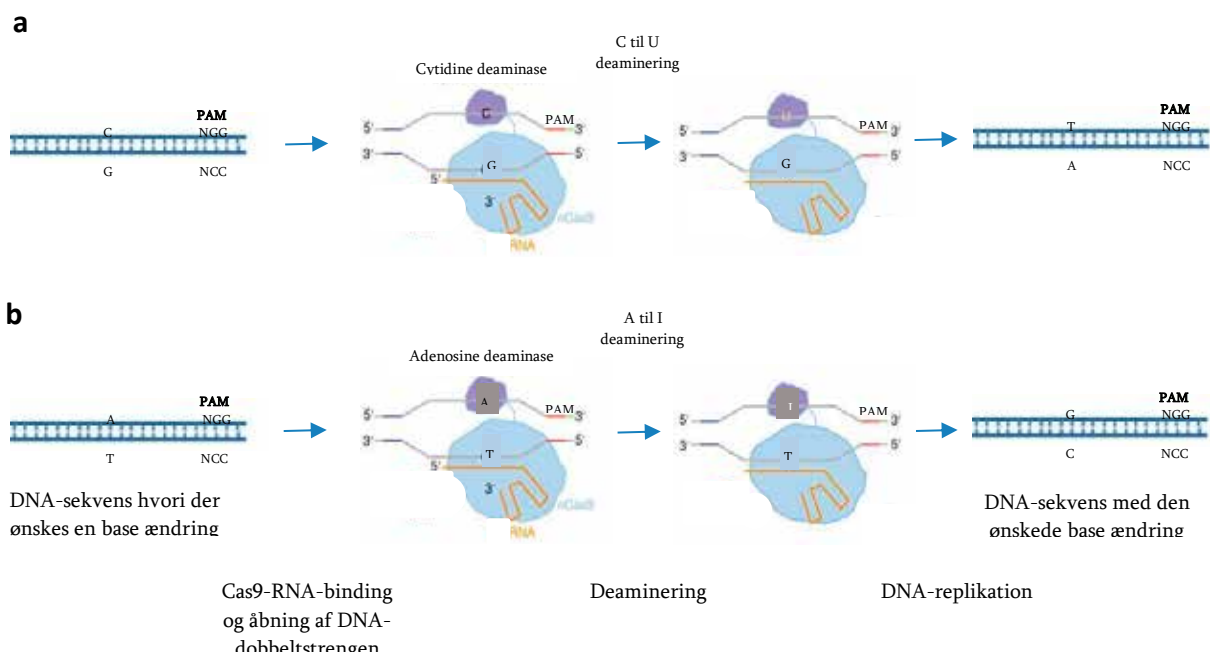
Induktionen af et dobbeltstrengt brud på et bestemt sted muliggør målrettet integration af lange DNA-sekvenser. DNA-fragmenterne kan for eksempel være hele gener. Overførsel af SDN-værktøjet sammen med overførsel af donor DNA til celler gør det muligt at indsætte hele gener på et bestemt sted i plantegenomet (SDN3). Herved undgås, at donorgenet indsættes tilfældigt i plantegenomet for eksempel direkte i et plante-gen, som herved inaktiveres og derved forårsager utilsigtede virkninger. Målrettet integration af donorgenet kan medieres af HR eller ved NHEJ afhængigt af tilstedeværelsen af komplementære DNA-sekvenser mellem donorgen og plantens DNA på det forudbestemte indsættelsessted (Figur 3.8). Sådant fremkomne planter, som indeholder fremmede gener, vil dog ved udsættelse i åbne miljøer med den nuværende lovgivning skulle godkendes via EU-lovgivning om genetisk modificerede organismer og være omfattet af direktiv 2001/18/EC.



Figur 3.8. Målrettet indsættelse af lange DNA-fragmenter (hele gener) via NHEJ eller HR (SDN3). Overførsel af SDN-værktøjet sammen med overførsel af et donorgen til celler muliggør indsættelse af hele gener på et forudbestemt sted i plantegenomet. Som vist kan integrationen af donorgenet medieres af NHEJ eller ved HR afhængigt af tilstedeværelsen af komplementære DNA-sekvenser mellem donorgen og plantens DNA på indsættelsesstedet.

3.2.6. Base-editering

Som nævnt under SDN2, så kan udskiftning af bare et enkelt nukleotid i et gen have stor betydning for et enzyms aktivitet eller specificitet. Opnåelse af en sådan ændring ved SDN2 metoden er imidlertid vanskelig, da leveringen af SDN-værktøjet til cellen skal koordineres med leveringen af DNA-skabelonen. Der er derfor inden for det sidste halvandet år blevet udviklet en alternativ metode, hvorved man kan ændre et bestemt nukleotid i en DNA-sekvens til et andet nukleotid uden brug af en DNA-skabelon. Metoden er baseret på CRISPR/Cas9-værktøjet og går i korthed ud på anvendelsen af et muteret Cas9 protein, som er fusioneret til et deaminerings-enzym samt en gRNA designet til det sted i genomet, hvor man ønsker en udskiftning (Figur 3.9). Når Cas9-RNA-komplekset binder sig de komplementære sekvenser i cellens DNA, så kan deaminerings-enzymet fjerne en aminogruppe fra et nukleotid i den komplementære DNA-sekvens, som ved den efterfølgende DNA-replikation vil ændres til et andet nukleotid. Der er foreløbigt udviklet to Cas9-fusionerede deaminerings-systemer. Det ene kan ændre cytosin (C) til thymin (T) og det andet adenin (A) til guanin (G) (Figur 3.9). Metoden blev i første omgang udviklet til humane celler, men har på nuværende tidspunkt vist sig også at virke effektivt i vigtige afgrødeplanter som tomat, raps, majs, ris og hvede (Shan og Voytas, 2018). Indtil videre må man dog stadig gøre brug af SDN2-metoden, hvis man vil ændre for eksempel en guanin til en cytosin eller en thymin til en adenine.



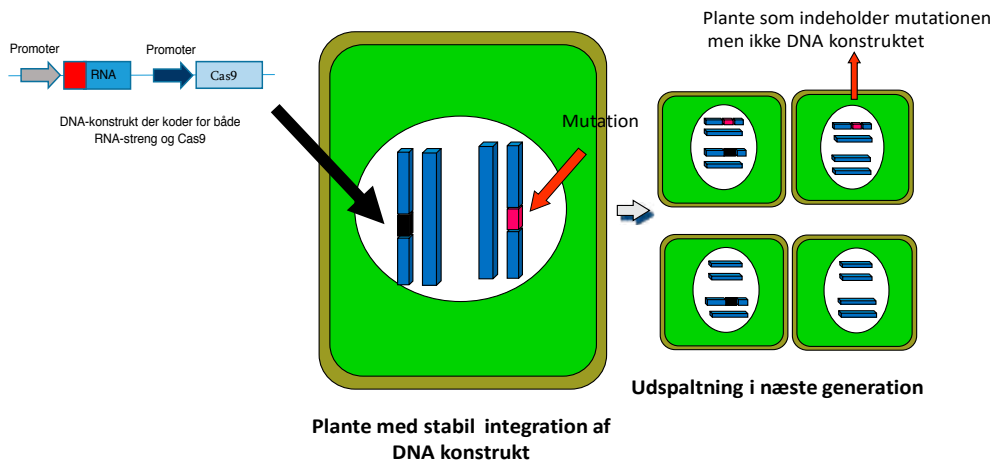
Figur 3.9. Base-editing. Øverst (a) udskiftning af C-G til T-A. Nederst (b) udskiftning af A-T til G-C. Systemerne er baseret på CRISPR/Cas9-værktøjet. Ved begge systemer anvendes en gRNA designet til det sted i genomet, hvor man ønsker en nukleotidændring. Cas9-enzymet er muteret i et af de to nukleasedomæner (nCas9), så det ikke kan lave et DNA-dobbeltstrengt brud, men kan åbne DNA-dobbeltstrengen, således at deaminaserne, der er fusioneret til nCas9 (som kun kan virke på enkeltstrengt DNA) kan fjerne en aminogruppe på de nukleotider, de er målrettet mod at ændre. Cytidine deaminase kan ændre cytosin til uracil (U), som ved den efterfølgende DNA-replikation vil blive erstattet med thymin (a). Adenosine deaminase kan ændre adenin til inosin (I), som ved den efterfølgende DNA-replikation vil blive erstattet med guanin (b). Billeder er tilpasset med tilladelse fra Nature/Springer/Palgrave, Nature Plants, Shan og Voytas, 2018.

3.3. Overførsel af værktøjerne til enkeltceller med efterfølgende regenerering af planter fra enkeltceller

Plantevævskultur anvendes til steril dyrkning af plantevæv og organer. Dette kan være afskårne blad- eller stængelstykker eller hele organer som embryoer. Plantevævet dyrkes sterilt på næringssubstrater, der foruden næringselementerne også indeholder plantehormoner. Plantehormonerne er i stand til at få vævet til at danne uorganiserede celler. Det helt unikke ved plantevævskulturer er, at man ofte er i stand til at regenerere nye planter ud fra disse uorganiserede celler også kaldet kallus (George, 1993). Vævskulturteknikken kan derfor benyttes i forbindelse med overførsel af SDN-værktøjerne til planter, idet man kan levere værktøjerne til de uorganiserede enkeltceller og derefter regenerere planter, som besidder mutationerne ud fra enkeltcellerne. Værktøjet leveres oftest til celler som DNA-konstrukter, der koder for værktøjet. I modsætning til mammale celler besidder planteceller en cellevæg. De metoder, der anvendes til overførsel af værktøjerne til mammale celler, kan derfor ikke anvendes direkte til planteceller. De mest almindelige leveringsmetoder af værktøjerne til planteceller er derfor baseret på metoder, som kan overføre værktøjerne til celler med plantevæg. De to mest anvendte metoder er via jordbakterien *Agrobacterium tumefaciens* eller via partikelbombardement, som begge kan overføre værktøjerne til celler med plantevæg. Det er dog også muligt at fjerne cellevæggen fra planteceller ved hjælp af enzymer, som nedbryder cellulosen og pektinen i cellevæggen. Protoplaster kan derefter anvendes til nogle af de overførselsmetoder, som også anvendes til mammale celler. Protoplasterne gendanner efter overførslen cellevæggen, deler sig og danner kallus. Generelt er planteregenerationsfrekvensen ud fra enkeltcellerne i kallus meget afhængig af overførselsmetoden, udgangsmaterialet, plantearten og også genotypen (George, 1993). Det er således for mange plantearters vedkommende kun muligt at regenerere planter i nogle få genotyper med en bestemt overførselsmetode og et bestemt udgangsmateriale. Da dette selvfølgelig er en begrænsning på anvendelsen af værktøjerne, arbejdes der i øjeblikket ihærdigt på at udvikle overførselsmetoder til udgangsmateriale, som er mindre afhængige af genotypen.

3.3.1. Stabil integration af værktøjerne med efterfølgende udspaltning af værktøjerne i næste generation

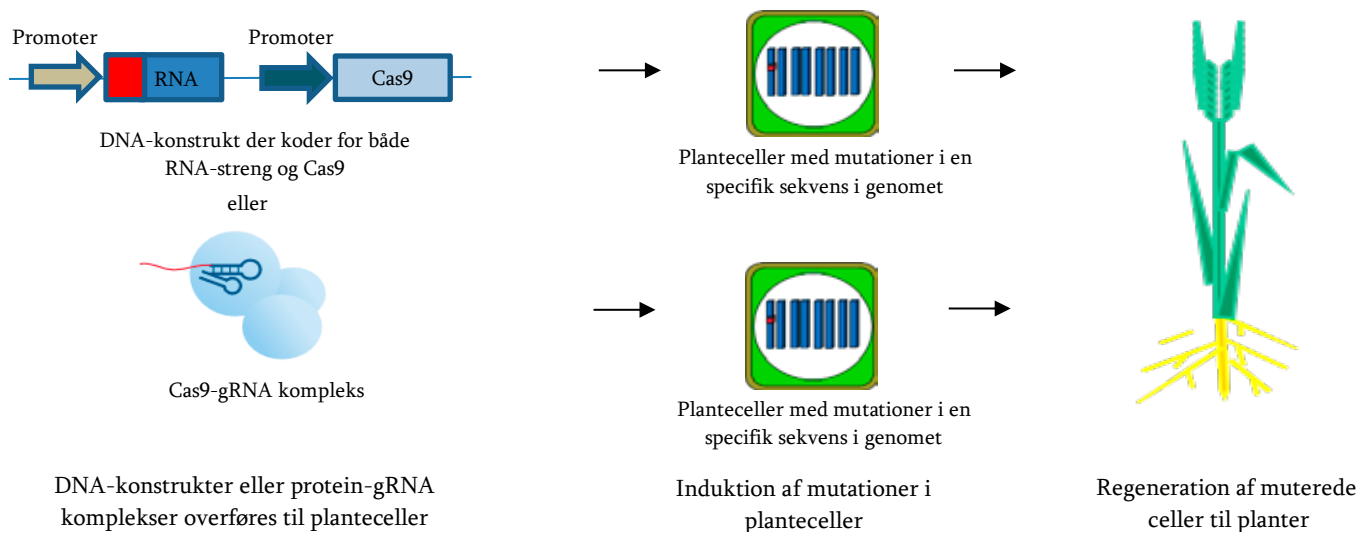
SDN-værktøjerne til at generere de dobbeltstrengede brud kan leveres til plantecellerne som DNA-konstrukter, der koder for værktøjerne. Disse konstrukter kan integreres stabilt i plantegenomet. Fordi der oftest ikke er nogen kobling mellem stedet for indsættelsen af konstrukterne og stedet for den præcise mutation, er det ved stabil integration via udspaltning mellem DNA-konstruktet og mutationen i den efterfølgende generation muligt at selekere planter, som indeholder mutationen, men ikke DNA-konstruktet (Figur 3.10).



Figur 3.10. Simplificeret illustration af stabil integration af et DNA-konstrukt, der koder for SDN-værktøjet med efterfølgende udspaltning af konstruktet i næste generation. Planter er repræsenteret ved enkeltceller. Konstruktet vil i langt de fleste tilfælde integreres i plantens DNA på steder, der ikke har kobling til det specifikke sted, hvortil værktøjet er designet til at inducere det dobbeltstrengede brud. Derfor vil konstruktet og mutationen udspalte uafhængigt af hinanden, og det vil være muligt at finde afkomplanter, der indeholder mutationen, men ikke DNA-konstruktet.

3.3.2. Transient ekspresion af værktøjerne

Det er også muligt at overføre SDN-værktøjerne til planteceller og inducere kromosombrudene uden integration af fremmed DNA i plantegenomet. Værktøjerne kan således overføres til planteceller, som et DNA-konstrukt, der ikke integreres i plantegenomet. For CRISPR/Cas9 er det også muligt at overføre det protein-RNA-kompleks, der bliver dannet i cellen mellem Cas9-enzymet og RNA-strengen, før komplekset binder sig til den komplementære sekvens og inducerer mutationen. Denne form for overførsel udelukker fuldstændigt integrationen af fremmed DNA i planten (Figur 3.11). Fælles for begge metoder er, at værktøjerne overføres transient enten ved partikelbombardement af planteceller eller ved at få protoplaster til at optage dem. I cellerne vil de inducere mutationerne og derefter gå til grunde. Det er derefter en forudsætning, at man kan regenerere planter fra de celler, hvor mutationerne er induceret. Valg af metode til overførsel afhænger af den specifikke plantearts evne til at regenerere planter fra planteceller med en cellevæg eller fra protoplaster.



Figur 3.11. Transient overførsel af SDN-værktøjet til planter. Her vist for CRISPR/Cas9-værktøjet. CRISPR/Cas9-værktøjet kan leveres til planteceller som et DNA-konstrukt, der ikke integreres i plantegenomet, eller som et protein-RNA-kompleks, som fuldstændig udelukker DNA-integration.

3.4. Oligonucleotide directed mutagenese (ODM)

ODM er et andet værktøj til præcis mutagenese i planter. Ved ODM benyttes oligonukleotider (mellem 20 til 100 nukleotider lange) til at inducere en præcis ændring af plantens DNA på et specifikt sted i plantens genom (Breyer et al., 2009). Oligonukleotiderne syntetiseres kemisk og designes således, at de er identiske med den tilsvarende del af plantens genetiske materiale bortset fra en eller nogle få ændrede nukleotider tilsvarende den påtænkte ændring. Når oligonukleotiderne overføres til cellen, binder de sig til den komplementære DNA-sekvens i genomet, og dette genererer forkert parring mellem nukleotiderne tilsvarende de ændrede ikke-komplementære nukleotider (Figur 3.12). Cellens eget DNA reparationssystem genkender disse forkert parrede nukleotider og kopierer ændringen ind i cellens DNA. Som et resultat opnås en ønsket ændring et præcist sted i genomet. Oligonukleotiderne bliver nedbrudt i cellen, mens de inducerede mutationer nedarves stabilt. Oligonukleotider leveres til planteceller transient via partikelbombardement af planteceller eller ved overførsel til protoplaster.



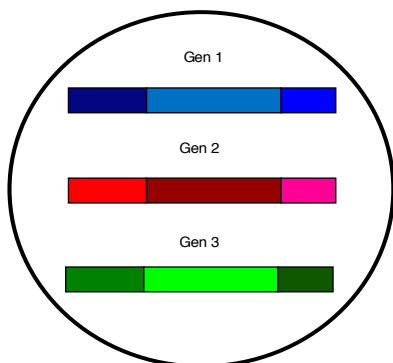
Figur 3.12. Forenklet illustration af ODM. Til venstre: DNA-helix med en komplementær oligonukleotid indeholdende en tilsigtet ændring (mørk blå). Til Højre: Når plantens egen DNA-reparationsmekanisme har kopieret ændringen (lyserød) ind i DNA-strengen, nedbrydes skabelonen. DNA strengene vender tilbage til deres oprindelige form, og DNA-reparationsmekanismen kopierer ændringen ind i den komplementære DNA-streng (ikke vist). Billede er venligst stillet til rådighed af NBTPlatform.org.

3.5. Cisgenese og intragenese

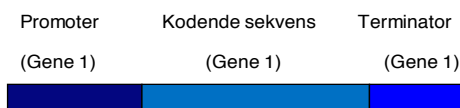
Cisgenese og intragenese er begge GM-koncepter udviklet for afgrøder med kommercielt udbredte heterozygotiske kloner, som opformerer vegetativt, såsom kartoffel, æbler og druer. Direkte overførsel af et specifikt gen fra en beslægtet art har store fordele for netop heterozygotiske kloner, som kun kan vedligeholdes ved kloning for at forblive genetisk intakte. Konventionel overflytning af gener fra en beslægtet plante til en heterozygotisk klon kræver mange tilbagekrydsningsgenerationer og skaber mange nye genotyper, og i de fleste tilfælde er det ikke muligt at genskabe den originale klon. Direkte indsættelse og stabil integration af det ønskede gen i plantens genom med efterfølgende nedarving af genet til næste generationer sikrer, at genotyperne forbliver intakte. Sådant fremkomne planter vil dog ved udsættelse i åbne miljøer skulle godkendes via EU-lovgivning om genetisk modificerede organismer og være omfattet af direktiv 2001/18/EC. Derfor er de to nye koncepter cisgenese (Schouten et al., 2006) og intragenese (Rommens 2004) blevet introduceret. Koncepterne blev introduceret dels for at undgå godkendelse via EU-lovgivningen om genetisk modificerede organismer og dels på grund af, at et af de væsentligste argumenter imod genetisk modifikation af kulturplanter både i Danmark og internationalt kan relateres til, at der overføres genetisk materiale mellem arter, der ikke kan krydse naturligt med hinanden (Bauer og Gaskell, 2002; Lassen et al., 2002). I modsætning til transgenese, som kan anvendes til at overføre gener isoleret fra enhver organisme til en given plante, så er det ifølge de to koncepter cisgenese og intragenese kun tilladt at overføre gener eller DNA-fragmenter, som stammer fra planten selv eller fra beslægtede seksuelt forenelige arter. Seksuelt kompatible arter kan være nært beslægtede dyrkede arter eller beslægtede vilde arter. I tilfælde af cisgenese er hele genet med dets egne regulatoriske elementer (promotorer) indsat. I tilfælde af intragenese kan det indsatte DNA være en ny kombination af regulerende og kodende DNA-fragmenter fra selve arten eller fra en seksuelt kompatibel art (Fig 3.13).

Seksuelt kompatibel genpulje

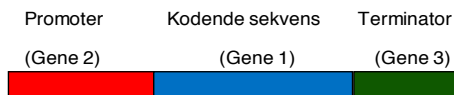
Gener fra planten selv eller fra nært beslægtede arter



Cisgent DNA konstrukt



Intragenet DNA konstrukt

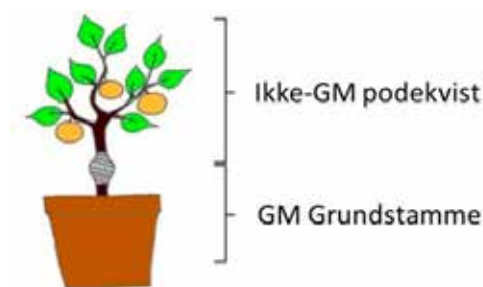


Figur 3.13. Illustration af cisgene og intragene konstrukter, som de er defineret af henholdsvis Schouten et al. (2006) og af Rommens (2004). Cisgenet er en identisk kopi af et gen isoleret fra den seksuelt kompatible genpulje og indbefatter promotoren, den kodende sekvens og terminatoren af genet. Intragenese tillader in vitro rekombination af elementer isoleret fra forskellige gener inden for den seksuelt kompatible genpulje. For eksempel kan promotoren stamme fra ét gen og den kodende sekvens fra et andet gen og terminatoren fra et tredje gen.

Cisgene og intragene planter produceres ved samme genoverførselsmetoder, som anvendes ved transgenese. I princippet vil planter svarende til cisgene planter ofte kunne opnås ved konventionel forædling. Intragene planter er derimod forskellige fra planter, der kan opnås ved konventionel forædling. Intragenese-konceptet tilbyder dog betydeligt flere muligheder for at ændre udtrykningsniveauet af det indsatte gen end cisgenese, fordi intragenese tillader kombinationer af gener med forskellige promotorer og regulatoriske elementer. For begge koncepter gælder dog, at integrationen af intra/cisgenerne sker på tilfældige steder i plantegenomet, således at de for eksempel kan indsættes direkte i et af plantens gener, inaktivere det og derved kunne forårsage utilsigtede virkninger. Den tilfældige integration kunne undgås ved at overføre cisgenet eller intragenet til plantecellen sammen med et SDN-konstrukt designet til lave et dobbeltstrenget brud på et ønsket sted i genomet og således sikre integrationen af generne på præcist dette sted via SDN3 (se afsnit 3.2.5.3).

3.6. Podning på GM-grundstamme

Podning består i en overflytning af en kvist eller en knop fra en plante til en stamme med rod fra en anden plante. Man tilstræber derefter en sammenvoksning samt en etablering af normal strøm af næringsstoffer mellem grundstammen og podekvisten, således at podekvisten kan vokse og udvikle sig. Metoden anvendes ofte i frugttræer, grønsager og pryddplanter for at kombinere kvaliteten af det høstede produkt fra podekvisten med gode egenskaber fra grundstammen. Ved podning af en ikke-GM podekvist på en GM-grundstamme kan man udnytte GM-stammens nyttige egenskaber og derved forøge udbyttet (van der Salm et al., 1998). Den genetiske modifikation i grundstammen kan for eksempel have forbedret rodkapacitet og/eller resistens over for jordbårne sygdomme og skadedyr. Da alle skud på GM-grundstammen fjernes, vil alle stængler, blade blomster, frø og frugter stamme fra ikke-GM podekviste og derfor ikke bære den genetiske modifikation (Figur 3.14).

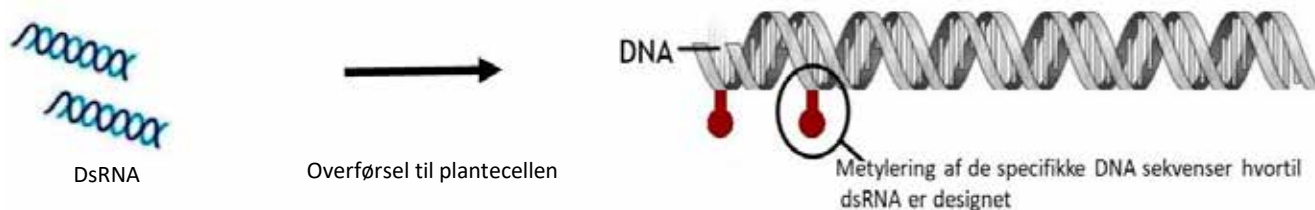


Figur 3.14. Illustration af en ikke-GM podekvist podet på en GM grundstamme. Billede er venligst stillet til rådighed af NBTPplatform.org.

3.7. RNA-afhængig DNA-metylering

Udtrykkelsen af et specifikt gen kan ændres, hvis det DNA, der koder for genet, bliver metyleret. Ved anvendelse af RNA-afhængig DNA-metylering er man i stand til at metylere specifikke DNA-sekvenser i en plantes genom. Man kan for eksempel metylere specifikke sekvenser i et gens promoter, som bevirker at genet ikke længere kan udtrykkes, men inaktiveres (Chinnusamy et al., 2009). Metyleringen nedarves gennem flere generationer, og RNA-afhængig DNA-metylering tillader derfor planteforældre at producere planter, der ikke indeholder fremmede DNA-sekvenser, og hvor der ikke foretages ændringer i DNA-sekvensen, men hvor gen-udtrykkelsen er ændret ved metylering. Metoden går kort ud på at korte dobbeltstrengede RNA-molekyler (dsRNA) med homologi til et specifikt sted i plantegenomet introduceres til planten. Dette får planten til at metylere DNA'et på det specifikke sted, hvortil dsRNA-molekylerne er designet (Figur 3.15). Ved denne modifikation forbliver plantens DNA-sekvens uændret, men kromatinstrukturen (et kompleks af DNA-sekvenser og proteiner) ændres, hvilket resulterer i nedsat aktivitet eller inaktivering af et specifikt gen.

Genkonstruktet, der fører til fremstillingen af dsRNA, kan overføres enten transient eller stabilt til planten. Ved stabil overførsel fjernes genkonstruktet ved udspalning efter selvbestøvning eller krydsning med planter, der ikke besidder genkonstruktet. Som følge heraf er den endelige plante, som udsættes i åbne miljøer ikke genetisk modificeret, da planten ikke indeholder fremmed DNA genetisk materiale, og der er ingen ændring af plantens DNA-sekvens i forhold til udgangsmaterialet. Den eneste forskel er den specifikke metylering af en bestemt DNA-sekvens, der resulterer i den ønskede egenskab.



Figur 3.15. Simplificeret illustration af RNA-afhængig DNA-metylering. Dobbeltstrengede RNA (dsRNA) molekyler introduceres til plantecellen og genkendes af plantens naturlige forsvarsmekanisme. DsRNA aktiverer DNA-metyleringsvejen i planten, hvilket bevirker DNA-metylering af DNA-sekvenser, som er komplementære til dsRNA'et. Billede er tilpasset og venligst stillet til rådighed af NBTPplatform.org.

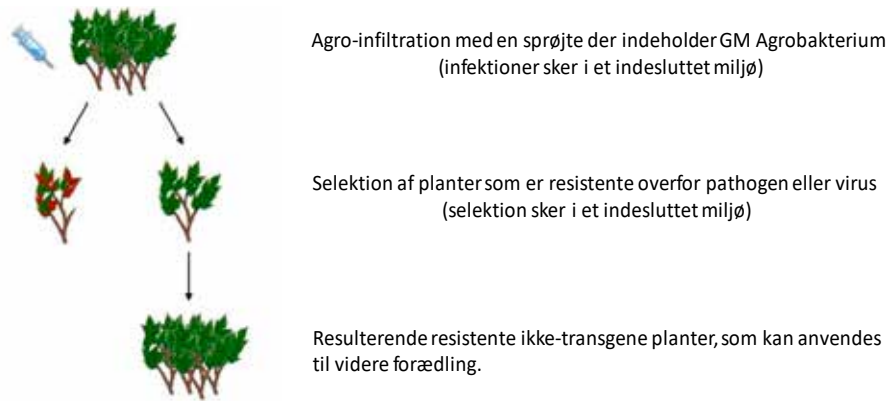
3.8. Agro-infiltration 'sensu stricto'

Nogle plantesygdomme kan ikke overføres til værtsplanter ved hjælp af mekanisk inokulation, men kræver et insekt til overførslen. Dette er et stort problem i resistensforædlingen, og man har derfor udviklet Agro-infiltration-metoden 'sensu stricto' for at overkomme dette problem (Vaghchhipawala et al., 2011). Ved denne metode infiltreres en del af planten (for det meste blade) med en flydende suspension af *Agrobacterium*, der indeholder specifikke sygdoms DNA-sekvenser for eksempel DNA-sekvenser fra virus. *Agrobacterium* kan så overføre de sygdomsfremkaldende DNA-sekvenser til bladvævets celler og på den måde efterligne en virusinfektion fremkaldt ved insektoverførsel (Figur 3.16).



Figur 3.16. Agro-infiltration af tomatplanter med *Agrobacterium* indeholdende DNA-sekvenser fra tomato yellow leaf curl virus, som normalt overføres af mellus. Til venstre: inficeret blad fra modtagelig plante. Til højre: inficeret plante fra resistent plante. Billede er venligst stillet til rådighed af NBPlatform.org.

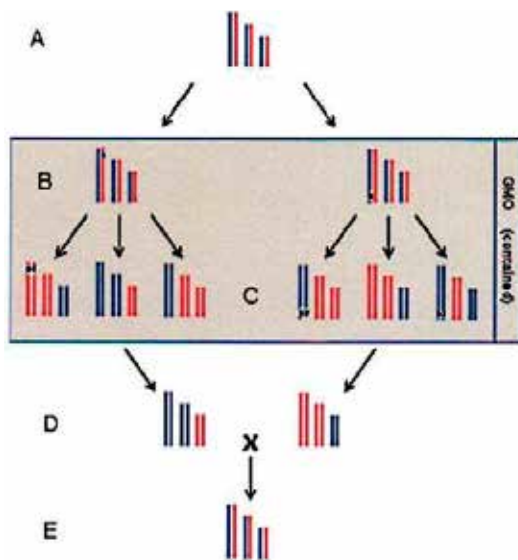
Agro-infiltrationen foregår udelukkende i indesluttede miljøer (Figur 3.17). Bladvævet evalueres efterfølgende for resistens mod sygdommen og resistente planter udvælges og kan anvendes direkte som forældre i forædlingsprogrammer. Den testede plante vil ikke kunne overføre transgenerne til den næste generation, da transgenerne kun er tilstede i de infiltrerede blades celler. Man kan dog ikke udelukke, at *Agrobacterium* flytter sig fra bladet til andre dele af planten og derfor skal fravær af transgener undersøges i planter, som anvendes direkte i forædlingsprogrammer. Alternativt kan andre planter, som er genetisk identiske med den resistente plante, anvendes som forældreplanter i et forædlingsprogram.



Figur 3.17. Forenklet illustration af Agro-infiltration 'sensu stricto'. Billede er venligst stillet til rådighed af NBTPPlatform.org.

3.9. Reverse Breeding

Når en heterozygotisk plante med specielt gode egenskaber identificeres for eksempel under et forædlingsforløb, kan den ikke genfindes efter frøformering, da alle afkomsplanter vil være genetisk forskellige fra den oprindelige heterozygotiske plante. Dette skyldes den naturlige genetiske rekombination, som foregår under meiosen. Reverse breeding er en ny teknik, hvormed man kan gendanne den heterozygotiske plante ved at fremstille homozygotiske forældrelinjer, der ved sammenkrydsning vil give ophav til en eksakt genetisk sammensat kopi af den oprindelige heterozygotiske plante (Dirks et al., 2009). Metoden går ud på, at man ved hjælp af genetisk transformation af den oprindelige heterozygotiske plante inaktiverer de gener, som er ansvarlige for rekombination under meiosen (Figur 3.18). De hanlige kønsceller (pollen), der efterfølgende dannes på de transgene planter har således ikke undergået meiotisk rekombination. Disse pollenkorner anvendes til at producere homozygotiske linjer (dobbelt haploid produktion, se kapitel 1). Nogle af disse homozygotiske linjer vil ved sammenkrydsning kunne gendanne den oprindelige heterozygotiske plante. Alle homozygotiske linjer evalueres som forældrelinjer og komplementære homozygotiske forældrelinjer, hvori transgenet er udspaltet, udvælges (Dirks et al., 2009). Alt dette arbejde foregår udelukkende i indesluttede miljøer. De komplementære forældrelinjer uden transgener kan derefter udsættes i åbne miljøer. Her kan de opformeres og anvendes igen og igen til ved krydsning at gendanne den oprindelige heterozygot. Hverken forældrelinjer eller deres heterozygotiske afkomsplanter vil indeholde transgenerne.



Heterozygotisk plante med gode egenskaber

Den heterozygotisk plante transformers med et genkonstrukt, som kan inaktivere overkrydsning i meiosen (transgenet er indikeret med en sort prik). Forskellige transformanter udvælges.

Derefter produceres dobbelt haploide linjer fra de forskellige transformanter. Linjerne evalueres og komplementære forældre linjer, som ikke indeholder transgenet, udvælges.

Alt arbejde med de transgene planter foregår i indesluttede miljøer.

Komplementære forældre linjer, som ikke indeholder transgenet, udsættes i åbne miljøer og krydses

Den oprindelige heterozygot gendannes. De komplementære forældre linjer kan opformeres og anvendes igen og igen til at gendanne heterozygoten. Hverken forældre linjer eller de heterozygotiske planter vil indeholde transgenerne.

Figur 3.18. Forenklet illustration af reverse breeding. Billede er venligst stillet til rådighed af NBTPlatform.org.

3.10. Potentiel risici og uønskede effekter af NBT

Den Europæiske Fødevarerikkerhedsautoritet (EFSA) er indtil nu kun blevet anmodet om at foretage risikovurderinger af planter udviklet via cisgenese, intragenese og SDN3-teknikkerne og om hvorvidt disse planter falder inden for rammerne af den nuværende EU-GMO lovgivning. Disse teknikker er også de eneste af New Breeding Teknikkerne, der forudsætter, at de overførte gener indsættes permanent i plantens DNA for at opnå den fordelagtige effekt af generne. De herved opnåede planter, der senere skal udsættes og dyrkes i åbne miljøer, er derfor planter med permanent indsættelse af ekstra gener.

Risikovurderingerne startede med cisgenese og intragenese efterfulgt af en risikovurdering af SDN3. Begge evalueringer blev efterfølgende offentliggjort i 2012 som to videnskabelige udtalelser i EFSA Journal (EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), 2012a; EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO), 2012b). EFSA konkluderede, at eksisterende GM-vejledninger til fødevarer og fødevarerikkerhed og for miljø-mæssige risikovurderinger også var hensigtsmæssige at benytte for cisgenese, intragenese og for SDN3-teknikken. EFSA vurderede dog, at risici forbundet med cisgene-planter er sammenlignelige med dem, der er forbundet med konventionelt forædlede planter, men at nye risici kunne være forbundet med intragene og SDN3-planter. EFSA konkluderede, at alle disse metoder kan producere variable frekvenser og sværhedsgrader af utilsigtede virkninger, hvor hyppigheden ikke kan forudsiges og skal vurderes fra sag til sag. Mængden af data til risikovurdering af både cisgene og intragene-planter og planter opnået via SDN3 kunne derfor reduceres i nogle sager på baggrund af allerede tilgængelig oplysninger om egenskabens karakter og historisk sikker anvendelse.

De potentielle risici ved Agro-infiltration, reverse breeding og RNA-afhængig metylering må vurderes at være små, idet fremmed DNA kun introduceres som et mellemed. Dette sker i indesluttede miljøer og de endelige planter, som udsættes i åbne miljøer er uden fremmede gener.

Ved podning på GM-grundstammen er det meget vigtigt, at alle skud fra GM-grundstammen fjernes, således at alle stængler, blade blomster, frø og frugter stammer fra ikke-GM podede kviste og derfor ikke bærer den genetiske modifikation.

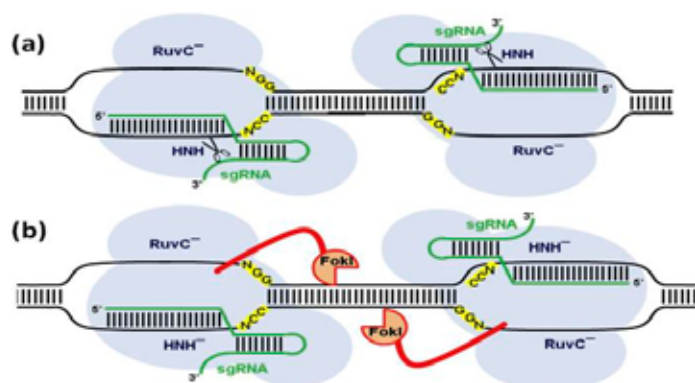
Generelt er der meget få potentielle risici forbundet med præcis mutagenese (SDN1), SDN2 og base editing, når man sammenligner med konventionel mutationsforædling. Den største sideeffekt er, at der kan opstå uønskede og ukendte mutationer i DNA-sekvenser, som det ikke var meningen, værktøjerne skulle mutere. Uønskede mutationer induceres dog i meget mindre grad ved disse metoder end ved konventionel mutationsforædling (se kapitel 2). Både ZFN, TALENs og CRISPR/Cas9 kan inducere såkaldte off-target mutationer, men frekvensen er større, når CRISPR/Cas-værktøjet anvendes, hvis der ikke tages yderligere forholdsregler (Zischewski et al., 2017). Der er ikke fundet offentliggjorte data vedrørende off-target mutationsfrekvenser for ODM. Men da denne teknik ikke involverer DNA-skæringer, kræver lange oligonukleotider med en længde på mellem 20 til 100 nukleotider og har en meget lav effektivitet, så forventes der ikke off-target effekter ved denne metode. I det efterfølgende afsnit vil forskellige forholdsregler, der kan tages imod off-targets fra CRISPR/Cas9-værktøjet, blive gennemgået.

3.11. Forholdsregler imod off-target mutationer

Off-target mutationer opstår, når værktøjet er i stand til at binde og inducere dobbeltstrenget brud i andre meget ens sekvenser i plantegenomet. Sådanne sekvenser kaldes også off-target sekvenser. Selvom genkendelsesfrekvensen for CRISPR/Cas9 på 20 nukleotider er lang nok til kun at findes en gang i langt de fleste plantegenomer, så er den specifikke binding størst for de 10-12 nukleotider af gRNA'et, der efterfølger PAM-sekvensen. Dette betyder, at gRNA'et kan binde sig til sekvenser, selvom der er forkert parring i de sidste 8-10 nukleotider mellem gRNA'et og plantens DNA. Den vigtigste strategi til at undgå off-target mutationer er derfor at designe en gRNA, som er meget specifik, og at tjekke for tilstedeværelsen af off-target sekvenser i genomet, som gRNA'et kunne binde sig mere uspecifikt til. Der er udviklet forskellige software platforme, som man kan anvende til at designe gRNA, som meget specifikt vil binde sig til kun den sekvens, hvor man ønsker mutationen.

Derudover er der også udviklet forskellige strategier, som kan anvendes til at reducere risikoen for off-target mutationer yderligere. CRISPR/Cas9-specificiteten kan for eksempel øges ved at øge antallet af nukleotider, der kræves for at genkende tilsvarende nukleotider i plantegenomet. Dette kan ske ved anvendelse af Cas9-nickaser eller Cas9-FokI-fusionsproteiner (se beskrivelse Figur 3.19). Begge strategier reducerer antallet af mulige off-target sekvenser kraftigt (Bortesi og Fischer, 2015). En anden strategi er at anvende nogle af de nyligt udviklede Cas9-varianter, som også besidder en højere specificitet. Specielt har det vist sig, at der i planter er langt færre off-target mutationer ved anvendelsen af CRISPR-Cpf1-systemet (Hu et al., 2017).

Overførselsmetoden, der anvendes til CRISPR/Cas9-værktøjet, har også stor indflydelse på frekvensen af off-target mutationer. Det har vist sig, at når CRISPR/Cas9-værktøjet overføres til cellen, som et protein-RNA-kompleks, så nedbrydes det hurtigere i cellen end et DNA-konstrukt, hvilket reducerer antallet af off-target mutationer (Kim et al., 2014, Liang et al., 2017).



Figur 3.18. CRISPR/Cas9-specificitet kan øges ved at øge antallet af nukleotider, der kræves for at genkende stedet, hvor der ønskes et dobbeltstrengt brud. (a) Anvendelse af to Cas9-nickaser. En af de to nukleatedomæner i Cas9 inaktiveres (i dette tilfælde RuvC), således at Cas9 kun kan overlippe den ene DNA-streng. Der kræves derfor to Cas9-nickaser til at inducere et dobbeltstrengt brud. Den samtidige anvendelse af to Cas9-nickaser giver større specificitet, da dobbelt så mange nukleotider skal genkendes og bindes af gRNA for at inducere et dobbeltstrengt brud. (b) Cas9-FokI-fusionsproteiner. Her anvendes Cas9-varianter, som er inaktiverede i begge nukleatedomæner (RuvC og HNH). Disse fusioneres til FokI nukleatedomænet. Som for ZFN og TALENS, så er overlipping med FokI afhængig af dimerisering, og der skal derfor designes to Cas9-FokI-fusionskomplekser, som kan binde sig på hver sin side af det sted, hvor man ønsker et dobbeltstrengt kromosombrud. Som for Cas9-nickaser giver dette større specificitet, da dobbelt så mange nukleotider skal genkendes og bindes af gRNA for at inducere et dobbeltstrengt brud. Billede er fra Bortesi og Fischer, 2015.

3.12. Konklusion

Alle syv NBT'er åbner nye muligheder for planteforædlingen, som ikke er mulige med konventionelle forædlingsteknikker. Anvendelsen af NBT gør også mange forædlingsprocesser hurtigere og nedsætter derved produktionsomkostningerne. Der er dog stadig vigtige begrænsninger for implementering af NBT i forædlingen både effektivt og økonomisk. En vigtig begrænsning er, at alle disse teknikker kræver overførsel af DNA, RNA og/eller proteiner til enkeltceller med efterfølgende regeneration af planter fra disse celler. Som tidligere nævnt er planteregenerationsfrekvensen ud fra enkeltceller meget afhængig af overførselsmetoden, udgangsmaterialet, plantearten og også genotypen. Det er således for mange plantearters vedkommende kun muligt at regenerere planter i nogle få genotyper med en bestemt overførselsmetode og et bestemt udgangsmateriale. Da dette selvfølgelig sætter en begrænsning på anvendelsen af teknikkerne, kræves derfor for adskillige afgrøder en udvikling af overførselsmetoder til udgangsmateriale, som er mindre afhængig af genotypen. Økonomiske begrænsninger af NBT er i høj grad relateret til omkostningerne forbundet med registrering af nye sorter. Denne omkostning er lav, hvis planter fremstillet ved NBT klassificeres som non-GM-planter. Hvis de derimod klassificeres som GM-planter, så er udgifterne enorme, og det vil derfor kun være muligt for store multinationale firmaer at anvende NBT.

Præcis mutagenese, hvor det dobbeltstrengede kromosombrud induceres af SDN-værktøjerne og efterfølgende repareres ved NHEJ, er den NBT-teknik, som har det største potentiale for planteforædlingen, og som samtidig besidder meget få potentielle risici. Dette område er også på nuværende tidspunkt i kraftig udvikling og forbedrede værktøjer og overførselsmetoder til udgangsmateriale, som er mindre genotypeafhængige, er allerede undervejs eller vil med stor sandsynlighed blive udviklet inden for kort tid.

Referencer

- Amrani N, Gao XD, Liu P, Gupta A, Edraki A, Ibraheim R, Sasaki KE, Zhu LJ, Wolfe SA, Sontheimer EJ.** 2017. NmeCas9 is an intrinsically high-fidelity genome editing platform. *BioRxiv*. doi 10.1101/172650
10.1101/172650.
- Bauer M, Gaskell G.** 2002. Researching the public sphere of biotechnology. In Gaskell, G. and Bauer, M., eds. *Biotechnology: The Making of a Global Controversy*. Cambridge University Press, 1–19.
- Bibikova M, Beumer K, Trautman JK, Carroll D.** 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* **300**, 764.
- Bogdanove AJ, and Voytas DF.** 2011. TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science* **333**, 1843-1846. doi: 10.1126/science.1204094
- Bortesi L, Fischer R.** 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* **33**, 41-52.
- Breyer D, Herman P, Brandenburger A, Gheysen G, Remaut, E, Soumillion P, Van Doorselaere J, Custers R, Pauwels K, Sneyers M, Reheul D.** 2009. Genetic modification through oligonucleotidemediated mutagenesis. A GMO regulatory challenge? *Environmental Biosafety Resesearch* **8**, 57-64.
- Chinnusamy V, Zhu JK.** 2009. RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants. *Science China Life Science* **52**, 331-343.
- Dirks R, van Dun K, de Snoo CB, van den Berg M, Lelivelt CL, Voermans W, Woudenberg L, de Wit JP, Reinink K, Schut JW, van der Zeeuw E et al.** 2009. Reverse breeding: a novel breeding approach based on engineered meiosis. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 837-845
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO).** 2012a. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. *EFSA J.* **10**, 2561 [33 pp].
- EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO).** 2012b. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site-Directed Nucleases with similar function. *EFSA Journal* 2012 **10**, 2943. [31 pp]
- Endo A, Masafumi M, Kaya H, Toki S.** 2016. Efficient targeted mutagenesis of rice and tobacco genomes using Cpf1 from *Francisella novicida*. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/snep38169.
- George EF.** 1993. *Plant propagation by tissue culture, Part1. The Technology*. 2nd Edition, Exegetics Limited, Edington, Wilts, England.

Gorbunova V, Levy AA. 1997. How plants make ends meet: DNA double-strand break repair. *Trends in Plant Science* **4**, 263-269.

Hu X, Wang C, Liu Q, Fu Y, Wang K. 2017. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cpf1 system. *Journal of Genetics and Genomics* **44**, 71-73

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337** (6096), 816-821. doi:10.1126/science.1225829

Kaya H, Mikami M, Endo A, Endo M, Toki S. 2016. Highly specific targeted mutagenesis in plants using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Scientific Reports*. DOI: 10.1038/srep26871.

Kim E, Koo T, Park SW, Kim D, Kim K, Cho H, Song DW, Lee KJ, Jung MH, Kim S et al. 2017. In vivo genome editing with a small Cas9 orthologue derived from *Campylobacter jejuni*. *Nature Communications* **8**. DOI 10.101038/ncomms14500.

Kim S, Kim D, Cho SW, Kim J, Kim J. 2014. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research* **24**, 1012-1019.

Kleinstiver BP, Prew MS, Tsai SQ, Topkar VV, Nguyen NT, Zheng Z, Gonzales APW, Li Z, Peterson RT, Yeh JJ et al. 2015a. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* **523**, 481-485.

Kleinstiver BP, Tsai SQ, Prew MS, Nguyen NT, Welch MM, Lopez JM, McCaw ZR, Aryee MJ, Joung JK. 2015b. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* **34**, 869-874.

Lassen J, Madsen KH, Sandøe P. 2002. Ethics and genetic engineering -lessons to be learned from GM foods. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **24**, 263-271.

Liang Z, Chen K, Li T, Zhang Y, Wang Y, Zhao Q, Liu J, Zhang H, Liu C, Ran Y, Gao C. 2017. Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature Communications* **8**. Doi: 10.1038/ncomms14261.

Murovec J, Pirc Z, Yang B. 2017. New variants of CRISPR RNA-guided genome editing enzymes. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 917-926.

New Breeding Techniques Platform. www.nbtplatform.org

Ran FA, Cong L, Yan WX, Scott DA, Gootenberg JS, Kriz AJ, Zetsche B, Shalem O, Wu X, Makarova KS et al. 2015. In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* **520**, 186-191.

Rommens CM. 2004. All-native DNA transformation: a new approach to plant genetic engineering. *Trends in Plant Science* **9**, 457-464.

- Schaeffer SM, Nakata PA.** 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to fields. *Plant Science* **240**, 130-142.
- Schouten HJ, Krens FA, Jacobsen E.** 2006. Cisgenic plants are similar to traditionally bred plants. *EMBO Reports* **7**, 750-753.
- Shan Q, Voytas DF.** 2018. Editing plant genes one base at a time. *Nature Plants*. DOI: 10.1038/s41477-018-0177-y.
- Smith J, Grizot S, Arnould S, Duclert A, Epinat J-C, Chames P, Prieto J, Redondo P, Blanco FJ, Jeronimo B et al.** 2006. A combinational approach to create artificial homing endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Reseach* **34**. DOI: 10.1093/nar/gkl720.
- Steinert J, Schiml S, Fauser F, Puchta H.** 2015. Highly efficient heritable plant genome engineering using Cas9 orthologues from *Streptococcus thermophiles* and *Staphylococcus aureus*. *The Plant Journal* **84**, 1295-1305.
- Tang X, Lowder LG, Zhang T, Malzahn AA, Zheng X, Voytas DF, Zhong Z, Chen Y, Ren Q, Li Q et al.** 2017. A CRISPR-Cpf1 system for efficient genome editing and transcriptional repression in plants. *Nature Plants* **3**. Doi: 101038/nplants.2017.18.
- Vaghchhipawala Z, Rojas CM, Senthil-Kumar M, Mysore KS.** 2011. Agroinoculation and Agroinfiltration: Simple Tools for Complex Gene Function Analyses. In: Pereira A. (eds) *Plant Reverse Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* Humana Press, Totowa, NJ. , vol 678.
- van der Salm TPM, Bouwer R, van Dijk AJ, Keizer LCP, ten Cate CHH, van der Plas LHW, Dons JJM.** 1998. Stimulation of scion bud release by rol gene transformed rootstocks of *Rosa hybrida* L. *Journal of Experimental Botany* **49**, 847-852.
- Voytas DF.** 2013. Plant genome editing with sequence specific nucleases. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 327-350.
- Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Slaymaker IM, Makarova KS, Esssletzbichler P, Volz SE, Joung J, van der Oost J, Regev A et al.** 2015. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* **163**, 759-71.
- Zetsche B, Heidenreich M, Mohanraju P, Fedorava I, Kneppers J, DeGennaro EM, Winblad N, Choudhury SR, Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Wu WY et al.** 2017. Multiplex gene editing by CRISPR-Cpf1 using a single crRNA array. *Nature Biotechnology* **35**, 31-34.
- Zischewski J, Fischer R, Bortesi L.** 2017. Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnology Advances* **35**, 95-104.

4.. Precision breeding (på dansk: præcisionsforædling)

Kim H. Hebelstrup, lektor, Institut for Molekylærbiologi og Genetik, Aarhus Universitet

4.1. Indledning

I dette kapitel beskrives en række konkrete eksempler på brug af præcisionsforædling. Der er på nuværende tidspunkt i litteraturen eksempler på brug af præcisionsforædling både i forbindelse med kvalitet og sundhed, udbytte, kvælstofoptag og potentiale for nedsat brug af plantebeskyttelsesmidler ved introduktion af naturlig resistens i afgrøder m.v. Desuden rummer præcisionsforædling mulighed for at forædle afgrøder med kvaliteter, der på nuværende tidspunkt ikke eksisterer, og som, trods teoretisk mulighed, i praksis vil være umulig af fremstille uden brug af præcisionsforædling. Et eksempel på dette er hvede med meget lavt indhold af gluten, som bl.a. beskrives som én af de udvalgte eksempler. De enkelte eksempler diskuteres i forhold til den bagvedliggende genetik i den pågældende afgrøde, og det vurderes hvorledes de allerede kendte og godkendte metoder til induktion af mange vilkårlige mutationer med fysisk og kemisk mutagenese vil kunne bruges til at opnå samme egenskaber. I forlængelse af dette vurderes generelt konsekvenser ved brug af præcisionsforædling og konsekvenser ved at undlade brug af præcisionsforædling.

4.2. Sammenligning af klassisk mutationsforædling og præcisionsforædling i konkrete eksempler

Ved brug af tilfældig mutagenese i afgrøder i klassisk forædling bliver der induceret mange og vilkårlige mutationer i planternes DNA. F.eks. når man ved traditionel kemisk mutagenese bruger cytotoxiske stoffer som natrium azid (NaN₃), EMS (Ethylmethansulfonat) eller tilsvarende stoffer, vil der typisk ske vilkårlige mutationer i én ud af mellem 500 og 2500 basepar i det genomiske DNA. Dette betyder, at der typisk sker mellem 10.000 og op til 100.000 vilkårlige mutationer i én plante. I modsætning til dette kan man ved præcisionsforædling ramme netop lige de ganske få steder i det genomiske DNA, hvor man ønsker mutationer (se kapitel 2). Dette kan ske ved singulær præcisionsforædling, hvor man rammer et eller få steder i genomisk DNA, som har samme sekvens, eller ved multiplex præcisionsforædling, hvor 2-6 forskellige sekvenser rammes. I dette kapitel beskrives, hvorledes dette muliggør forædlingsstrategier, som er særligt anvendelige til komplekse genetiske fænomener som f.eks. hvedearternes høje kromosomantal eller forædling relateret til glutenintolerans, som er bestemt af ca. 100 homologe gener i hvede.

4.3. Brug af præcisionsforædling – et overblik

Der er i den seneste årrække blevet publiceret en del studier, hvor præcis mutagenese er blevet brugt til præcisionsforædling. Det drejer sig i mange tilfælde om teknikker, hvor præcis mutagenese udføres med genom-redigeringsteknikker som: CRISPR/CAS eller TALEN (se kapitel 3). Tabel 4.1 giver et overblik med udvalgte eksempler. Alle eksempler i dette kapitel er af typen SDN1 (se kapitel 3). Dvs. der er tale om enkelt-base-substitutioner eller små deletioner eller indsæt i DNA af størrelsen 1-10 baser, dog som oftest blot én base.

Table 4.1. Udvalgte konkrete eksempler på brug præcisionsforædling med angivelse af, hvilket gen eller hvilke gener der er brugt som præcisionsmål for at åbne den beskrevne egenskab.

Plante	Egenskab	Gen	Forædler	Reference
Brødhvede (<i>Triticum aestivum</i>)	Kraftigt reduceret glutenindhold med henblik på at udvikle en hvede sort som kan indtages af personer med glutensensitivitet	α -gliadin	Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Cordoba, Spanien	(Sánchez-León <i>et al.</i> , 2018)
Brødhvede (<i>Triticum aestivum</i>)	Resistens mod svampesygdommen meldug	Mildew Resistance locus (MLO)	Chinese Academy of Sciences, Beijing, Kina	(Wang <i>et al.</i> , 2014)
Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Sen modning og længere holdbarhed	RIN	National Food Research Institute, Japan	(Ito <i>et al.</i> , 2015)
Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Forhøjet udbytte	SIWUS	Cold Spring Harbor, Laboratory, USA	(Rodríguez-Leal <i>et al.</i> , 2017)
Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Resistens mod en række forskellige plantesygdomme som skyldes infektion af bakterier eller svampe	DMR6	University of California, Berkeley, USA	(Thomazella <i>et al.</i> , 2016)
Majs (<i>Zea mays</i>)	Forhøjet tolerance overfor tørkestress	ARGOS8	DuPont Pioneer, USA	(Shi <i>et al.</i> , 2017)
Ris (<i>Oryza sativa</i>)	Resistens mod sygdomme <i>rice blast</i> der skyldes svampen <i>Magnaporthe grisea</i>	ERF922	Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing	(Wang <i>et al.</i> , 2016)
Ris (<i>Oryza sativa</i>)	Ris med højt indhold af amylose og resistent stivelse	SBEIIb	Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing	(Sun <i>et al.</i> , 2017)
Ris (<i>Oryza sativa</i>)	Ris med forhøjet optagelse af kvælstof	NRT1.1B	Shanghai Center for Plant Stress Biology, Kina	(Lu and Zhu, 2017)

Plante	Egenskab	Gen	Forædler	Reference
			Purdue University, IN, USA	
Ris (<i>Oryza sativa</i>)	Ris med forhøjet udbytte relateret til agronomiske fænotyper	Gn1a, DEP1, GS3, IPA1	Chinese Academy of Sciences, Guangzhou, South China Normal University	(Li <i>et al.</i> , 2016)
Tomat (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Sort med evne til at sætte frøløse tomatfrugter under ekstrem varme	SIAGL6	Agricultural Research Organization, Rishon LeZion, Israel	(Klap <i>et al.</i> , 2017)
Ris (<i>Oryza sativa</i>)	Sort med væsentligt forhøjet tolerance overfor tørke	SAPK2	Chinese Academy of Sciences, Beijing	(Lou <i>et al.</i> , 2017)
Sæddodder (<i>Camelina sativa</i>)	Gammel, men relativ ukendt afgrøde med højt olie- og protein indhold. Præcisionsforædling er blevet anvendt til at lave sorter med særligt gavnligt indhold af omega-3 fedtsyrer.	CsFAD2	AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Frankrig	(Morineau <i>et al.</i> , 2017)

Tabel 4.1 – fortsat fra forrige side

4.4. Eksempler på præcisionsforædling der relaterer til afgrøde kvalitet og sundhed

Optimering af afgrøde kvalitet giver potentielle muligheder for forbedret folkesundhed og højere prissætning af dansk producerede afgrøder. I det følgende gives tre udvalgte eksempler på brug af præcisionsforædling, som er relevant i denne kontekst.

4.4.1. Gluten

Som beskrevet i faktaboks 4.1 er gluten en betegnelse for en kompleks struktur af mange forskellige proteiner som dannes i en meldej af hvede. Indhold og sammensætning af disse proteiner er derfor af væsentlig betydning for en hvedekernes kvalitet. Herunder er der en række genetiske forhold, som er afgørende for hvedes glutenindhold og sammensætning.

Glutenproteinerne er desuden også ansvarlige for glutenallergi (cøliaki) og glutensensitivitet. Det drejer sig om de af glutenproteinerne, der tilhører familien af såkaldte α -gliadiner. Disse proteiner indeholder elementer – såkaldte epitoper – som giver en immunologisk reaktion hos nogle mennesker. Forædling af hvede med ingen eller færre α -gliadiner er derfor blevet foreslået som en oplagt strategi til at opnå hvedesorter, som er tolerante for patienter med cøliaki eller glutensensitivitet. α -gliadiner dannes af ca. 100 forskellige gener, som er lokaliseret tæt ved hinanden på samme kromosomer. Det er ved traditionel forædling med induceret kemisk eller fysisk mutagenese ikke lykkedes at fremstille hvedesorter med væsentligt lavere indhold af α -gliadiner. Dette skyldes primært det forhold, at der ved traditionel forædling kun optræder vilkårlige mutationer, og at sandsynligheden for, at disse rammer netop i alle α -gliadinernes gener i samme plante, ikke er til stede.

Faktaboks 4.1: Gluten, cøliaki og glutensensitivitet

- Gluten er en samlet betegnelse for den elastiske proteindiel af hvedemel
- Det er glutenproteiner, der giver de særlige viskoelastiske egenskaber til hvededej og andre hvedemelsholdige produkter. Glutenproteinerne i hvedemelet danner et netværk, imellem hvilket stivelse findes som kugleformede stivelseskorn. Stivelseskornene kan udvaskes fra en dej af mel, således at glutendelen er tilbage.
- Gluten består af en række forskellige proteintyper, herunder α -gliadiner. α -gliadiner er en familie af proteiner, som udgør den del af gluten, som er associeret med udvikling af cøliaki og glutensensitivitet.
- Cøliaki og glutensensitivitet rammer tilsammen mere end 7% af befolkningen i den vestlige verden.
- Forskellige gener er bestemmende for dannelse af forskellige proteiner. For familien af α -gliadiner er der ca. 100 forskellige gener, som er medvirkende til dannelse af denne proteintype.
- Ved præcisionsforædling er det lykkedes at opnå hvede med et væsentligt lavere glutenindhold. Derimod er det ved forædling ved brug af tilfældig mutagenese ikke lykkedes at opnå hvede med væsentligt lavere glutenindhold.

Kilde: Sánchez-León et al., 2018

Det er teoretisk muligt at kombinere forskellige planter ved sammenkrydsning der hver har en mutation i ét α -gliadin gen. Men dette vil være et meget omfattende projekt som vil skulle foregå over mange år og kræve et meget stort antal planter. Sammenkrydsning af forskellige planter med mutationer i forskellige α -gliadin gener vil desuden besværliggøres af at disse er placeret tæt ved hinanden på samme kromosom, hvilket nedsætter antallet af afkom som indeholder mutationer i α -gliadin fra hver af forældreplanterne.

Præcisionsforædling løser dette problem ved specifikt at give mutationer i de ønskede gener. I et studie publiceret i år i *Plant Biotechnology Journal* (Sánchez-León et al., 2018) påviser en spansk gruppe af forskere således, at genom-redigeringsteknikken CRISPR/Cas9 kan anvendes til at gennemføre en præcisionsforædlingsstrategi, hvor man rammer netop α -gliadin generne. Ved en sådan strategi opnåede forskerne en hvede med meget lavt glutenindhold og 85% nedsat immunreaktivitet, som relaterer til patienter med cøliaki.

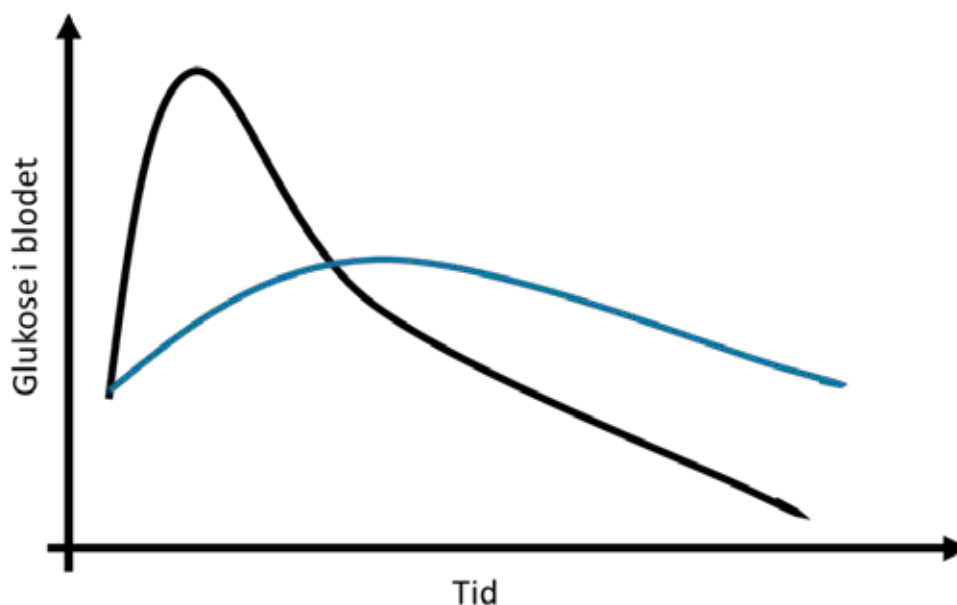
Præcisionsforædling af gener der relaterer til gluten er derfor et eksempel på en situation, hvor man opnår en ny afgrødekvalitet – i dette tilfælde en meget lavt glutenrelateret immunreaktivitet – som man i teorien ville kunne lave baseret på traditionel induceret kemisk eller fysisk mutagenese og forædling. Men som i praksis er så kompleks, at det endnu ikke er lykkedes at opnå en hvede med denne egenskab ved traditionelle metoder.

Brug af præcisionsforædling i relation til gluten rummer desuden en række andre potentialer. I det omtalte spanske studie er der opnået en hvede med lavt glutenindhold og nedsat immunreaktivitet i relation til cøliaki-patienter. Metoden rummer dog mulighed for udvikling af endnu mere effektive strategier, således at det måske er muligt at opnå en hvede, som er helt tolerabel for cøliaki patienter. Gluten-immunreaktivitet er desuden ikke kun et problem, der relaterer sig til hvede, og således er der også en potentiale i at anvende denne strategi for præcisionsforædling i andre arter af afgrøder. F.eks. indeholder byg også glutenlignende proteiner, som kan give en immunreaktivitet. Byg indgår i øl, og glutenrelateret immunreaktivitet kan derfor også være et problem i denne sammenhæng, som præcisionsforædling potentielt kan afhjælpe.

4.4.2. Kulhydrater

En væsentlig del af mange afgrøder består af kulhydrater. Således står kulhydrater for mellem 90 – 99 % af det samlede kalorieindhold i kartofler, hvede og byg. Kulhydrater kan ernæringsmæssigt opdeles i tre grupper: A) fibre, som ikke fordøjes af kroppens enzymer og derfor ikke bidrager til fødevarers kalorieindhold. B) Stivelse som af kroppen kan nedbrydes til sukker. C) Sukkerstoffer som kan optages direkte eller meget hurtigt i blodet som glukose.

Glykæmisk indeks er et tal for hvorledes en fødevarer bidrager til kroppens blodsukker (Se faktaboks 4.2 og figur 4.1). Hurtige ændringer i blodsukker, som bl.a. kan forårsages af fødevarer med et højt glykæmisk indeks, sættes i forbindelse med udvikling af en række livstilssygdomme og tilstande som overvægt og fedme. Omvendt sættes fødevarer med et lavt glykæmisk indeks i forbindelse med en stabiliserende effekt på ændringer i blodsukker og forebyggelse af en række sygdomme.



Figur 4.1. Efter indtagelse af en fødevarer sker der typisk en stigning i blodets indhold af glukose, der ses som en stigende kurve i en graf. Ved at beregne arealet under den del af kurven, der ligger over blodets indhold af glukose ved start findes en fødevarers glykæmiske indeks ved sammenligning med en defineret reference, hvis glykæmiske indeks defineres til 100. Glykæmisk indeks beregnes derfor således:

$$GI = \frac{\text{Areal (fødevarer)}}{\text{Areal (reference)}} * 100$$

De to kurver viser eksempler på udvikling i blodsukker i en forsøgsgruppe efter indtagelse af to fødevarer med forskelligt glykæmisk indeks. Den sorte kurve har et forløb svarende til et højt indhold af sukker eller af kulhydrater, der let omsættes til sukker i kroppen, hvor der sker hurtige ændringer i blodsukker. Den blå kurve viser et forløb efter indtagelse af en fødevarer med en mere stabiliserende effekt på blodsukkerkurven. Dette kunne f.eks. være en fødevarer med et højt indhold af resistent stivelse eller kostfibre.

Faktaboks 4.2: Glykæmisk indeks

- Glykæmisk indeks er et mål for en fødevarers bidrag til blodets indhold af glukose (populært kaldet blodsukker).
- Glykæmisk indeks beregnes ved at sammenligne den gennemsnitlige udvikling af blodets indhold af glukose efter indtag af forskellige fødevarer i en gruppe af forsøgspersoner (Se figur 4.4). For at have et sammenligningsgrundlag defineres en fødevare til at have et glykæmisk indeks på 100. Typisk vælges hvedebrød eller ren sukker som denne reference. I det tilfælde vil de fleste fødevarer have et glykæmisk indeks under 100.
- Indtagelse af fødevarer med et lavt glykæmisk indeks er særligt vigtigt for personer med diabetes og metabolsk syndrom, samt i forbindelse med en vægtregulerende eller vægtstabiliserende diæt. Indtagelse af fødevarer med højt glykæmisk indeks sættes derimod i forbindelse med udvikling af livsstilsrelaterede sygdomme.

Stivelse udgør ofte den væsentligste del af kulhydrater i en fødevare (Se faktaboks 4.3). Kroppen er i stand til enzymatisk at omdanne det meste stivelse til sukker som optages i blodet. Hastigheden hvormed denne enzymatiske nedbrydning sker er af stor betydning for hvorledes stivelse fra en afgrøde bidrager til det glykæmiske indeks. En mindre del af stivelsen, som betegnes resistent stivelse, bliver ikke nedbrudt af kroppens egne enzymer. Denne resistente stivelse har nogle effekter som forbindes med forebyggelse af en række sygdomme, dels ved at bidrage til et lavere glykæmisk indeks, og dels ved en præ-biotisk effekt, hvor specifikke mikroorganismer favoriseres i tarmkanalen.

Faktaboks 4.3: Om stivelse og kulhydrater i fødevarer

- Stivelse udgør dens største del af menneskers indtag af kulhydrater og også af menneskers samlede kalorieindtag i det hele taget.
- Stivelse består af suktermolekyler som er sammensat af to fraktioner der består af henholdsvis forgrenede og uforgrenede kæder. Fraktionen af uforgrenede kæder kaldes amylose og den forgrenede fraktion kaldes amylopektin. Amylopektin dannes fra amylose ved at såkaldte stivelsesforgrenende enzymer indsætter forgreninger. Stivelse er planterens måde at opbevare sukker på. Forskellige sukkerstoffer er det direkte produkt af planterens fotosyntese.
- For at kunne opbevare det sukker, som en plante har produceret må den i mange tilfælde omdanne det til stivelse. Omdannelse af sukkerstoffer til stivelse foregår derfor i de fleste blade med aktiv fotosyntese, som ved afslutningen af en dag indeholder sin maksimale mængde stivelse. I løbet af natten, hvor fotosyntesen er inaktiv i mørket, forbruges den ophobede stivelse ved forbrænding.
- I andre tilfælde bruger planter stivelse som en måde at opbevare kulhydrater og energi over en sæson eller over en generation. Det ser man i afgrøder. F.eks. er kartofler en måde hvor kartoffelplanter kan opbevare energi, kulhydrater og til dels også protein til nye planter som opstår ved vegetativ formering. I naturen findes vilde kartoffelplanter, som danner kartoffelknolde for enden af jordstængler. Ligeledes dannes stivelse i kornfrø som en "madpakke" til den kimplante der vokser fra frøet. Det er denne biologiske funktion i naturen som mennesket udnytter til mad og dyrefoder, og er derfor udgangspunkt for størstedelen af verdens fødevareproduktion.
- Stivelse fordøjes i kroppen af en række forskellige enzymer (amylaser, glukooamylaser m.v.). Det meste af denne enzymatiske fordøjelse sker i tarmene, primært i tyndtarmen. En andel af stivelse i et måltid bliver dog ikke nedbrudt i tyndtarmen af kroppens enzymer, men nedbrydes i stedet ved fermentering af bakterier i tyktarmen. Denne diætetiske stivelsesfraktion betegnes resistent stivelse (RS). Der findes fire typer af resistent stivelse (RS1-RS4), se tabel 4.2.
- Stivelse med et relativt højt indhold af amylose indeholder generelt et større andel af resistent stivelse af typen RS2.

Resistent stivelse findes i fire forskellige typer (Se tabel 4.2). Typen RS2 relaterer til den kemiske og fysiske opbygning af stivelsen, som er afhængig af en række genetiske faktorer. Således findes der sorter af forskellige afgrøder med et varierende indhold af RS2. De fleste stivelsesholdige planter som udgør størstedelen af menneskers fødevarerindtag på globalt plan, herunder ris, hvede og kartofler, har et meget lavt indhold af resistent stivelse.

Tabel 4.2. Typer af resistent stivelse

Resistent stivelsestype	Forklaring
RS1	En type resistent stivelse hvor stivelsen er gemt bag en fysisk barrierer, således at kroppens enzymer ikke kan komme i kontakt med stivelsen, og omsætte den til sukker. Den fysiske barrierer består typisk af fiber. Eksempel: Ufordøjelige frøkernel, hvor stivelsen beskyttes af en ydre skal.
RS2	En resistent stivelsestype hvor stivelsen findes i sin naturlige halvkrystallinske struktur. RS2 findes i produkter af stivelsesafgrøder som ikke er kogte, bagte eller på anden måde opvarmet, eller i den del af stivelsen som forbliver krystallinsk under opvarmning. Eksempel: Stivelse med et meget højt amylose-indhold.
RS3	En resistent stivelsestype som forekommer, når en stivelsesholdig fødevarer efter opvarmning opbevares nedkølet. Ved denne proces genetablerer stivelsen sin halvkrystallinske form. Eksempel: afkølede kogte ris og pasta
RS4	Stivelse som ved kemisk modifikation har opnået en struktur der gør det mindre nedbrydeligt for kroppens enzymer. Eksempel: Industrielt modificeret stivelse

Indholdet af RS2-typen af resistent stivelse påvirkes negativt ved dannelse af den del af stivelsen som betegnes amylopektin, som kræver aktivitet af såkaldte stivelsesforgrenende enzymer (se faktaboks 3). Ved hjælp af præcisionsforædling har det vist sig at være muligt at reducere aktiviteten af disse enzymer i ris, således at mængden af resistent stivelse stiger markant. Et højt glykæmisk indeks er et særligt problem i ris som forbindes med stigninger i antallet af livsstilssygdomme på globalt plan. Men metoden kan desuden overføres til andre sorter, herunder hvede og kartofler til at opnå fødevarer med markant lavere glykæmisk indeks i forbindelse med forebyggelse af livsstilssygdomme. Brugen af præcisionsforædling i denne sammenhæng er særligt interessant for kartofler, idet kartofler formeres vegetativt. Dette betyder at nye kartoffelplanter er kloner af tidligere kartoffelplanter. Kartofler kan også formeres ved dannelse af frø. Men dette er ikke hensigtsmæssigt, fordi det inducerer et tab af genetisk variation i en kartoffel elitesort, oftest med væsentligt tab af udbytte (se kapitel 1). Ved brug af traditionel kemisk mutagenese og forædling hvor mutationer rammer villkårligt, er det nødvendigt at bruge frøformering ved kryds af kartofler med mutationer i forskellige stivelsesforgrenende enzymer. Brugen af præcisionsforædling løser dette problem således at en ny afgrøde kvalitet f.eks. et højt indhold resistent stivelse og et lavt glykæmisk indeks kan tilføjes direkte til en elitesort.

4.4.3. Fedtstoffer og omega-3

Sæddodder er en gammel, men relativt ukendt afgrøde med et højt olie- og proteinindhold. Den ses i øjeblikket som et muligt alternativ til nogle typer af rapsproduktion. Den rummer desuden et potentiale for at kunne producere særligt gavnlige omega-3 fedtsyrer. Præcisionsforædling er blevet anvendt til at opnå nye sorter af sæddodder med ændrede oliesammensætning, herunder et højere indhold af sunde fedtsyrer. Som en konsekvens heraf er sæddodder nu i udvikling til at kunne markedsføres som et bæredygtigt vegetabilsk alternativ til indtagelse af særligt gavnlige typer omega-3 fedtstoffer som ellers typisk produceres fra fisk.

4.4.4. Frugtmodning

Hastigheden hvormed frugter modnes er af betydning for produktion af mange typer vegetabilsk fødevarer. Våde frugter modnes typisk ved selv at danne plantehormonet ætylen, som aktiverer en række forskellige enzymer der nedbryder cellevægge og/eller omdanner stivelse eller andre komplekse kulhydrater til sukker. Modning gør en frugt mere modtagelig for sygdomme – som f.eks. visse typer af svampe. For tidlig modning kan derfor føre til tab af kvalitet. Genet *RIN* (*ripening inhibitor*) har været kendt i tomat planter i mange år. *RIN* regulerer aktiviteten af gener som relaterer til frugtmodning, herunder den omtalte dannelse af ætylen og aktivering af modningsrelaterede enzymer. Mutationer i dette gen giver en forsinket modning, og har derfor været anvendt i tomatforædling i mange år. Ved præcisions forædling er det lykkedes for en Japansk forskergruppe at opnå tomat sorter med forhøjet holdbarhed ved præcis mutagenese i *RIN* (Ito *et al.*, 2015).

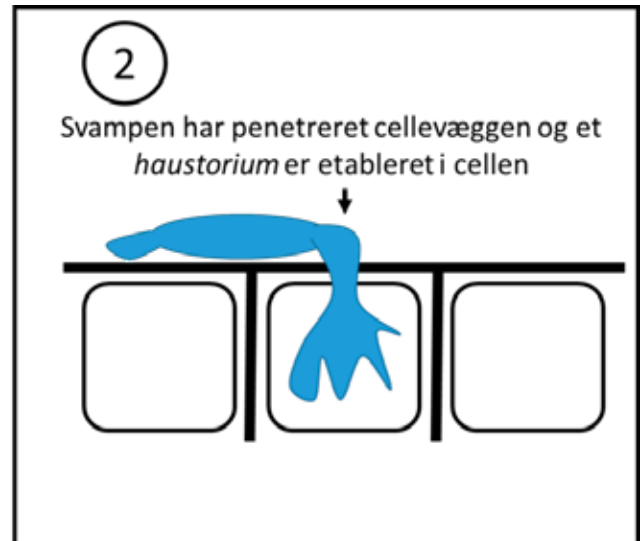
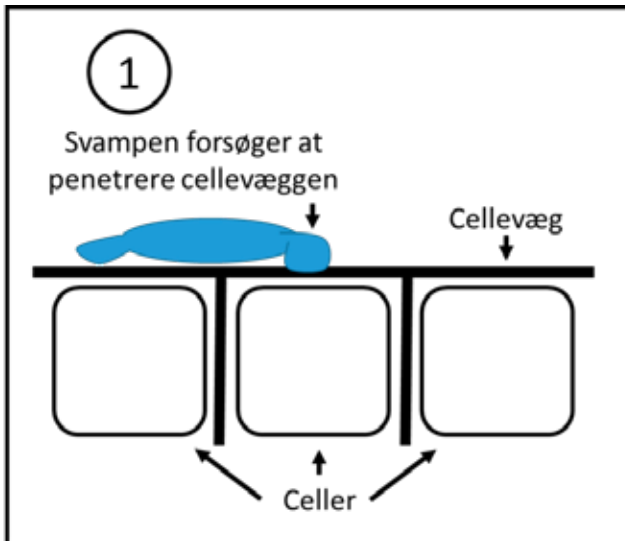
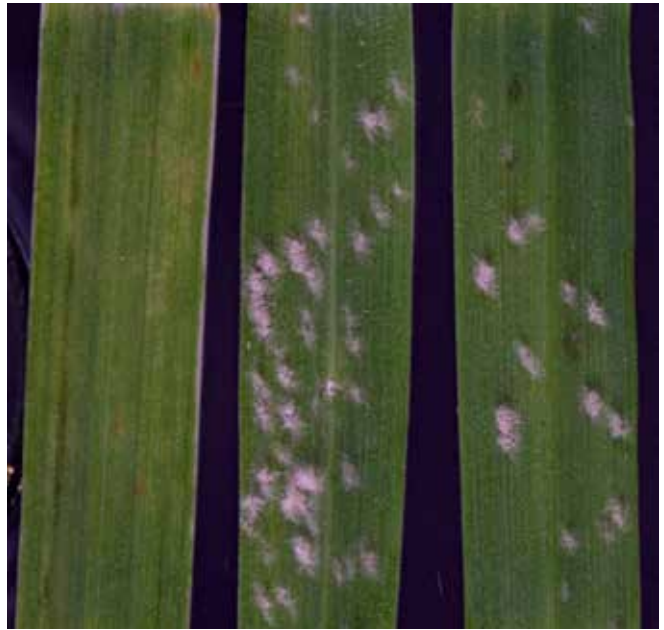
4.5. Eksempler på præcisionsforædling der relaterer til nitrogengødsning, udbytte og vækst af afgrøder, herunder potentiale for reduceret behov for brug af plantebeskyttelsesmidler

Forædling af planter har fra landbrugets oprindelse i oldtiden og frem til i dag betydet væsentlige ændringer af afgrøders fænotyper som relaterer til deres agronomi. Særligt ses en evolutionær meget hurtigt udvikling i de første århundreder efter landbrugets oprindelse, som især relaterer til begrænset frøspredning, blomstring, frøhvile, højere udbytte samt større frugt- og knoldstørrelse. Efter den moderne naturvidenskabs fremkomst sker op igennem det 20. århundrede væsentlige ændringer i afgrøders diversitet og egenskaber. Men der er til stadighed et behov for udvikling og tilpasning af afgrøder til dyrkning under forhold med lav tilgængelighed af nitrogen og til ændrede dyrkningsforhold så som ændret klima og nye typer af sygdomsfremkaldende mikroorganismer.

I dette afsnit gennemgås en række eksempler på brug af præcisionsforædling i relation til disse faktorer.

4.5.1. Sygdomsresistens og reduceret brug af fungicider og pesticider

Angreb fra patogene mikroorganismer er den væsentligste årsag til opståen og udbredelse af plantesygdomme i forbindelse med dyrkning af afgrøder. Plantesygdomme kan skyldes angreb af svampe, bakterier og virus. Dog er forskellige svampearter den mest udbredte årsag til de plantesygdomme som er af størst økonomisk betydning. Dette gælder f.eks. svampe som forårsager sygdomme som meldug og rust i afgrøder (Se faktaboks om meldug).



Figur 4.2. Meldug i hvede skyldes infektion af en såkaldt biotrof svamp med navnet *Blumeria graminis* f.sp. *Tritici* (se faktaboks 4.4). Øverste venstre billede: Unge planter med meldug. Øverste højre billede: Tre hvedeblade som alle er behandlet med svampesporer af meldug (venligst stillet til rådighed af Christina Ingvarsdén). Bladet til venstre er resistent fordi det ikke har en funktionel variant af genet MLO, og der ses derfor ikke tegn på svampevækst på bladets overside. De to blade til højre er derimod ikke resistente. Melduggens svampesporer er derfor i stand til at etablere sig og vokse på bladet. Melduggen er kendetegnet ved at den danner hvide mellignende sporer i såkaldte postuler som ses på overfladen af bladet. Illustration nederst: Melduggens strategi er at etablere haustoria i hvedebladets øverste cellelag, hvorfra den kan leve som snylter ved at suge vand og de nødvendige biokemiske næringsstoffer. Den vil derfor forsøge at penetrere hvedens ydre cellevæg for at kunne etablere et haustorium i en plantecelle, hvorefter svampen er i stand til at vokse og danne nye sporer i postuler. Disse sporer spreder sygdommen yderligere ved at inficere nye blade og andre planter. Melduggen kan ikke gennemføre hele denne proces i planter som ikke har funktionel variant af genet MLO. Disse er derfor resistente over for meldug.

Faktaboks 4.4: Meldug - en plantesygdom

- Meldug skyldes vækst på ydersiden af planter af en såkaldt biotrof svamp. Biotrof betyder at svampen vokser på levende plantedele. Døde planter og døde plantedele kan ikke være dens livsgrundlag.
- Som en del af sin livscyklus danner meldug såkaldte pustler, typisk på oversiden af blade (se figur 4.2). I disse pustler dannes sporer, som kan sprede sygdommen til andre planter. Ved infektion af en plante skal en spore etablere et netværk af svampeceller, et såkaldt mycelium på plantens overflade. Fra dette mycelium skal svampe lykkes med at penetrere celler på plantens yderste cellelag og etablere en snyltestruktur inde i værtsplantens celler. Denne snyltestruktur kaldes et haustorium, og det er gennem haustoria at svampen fra de levende planteceller får vand og de nødvendige organiske stoffer til at vokse og lave pustler med nye sporer.
- Meldug angriber mange forskellige plantearter herunder byg og hvede.
- Byg sorter med mutationer i genet MILDEW RESISTANCE LOCUS O (MLO) er resistente over for meldug, fordi melduggens sporer ikke er i stand til at gennemføre infektionsprocessen med etablering af haustoria og dannelse af pustler. Bygsorter med denne mutation blev opdaget første gang i 1942 og udbredt i sorter i perioden efterfølgende – særligt fra og med 1980'erne og frem. Før denne periode var meldug et væsentligt problem. Efter udbredelsen af MLO mutationer i byg sorter er meldug ikke længere et problem.
- Der er blevet identificeret hvede med mutationer i MLO gener med meldug resistens både ved brug af kemisk mutagenese og ved brug af præcisionsforædling, men kun ved brug af præcisionsforædling kan egenskaben tilføres en eksisterende sort uden risiko for tab af eliteegenskaber.

Kilder: Jørgensen, 1992; Koeck et al., 2011; Wang et al., 2014

Svampe og bakterier, som forårsager sygdomme i planter, kan have forskellige strategier i forhold til hvorledes de angriber og udnytter en værtsplantens celler. Nekrotrofe svampe og bakterier følger en strategi med at dræbe værtsplantens celler og væv som herefter nedbrydes og optages af svampen eller bakterien. I modsætning til dette er biotrofe svampe og bakterier som er afhængige af at snylte på en værtsorganisme med levende celler. En sådan biotrof organisme er helt afhængig af at kunne optage vand og næring fra sin planteværts celler. Disse typer af sygdomsfremkaldende organismer har derfor udviklet cellulære strukturer, som hjælper med at optage næring fra sin vært. For eksempel danner biotrofe svampearter som fremkalder sygdomme i afgrøder ofte såkaldte *haustoria* (Se figur 4.2 og faktaboks 4.4).

Haustoria er strukturer fra svampens egne celler som den danner ved at penetrere værtsplantens cellevægge og vokse ind i værtsplantens celler, hvor haustoriet således optager næring og vand direkte fra det indvendige af de af værtens celler, som er angrebet. Denne strategi kræver at den sygdomsfremkaldende svamp både holder de angrebne cellerne i sin værtsorganisme i live på samme tid med at den forårsager væsentlige ændringer i cellernes struktur og biokemi for at kunne snylte på værtsplanten. Værtsplanten vil derimod forsøge at afbryde den angribende biotrofe svamps mulighed for vand og tilførelse af næring ved at iværksætte et program for at den angrebne celle og eventuelt også nogle af de omkringliggende celler disintegrerer og dør. Denne proces kaldes programmeret celledød, fordi den angrebne plantecelle selv iværksætter programmet for celledød. Omvendt vil den angribende biotrofe organisme forsøge at undertrykke værtscellernes programmerede celledød ved at sende en række forskellige signaler direkte ind i værtscellerne. Disse signaler består af kemiske stoffer og komplekse molekyler som har til formål at snyde og "kapre" kontrol med værtscellernes eget styresystem. Omvendt igen, har nogle planter og forskellige sorter af afgrøder en evne til at genkende disse signaler fra den angribende mikroorganisme og reagere på dette.

Ud over at benytte sig af programmeret celledød, har planter en række andre muligheder for at forhindre angribende mikroorganismer i at etablere en infektion. Planten har mulighed for at forstærke sin cellevæg så den angribende mikroorganisme ikke kan penetrere den og etablere de nødvendige cellulære strukturer, som f.eks. *haustoria*. Ligesom den programmerede celledød beror dette på plantens evne til at genkende den angribende mikroorganisme. Det kan være forskellige kendetegn ved en angribende mikroorganisme som en plante kan genkende, f.eks. biokemiske strukturer af mikroorganismens cellevæg eller stoffer og signaler som mikroorganismen udskiller. Sådanne stoffer kan være de komplekse molekyler, som en angribende mikroorganisme bruger i sit forsøg på at overtage kontrollen med den potentielle vært, som beskrevet ovenfor. For at kunne genkende sådanne signaler og biokemiske kendetegn hos en angribende mikroorganisme er planterne nødt til at have bestemte varianter af gener med den rigtige DNA-sekvens som koder for en receptor, der genkender den angribende mikroorganismes biokemiske kendetegn eller de signal og komplekse molekyler den udskiller til planten. Et sådant gen kaldes et resistens gen og betegnes ofte R. Ligeledes afhænger tilstedeværelsen af et sådant for planten genkendeligt signal, at der er et gen med en bestemt DNA-sekvens i den angribende mikroorganisme, som med sin DNA koder anviser, hvordan det pågældende kendetegn udformes. Et sådant gen kaldes et avirulens gen (Avr). Match og mis-match mellem R gener i en afgrøde og Avr gener i en angribende mikroorganisme er derfor et væsentligt kriterie for hvorvidt en mikroorganisme er i stand til at inficere og etablere sygdom i en afgrøde eller om afgrøden kan stoppe infektionsprocessen.

4.5.2. Dynamik af sygdomme i afgrøder og brug af plantebeskyttelsesmidler

Det mønster af plantesygdomme og varianter af angribende mikroorganismer som afgrøder udsættes for er ikke statisk. Der sker en konstant forandring af de mikroorganismer som forårsager sygdommene og nye varianter opstår hele tiden, bl.a. fordi Avr gener i mikroorganismene ændrer sig. Dette betyder at det er nødvendigt at have en konstant tilpasning af afgrøder til det tilstedeværende sygdomsmønster i afgrøder fra sæson til sæson (se kapitel 7). Ved situationer med manglende resistens vil brugen af plantebeskyttelsesmidler øges. Omvendt vil brug af sorter med høj resistens over for et bredt spektrum af mikroorganismer, som forårsager sygdomme, nedsætte brugen af plantebeskyttelsesmidler. I det følgende afsnit gennemgås en række eksempler på brug af præcisionsforædling til at opnå resistens i afgrøder mod sygdomsforårsagende mikroorganismer.

4.5.3. Meldugresistens i hvede

Meldug er en udbredt sygdom i mange kulturplanter, herunder de kendte kornsorter (Se faktaboks 4.4). Meldug er en biotrof svamp som angriber det yderste cellelag af sin vært, typisk på bladene. Ved at etablere haustoria i sin værts celler kan meldug suge de nødvendige biokemiske stoffer fra sin vært som melduggen således snylter på. Som beskrevet ovenfor kræver dette at melduggen er i stand til at overtage kontrollen med de angrebne celler hos planteværten. Et gen kaldet MLO er blevet identificeret i byg i 1942, hvor det viste sig, at bygsorter med den rette DNA-sekvens af dette gen var resistente over for angreb af alle typer af meldug af arten *Blumeria graminis*. Således var denne type resistens uafhængig af den genetiske profil af en bygplantens R gener, og ligeledes melduggens Avr. Derfor er alle sorter, som indeholder den resistens-associerede variant af MLO, resistente over for meldug. Dette gør MLO genet særligt effektivt til at forædle sorter med meldugresistens. Genet er kodende for et protein, som er lokaliseret i bygplantens cellemembraner. Hvis dette protein ikke er til stede i bygplantens cellemembran, er meldug ikke i stand til at penetrere byggets cellevæg og etablere sig med et haustorium.

MLO genet findes også i hvedearternes kromosomer. Men da hvedearternes samlede genom består af en hybrid af 2-3 forskellige arter, findes MLO genet ikke kun ét, men op til tre forskellige steder i hvedeplantens genom. MLO resistensen opnås kun, hvis den DNA-sekvens, som er associeret med meldugresistens, er til stede i alle de 2-3 steder i en hvedesorts genom. Dette skyldes at resistensen er afhængig af at MLO genet ikke er funktionelt, og således vil evt. øvrige funktionelle varianter af genet kunne kompensere for et ikke-funktionelt gen. Dette kaldes et recessivt træk.

Ligesom det tidligere har været i byg, er meldug i hvede stadig et udbredt problem. Men på trods af at MLO genet også findes hos hvede, har det ikke været muligt at evaluere, hvorvidt dette gen også kan give resistens i hvede over for meldug før 2014, hvor et kinesisk forskerhold i *Nature genetics* publicerede et studie, hvor de med præcisionsforædling er i stand til at udvikle en brødhvedesort med resistensvarianten i alle sine MLO gener (Wang et al., 2014). I dette studie påviste forfatterne, at både teknologien TALEN og teknologien Crispr/Cas9 var effektive metoder til præcisionsforædling af meldugresistent hvede med præcise mutationer i MLO generne.

Det er sidenhen lykkedes at fremstille meldugresistent brødhvede med kombination af mutationer i de forskellige MLO gener med kemisk mutagenese. Men ved kemisk mutagenese er det nødvendigt ved kryds mellem forskellige linjer at kombinere tre forskellige planter, fordi der er tre forskellige MLO gener i brødhvede. Desuden kræves der en omfattende screeningsproces mellem flere tusinde forskellige individer af planter, som har været udsat for den behandling med de cytotoxiske kemikalier, som inducerer vilkårlige mutationer i DNA.

Tilsammen er dette en langt mere omfattende og tidskrævende proces end brugen af præcisionsforædling. Desuden kan den omtalte kinesiske metode med præcisionsforædling potentielt anvendes på elitehvedesorter og etablere MLO-baseret meldug resistens uden ændring af sortens øvrige gener. I modsætning til dette er MLO-resistens i hvede baseret på kemisk mutagenese begrænset til kun de sorter, hvor en veldefineret mutagenese-population er etableret, og desuden påføre sorten en stort antal vilkårlige mutationer i sortens genom, med risiko for tab af eliteegenskaber.

4.5.4. Sygdomme i ris

Rice blast [dansk navn eksisterer ikke] er en udbredt sygdom i ris og udgør et stort globalt problem ved at forårsage udbredte og massive tab af udbytter. Sygdommen skyldes infektion af svampen *Magnaporthe oryzae*. Svampen inficerer sin værtsplantes celler ved at penetrere plantens cellevæg og etablere sin celler inde i værtsplantens celler, som den således snylter på. Risplanten er i stand til at genkende svampen og iværksætte et moderat respons. Dette respons er dog permanent nedreguleret af en faktor i plantens egne celler, som kodes af genet *OsERF922*. Ved præcisionsforædling med teknikken CRISPR/Cas9 er det lykkedes at udvikle ris sorter med væsentligt forhøjet resistens mod rice blast.

Forhøjet resistens mod rice blast kan således adderes til eksisterende eliterissorter ved præcisionsforædling, uden at sortens øvrige egenskaber ændres, herunder at der sker udbyttetab. Ved brug af kemisk eller fysisk mutagenese ville sortens øvrige DNA blive ændret væsentligt pga. vilkårlige mutationer.

4.5.5. Andre sygdomme

Ved præcis mutagenese af genet *DMR6* i tomat med CRISPR/Cas9 teknik er det lykkedes at opnå en bredspektret sygdomsresistens. Tomaterne var således resistente overfor vidt forskellige angribende mikroorganismer, herunder: *Pseudomonas syringae*, *Phytophthora* spp., *Xanthomonas* spp. Genet *DMR6* koder for et enzym, som har en nedregulerende rolle i forhold til signaler i planter som aktiverer resistensmekanismer mod sygdomsfremkaldende mikroorganismer. Sorter med præcisionsforædling af genet *DMR6* har således et forhøjet resistensniveau. Denne egenskab vil ligeledes kunne adderes til tomatorter og eventuelt også andre frugtproducerende arter.

4.6. Tilpasning til klimabegivenheder

Ekstreme klimabegivenheder som tørke, perioder med ekstrem hede eller kulde, oversvømmelse af landbrugsjord udgør en trussel mod fødevareproduktion. I det følgende gives et eksempel på strategier af præcisionsforædling i forhold til sådanne trusler.

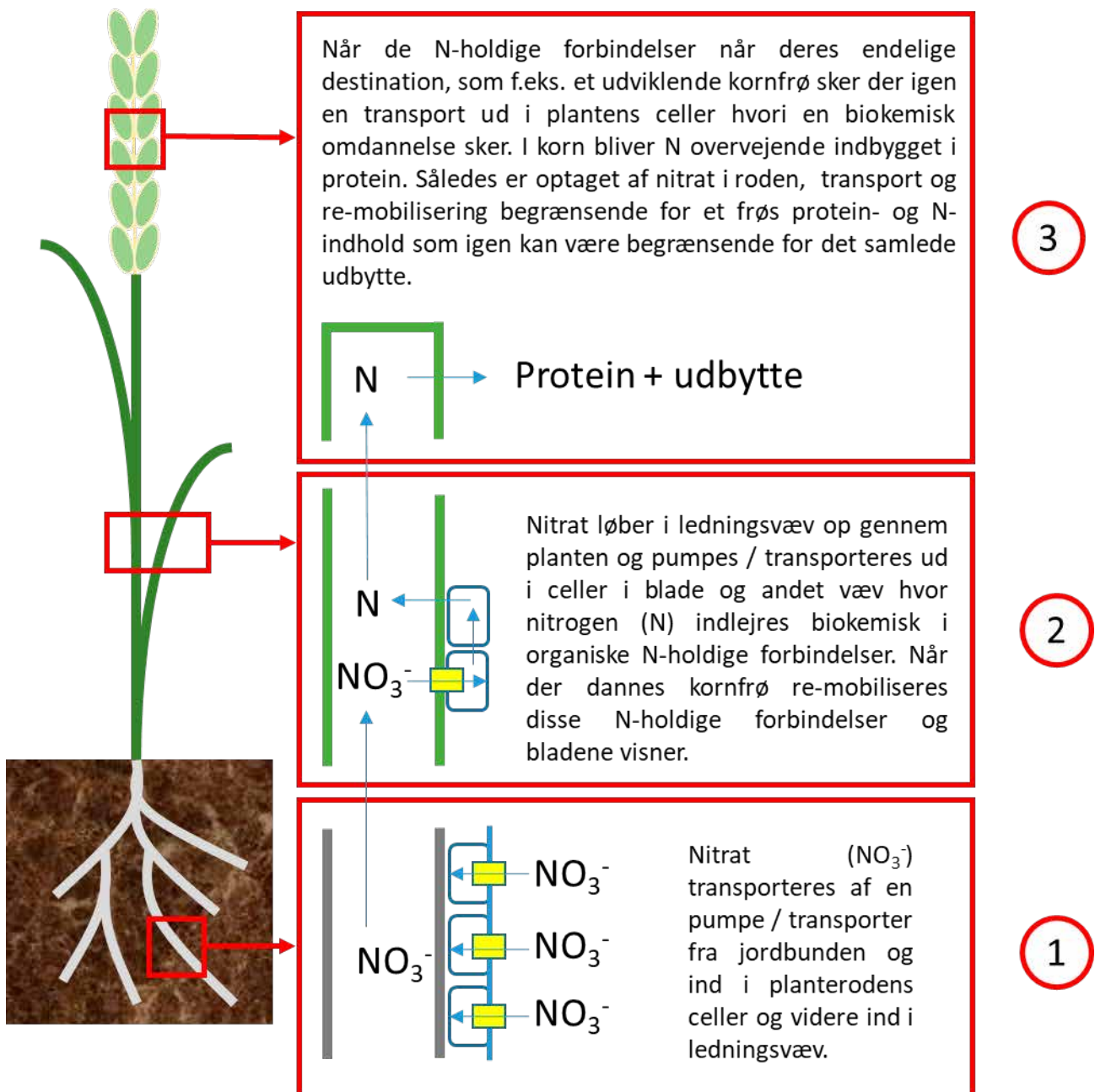
Ved ekstrem varme ødelægges mange frugtafgrøders blomster, hvorved der sker et væsentligt udbyttetab ved at planterne sætter væsentligt færre frugter. I tomat har præcisionsforædling løst dette problem ved at indføre præcise mutationer i et gen, som relaterer til blomst og frugtudvikling. Denne egenskab kan derfor ved brug af præcisionsforædling tilføjes eksisterende tomatsorter (Klap et al., 2017).

Brugen af præcisionsforædling har været brugt til at opnå ris med en væsentligt højere tolerance for tørkestress (Lou et al., 2017).

I andre tilfælde har præcisionsforædling været brugt til at påvise et potentiale for bedre resistens mod ekstreme klimabegivenheder. Således viser et studie at et gen kan være involveret i tolerance overfor ekstrem kulde i ris (Shen et al., 2017).

4.7. Brug af præcisionsforædling til optimering af nitrogengødsning og afgrøders evne til at optage nitrogen

For mange afgrøder gælder ved produktion, at tilgængelighed af nitrogen er en begrænsende faktor for både udbytte og kvalitet. Planter optager som udgangspunkt primært nitrogen (N) som nitrat (NO_3^-) fra jordbunden. Nitrogengødsning er en mulighed for at højne en jordbunds indhold af tilgængelig nitrogen. Planter optager nitrat ved aktivt at pumpe nitrat ind i plantens celler. I planteceller sidder der derfor pumper opbygget af molekyler, som er i stand til at genkende og transportere nitrat ind i en plantecelle. Disse nitrat-pumper/-transportere sidder på ydersiden af planters rødder, hvor de spiller en essentiel rolle for selve optagelsen af nitrat ind i planten, men de findes også inde i plantens væv, hvor de er medvirkende til at fordele nitrat rundt i en plantes organer ved aktiv transport (se figur 4.3).



Figur 4.2. Beskrivelse af hvorledes nitratpumper spiller en væsentlig rolle for planters evne til at optage nitrogen fra jordbunden. Afgrøders evne til at optage nitrat er afgørende for deres NUE (nitrogen use efficiency). Et højt NUE giver mulighed for højere udbytte og/eller bedre afgrøde kvalitet og er særligt af betydning i forhold med begrænset nitrogen gødskning. Et højt NUE nedsætter desuden risiko for udvaskning af nitrogen til vandmiljøet.

Planters evne til at optage nitrogen fra jordbunden varierer meget fra art til art, og for afgrøders vedkommende kan denne evne også variere en del mellem forskellige sorter. I forbindelse med dyrkning af afgrøder arbejdes der med fokus på en sorts evne til at udnytte den eksisterende tilgængelige nitrogen i jordbunden. Denne evne, som ofte betegnes NUE (nitrogen use efficiency), kan opgøres på flere måder. Dels kan man måle udbytte i forhold til tilgængeligt kvælstof, man kan måle andelen af tilgængelig kvælstof som optages i den dyrkede plantes samlede biomasse eller kun i en specifik del af planten – som f.eks. frø. I alle tilfælde gælder at NUE er afhængig af en sorts genetisk bestemte fysiologi, som relaterer til nitrogenoptag. NUE kan derfor optimeres ved forædling.

NUE er af særligt af væsentlig interesse for at optimere udbytte og kvalitet under forhold med begrænsning af nitrogen-tilføring ved begrænset gødsning. Desuden giver en genetisk optimering af en afgrødes NUE en lavere risiko for udvaskning af nitrogen til vandmiljøet.

I tidsskriftet *Molecular Plant* fra 2017 (Lu and Zhu, 2017) påviser en kinesisk forskningsgruppe fra Shanghai, at præcisionsforædling kan bruges til at forbedre NUE i ris. Strategien for præcisionsforædling, som denne gruppe anvender, er baseret på et tidligere kinesisk studie, hvori en væsentlig forskel i NUE mellem to forskellige underarter af ris undersøges. I dette studie undersøges de to underarter af ris (*Oryza sativa* L.), som kaldes henholdsvis japonica og indica. Underarten indica har som regel et væsentligt højere NUE end japonica. Gruppen finder at denne forskel skyldes en enkelt variation i ét gen, som koder for en pumpe/transporter af nitrat. Varianten er blot én enkelt base i genets DNA, som varierer mellem de to underarter (Hu et al., 2015). Studiet konkluderer desuden, at den variation, som giver et højt NUE og desuden også et højere udbytte, er opstået i risunderarten indica i den tidlige fase af risdyrkingen i forhistorisk tid, og at mennesker i denne periode har været medvirkende til at selekttere risplanter med denne genvariant ved dyrkning. Ved præcisionsforædling er det lykkedes at indføre denne ene variation i en base i genets DNA i japonica ris, hvorved dennes NUE steg markant.

Det ovennævnte studie giver grund til at vurdere, at NUE på tilsvarende vis kan forhøjes i andre afgrøder ved hjælp af præcisionsforædling. Det er i teorien muligt, at en tilsvarende ændring af genet for den nitratpumpe/-transporter, som kan give et væsentligt højere NUE, kan opnås med traditionel mutagenese. Men da traditionel induceret mutagenese højest giver en ændring i én ud af ca. 500 baser i et DNA, og idet der kun er tale om en specifik ændring af basen, vil det kræve mutagenese i et meget stort antal planter for at opnå den ønskede variant, og vil desuden betyde introduktion af mange tusinde andre vilkårlige mutationer i den pågældende afgrøde.

4.8. Udbytteparametre

En afgrødes udbytte er typisk afhængig af en række morfologiske faktorer som har med plantens anatomi at gøre. For frøplanter hvor afgrøden udgøres af frøet, er det særligt faktorer som antallet af frøstande, antallet af frø per frøstand og størrelsen af frøene som er afgørende.

I et kinesisk studie (Li et al., 2016) påviser en gruppe forskere, at præcisionsforædling kan bruges til at kombinere lige præcis de varianter i en gruppe af gener, som hver især har med forskellige udbytte-relaterede faktorer at gøre. Forskerne kombinerer en variant af et gen, som giver større riskorn, med en variant i et gen, som giver frøstande med flere ris (frø), og en variant af et gen, som giver mere robuste frøstande. Disse varianter er alle tidligere kendt i sammenhænge med forædling af forskellige rissorter, men i dette studie samler forskerne de omtalte faktorer i én samlet sort ved hjælp af præcisionsforædling, som fokuserer netop på at introducere mutationer kun i disse tre gener alene. En tilsvarende strategi ville være svær at gennemføre ved traditionel forædling, hvor forskellige sorter hver med den optimale genvariant i hver sit gen kombineres ved krydsning, og udfaldet ville være en helt ny sort med mange andre ukendte komponenter som relaterer til udbytte.

Det ovenfor omtalte studie påviser således en strategi for, hvorledes præcisionsforædling kan bruges til at kombinere optimale morfologiske træk i samme sort på en måde, som både er hurtigere og indeholder færre risici for uønskede træk, som kunne opstå ved traditionel mutagenese og forædling.

4.9. Konklusion

Præcisionsforædling er blevet anvendt i strategiske forskningssammenhænge, hvor afgrøder har opnået en lang række effekter, der relaterer bredt til afgrødernes egenskaber. Der er eksempler på afgrøder med højere naturlig sygdomsresistens, bedre kvalitet i form af sundhedsfremmende indholdsstoffer, lavt glutenindhold, bedre udnyttelse af nitrogen – særligt under dyrkningsforhold med begrænset nitrogenadgang.

Ved sammenligning med traditionel forædling og brug af fysisk eller kemisk induceret mutagenese falder eksemplerne på præcisionsforædling i to kategorier:

1. I nogle tilfælde kan den egenskab som opnås ved præcisionsforædling også opnås ved traditionel forædling kombineret med fysisk/kemisk mutagenese, men ofte med længere udviklingstid. Dog skal man være opmærksom på, at ved disse traditionelle metoder opstår et stort antal vilkårlige og ukendte mutationer, og vilkårlige variationer i andre egenskaber øger risikoen for uønskede sideeffekter. Brugen af præcisionsforædling løser dette problem ved præcist at inducere få ønskede mutationer i allerede velbeskrevne sorter. Dette er særligt af betydning for afgrøder og egenskaber med en mere kompleks genetik. Dette gælder når: Der er flere end ét gen, som relaterer til egenskaben, afgrøden formeres vegetativt (som kartofler), eller afgrøden har et kompleks sammensat genom (som f.eks. hvede)
2. I andre tilfælde kan en egenskab opnået ved præcisionsforædling i teorien også opnås ved fysisk/kemisk mutagenese, men er i praksis ikke opnået, fordi der kræves en stor præcision i, hvor mutationerne rammer i DNA. Dette gælder f.eks. tilfældet med hvede med lavt indhold af immunreaktion fremkaldende gluten, hvor præcise mutationer i en familie af et stort antal ens gener er nødvendigt.

Det bemærkes desuden, at et stort antal eksisterende studier af anvendelsesmuligheder af præcisionsforædling er udført i ris, hvorimod studier, som relaterer til afgrøder af særlig dansk interesse, er underrepræsenteret. Dette skyldes ikke et manglende potentiale for brug af præcisionsforædling i afgrøder af dansk interesse, men snarere en begrænset prioritering af denne type forskningsaktivitet.

Referencer

- Hu B, Wang W, Ou S, et al.** 2015. Variation in NRT1.1B contributes to nitrate-use divergence between rice subspecies. *Nature Genetics* **47**, 834–838.
- Ito Y, Nishizawa-Yokoi A, Endo M, Mikami M, Toki S.** 2015. CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the RIN locus that regulates tomato fruit ripening. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **467**, 76–82.
- Jørgensen IH.** 1992. Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley. *Euphytica* **63**, 141–152.
- Klap C, Yeshayahou E, Bolger AM, Arazi T, Gupta SK, Shabtai S, Usadel B, Salts Y, Barg R.** 2017. Tomato facultative parthenocarpy results from SIAGAMOUS-LIKE 6 loss of function. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 634–647.
- Koeck M, Hardham AR, Dodds PN.** 2011. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular Microbiology* **13**, 1849–1857.
- Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H.** 2016. Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Lou D, Wang H, Liang G, Yu D.** 2017. OsSAPK2 Confers Abscisic Acid Sensitivity and Tolerance to Drought Stress in Rice. *Frontiers in Plant Science* **8**, 993.
- Lu Y, Zhu J-K.** 2017. Precise Editing of a Target Base in the Rice Genome Using a Modified CRISPR/Cas9 System. *Molecular Plant* **10**, 523–525.
- Morineau C, Bellec Y, Tellier F, Gissot L, Kelemen Z, Nogué F, Faure J-D.** 2017. Selective gene dosage by CRISPR-Cas9 genome editing in hexaploid *Camelina sativa*. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 729–739.
- Rodríguez-Leal D, Lemmon ZH, Man J, Bartlett ME, Lippman ZB.** 2017. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. *Cell* **171**, 470–480.e8.
- Sánchez-León S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Giménez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F.** 2018. Low-gluten, non-transgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnology Journal* **16**, 902–910.
- Shen C, Que Z, Xia Y, Tang N, Li D, He R, Cao M.** 2017. Knock out of the annexin gene OsAnn3 via CRISPR/Cas9-mediated genome editing decreased cold tolerance in rice. *Journal of Plant Biology* **60**, 539–547.
- Shi J, Gao H, Wang H, Lafitte HR, Archibald RL, Yang M, Hakimi SM, Mo H, Habben JE.** 2017. ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 207–216.
- Sun Y, Jiao G, Liu Z, et al.** 2017. Generation of High-Amylose Rice through CRISPR/Cas9-Mediated Targeted Mutagenesis of Starch Branching Enzymes. *Frontiers in Plant Science* **8**, 298.
- Thomazella DP de T, Brail Q, Dahlbeck D, Staskawicz BJ.** 2016. CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of a DMR6 ortholog in tomato confers broad-spectrum disease resistance. *bioRxiv*, 064824.
- Wang Y, Cheng X, Shan Q, Zhang Y, Liu J, Gao C, Qiu J-L.** 2014. Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* **32**, 947–951.
- Wang F, Wang C, Liu P, Lei C, Hao W, Gao Y, Liu Y-G, Zhao K.** 2016. Enhanced Rice Blast Resistance by CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis of the ERF Transcription Factor Gene OsERF922. *PLOS ONE* **11**, e0154027.

5. Detektion af planter lavet ved NBT. Kan det detekteres?

*Lotte Hougs, molekylærbiolog, Enhed for fødevarer kemi og plantesundhed,
Fødevarestyrelsen, Miljø og Fødevareministeriet*

5.1. Detektion af traditionel genetisk modificerede organismer (GMO) i dag

En klassisk GMO er karakteriseret ved, at der er indsat et større stykke fremmed DNA ved hjælp af genteknologiske metoder. Dette stykke DNA er typisk konstrueret således, at det tilfører planten et nyt protein og dermed en ny egenskab. Denne egenskab har ofte været tolerans over for et sprøjtemiddel (Glyfosat) eller at planten producerer et protein, som bestemte insekter ikke kan tåle (insektresistens).

Det indsatte stykke DNA er en konstruktion, hvor der er en promotor, som er et startsignal til at producere protein, et gen der koder for det ønskede protein, og en terminator, som er et stopsignal, der fortæller at proteinet er færdigt. Mange GMO'er benytter samme promotor og terminator, og desuden benyttes der også ofte de samme gener til de proteiner, der tilføres planten, da det ofte er de samme egenskaber, der ønskes indsat.

Det fremmede DNA er indsat et tilfældigt sted i plantegenomet, men det er undersøgt, hvor det er indsat og præcist, hvad der er sat ind, når en ny GMO godkendes. Således kendes hele den indsatte sekvens sammen med de plantesekvenser, der er tættest på det indsatte stykke. Denne viden benyttes til at lave et detektionssystem, der viser om en bestemt GMO er til stede i et produkt.

Der kan vælges forskellige strategier for at påvise GMO i en prøve, og denne strategi bestemmes ud fra kendskab til prøven. Når der screenes for nogle af de gen-elementer, der hyppigt er brugt i GMO'er, kan et større antal GMO'er påvises med samme metode. Screening bruges på f.eks. økologiske prøver eller såsæd, hvor der ikke forventes at være GMO tilstede overhovedet. Hvis der ved screeningen viser sig at være GMO tilstede, kan der derefter benyttes mere specifikke metoder, der påviser hver enkelt GMO (eventspecifikke metoder). Derved kan det bestemmes præcis, hvilken eller hvilke GMO'er der er tilstede i den pågældende prøve.

Hvis der på forhånd er en forventning om, at der er GMO i en prøve, kan der i stedet vælges at bruge specifikke metoder fra starten, f.eks. til at se efter om der er GMO i prøven, der ikke er godkendt til brug i EU. Denne strategi benyttes f.eks. på prøver, der allerede er mærket med indhold af GMO.

Det er kendt, hvilke elementer de enkelte GMO'er indeholder, så når en screening viser, at der er et eller flere elementer tilstede, kan en oversigt benyttes til at finde ud af, hvilke GMO'er der sandsynligvis er tale om. Derefter undersøges prøven med metoder, der er specifikke for de sandsynlige GMO'er. Der findes forskellige former for beslutningsværktøj, der ud fra resultater af screeningsanalyser hjælper til at finde sandsynlige GMO'er for det opnåede resultat.

Et eksempel på en screeningstabel er vist i nedenstående Tabel 5.1. Tabellen er sorteret efter, om der er raps og soja i den aktuelle prøve og der er påvist promotoren kaldet P35S. Tabellen viser, at der kan være 6 forskellige raps og 10 forskellige soja events, når P35S er påvist. Hvis prøven samtidig var negativ for f.eks. terminatoren T-nos, ville der derefter være 5 raps og 5 soja events tilbage med P35S påvist og T-nos ikke påvist.

Tabel 5.1. Eksempel på en screeningstabel sorteret efter fund ved screeningsanalyser (Screening_tabelle_gvoNachweis fra 2018 Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL, Germany)).

Event	Unique Identifier (first event mentioned)	Plant	P35S		T-nos		CTP2-CP4EPSP ^S		bar		35S-pat		cry1Ab/Ac	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Laurical 23-198 (Event 23)	CGN-89465-2	canola	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laurical 23-18-17 (Event 18)	CGN-89111-8	canola	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Liberator L62 (pHoe6/AC)	ACS-BN009-3	canola	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
OXY235	ACS-BN011-5	canola	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
T45 (LibertyLink)	ACS-BN008-2	canola	+	+	-	*	-	-	-	*	+	+	-	-
Topas19/2 (HCN 10, HCN 92 LibertyLink)	ACS-BN007-1	canola	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
260-05	DD-026005-3	soybean	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
356043	DP-356043-5	soybean	+	+	-	*	-	-	-	-	-	-	-	-
A2704-12	ACS-GM005-3	soybean	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
A2704-21, A5547-35	ACS-GM004-2	soybean	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
A5547-127 (LibertyLink)	ACS-GM006-4	soybean	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
G94-1, G94-19, G168	DD-026005-3	soybean	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GTS 40-3-2 (Roundup Ready)	MON-04032-6	soybean	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
GU262 (LibertyLink)	ACS-GM003-1	soybean	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
SYHT0H2	SYN-000H2-5	soybean	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
W62, W98 (Liberty Link)	ACS-GM001-8	soybean	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Selve metoden, der benyttes til at detektere de fleste GMO'er, er realtime polymerase kædereaktion (realtime PCR). Metoden har en cyklus af forskellige temperaturer, hvorved en DNA-polymerase kopierer et forudbestemt stykke DNA. I princippet er det en kopimaskine, der kopierer et bestemt stykke DNA, så antallet af kopier fordobles for hver PCR-cyklus, der udføres. Generelt udføres mellem 40 og 45 temperatur-cykler, og dermed kan selv et enkelt DNA-stykke blive til millioner af kopier i en PCR reaktion. Dermed kopieres et udvalgt stykke DNA til så mange kopier, at det er muligt at måle dem.

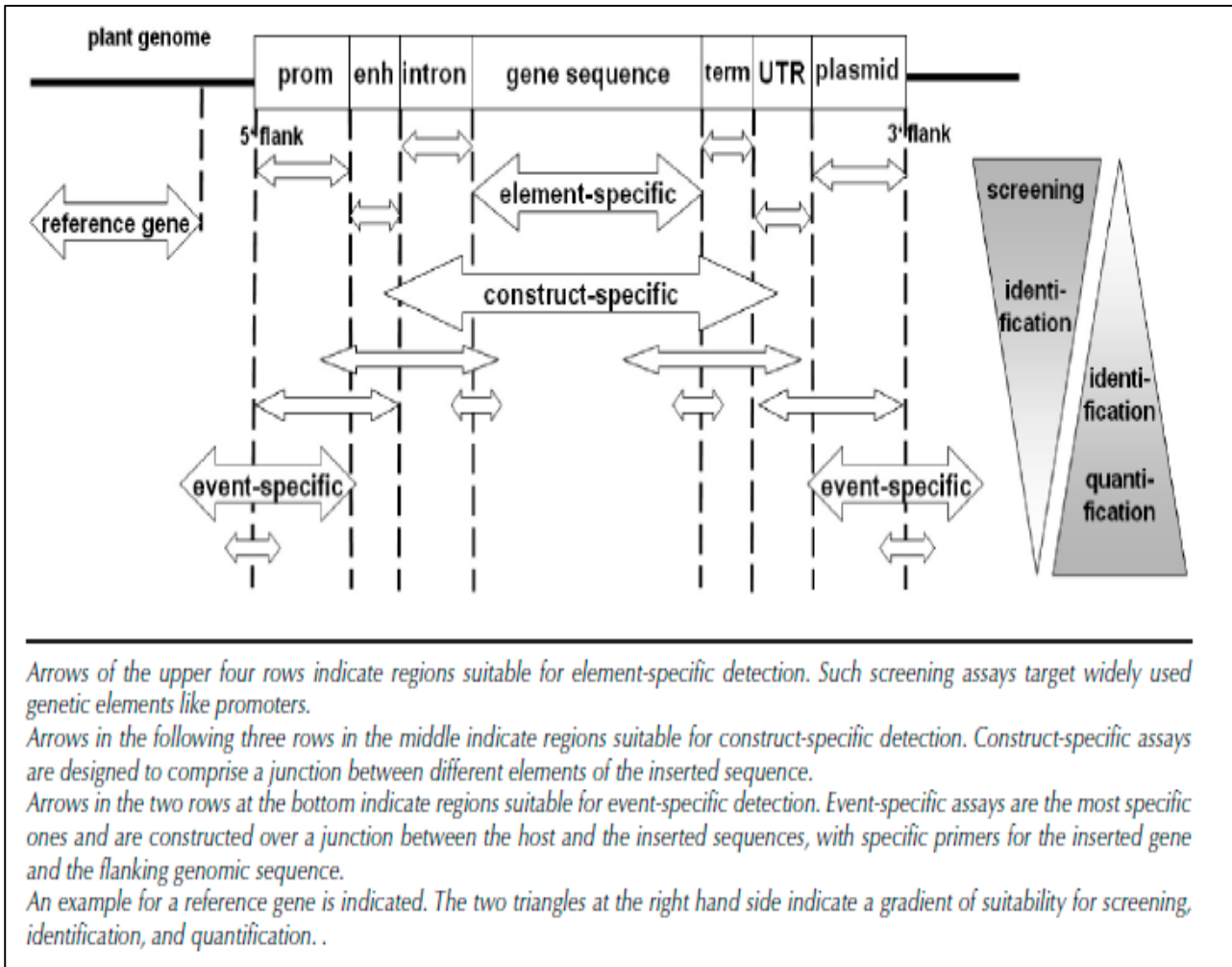
Til realtime PCR designes 3 kunstige stykker DNA (2 primere og en probe), der genkender de DNA-sekvenser, der skal påvises. De to primere er i hver ende af det ønskede stykke DNA, medens proben er imellem primerne. For hver kopi primerne genererer, kommer proben til at frigive et fluorescerende signalstof. Fluorescensmængden måles for hver cyklus (deraf navnet "realtime"), og det kan beregnes, hvor mange kopier af DNA, der er lavet i hver cyklus i PCRen, når der er inkluderet referencemateriale med kendt kopital i det aktuelle assay.

Tilsvarende benyttes en realtime PCR-metode, der genkender sekvenser, der f.eks. er tilstede i en genom-kopi i alle soja-genomer, men ikke i andre kendte plantegenomer. Dette kaldes for et referencegen og det benyttes til at beregne, hvor stor en andel af soja i en prøve, der er GMO-soja. Dette gøres ved at tage forholdet mellem det antal kopier af soja, der påvises, og det antal kopier af en GMO, der er påvist.

Alt efter hvilken specificitet der ønskes (element-, konstruktions- eller eventspecifik), designes primere og prober til at genkende forskellige stykker af det indsatte DNA.

Til den eventspecifikke realtime PCR udnyttes, at hver GMO har en helt unik overgang mellem plantegenomet og det indsatte stykke DNA. Den ene primer designes f.eks. til at genkende overgangen mellem plantegenomet og det indsatte stykke DNA, medens proben og den anden primer genkender det indsatte stykke DNA. På den måde kan det sikres, at metoden udelukkende genkender den specielle ønskede GMO. Figur 5.1 illustrerer

7 elementer sat ind i en plante og hvilken grad af viden, der opnås ved at placere primere på forskellig måde i det indsatte stykke DNA.



Figur 5.1. Schematisk tegning af en transformationskonstruktion, der viser 7 elementer indsat i et plantegenom gennem et unikt transformationsevent og derfor flankeret af en specifik DNA-sekvens fra plantegenomet. (Lusser et al., 2011)

Påvisning af GMO kræver en vis form for forhåndsviden. En GMO der er konstrueret med elementer, der normalt ikke er benyttet i andre GMO'er, vil være svær at finde, da der typisk screenes med elementer, hvor det er kendt, at de har været brugt før til konstruktion af GMO. For at en GMO kan godkendes til brug i EU, skal firmaet udlevere både sekvens og en metode til at påvise GMO'en, så for GMO'er, der enten er godkendte i EU eller på vej igennem godkendelsesprocessen, kendes hele den indsatte sekvens og de nærliggende regioner. Desuden foreligger både en metode og referencemateriale, således at metoden blot skal indføres i kontrollaboratoriet, hvor det verificeres at den fungerer.

5.2. I hvilket omfang kan SDN detekteres?

De SDN'er, hvor der indsættes større stykker DNA (SDN3) f.eks. fra samme plante eller beslægtede arter, vil kunne påvises på samme måde, som GMO'er påvises i dag. Når der er en unik overgang mellem plantegenomet og det indsatte stykke DNA, vil det altid være muligt at påvise denne overgang, uanset hvilken genteknologisk metode der er brugt. Dette gælder f.eks. cisgenese og intragenese. Dette er dog under forudsætning af, at der er kendskab til overgangen mellem plantegenomet og det indsatte stykke DNA. Da der ikke er fremmed DNA, der kan påvises ved screening, men kun DNA fra samme eller beslægtede arter, er der ikke mulighed for at lede efter sekvenser, der ikke bør være tilstede i planten. Kendskab til planter, der er forædlet med SDN1 og SDN2, kan opnås enten fra oplysninger fra forædler eller f.eks. fra patentdatabaser, hvor det kan søges frem, hvis der ansøges om patenter på en ny plante. Stadig skal der være en viden om, hvad der skal søges på enten sekvensmæssigt eller nøgleord i beskrivelserne, hvis der skal være en rimelig mulighed for at finde frem til en plante, der er frembragt med SDN.

SDN3-planter med større forandringer vil kunne påvises til et niveau på 0,1% svarende til detektionsgrænsen på GMO planter i dag.

SDN1- og SDN2-planter, hvor der er lavet enkelt baseændringer, indsat meget små stykker DNA eller fjernet DNA, vil være nærmest umulige at påvise, specielt på lave niveauer. En enkelt mutation vil kunne påvises med forskellige molekylærbiologiske metoder. Det kan dog resultere i specificitetsproblemer, når det kun er en enkelt baseændring, der er foretaget. For at kunne påvise en enkelt mutation eller små deletioner eller indsættelser er det helt nødvendigt at kende til ændringen, der skal søges efter. Det er ikke muligt at screene, da det, der er ændret, vil være helt unikt for hver SDN-plante. Desuden vil det være vanskeligt at nå ned på en detektionsgrænse på 0,1% med en del af de molekylærbiologiske teknikker, der kan påvise enkeltmutationer.

De planter, der er lavet f.eks. ved podning af almindeligt plantemateriale på en rod af SDN-materiale, vil ikke kunne genkendes, hvis det er frø eller blad-materiale, der undersøges. Hvis det er rod-materiale, kommer det an på den ændring, der er foretaget på rodmaterialet. En SDN-plante, hvor der først er foretaget en ændring, og ændringen derefter er krydset ud af planten igen, vil ikke adskille sig fra almindelige planter og vil dermed slet ikke kunne påvises ved en test.

5.3. Kan SDN-planter adskilles fra traditionelt forædlede planter, herunder muterede planter.

Muligheder og konsekvenser

Planter, hvor der er benyttet SDN til præcisionsforædling, vil ofte blot have enkeltbaseændringer eller meget små deletioner eller indsættelse af 1-10 baser. En del af disse ændringer forekommer allerede naturligt, og andre har tidligere været eller vil kunne introduceres ved hjælp af mutationsforædling med kemiske og /eller fysiske metoder.

Selvom der er teknikker, der kan påvise f.eks. enkeltbaseforandringer, vil det altså ikke være muligt at fortælle noget om oprindelsen af ændringen. SDN1 og SDN2 efterlader ikke nogen form for markering på DNA'et om, at det er den teknik, der er benyttet frem for andre ældre teknikker.

Når det ikke er muligt at se, hvordan en mutation er frembragt, betyder det, at der vil skulle laves et andet system til at registrere SDN1- eller SDN2-planter, hvis de skal reguleres. Dette system må være data-baseret, således at de specifikke mutationer/ændringer i SDN-planter kan/skal registreres et samlet sted. Der vil ikke være nogen laboratiemæssig sikker metode til at kontrollere, om dette sker.

5.4. Konklusion

Den anvendte modifikation indført i en plante har afgørende betydning for, om en SDN-plante kan påvises på samme måde som klassiske GMO planter.

1. Planter, der indeholder et større stykke DNA fra planten selv eller beslægtede arter, og som er indsat på et nyt sted i genomet ved hjælp af SDN3, vil kunne påvises med specifikke metoder svarende til Event-specifikke GMO-metoder. Der vil som oftest ikke være mulighed for screening af de enkelte elementer, da de også vil forekomme i planten naturligt.
2. Planter der indeholder enkelt-mutationer eller små indsættelser eller deletioner (SDN1 og SDN2) vil som regel kunne påvises, hvis der er specifik viden om den ændring, der er sket. Det er dog ikke muligt at afgøre, om ændringen skyldes SDN, er naturligt forekommende eller fremkommet ved klassisk forædling, fordi genomet viser det samme, uanset hvordan forandringen er fremkommet.

Hver enkelt ændring, der er lavet med SDN, vil skulle påvises med en eventspecifik metode, da det ikke er muligt at screene på samme måde som ved GMO og derved lede efter noget ukendt. Det er nødvendigt at have helt præcis forhåndsviden om, hvad der skal ledes efter, for at det er muligt at påvise en SDN-plante. Nogle SDN-planter vil være lette at påvise, hvis sekvensen for overgangen mellem plantegenom og det indsatte er kendt (SDN3). En del af SDN-planterne vil være mere vanskelige at påvise, og vil formentlig ikke kunne påvises, når de kun udgør en lille andel af f.eks. et kornparti (SDN1 og SDN2). Det er ikke muligt at bestemme SDN1 og SDN2 ændringer som SDN-planter, fordi mutationerne er identiske med mutationer, som kan forekomme naturligt.

Referencer

Lusser M, Parisi C, Plan D, Rodriguez-Cerezo E. New plant breeding techniques. State of the art and prospects for commercial development. 2011. <http://ipts.jrc.ec.europa.eu/publications/pub.cfm?id=4100>

Screening_tabelle_gvoNachweis fra 2018 *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL, Germany)* https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/screening_tabelle_gvo-Nachweis.html?nn=1401078&v=2%2F&__blob=publication%E2%80%8CFile

6. Sammenligning af præcisionsforædling med konventionelle forædlingsteknologier

Per L. Gregersen, Inger Bæksted Holme, Kim H. Hebelstrup, Lotte Hougs & Henrik Brinch-Pedersen

Som en opsummering på denne rapport gennemgang af metoder og muligheder i den konventionelle planteforædling og i den nye præcisionsforædling (kapitel 1-5) laves her en sammenligning af traditionel forædling, klassisk mutationsforædling og præcisionsforædling.

6.1. Hvordan ser slutproduktet ud?

Hvis målet for en forædlingsproces er baseret på introduktion/ændring af enkeltgen-baserede træk, er der ikke nødvendigvis nogen forskel på slutproduktet, i forhold til om der anvendes traditionel forædling, mutationsforædling eller præcisionsforædling. Traditionel forædling med kombination eller introduktion af eksisterende gener, der er tilstede i genpuljen, har historisk vist sin styrke i forbedring af dyrkede planter, men den har også sine begrænsninger, især i forhold til at introducere specifikke ændringer i bestemte gener for at forbedre en egenskab. Teoretisk ville man med de tre metoder kunne opnå de samme fænotyper, men i praksis ikke de samme genotyper. Primært fordi præcisionsforædling, med SDN1-værktøjer, kan laves meget mere præcist end det gælder for både traditionel planteforædling og mutationsforædling, hvor der vil være et linkage drag af andre gener og mutationer.

6.2. Uønskede effekter

Mht. uønskede effekter er der en klar forskel mellem de tre forædlingsmetoder, når det gælder introduktion af uønskede gener i forædlingsmaterialet. Klassisk planteforædling, når den anvender indkrydsning af gener fra fjerntbeslægtede arter eller typer, giver stor mulighed for indførelse af uønskede gener, som det tager meget lang tid at fjerne ved gentagne tilbagekrydsninger, hvilket ofte vil kræve et præ-forædlingsprogram. Dette gælder ugunstige, negative egenskaber, såsom nedsat udbytte eller lavere kvalitet af høstede produkter. Men det gælder også risikoen for at introducere direkte uheldige egenskaber, såsom højere niveau af toksiske forbindelser. Mht. det første gælder det samme for mutationsforædlingen. Efter selektion af en mutantlinje med en ønsket mutation kan der gemme sig mange uønskede mutationer i linjen, som det kan være vanskeligt at komme helt af med i et tilbagekrydsningsprogram. Præcisionsforædlingen, hvor strategien er optimeret til at undgå off-target mutationer, skiller sig ud her ved at kunne love, at der kun forekommer mutationer i det gen, som har været målet for mutationsstrategien. Mht. mulige pleiotrope (afledte) effekter af en enkelt introduceret mutation vil situationen være den samme for alle tre metoder. Men jo flere mutationer, der er tilstede, kendte eller ukendte, jo større er sandsynligheden for, at nogle af dem medfører en pleiotrop effekt. Således må forventes flere pleiotrope effekter ved f.eks. klassisk mutationsforædling end ved præcisionsforædling.

6.3. Hastighed og omkostning

Udvikling af en enkelt sort kræver i klassisk forædlingsarbejde som regel mange år (for hvede omkring 10 år). Den krævede tid forsøges dog til stadighed afkortet, især ved at forkorte generationstiden og antallet af generationer pr. år. Under alle omstændigheder vil forædling af nye sorter vedvarende forblive en mangeårig proces. Forhåbningerne til mutationsforædling var oprindeligt, at den kunne være en genvej til at introducere ekstra nye egenskaber i elitesorter på en kortere tid, end det ville tage at udvikle en ny sort fra en krydsning. På grund af off-target mutationer viste det sig dog ikke at holde stik, fordi der kræves mange tilbagekrydsninger, og dermed igen tid, for at fjerne disse uønskede mutationer. Forhåbningerne til præcisionsforædlingen er for så vidt de samme som oprindeligt for mutationsforædlingen, nemlig at nye egenskaber kan introduceres i elitesorter og dermed forkorte tiden til fremstillingen af en ny forbedret sort. Metodemæssigt er der grundlag for at forudsige, at forhåbningerne i dette tilfælde kan indfries, idet raten af off-target mutationer vil være meget lav ved brug af præcisionsforædlingens SDN1-værktøjer. Det vurderes derfor som værende realistisk, at elitesorter forholdsvis let og hurtigt vil kunne forbedres ved hjælp af præcisionsforædling.

Det er værd at fremhæve, at i afgrøder med komplekse genomer, f.eks. hvede eller kartoffel, har præcisionsforædling en særlig fordel i tid og omkostninger i forhold til både traditionel forædling og klassisk mutationsforædling. Ligeledes i afgrøder, der formeres vegetativt, f.eks. kartoffel, pryddplanter samt frugt og bærafgrøder, kan multiplex præcisionsforædling anvendes til at kombinere forskellige mutationer uden at skulle krydse forskellige sorter.

Planteforædling er en arbejdskrævende proces, og omkostningerne knytter sig især til mangeårige afprøvninger, test og udvælgelse. I den sammenhæng vurderes det, at hverken mutations- eller præcisionsforædling væsentligt vil forøge omkostningerne i deres bidrag til forædlingen, fordi de begge primært kun vil bidrage i de første trin af processen, hvor der introduceres ny variation. Mutationsforædling kræver dog både tidsmæssige og økonomiske engangsomkostninger til etablering af mutantpopulationer. Overordnet vurderes mutations- og præcisionsforædling klart at have mindre omkostninger end klassisk forædling med indkrydsning af genetisk materiale fra beslægtede arter. For præcisionsforædlingen vil dette dog kræve, at sorter fremstillet med denne metode friholdes fra at skulle gennemgå godkendelsesprocedurerne for GM planter, bestemt af EU-lovgivningen. Hvis dette ikke er tilfældet, vil omkostningerne, både tidsmæssigt og økonomisk, være høje pga. langvarig og omkostningstung dokumentation.

6.4. Sporbarhed

Principielt kan alle ændringer i DNA, som er fremkommet ved de tre forædlingsmetoder spores med PCR-teknikker, hvis man på forhånd har kendskab til, hvor i genomet og hvilke ændringer i DNA'et der er foretaget. Det afgørende er dog, at man ikke kan se forskel på, hvilken teknik der har været anvendt til at lave ændringerne. Således vil en DNA-baseændring, som er fremkaldt ved hjælp af konventionel mutagenese, eller blot naturligt muteret, ikke kunne skelnes fra en ændring skabt med præcisionsforædling, hvor SDN1-værktøjer er anvendt. Konsekvensen for regulering inden for dette felt vil være f.eks. at sorter, som er fremstillet med præcisionsforædling, ikke kan identificeres ved import, både af rene sorter og i særdeleshed ikke ved indblandinger.

6.5. Teknologiernes parathed og implementerbarhed

Klassisk planteforædling med alle dens facetter er i høj grad en allerede optimeret proces, som løbende bliver forbedret hos de danske forædlingsvirksomheder, især teknologisk mht. til genotyping baseret på DNA-markører og -sekventeringsteknologier. Man må forudse, at dette vil være en udvikling, som fortsætter ud i fremtiden med uformindsket styrke. Mutationsforædling er en velkendt metode til at introducere ny genetisk variation i forædlingsmateriale, som kunne synes udtømt, i forhold til den vigende interesse hos forældre. Dog er implementering af TILLING-metoderne endnu ikke fuldt udbredt, hvilket kunne, hvis det skete, give mutationsforædlingen en renæssance. Dette kræver etablering af gode mutantpopulationer inden for de enkelte afgrødearter, og det kræver desuden, at screeningsmetoderne til at finde ønskede mutationer etableres. Disse metoder er velkendte, men skal optimeres i forhold til implementering i praktisk forædling, samtidig med at de skal kobles til eksisterende og kommende viden om enkeltgeners rolle for bestemmelse af forskellige egenskaber. Et omfattende tilbagekrydsningsprogram vil stadig være påkrævet.

De nye præcisionsforædlingsteknikker har et endnu større potentiale i at kunne udnytte kendskab til enkeltgeners rolle for planternes egenskaber, fordi de giver mulighed for at lave meget specifikke ændringer/mutationer. Da kendskabet om enkeltgeners rolle stadig er begrænset for de fleste gener, vil potentialet i præcisionsforædlingen blive større og større i takt med den rivende udvikling, der løbende sker i udforskningen af basale molekylære reguleringsprocesser i planter og dermed også i identificeringen af velegnede kandidatgener, som ved mutation kan forbedre bestemte egenskaber. En optimal udnyttelse af potentialet i præcisionsforædling kræver stadig nogle teknologiske fremskridt, for at teknologien kan udnyttes rutinemæssigt i planteforædlingen. Dette gælder især udvikling af metoder til levering af SDN-værktøjer til planteceller, som ikke er afhængige af bestemte genotyper/sorter.

Præcisionsforædlingen, med SDN1-værktøjer, vurderes i fremtiden at kunne implementeres hos planteforældre uden de store ekstra omkostninger og investeringer, fordi der i høj grad anvendes metoder og faciliteter, som allerede er gængse hos planteforædlerne. Dette gælder især anvendelsen af vævskulturer og regenerering af planter derfra. Man kan derfor forudse, at selv små og mellemstore virksomheder inden for planteforædlingen vil kunne udnytte teknologien i deres forædlingsprogrammer. Igen vil dette dog kræve, at sorter fremstillet med denne metode friholdes fra at skulle gennemgå godkendelsesprocedurerne for GM planter, bestemt af EU-lovgivningen, idet omkostningerne til dette kun kan bæres af store virksomheder med stort økonomisk volumen i forædlingsprogrammet. Det er på længere sigt også forventeligt, at ønskede mutationer i en afgrøde rutinemæssigt vil kunne bestilles fra kommercielle virksomheder. En udvikling, som allerede er påbegyndt (<http://www.danziger-innovations.com/Article-23,1239-MemoGene-Applications.aspx>).

6.6. Konklusion

Mutationsforædling og de nye præcisionsteknologier kan ses som ekstra muligheder for en allerede meget effektiv og optimeret planteforædling af vores større afgrødeplanter. Især præcisionsforædlingen vurderes at have et stort potentiale, fordi den er præcis i forhold til placering af introducerede mutationer, og fordi antallet af off-target mutationer kan minimeres. Præcisionsforædlingens potentiale forudses endvidere at kunne stige kraftigt, når den kobles med den fortsatte udvikling i viden om basale molekulære reguleringsprocesser i planter til at kunne udpege velegnede kandidatgener. Hvis præcisionsforædlingen bliver friholdt fra GMO-lovningens krav om godkendelse, vurderes den at kunne anvendes bredt af selv mindre forædlingsvirksomheder til at introducere nye egenskaber i plantesorterne, fordi den ikke er omkostningstung eller kræver store investeringer. Reguleres planter fremstillet med de nye teknologier som GMO, vurderes det, at kun de allerstørste internationale forædlingsvirksomheder vil kunne bære omkostningerne ved at udvikle nye sorter med disse teknologier. I så fald vil det ikke være realistisk for danske forædlingsvirksomheder, og dermed i vid udstrækning for dansk landbrug, at drage nytte af de nye teknologier.

7. Udfordringer i danske landbrugsafgrøder. Kan NBT bidrage?

Birte Boelt, seniorforsker, og Tine Schmidt Nielsen, videnskabelig assistent, Institut for Agroøkologi, Aarhus Universitet

7.1. Aktuelle dyrkningsudfordringer i de fire største afgrøder i dansk landbrug

Dansk landbrug står over for en række dyrkningsmæssige udfordringer i de kommende år. Det gælder i forhold til ændrede klima-/vækstforhold, næringsstofhusholdning og pesticidresistente, sygdomsfremkaldende organismer, skadedyr og ukrudt. Der er en stigende interesse for økologisk produktion, hvor i særdeleshed skadegørere, ukrudt og begrænset adgang til næringsstoffer influerer produktionspotentialer og kvaliteten af de høstede afgrøder.

Samtidig er der stigende fokus på landbrugets klima- og miljøeffekter. Der gennemføres løbende tiltag til reduktion af kvælstof- og fosforudledningen, samt begrænsninger i pesticidforbruget, hvilket suppleres af en generel reduktion i adgangen til plantebeskyttelsesmidler, og landbruget skal bidrage til den grønne omstilling.

Uanfægtet ovennævnte forhold er der behov for en øget produktion af fødevarer, foder og planteprodukter til erstatning af fossile råstoffer.

Ovennævnte illustrerer behovet for, at afgrøder og produktionsmetoder løbende tilpasses de aktuelle dyrkningsudfordringer/-forhold i dansk landbrug. Afgrøder udvikles via planteforædling, hvor der kontinuerligt udvikles nye, forbedrede sorter. I Danmark foregår planteforædling i regi af private virksomheder, og aktiviteterne omfatter landbrugsafgrøderne hvede, byg, roer, kartofler, græs og kløver. Inden for de seneste år er forædling af bælgplanter (hestebønne) genoptaget for at imødekomme behovet for lokalt produceret protein. Nye produktionsmetoder udvikles i samarbejde mellem universiteter, rådgivningstjeneste, virksomheder og praktikere, og de sammensættes til dyrkningsmæssige strategier, som afprøves i lokale rådgivningscentre.

Uafhængig af afgrøde og lokalitet vil følgende faktorer have indflydelse på udbytte og produktkvalitet:

- Vejrforhold i vækstsæsonen
- Sygdomme
- Skadedyr
- Ukrudt
- Gødningstildeling

I oversigt over landsforsøgene, der udgives hvert år af SEGES, er resultater af markforsøg og vækstsæsonens betingelser samlet, og i det følgende tages udgangspunkt i disse resultater til illustration af udbytteudviklingen og aktuelle dyrkningsudfordringer i dansk landbrug.

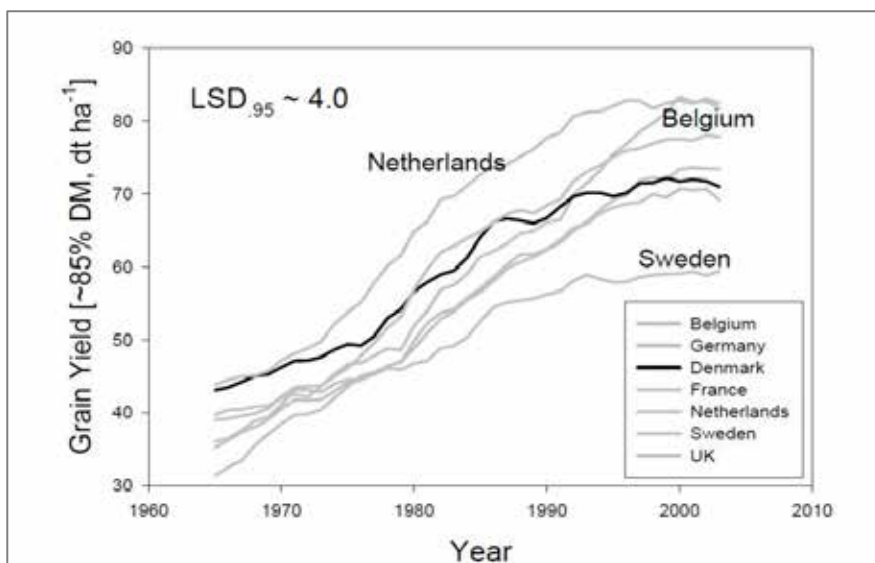
Tabel 7.1. De fire mest dyrkede afgrøder (ha) i Danmark (gennemsnit fra 2008-2017) (Danmarks Statistik, 2017).

Afgrøde	Areal (ha)
Hvede (vår og vinter)	652.969
Byg (vår og vinter)	652.902
Græs- og kløvermark i omdrift	301.701
Raps (vår og vinter)	165.370

De fire afgrøder, som dækker den største del af det dyrkede landbrugsareal i Danmark er hvede, byg, græs- og kløver i omdrift samt raps (tabel 7.1). Særligt kornafgrøderne står over for en række udfordringer primært som resultat af mange års intensiv dyrkning af disse, men også i forhold til ændrede klimaforhold.

7.1.1. Hvede

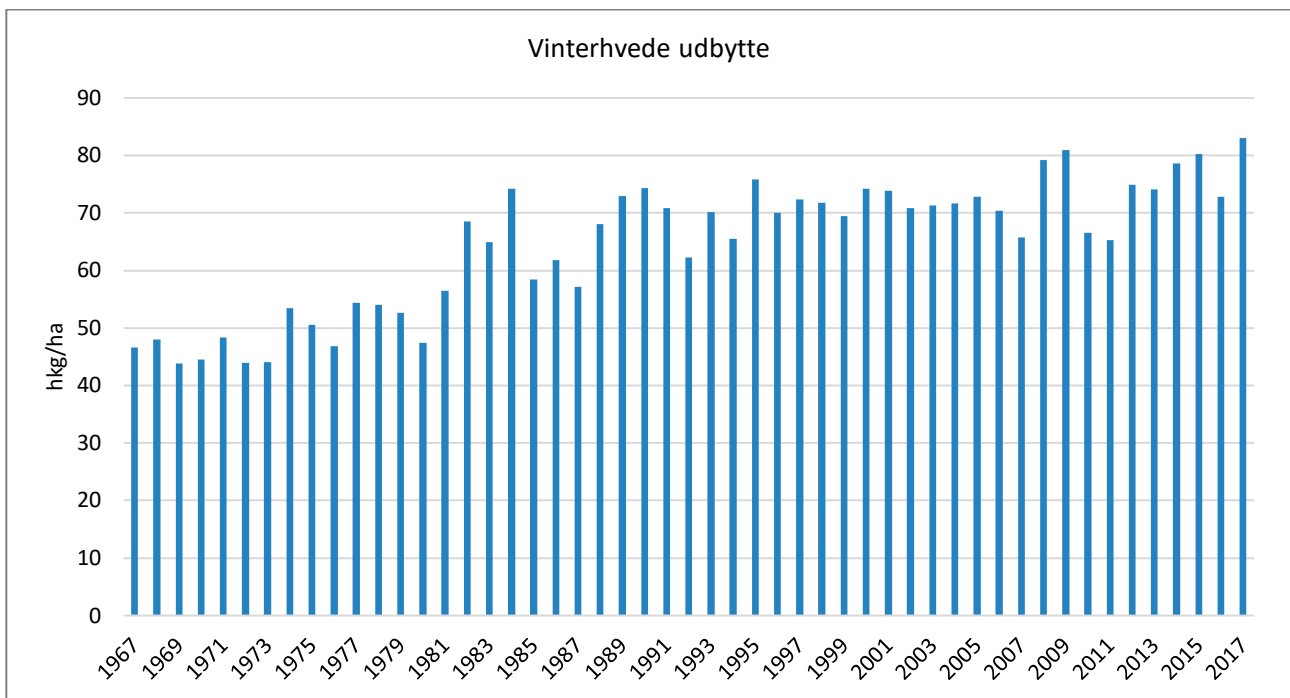
Hvede var den mest udbredte afgrøde i perioden 2008-2017 i Danmark (Tabel 7.1), og den anvendes både til foder og human ernæring i form af mel til brød. Siden midten af 1960'erne og frem til ca. 1990 har der været en generel stigning i hvedeudbyttet på niveau med de andre lande i Nordvesteuropa, som vi normalt sammenligner os med. Men fra 1990'erne og frem til 2010 følger Danmark ikke med lande som Holland og Belgien.



Figur 7.1. Udbytteudvikling i hvede (dt/ha) fra 1965 til 2005 (Petersen et al., 2010).

Figur 7.1 viser udviklingen i hvedeudbyttet fra ca. 1960-2005, hvor de danske udbytter ikke følger den samme stigning som f.eks. Holland og Belgien. Videnssynthesen "Causes of yield stagnation in winter wheat in Denmark" udarbejdet af Aarhus Universitet adresserer problematikken og kortlægger mulige årsager hertil.

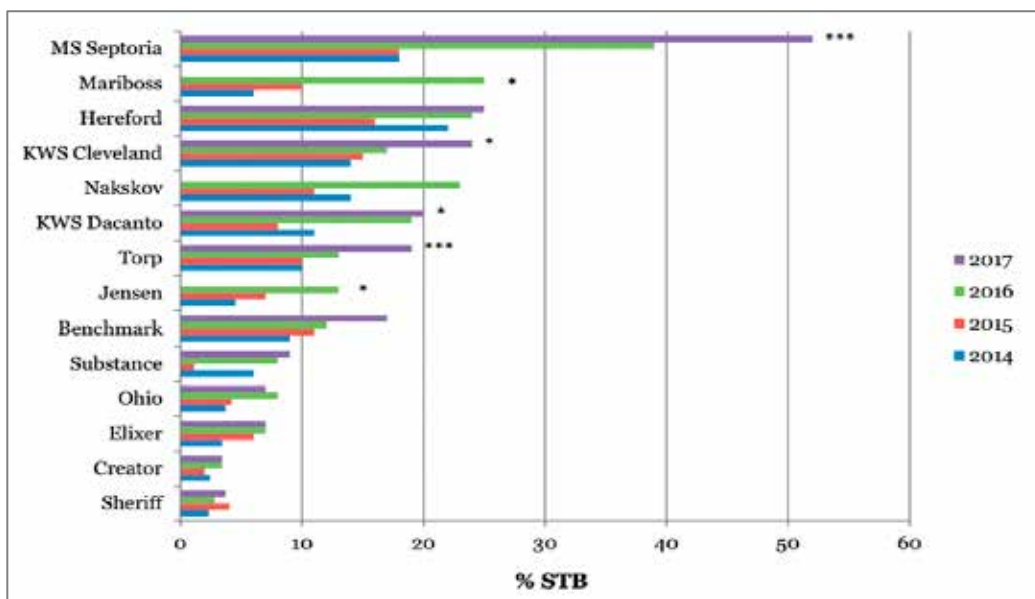
Videnssynthesen fremhæver i særlig grad den reducerede kvælstoftildeling siden 1990'erne og ensidige sædskifter, der bidrager til højt sygdomstryk, som mulige årsager til udbyttestagnation. De ensidige sædskifter kræver sorter, der er konkurrencedygtige mod ukrudt og samtidigt er resistente over for sædskiftesygdomme.



Figur 7.2. Gennemsnitsudbytte for vinterhvede (hkg/ha) fra Landsforsøgene (SEGES, red.)

Figur 7.2 viser de gennemsnitlige vinterhvedeudbytter opnået i Landsforsøgene. Her ses den samme overordnede trend med stagnerende udbytter fra 1990 til omkring 2010 som i figur 7.1, mens man i figur 7.2 efter 2011 igen ser en svag udbyttetigning.

En af de største udfordringer i vinterhvede i Danmark, er bladsygdomme og i særdeleshed Septoria, der forårsager massive udbyttetab, hvis ikke den bekæmpes kemisk eller ved forebyggende brug af resistente sorter.



Figur 7.3. Danske vinterhvedesorters modtagelighed over for *Septoria tritici blotch* (STB) angivet som % STB på forskellige lokaliteter i Danmark fra 2014-2017 (Jørgensen et al., 2018).

Jørgensen et al. (2018) beskriver udviklingen af sorters modtagelighed over for *Septoria*. Figur 7.3 viser, at for mange sorter med vertikal resistens stiger modtageligheden efter en årrække, og det er særligt i de mest dyrkede sorter, at modtageligheden stiger hurtigst.

Der findes i dag ingen 100 % *Septoria* resistente sorter, som man ser det mod f.eks. meldug i byg, hvor mlo-resistensgenet fortsat er effektivt mod sygdommen efter mange års udbredt anvendelse (Andersen et al., 2012). En del af livscyklens for *Septoria* er, at den flere gange på en sæson laver kønnet forering. Det betyder, at svampen optræder som mange forskellige racer, der gør det meget vanskeligt at forædle imod vedvarende *Septoria* resistens (Jørgensen og Nielsen 1999).

Den relativt progressive nedbrydning af resistens i nogle sorter er også et resultat af ensidig dyrkning. Derudover er der en lang latensperiode, der betyder, at man typisk udfører flere præventive fungicidbehandlinger før man kender til angrebets egentlige omfang (Væрге 2015). Dette ville ikke være tilfældet for resistente sorter. I 2014 var der mange steder kraftige angreb af *Septoria* i vinterhvede, primært forårsaget af tidlig etablering i efteråret 2013, samt den milde vinter og efterfølgende mildt forår (SEGES, 2014).

Tabel 7.2. Septoria og gulrust dækning (%) samt modtagelighed og merudbytte ved svampebehandling (hkg/ha) i udvalgte sorter i 2014, (sammenstillet data fra sortinfo.dk og Oversigt over Landsforsøgene 2014)

Sort	% dækning af gulrust	% dækning af septoria	Modtagelighedsgruppe (0-4) Septoria	Modtagelighedsgruppe (0-4) Gulrust	Merudbytte ved svampebehandling
Creator	5	16	1	2	11,4
Sheriff	0,1	18	1	1	9,4
Torp	0,2	27	2	1	14,5
KWS Cleveland	1	33	2	1	16,2
Nakskov	0,5	30	2	2	11,7
Benchmark	4	30	2	3	14,1
Hereford	0,01	38	3	1	16,5
Pistoria	0	29	3	0	13,1
JB Asano	30	23	3	3	33,4

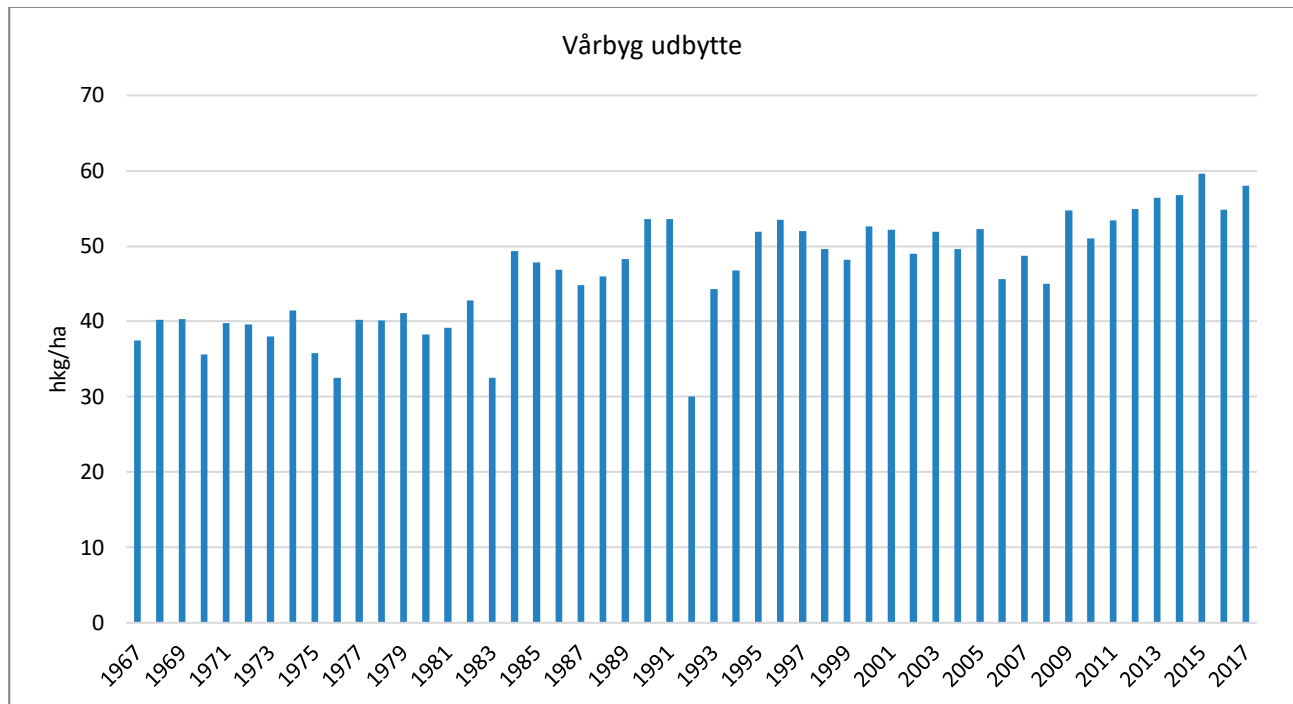
Tabel 7.2 giver et overblik over gulrust- og Septoria-angreb i ubehandlede led samt sorternes modtagelighed over for disse to sygdomme i 2014, og merudbyttet ved svampebehandling. Resultaterne viser tendens til øget merudbytte ved stigende dækningsgrad med Septoria. En enkelt sort, JB Asano, skiller sig ud med et meget kraftigt angreb af gulrust. Septoria er en sygdom, hvor der er et stort behov for rettidige fungicidbehandlinger, men dette indikerer samtidigt, at der også er et stort potentiale for at videreudvikle resistente sorter.

Inden for de seneste 10 år har merudbyttet for svampebekæmpelse i hvedesorter generelt ligget i intervallet 5-15%, men for to år i perioden 2008-2017 har merudbyttet været større end 15%. Af afgrøderegistreringerne i ubehandlede led fremgår, at angreb af Septoria har været hyppigere end rust, som igen har været hyppigere end meldug. Procent angreb med meldug har typisk været mindre end 1%, hvilket skyldes, at der anvendes resistente sorter. Både meldug og gulrust kan medføre betydelige udbyttetab, hvis sorters resistens nedbrydes og der samtidig ikke gennemføres en effektiv svampebekæmpelse.

Svampeangreb er den overvejende dyrkningsudfordring i vinterhvede, men egenskaber som god overvintringsevne og stråstivhed er også relevante.

7.1.2. Byg

Vårbyg er traditionelt den næstmest udbredte afgrøde efter vinterhvede, men i de seneste 10 år har udbredelsen af de to kornafgrøder været på næsten samme niveau. Vårbyg udbyttet er typisk lavere end i hvede, men vårbyg har nogle sædskiftemæssige fordele. Eksempelvis er der en mindre forekomst af græsukrudt, som typisk opformerer sig i sædskifter med en høj andel af vintersæd.



Figur 7.4. Gennemsnitsudbytte for vårbyg fra Landsforsøgene (SEGES, red.).

Figur 7.4 viser, at udbyttet i vårbyg har været stigende fra 1967 indtil ca. 1985. Herefter har de været stagnerende frem til omkring 2010, hvorefter man igen ser en lille fremgang i udbytterne indtil 2017.

Sygdom	Skadeomfang ved angreb	Anvendelig specifik resistens	Uspecifik resistens	Sprøjtebehov ved angreb
Bygmeldug	begrænset ^A	Meget	Noget	Begrænset ^A
Bygrust	Betydelig	Noget	Noget	Middel
Bladplet	Betydelig	Uholdbar	Meget	Højt
Skjoldplet	Betydelig	Uholdbar	Meget	Højt
Ramularia	Betydelig	Uholdbar	Dårlig kendt	Middel
Bipolaris	Nogen	Uholdbar	Dårlig kendt	Middel
Fusarium (aks)	Betydelig	Nej	Dårlig kendt	Middel

^A så længe mlo er virksomt

Figur 7.5. Sygdomme i vårbyg, resistens og sprøjtebehov (Andersen et al., 2012).

Lige som for hvede er én af de vigtigste dyrkningsudfordringer svampesygdomme, hvor nettomerudbyttet for svampebekæmpelse typisk er i intervallet 5-10 hkg. De mest betydende svampesygdomme er meldug, bygrust, skoldplet og bygbladplet (Eriksen, 2017). Som nævnt tidligere findes meldugresistente sorter, men figur 7.5 viser, at der fortsat er behov for udvikling af resistente sorter, der kan modstå sygdomme som bygrust og bladplet. Øvrige betydende sortsegenskaber er resistens mod havrecystenematoder, god stråstivhed og svag tendens til nedknækning af aks og strå.

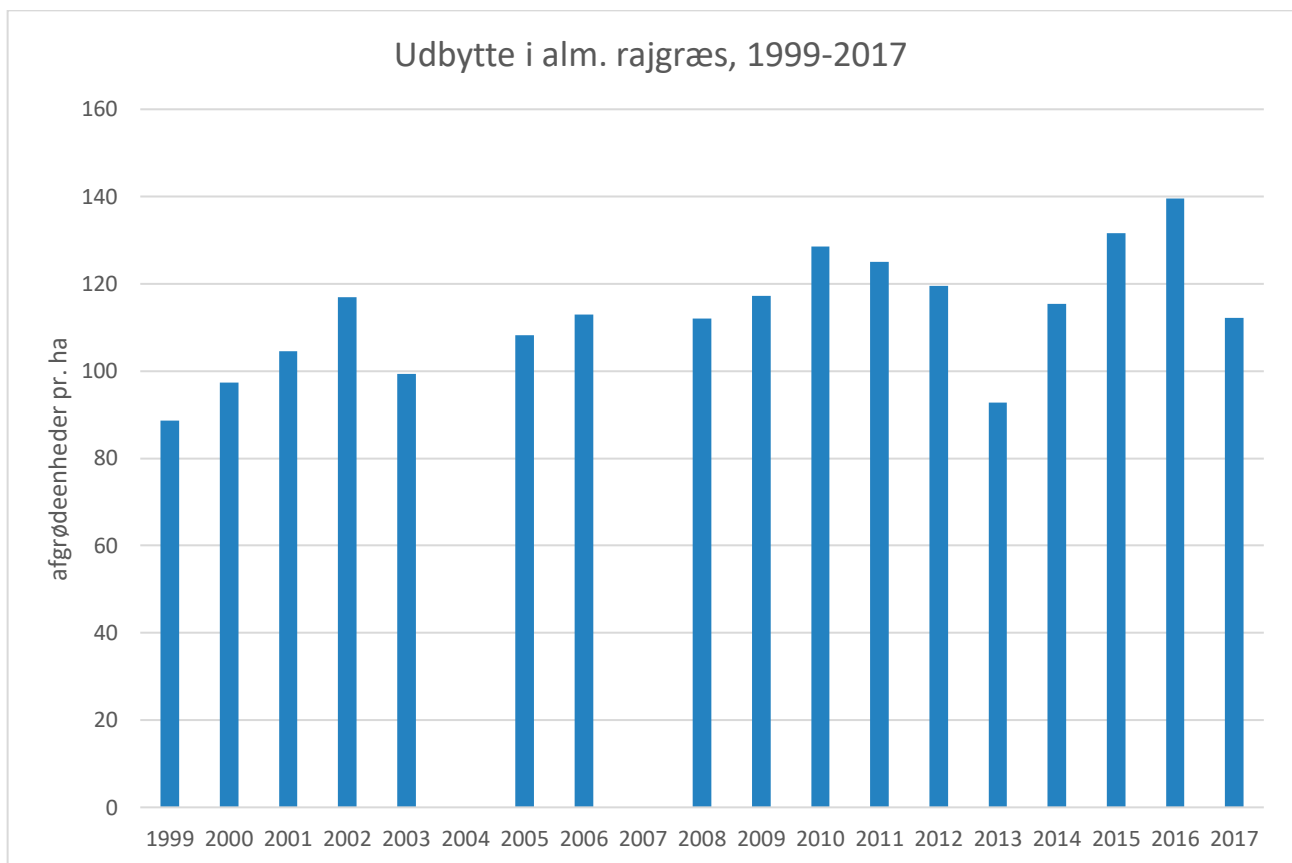
7.1.3. Græs og kløver

I Danmark dyrkes græs- og kløvermarker til foder i flerårige slæt- eller afgræsningsmarker, og der er tradition for at anvende blandinger af græs- og kløversorter, som er tilpasset specifikke anvendelser og dyrkningsforhold. De væsentligste dyrkningsudfordringer er opretholdelse af et højt foderudbytte med høj fordøjelighed, hvilket opnås gennem en målrettet slæt-/afgræsningsstrategi.

Der anvendes generelt høje kvælstofmængder, hvor græs dyrkes i renbestand, men specielt for kløvergæsmarker nedsætter en høj kløverandel behovet for kvælstofgødskning. Figur 7.6 viser en positiv udvikling af udbyttet i alm. rajgræs, middeltidlige sorter i slætforsøg, første brugsår udtrykt som afgrødeenheder (a.e.) pr. ha. Udbyttet i afgrødeenheder afspejler afgrødens fordøjelighed, og der har været en positiv udvikling i perioden 1999-2017. Græs- og kløvermarker er flerårige, og landmandens dyrkningsøkonomi forbedres, jo længere tid der går mellem omlægning. Som udgangspunkt er udbyttet højest i første brugsår, men de seneste år har forsøgsarbejdet fokuseret på at identificere de arter og sorter inden for arten med bedst persistens og overvintringsevne. Eftertragtede egenskaber er:

- Høje og stabile udbytter igennem vækstsæsonen efter flere slæt eller afgræsninger
- God persistens, som er græssernes evne til at vokse godt og ensartet i en årrække uden behov for omlægning
- Stabile udbytter igennem vækstsæsonen efter flere slæt eller afgræsninger
- Foderegenskaber som f.eks. fordøjelighed, kemisk sammensætning af proteiner, sukker, lignin, mv.
- Sygdomsresistens, tørketolerance og overvintringsevne

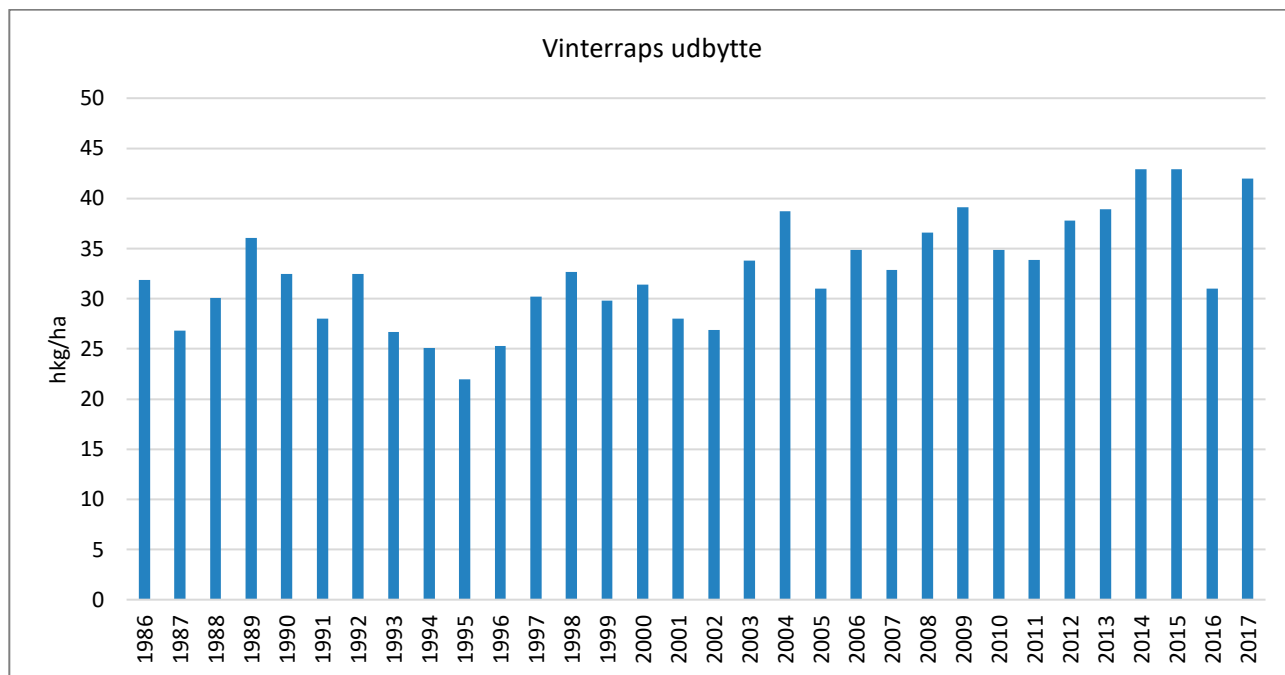
Græs og kløver til slæt og afgræsning anvendes som regel i form af arts- og sortsblandinger tilpasset anvendelsesformål og lokale dyrkningsforhold. Traditionelt er anvendt blandinger af alm. rajgræs og hvidkløver, men gennem de senere år er blandingerne suppleret med rajsvingel (*Festulolium*), strandsvingel og rødkløver, -arter, som er mere robuste over for ændringer i vækstforhold, eksempelvis er de mere tørketolerante. En meget stor andel af de danskforædlede græs- og kløversorter anvendes i andre produktionsområder, hvor tørketolerance, overvintringsevne og resistens mod de aktuelle sygdomme er vigtige parametre.



Figur 7.6. Gennemsnitlige udbytter i alm. rajgræs (afgrødeenheder (a.e.) pr. ha) (SEGES, red.).

7.1.4. Raps

Udfordringer i rapsdyrkingen er sygdomme, skadedyr og gennem de senere år har forsøg i konventionel produktion vist positive effekter af vækstregering. Vinterraps etableres medio august, hvilket i nogle år kan være en udfordring i forhold til høst af den foregående afgrøde. Foruden udbytte har kvalitetsparametre som olieindhold og fedtsyresammensætningen betydning i rapsdyrkingen.



Figur 7.7. Gennemsnitlige vinterrapsudbytter (hkg/ha) (SEGES, red.).

Figur 7.7 viser, at de gennemsnitlige vinterrapsudbytter generelt har været svagt stigende fra 1998 indtil 2017, med enkelte udfald. Det gælder f.eks. i 2016, hvor særligt vejrforholdene betød en sen etablering og en relativ tør periode omkring blomstring forkortede blomstringsperioden. Samtidigt så man større angreb af sygdommen lys bladplet og af skadedyr såsom skulpesnudebille og skulpegalmug. Lys bladplet er normalt ikke en sygdom, der giver anledning til store udbyttetab i raps, men der var et lignende sammenfald mellem vejrforholdene og et relativt højere angreb af lys bladplet i 1995 (Pedersen 2016). Angreb af knoldbægersvamp kan også være tabsgivende, men generelt viser forsøgene beskedne merudbytter for svampebekæmpelse i vinterraps.

Med ensidige sædskifter og raps dyrket med korte intervaller er opformering af særligt kålbrok, der er jordbåren, et stigende problem. Der udvikles kålbrokresistente sorter, men sorterne er som oftest kun resistente over for én kålbrok-race. Opformeres andre racer i marken, vil sorten altså være modtagelig over for denne (Jensen 2014).

Særligt skadedyr er udfordrende for at opnå høje udbytter i raps.

7.1.5. Generelle dyrkningsudfordringer

Forekomst af ukrudt kan være både udbyttereducerende og kvalitetsforringende, og gode sortsegenskaber er hurtig etableringsevne og god konkurrenceevne mod ukrudt, men generelt er ukrudtsbekæmpelse en del af sædskiftestrategien. Inden for økologisk produktion betyder implementering af ny, kamerabaseret teknologi til stadighed forbedringer på området. Inden for konventionel produktion indskrænkes mulighederne for bekæmpelse, og forekomst af herbicidresistent ukrudt kan blive en meget væsentlig dyrkningsudfordring, hvis denne situation fortsætter.

Der blev i 2016 konstateret herbicidresistens hos fuglegræs, kornvalme, lugtløs kamille, italiensk og almindelig rajgræs og agerrævehale (Mathiassen og Kudsk, 2016), og det er en udvikling som følges med bekymring både i Danmark og internationalt.

7.2. Danske forædlingsaktiviteter og sortsafprøvning inden for landbrugsafgrøderne

Før en nyudviklet sort kan markedsføres i Danmark skal den godkendes i sortsafprøvningen. Sortsafprøvningen i Danmark foregår ved Tystoftefonden som den institution, der udsteder en endelig certificering og kan give sortsliste adgang i Danmark.

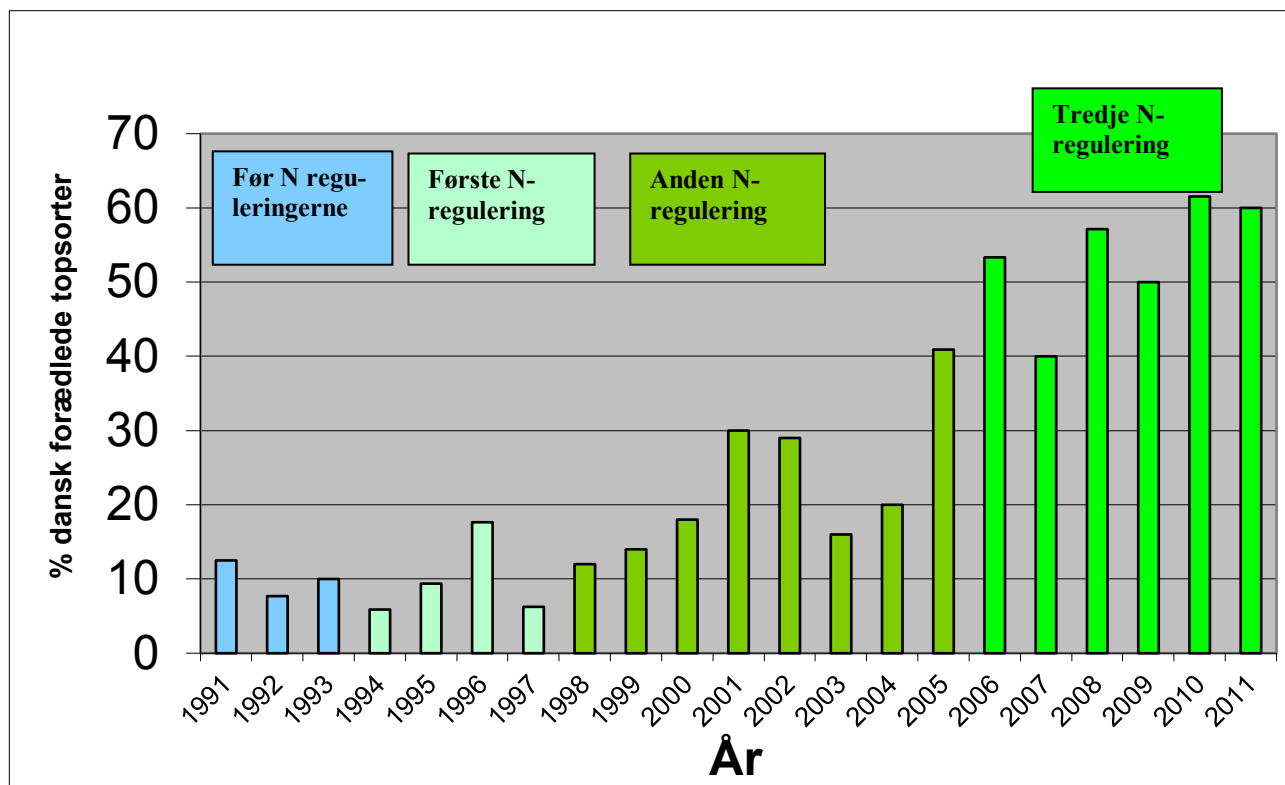
Sortsafprøvningen er opdelt i en SES-test og en værdiafprøvning. I SES-testen undersøges for Selvstændighed, Ensartethed og Stabilitet i 2-3 års afprøvning ved Tystoftefonden, og sorter under afprøvning testes op mod en række kontrolsorter. Der er endvidere krav om nyhedsværdi. Hvis sorten under afprøvning lever op til de specificerede krav, bliver den tildelt en plantenyhedsbeskyttelse, som gælder for op til 25 år. Disse krav er specificeret af EU-kontoret Community Plant Variety Office (CPVO) og foregår efter UPOV guidelines.

UPOV, The International Union for the Protection of New Varieties of Plants, er en interstatslig organisation med hovedkontor i Geneve, Schweiz. UPOV er dannet af the International Convention for the Protection of New Varieties of Plants. Konventionen blev vedtaget i 1961 og er senere revideret i 1972, 1978 and 1991. UPOV's mission er at tilvejebringe og støtte et effektivt system for plantesortsbeskyttelse med det formål at stimulere en udvikling af nye plantesorter til samfundets nytte (<http://www.upov.int/portal/index.html.en>).

Parallelt med SES-testen afprøves en ny sort for dens værdi i dyrkningen (værdiafprøvning). Dette foregår på flere lokaliteter i Danmark (antal afhænger af afgrøde), og under de aktuelle dyrkningsforhold, hvor der tildeles kvælstof efter normen/praksis for den respektive afgrøde. Der er ingen specifik afprøvning for sorter egnet til økologisk produktion, men sorter af korn testes med og uden svampebekæmpelse for at bedømme sorterens resistens egenskaber.

Værdiafprøvningen gennemføres over to år for korn, 3-5 år for græsmarksafgrøder og såfremt en ny sort lever op til kravene opnår den adgang til den danske og til EU sortsliste for en periode på op til 10 år. Værdiafprøvningen foregår i et samarbejde mellem forædlere, rådgivningstjenesten SEGES og Tystoftefonden – som et led i at sikre landmændene, at det, de dyrker, er det materiale forædlerne udgiver det for at være og samtidig er det en forsikring for, at nye godkendte sorter har en større dyrkningsværdi end de tidligere kendte.

Danmark har et stærkt forædlingsprogram med flere forædlingsstationer/virksomheder, der både konkurrerer internt og med store internationale forædlingsvirksomheder, men særligt den danske lovgivning omkring restriktive kvælstofnormer, har haft indflydelse på landmændenes brug af danske forædleres nye sorter (Andersen et al., 2012).



Figur 7.8. Procentandel af dyrkede dansk forædlede topsorter fra 1991-2011 (Tybirk 2012).

Figur 7.8 viser, at andelen af dansk forædlede topsorter i hvede har været stigende siden 90'erne, hvilket formentlig kan tilskrives at sorterne netop i værdiafprøvningen har været testet under kvælstof-restriktive dyrkningsforhold, og eksemplet afspejler således, hvordan forædling og sortsafprøvning foregår i et system som til stadighed frembringer mere dyrkningsegne sorter til de aktuelle produktionsforhold i Danmark.

De aktuelle forædlingsmål afspejles i de registreringer og observationer, som foretages i værdiafprøvningen. Aktuelle forædlingsmål for hvede og byg er udbytte, sygdomsresistens, foder/bagekvalitet og specifikke dyrkningsegenskaber som stråstyrke og lejesædstilbøjelighed.

I værdiafprøvning af vinterhvede registreres kerneudbytte, stivelses- og råproteinindhold, angreb af meldug, septoria og gulrust som standard og endvidere kan forædleren tilkøbe undersøgelser med kunstig tilført smitte af specifikke svampesygdomme. Disse undersøgelser gennemføres i samarbejde med Aarhus Universitet. Tilsvarende kan forædleren tilkøbe undersøgelse af bagekvalitet.

I værdiafprøvning af vårbyg registreres kerneudbytte, råprotein, angreb af meldug, bygrust, skoldplet og bladplet. Som for vinterhvede kan forædlerne tilkøbe supplerende undersøgelser eksempelvis med kunstig tilført smitte af specifikke svampesygdomme.

Aktuelle forædlingsmål inden for græs og kløver til foderbrug er udbytte, sygdomsresistens, foderkvalitet og persistens. Værdiafprøvningen udføres på 4-5 lokaliteter, hvor der registreres tørstofudbytte, kvalitetsparametre som protein, sukker, fibre mv. i 1.-3. brugsår. Endvidere registreres specielle dyrkningsforhold for de aktuelle afprøvningsperioder, og foruden de nævnte parametre af generel interesse kan nævnes evne til genvækst efter tørke. De tiltagende begivenheder med ekstreme vejrforhold har øget interessen for at forædle græsser med dybere rødder, hvilket p.t. screenes i forskningsprojekter bl.a. i et samarbejde mellem Københavns Universitet og Aarhus Universitet.

For øjeblikket gennemføres ikke forædling af vinterraps i Danmark, men en mikroforædler gennemfører aktivi-

teter med en hvidblomstret raps. I værdiafprøvning af vinterraps bestemmes udbytte, olieprocent og afgrødehøjde. Der kan tilkøbes supplerende undersøgelser.

Ud over forædling i korn, græs og kløver sker der en betydelig forædling af foder- og sukkerroer og kartofler i Danmark.

7.3. Hvor står vi, hvis vi bruger/ikke bruger præcisionsforædling på kort og lang sigt

Generelle dyrkningsudfordringer for danske landbrugsafgrøder både under konventionelle og økologiske dyrkningsforhold er angreb af sygdomme og skadedyr. I litteraturen og i foranstående afsnit er vist eksempler på anvendelse af præcisionsforædling til opnåelse af sygdomsresistens. Andre eftertragtede egenskaber i kornafgrøderne og i raps er øget stråstyrke, hvilket der også er vist eksempler på ved anvendelse af præcisionsforædling i ris.

Generelt gælder dog at landmænd primært udvælger sorter på baggrund af udbytte, - en kompleks egenskab, som påvirkes af en række forskellige egenskaber. Styrken i den danske og europæiske model for sortsafprøvning inden for landbrugsafgrøder er, at nye sorter under værdiafprøvningen testes under de aktuelle klima- og dyrkningsforhold. Det forudsætter selvsagt, at der pågår forædlingsaktiviteter målrettet danske dyrkningsforhold, hvilket aktuelt er tilfældet i korn, roer, kartofler, græs og kløver.

Foregående afsnit viser, at der konkret har været en positiv udbytte-udvikling i de nævnte afgrøder, og Andersen et al. (2012) anslår en udbyttetigning gennem de seneste 50 år svarende til 0,5% pr. år som følge af forbedrede kornsorter. Denne udvikling er sket samtidig med, at dansk landbrug har bevæget sig i en retning mod mindre anvendelse af handelsgødning og pesticider.

Overordnet vurderes de bedste udviklingsmuligheder for dansk landbrugsproduktion, såvel konventionel som økologisk, at opretholdes ved fortsat planteforædling målrettet danske dyrkningsforhold. Der er ikke planteforædling i Danmark inden for alle landbrugsafgrøder, eksempelvis ikke i raps og majs, men udenlandske forædlingsvirksomheder viser stor interesse for afprøvning af sorter inden for disse arter ved Tystoftefonden. De indgår dermed også i værdiafprøvningen under danske forhold, og derved sikres informationer og adgang til dyrkningsegne sorter.

En mulig anvendelse af præcisionsforædling er udvikling af herbicidresistente sorter. EU-kommisionens Joint Research Centre (JRC) udarbejdede i 2011 en rapport med titlen "New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects for commercial development" (Lusser et al., 2011). Heraf fremgår, at der pågår aktiviteter inden for præcisionsforædling (Oligonucleotide Directed Mutagenesis) i relation til udvikling af herbicidresistens i ris, raps og majs. Fire forædlingsvirksomheder har aktiviteter inden for dette område, og i 2011 var man nået til integration af egenskaben og markforsøg. Med de aktuelle restriktioner i pesticidanvendelse i Danmark og forekomst af herbicidresistente ukrudtsarter vil anvendelse af herbicidtolerante afgrøder kræve særlig opmærksomhed.

Referencer

- Andersen BS, Thomsen HT, Jensen SC, Rasmussen M, Bertelsen I, Jahoor A, Nielsen SB og Deneken G.** 2012. "Bedre Afgørder Til Fremtidens Jordbrug."
- Danmarks Statistik.** 2018. "Afgørder." <https://www.dst.dk/da/Statistik/emner/erhvervslivets-sektorer/landbrug-gartneri-og-skovbrug/afgroeder>.
- Jensen HF.** 2014. "Nye Sorter Med Resistens Mod Kålbrot." In . Plantekongres - produktion, plan og miljø.
- Jørgensen LN, Nielsen BJ, Jensen PK, Hartvig P, Wieczorek M, and Kaiser C.** 2018. Applied Crop Protection 2017. Aarhus University.
- Jørgensen LN, and Nielsen GC.** 1999. "Septoria i Hvede - Alternative Bekæmpelsesmetoder." Grøn Viden, no. 216.
- Mathiassen SK and Kudsk P.** 2016. Etablering af en status for forekomst af herbicidresistens i Danmark (2013-15). DCA rapport nr. 084. Aarhus Universitet.
- Li M, Li X, Zhou Z, Wu P, Fang M, Pan X, Lin Q, Luo W, Wu G, Li H.** 2016. Reassessment of the Four Yield-related Genes Gn1a, DEP1, GS3, and IPA1 in Rice Using a CRISPR/Cas9 System. Frontiers in Plant Science 7.
- Lusser M, Parisi C, Plan D and Rodriguez-Cerezo E.** 2011. New plant breeding techniques State-of-the-art and prospects for commercial development. JRC Scientific and technical report.
- Pedersen JB.** 2014. Oversigt over Landsforsøgene 2014. Videncentret for Landbrug P/S.
- Pedersen JB.** 2016. "Vinterraps 2016 - Hvorfor Mangler Der Udbytte?" https://www.landbrugsinfo.dk/Planteavl/Afgroeder/Olieplanter/Vinterraps/Sider/pl_pn_16_2453_2439.aspx.
- Petersen J, Haastrup M, Knudsen L, and Olesen JEO.** 2010. "Causes of Yield Stagnation in Winter Wheat in Denmark Causes of Yield Stagnation in Winter Wheat in Denmark."
- Tybirk, E.** 2011. "Hvilke Hvedesorter Udnytter Kvælstoffet Bedst ?" In , 224-27. Plantekongres - produktion, plan og miljø.
- Væрге AB.** 2014. "Udvikling Af Vinterhvedesorter over 30 År."
- UPOV** <http://www.upov.int/portal/index.html.en> tilgået 23-05-2018.

8. Udfordringer i dansk gartneri, skovbrug (juletræer). Kan NBT bidrage?

Karen Koefoed Petersen, seniorforsker; Martin Jensen, seniorforsker; Marianne G. Bertelsen, seniorforsker; Kai Grevsen, seniorforsker; Lars H. Jacobsen, AC-TAP; Institut for Fødevarer, Aarhus Universitet

8.1. Aktuelle dyrkningsudfordringer og forædlingsmål i danske havebrugsafgrøder

Danske havebrugsafgrøder kan inddeles i prydblplanter, frugt og bær, grøntsager og skovtræer. Prydblplanter dækker over potteplanter, udplantningsplanter og planteskoleplanter til private haver, parker og rekreative områder, grøntsager dækker over frilands- og væksthushgrøntsager og skovtræer dækker over erhvervsmæssig produktion af træ og juletræer.

I dag er dansk forædling af havebrugsafgrøder i høj grad koncentreret omkring potteplanter hvor mange af de store gartnerier har deres egne forsknings- og udviklingsafdelinger og en stor del af indtægten kommer fra salg af stiklinger pålagt en nyhedsbeskyttelsesafgift.

Med udgangspunkt i en stigende forbruger- og samfundsmæssig (politisk) opmærksomhed på vores miljø er der stor fokus på at spise mindre kød og dermed flere plantebaserede fødevarer inkl. frugt og grønt, at spise økologiske og bæredygtigt producerede fødevarer, at fødevarerne er lokalt producerede og at der er et minimum af spild. Desuden vil dansk gartneri, ligesom landbruget, stå over for udfordringer med globale klimaændringer, som vil give mere ekstreme vejsituationer. Både med en øget økologisk produktion og klimaændringer vil der i fremtiden være et større krav om robuste og fleksible sorter overfor abiotiske og biotiske dyrkningsfaktorer.

Havebrugsafgrøderne er en meget uhomogen gruppe af planter, som spænder fra enårige over toårige til flerårige, fra urteagtige til træagtige og hvor formeringen kan ske generativt via frø eller vegetativt via forskellige typer af stiklinger, ved podning eller okulering af en knop eller podekvist på en grundstamme eller ved adventiv eller aksillær skuddannelse in vitro. Disse forhold har stor betydning i forhold til forædling og introduktion af nye egenskaber.

8.1.1. Frilandsgrøntsager

De arealmæssigt største grøntsagsafgrøder i Danmark i 2015 var ærter (25 %), gulerødder (18 %), kål (14 %), løg (12 %), rodfrugter (8 %) og salat (5 %) (Fakta om dansk gartneri 2016/17). Det samlede areal med frilandsgrøntsager var i 2015 på 11.080 ha inkl. ærter til konserveres som udgjorde 2749 ha (Fakta om dansk gartneri 2016/2017). I tabel 8.1 er der en opsummering af nogle af de vigtigste egenskaber der forædles for i de største danske grøntsagsafgrøder. Vi har ikke medtaget ærter da langt den største andel er 'ærter til konserveres', og de dyrkes primært som landbrugsafgrøde af landmænd. Det er egenskaber som sygdomsresistens, udbytte, tidlighed, holdbarhed og udseende der går igen som de vigtigste for de fleste af afgrøderne.

Både frilands- og væksthushgrøntsager er oftest frøformerede og ofte er frøet såkaldt F1-frø hvor to indavlede linjer krydses sammen først og fremmest for at opnå en heterosiseffekt og sekundært for at sikre at gartnerne ikke selv høster frø og for at gøre videre forædling langsom.

8.1.2. Væksthushgrøntsager

I Danmark er der fire væksthushgrøntsagskulturer, som dominerer arealmæssigt; agurk (46 %), tomat (31 %), krydderurter (12 %) og salat (5 %). Det samlede areal med væksthushgrøntsager var 107 ha i 2015. Gartnerne inden for væksthushgrøntsager har fokus på bæredygtighed herunder at nedbringe energi-, vand- og pesticidforbruget. Mange af de danske producenter er certificerede under GLOBAL G.A.P. hvilket medfører krav til anvendelse af pesticider, gødning og hygiejne. Bl.a. bruges der i meget stor udstrækning biologisk bekæmpelse mod skadedyr. I tabel 8.2 er der en opsummering af nogle af de vigtigste egenskaber der forædles for i tomat, agurk og krydderurter. Salat er medtaget under frilandsgrøntsager. For væksthushgrøntsager er det især sygdomsresistens, udbytte, holdbarhed, udseende, smag og både biotisk og abiotisk robusthed der dominerer forædlingen.

8.1.3. Frugt og bær

De største frugtkulturer i Danmark er æble (24 %), jordbær (19 %), solbær (18 %), kirsebær (17 %) og pære (5 %) med et samlet dyrkningsareal på 6.349 ha.

Mange frugttræer og bærbuske er hybrider og/eller vegetativt formerede. Desuden er de træagtige og det tager flere år før de blomstrer. Det betyder at traditionel forædling tager mange år fra krydsning til færdig ny sort. I de seneste år har generationstiden for æbleforædling dog kunnet nedsættes fra 5 år til kun 2 år ved brug af 'fast-track' breeding (Volz 2009), hvor frøplanterne drives frem i væksthush, med korte hvileperioder. Forædling af æble foregår i New Zealand, Australien, USA samt en lang række Europæiske lande herunder Belgien, Tjekkiet, Italien, Sverige og Norge. Forædling af æble foretages i stigende omfang af private virksomheder eller samarbejder mellem private og offentlige virksomheder. Pæreforædlingsprogrammer er generelt færre og mindre end det er tilfældet for æble. Her har generationstiden endnu ikke kunne nedsættes til mindre end 6-8 år. Dog kan der foretages screening for sygdomsresistens og vækstkaraktistika i ungdomsfasen.

Forædling af solbær udføres ca. 15 forskellige steder i verden, hovedsagelig i Nord og Østeuropa, men også New Zealand har forædlingsprogrammer. Af frugtarterne er jordbær den med den hurtigste generationstid og det er også her der foregår den største forædlingsaktivitet. De fleste større producentlande har deres eget forædlingsprogram og der er mange private virksomheder som også arbejder med jordbærforædling. På universiteter og forsøgsstationer foregår der omfattende forskning med transgene planter. Ingen af disse er dog endnu kommerialiseret.

Forædling af surkirsebær har haft forholdsvis ringe bevågenhed. Der er en række forædlingsprogrammer i Østeuropa og også i Danmark har der været et mindre forædlingsprogram med fokus på robusthed over for sygdomme. I Canada er der arbejdet med at krydse arter for at udvikle planter med mindre vækstkraft, så træstørrelsen kan reduceres og høsten gøres lettere.

I tabel 8.3 er vist de vigtigste forædlingsmål for æble, pære, kirsebær, solbær og jordbær. Det ses at sygdomsresistens, udbytte, vækstkraft, frugtkvalitet, holdbarhed og abiotisk stresstolerance går igen for de fleste af frugt- og bærkulturerne.

8.1.4. Prydplanter

Der produceres et utal af potteplanter og udplantningsplanter i Danmark. De 10 største kulturer i 2016 er vist i tabel 8.4. Top 10 listen har været relativt stabil gennem de sidste 10 år med lidt indbyrdes omrokering og den domineres af *Kalanchoë*, *Rosa hybrida* og *Campanula portenschlagiana*. Det er også anført i tabel 8.4 om der forekommer dansk forædling eller ej. I 2016 eksporterede Danmark potteplanter, planteskoleplanter og snitblomster (inkl. løgblomster) for 2.35 mia. kr. (Tal om Gartneriet 2017). Ligesom for frugt og bærkulturerne er mange pryddplanter hybrider og vegetativt formerede (stiklinger, løg, knolde, mikroformering), men der findes også en lang række frøformerede kulturer. Fælles for kulturerne er at form, farve og størrelse af blomster og blade, god holdbarhed af den enkelte blomst og høj ethyltolerance er meget vigtige forædlingsparametre (tabel 8.5). Derudover kommer egenskaber der har betydning for produktionen så som vækstform, blomstringskontrol, ensartethed, sygdomsresistens og abiotisk stresstolerance. Afhængigt af hvor meget forædling der har været inden for den enkelte kultur benytter forædlerne sig af klassiske krydsninger både indenfor og mellem arter, mutationsbehandlinger, kromosomfordobling, embryo rescue efterfulgt af selektion hvor der ofte tages forskellige screeningsværktøjer i brug så som eksponering for ethylen og abiotiske stressfaktorer (temperatur, tørke) og DNA markører ud over visuel udvælgelse. Gennem de sidste 20-25 år er der kommet mere og mere fokus på genetisk modificering og i Danmark også på naturlig transformering med vildtyper af *Agrobacterium rhizogenes* (Lütken et al. 2012). Naturlig transformering med rol-gener fra *A. rhizogenes* giver mere kompakte planter, bedre roddannelse og sommetider en bedre holdbarhed af blomsterne (Christensen og Muller 2009) og klassificeres ifølge European Union directive 2001/18/EC som værende ikke genetisk modificeret.

Målet for mange forædlingsprogrammer er at kunne lave en serie af sorter hvor den eneste forskel er blomsterfarven. Det vil sige samme vækstform og væksthastighed som gør at produktionsplanlægningen og håndteringen under produktionen er ens. Optimalt set sorter der kun adskiller sig mht. blomsterfarve.

Aarhus Universitet har i en lang årerække været ansvarlig for SES-test af julestjerne i regi af CPVO og har derfor en god indsigt i hvilke egenskaber der forædles for i denne planteart og hvorvidt egenskaberne opnås via mutationsbehandling eller krydsninger. I tabel 8.6 findes en gennemgang af anmeldelser for julestjerne til EU-plantenyhedsbeskyttelse for perioden 2013-2018 og tabellen viser de egenskaber der er forædlet for og om den nye egenskab er en mutation eller stammer fra en krydsning. Gennemgangen viser, at der er stor fokus på blomsteregenskaber (højblade og cyatier) og den hyppigste forædlingsegenskab er farven på højbladene. Vækstform og -hastighed er andre vigtige forædlingskriterier, som har til formål at reducere inputtet af ressourcer per produceret enhed bl.a. reduceret brug af retarderingsmidler og kortere produktionstid (energi, gødning, vand). Overordnet var der 61 % af de anmeldte nyheder der stammede fra krydsninger og 39 % der stammede fra kemisk eller fysisk mutationsbehandling. Mange egenskaber kan opnås ved begge forædlings-

strategier (højbladernes farve og kompakthed) mens andre næste udelukkende opnås ved krydsninger (bedre forgrening og højbladernes størrelse).

8.1.5. Skovbrug og juletræer

Det plantemateriale der må anvendes i danske skove er styret af bl.a. EU direktiv for forstligt formeringsmateriale og implementeret i dansk lovgivning i forhold til hvad der må forhandles og hvilke egenskaber materialet som minimum skal opfylde (Proschowsky og Jørgensen, 2015). Politisk og fagligt har man, især i de senere år, fokuseret på at sikre, dels et klimatilpasset og klimarobust plantemateriale (dvs. så meget hjemmehørende dansk materiale som muligt eller materiale med kendt udvikling under danske klimaforhold), og dels en bred genetisk diversitet i de anvendte frøkilder for at modstå fremtidige klimacændringer og sikre langsigtet robusthed mod sygdomme og skadedyr. Ønsket om en bred diversitet især for arterne med lang omdrift betyder at forædlingsinstrumenterne generelt er mere traditionelle og lavteknologiske end for havebruget og landbruget. Da frøformering af skovtræer er meget mere succesfuld og billigere end vegetativ/klon-formering, og plantepriisen spiller en rolle ved nyplantning, er formering af skovtræer og træer til pyntegrønt stadig præget af frøformering via populationsafkom fra udpegede bevoksninger eller genetisk forbedrede eller afprøvede frøplantager. For poppel og pil til biomasse/energiskov er stiklingeformering dog standard, og for enkelt arter (eks. sitka, nordmannsgran) findes også viden og teknikker til vegetativ formering (stiklinger, vævskultur, somatisk embryogenese), som dog kun er implementeret i praksis i meget lille omfang endnu (Find, 2016; Nielsen et al., 2009; Rasmussen et al., 2009; 2010). En høj omkostning til vegetativ formering gør at de fleste arter stadig er frøformerede. Vigtige egenskaber i skovtræer og juletræer er sygdoms- og skadedyrsresistens, abiotisk stresstolerance, ensartethed og væksthastighed (tabel 8.7).

Tabel 8.1. Vigtige egenskaber i gulerod, løg, kål og salat. De vigtigste egenskaber er markeret med fed skrift.

Planteart	Egenskab	Kommentar	Reference
Gulerod (<i>Daucus carota</i>)	Sygdomsresistens Udbytte Smag Form og farve Indholdsstoffer Konsistens Placering i jorden; topfæste Topsundhed	Mange F1 hybrider	Pers. com.
Løg (<i>Allium cepa</i>)	Udbytte Farve , størrelse, form Skalstyrke Sygdomsresistens Lagerstabilitet ; spiringsresistens Stokløbning; tidlighed	Mange F1 hybrider	Anon. 2001
Kål (<i>Brassica oleracea ssp</i>)	Tidlighed Fasthed/tæthed Holdbarhed mark og lager Hovedform Udbytte Glathed, overflade kort stok indvendigt Sygdoms- og skadedyrsresistens Stokløbning	Mange F1 hybrider (80 %)	Anon. 2001
Salat (<i>Lactuca sativa</i>)	Sygdomsresistens Produktionstid Tipburn (Fysiologisk Ca-mangel) Brune nerver Hovedstørrelse og -dannelse Farve, størrelse, form Stokløbning Lys- og daglængdeafhængighed	Ikke F1 hybrider	Anon. 1997

Tabel 8.2. Vigtige egenskaber i tomat, agurk og krydderurter.

Planteart	Egenskab	Kommentar	Reference
Tomat <i>(Lycopersicon esculentum)</i>	Sygdomsresistens (bakterier, svampe, nematoder, virus mm)	En transgen på markedet	Bergougnoux 2014; Xiong <i>et al.</i> , 2015
	Udbytte Abiotisk stresstolerance Frugtstørrelse, form, farve Modning og farveudvikling	Mindst 10 transgene på markedet	
	Næringsværdi		
Agurk <i>(Cucumis sativus)</i>	Sygdomsresistens		Golabadi <i>et al.</i> , 2015; Li <i>et al.</i> , 2015; Liu <i>et al.</i> , 2017
	Udbytte		
	Vækstform (internodiælængde)		
	God frugtsætning på sideskud		
	Frugtstørrelse, form, farve		
Abiotisk stresstolerance (kulde, lav lys)			
Krydderurter	Sygdomsresistens		Lal 2014; Roemer 2010; Roemer <i>et al.</i> , 2010
	Abiotisk stresstolerance (holdbarhed, lav temperatur)		
	Indholdsstoffer (smag)		

Tabel 8.3. Vigtige egenskaber i æble, pære, kirsebær, solbær og jordbær.

Planteart	Egenskab	Kommentar	Rerference
Æble <i>(Malus x Domestica)</i>	Sygdomsresistens (skurv, ildsot) Abiotisk stresstolerance (vand, temperatur) Frugtkvalitet (tekstur, brunfarvning, følsomhed overfor ethylen) Holdbarhed (lagerstabilitet) Udbytte (stabil blomstring)	En transgen på markedet En transgen på markedet	Jamieson 2006; Laurens <i>et al.</i> , 2018; Xiong <i>et al.</i> 2015
Pære <i>(Cucumis sativus)</i>	Sygdomsresistens (skurv og ildsot) Tolerance over for skadedyr (pærebladlopper) Reduceret vækstkraft og jævn blomstring Abiotisk stresstolerance (vand, optag af jern) Frugtkvalitet (frugtfarve)		Evrenosoglu and Mertoglu 2018
Kirsebær	Sygdomsresistens Vækstkraft (mindre træer)		Quero-Garcia <i>et al.</i> , 2017
Solbær	Sygdomsresistens Bærkvalitet (antocyaninindhold, fasthed, sukkerindhold) Opret vækst (egnet til maskinhøst) Dyrkningssikkerhed (nedsat kuldekrav)		Vagiri 2012
Jordbær	Sygdomsresistens Frugtkvalitet (smag, tolerance over for transport) Tilpasning til forskellige dyrkningssystemer, udbytte		Jamieson 2006; Qin <i>et al.</i> , 2008

Tabel 8.4. Top 10 liste over de mest producerede potteplankulturer i Danmark i 2016

Kultur	Antal (mio. færdigvarer)	Dansk forædling
Kalanchoë	37,9	Ja (DK førende)
Rosa hybrid	21,5	Ja (DK blandt de førende)
Campanula portenschlagiana	21,5	Ja (DK førende)
Euphorbia pulcherrima (julestjerne)	7,4	Ja
Osteopermum (spansk marguerit)	7,1	Ja (DK blandt de førende)
Schlumbergera	7,0	Ja (DK førende)
Phalaenopsis	5,7	?
Hedera helix	5,6	Nej
Narcissus cyclamineus (tete a tete påskeliljer)	5,2	Nej
Aster hybrid	5,1	Ja (DK førende)
I alt	124	

Tabel 8.5. Vigtige egenskaber i potteplanter uanset planteart

Egenskab	Kommentar	Reference
Blostmeregenskaber (form, størrelse, farve, duft, dobbelte)	19 transgene nellikesorter på markedet. En transgen Petuniasort og én transgen rosensort på markedet	Xiong <i>et al.</i> , 2015
Remonterende blomstring		
Kontrol af blomstring (daglængde afhængighed)		
Løv (bladform, farve)		
Vækstform (kompakthed, forgrening)		
Væksthastighed (tidligere blomstring)		
Antal stiklinger per plante		
Ensartethed		
Hurtig rodning		
Abiotisk stresstolerance (kulde, varme, tørke)	Reduceret energiforbrug, nye anvendelse som udplantning	Azadi <i>et al.</i> , (2016)
Bedre holdbarhed (ethyltolerance)		
Sygdomsresistens		Kuligowska <i>et al.</i> , (2016)
Triploide/sterile salgsplanter	Vanskeliggør videre forædling	
Reduktion af allergifremkaldende stoffer		

Table 8.6. Forædlingsmål i julestjerne i perioden 2013-2018, angivet som antal anmeldelser til Plantenyhedsbeskyttelse i Europa. *) Årsagen til at det faktiske antal angivelser er lavere end summen af angivelser i tabellen er at der ofte er anmeldt mere end én egenskab per nyhedsanmeldt plante.

Egenskab	Antal angivelser	Heraf mutationer	Heraf krydsninger
Kompakthed	22	12	10
Kraftigere vækst	13	7	6
Bedre forgrening	8	0	8
Produktionstid	17	4	13
Stængel, tyk	5	1	4
Bladfarve, mørk	10	5	5
Bladfarve, lys	1	0	1
bladform, lobes	5	3	2
Højblade (bractee), farve	34	16	18
Højblade, størrelse	10	2	8
Højblade, form	1	0	1
Cyatier, antal	1	0	1
Cyatier, størrelse	3	1	2
Cyatier, holdbarhed	1	0	1
I alt	76^{*)}	30 (39%)	46 (61%)

Table 8.7. Principielle kriterier og hovedkriterier for udvælgelse af frøkilder der må danne baggrund for formeringsmateriale af skovtræarter til kommerciel produktion i Danmark inden for de 5 hovedanvendelsesområder.

			ønsket
Vedproduktion (eg, bøg, sitka, douglas, ær, fuglekirsebær)	Klimatilpasset, langsigtet robusthed (80-120 år), bred genetisk variation	Vedproduktion tons tørstof/ha Vedkvalitet og styrkeegenskaber (eks tømmer, eller finer), Stammerethed, ingen snoede stammer, fingrenet, Sygdoms- og skadedyrsresistens Abiotisk stresstolerance (frost)	Betydende arter mindst 20 kloner, små træarter mindst 10 kloner
Værn og læ (eg, fuglekirsebær, lind)	Klimatilpasset, mellem-langsigtet robusthed, bred genetisk variation	Tilvækst højde og bredde, Læegenskaber (løvholdende, velforgrenet) Sygdoms- og skadedyrsresistens Abiotisk stresstolerance (frost, vind) Bidrag til faunadiversitet (eks. bier, insekter, fugle)	Betydende arter mindst 20 kloner, små træarter mindst 10 kloner
Pyntegrønt og juletræer (nordmannsgran, nobilis)	Klimatilpasset, robusthed, smal til mellembred genetisk variation, kortsigtet robusthed (juletræer 7-12 år, pyntegrønt 20-30 år).	Ensartethed (kvalitet A) Klippeudbytte pyntegrønt Farve (blå nobilis) og form Sygdoms- og skadedyrsresistens Abiotisk stresstolerance (frost) Produktionstid (juletræer)	En vis genetisk bredde normalt foretrukket, men snævre kilder en mulighed.
Park og allétræer (lille formåls-gruppe)	Klimatilpasset, robusthed, smal til mellembred genetisk variation	Ensartet formudtryk Sundt plantemateriale Robusthed	Smal genetik accepteret
Biomasse og Energiskov (poppel og potentielle arter: sitka, Abies grandis m.fl.)	Klimatilpasset, smal genetik	Stor biomasse, tons TS/ha/år Sygdoms- og skadedyrsresistens Abiotisk stresstolerance Evne til at skyde fra stub efter nedskæring/genhøst Hurtig etablering og tilvækst Gode forbrændingsegenskaber	Enkelt kloner eller klon miks muligt, både kloner og frøkilder kræves afprøvet

8.2. Danske forædlingsaktiviteter inden for havebrugsafgrøder

Dansk forædling af havebrugsafgrøder sker primært inden for prydplanter og skovbrug/juletræer. Der er et par små enkeltmandsfirmaer der forædler grøntsagsafgrøder (spinat, raps) og der er nogle udenlandske firmaer der har en del af deres forædling placeret i Danmark. Inden for frugt og bær er der ikke deciderede forædlingsaktiviteter.

Dansk prydplanteindustri har gennem de seneste år været udfordret af især Holland og antallet af potteplantegartnerier er faldet mens den enkelte bedrift er blevet større og større og mere og mere specialiseret. Det glasdækkede areal med prydplanter (snitblomster og -grønt + potteplanter + udplantningsplanter) er faldet fra 353 ha og ca. 683 bedrifter i 2002 til 281 ha og ca. 306 bedrifter i 2014 (Tal om Gartneriet 2017). I tabel 8.4 ses en liste over de mest producerede potteplanter i Danmark i 2016 og om der forekommer dansk forædling af kulturen.

En meget stor andel af forædlingen inden for potteplanter og udplantningsplanter foregår i de store gartnerier hvor nogle har R & D afdelinger f.eks. Knud Jepsen A/S (Queen), PKM, Thoruplund og Graff Breeding, men også i deciderede forædlingsfirmaer som f.eks. Poulsen Roser A/S og Sunny ApS. Siden 1995 er der indgivet 2162 danske anmeldelser om nyhedsbeskyttelse af prydplanter til CPVO på prydplanter heraf 416 i perioden fra 2013-2017. Flere af de danske forædlingsprogrammer er de seneste år blevet solgt til udenlandske firmaer. F.eks. har Sunny ApS, som har forædlet spanske margueritter siden 1985, solgt forædlingsprogrammet Sunny® *Osteospermum* til det hollandske Beekenkamp Plants B.V.

Inden for prydplanter, som er et bredt område med mange plantearter og sorter, er Danmark førende med hensyn til forædlingen af nogle slægter. Det drejer sig bl.a. om *Kalanchoë*, *Hibiscus*, *Campanula* og *Schlumbergera* samt en væsentlig forædlingsindsats inden for roser, hortensia, klematis, lavendel, potteasters og spanske margueritter. Dette afspejles også i Top 10 listen over de kulturer, der bliver produceret i størst antal i Danmark (tabel 8.4).

For skovtræer er tiden fra frøspiring indtil et nyt træ sætter blomst og frø for mange træarter 15-25 år. Dette betyder at krydsningsarbejde laves med lange horisonter for udnyttelse. For nogle arter, eks kirsebær, er metoder til at reducere træets juvenile stadie (ungdomsfasen) til få år beskrevet (Jensen, pers com.).

En stor del af de træarter, der anvendes i dansk skovbrug, er kun lidt eller slet ikke forædlede, men blot udvalgt som det bedste på markedet med relevans for Danmark. F.eks. er der i hovedarten bøg kun udvalgt de bedste frøkilder (provenienser) ud fra sammenlignende populationsundersøgelser, mens der ikke er foretaget noget arbejde på enkelttræer eller klonfrøkilder (Jørgensen og Proschowsky, 2015). For den anden hovedart eg er status næsten den samme, men dog er enkelte klonfrøkilder forsøgt. For mange andre løvtræarter er der tilsvarende gennemført meget lidt forædling, men kun foretaget udvalg og afprøvninger. I nogle arter er der etableret frøplantefrøplantager eller klonfrøplantager, hvor de indgående enkeltfamilier eller enkeltkloner ud fra registreringer er sammenlignet og selekteret som særligt interessante (Krogh og Glud, 2018). Dette giver genetiske forbedringer i afkommet. I nogle arter er der risiko for hybridisering med andre arter, hvilket ikke er ønskeligt. Artsrenhed testes bl.a. i arter af eg og ædelgran med DNA-teknikker. Som en specialitet fremstilles bevidst artshybrider af europæisk og japansk lærk da afkommet opnår heterosis effekt og højere tilvækst. Her testes også for om frøet er hybridfrø eller selvbestøvet, og hybridprocenten skal offentliggøres ved salg af frø. Her kombineres udvalgte kloner af de to arter til en hybridfrøplantage.

Sitkagran er nok en af de mest undersøgte og forædlede skovtræarter i Danmark via arbejde udført af især Hans Roulund, ved KU. Kloner er veltestede og egenskaber som vækst og tørstofproduktion, vedkvalitet og modstandsdygtighed mod lus beskrevet. Selektioner efter kontrollerede krydsninger er udført og frømaterialer er internationalt anerkendt for dets høje standard. Klonformeringssteknikker er udviklet (stiklinger, mikroformering, somatisk embryogenese), men er ikke anvendt i praksis nok især på grund af omkostninger.

For juletræer og pyntegrønt er det primært arterne nordmannsgran og nobilis, der har betydning, nobilis mest til pyntegrønt endnu. Den overvejende frøgenetik importeres stadig fra Georgien, men de sidste 10-20 år er etableret mange danske klonfrøplantager især i statslig regi (Skov og Naturstyrelsen) med selekteret godt materiale udvalgt efter intensive forsøg og afprøvninger (Ditlevsen og Nielsen, 2009; Ditlevsen og Christensen, 2010). Sådant en udvikling har en meget lang investeringshorisont på 15-20-25 år før ny forbedret frøforsyning er på markedet, da blomstring og frøsætning i frøplanter først kommer efter 15-25 år, i podede træer dog oftest lidt hurtigere. Danske forbedrede frøkilder i Nordmannsgran forventes at opfylde mere af behovet i fremtiden. Kontrollerede kryds af udvalgte enkelt plustræer er gennemført (Hansen et al., 2013) og afkom af dette vil være 5 generation af nordmannsgran i Danmark. En forædlingsoversigt i nordmannsgran er givet af Nielsen (2007;2010) og Hansen og Nielsen (2013). For nobilis er der tilsvarende lavet klonudvalg og klonfrøplantager, der nu bidrager med forbedret frø. Her er vegetativ formering endnu ikke udviklet.

DNA analyser bruges til at forstå og styre udvalg og sikre genetisk variation i materialet og gør at det genetiske arbejde bl.a. med heritabilitetsanalyser endnu stærkere.

For nordmannsgran er kloning af supertræer ved vegetativ formering med stiklinger vist, men ikke implementeret endnu, bl.a. fordi plagiotrop skæv vækst er en udfordring. Et system til somatisk embryogenese fra umodne frø i nordmannsgran er udviklet igennem de ca. sidste 20-25 år i Danmark (Find, 2016). Udfordringen er at de genetiske og fænotypiske egenskaber hos embryoet ikke er kendt og det kræver ca. 10 års afprøvning før de bedste kloner kan udpeges. Det er endnu ikke muligt at bruge udgangsmateriale fra ældre træer som udgangspunkt for somatisk embryogenese.

I Danmark er omsætningen af forstligt formeringsmateriale fra frø eller vegetativt materiale reguleret af et EU direktiv for de vigtigste skovtræarter ud fra en defineret EU artsliste. Herudover er der skovarter, der ikke er på EU listen, som i stedet er omfattet af OECD regler og endelig er der arter som ikke er omfattet af nogen af disse regler og derfor frit kan omsættes og plantes. Specielt for bl.a. nordmannsgran og nobilis til pyntegrønt og juletræer er der lavet en dansk frivillig aftalebaseret certificeringsordning, der bl.a. omfatter import af frø fra lande, der ikke har implementeret OECD regler. EU direktivet for forstligt formeringsmateriale og dansk regulering styres af Landbrugsstyrelsen under Miljø og Fødevarerministeriet efter indstillinger fra det rådgivende udvalg, Kåringsudvalget, der omfatter en række eksperter fra bl.a. universiteter, frøhandel og skovbrugsorganisationer. Kåringsudvalget vurderer indstillet forstligt plantemateriale fra producenter indenfor 5 hovedformål, vedproduktion, værn og læ, juletræer og pyntegrønt, park og alléer og biomasse. Kvaliteten af det indstillede frøkilde materiale vurderes inden for forskellige kategorier, 'udvalgt' (bevoksningsafkom), 'kvalificeret' (klonfrøplantager og frøplanteplantager) og 'afprøvet materiale', hvor den sidste kategori har højest dokumentationsstatus. Nye frøkilder skal for mindst en relevant egenskab være overgennemsnitlig inden for kategorien for at blive kåret. Ikke kåret plantemateriale omfattet af reglerne må ikke omsættes.

8.3. Hvor står vi, hvis vi bruger/ikke bruger NBT på kort og lang sigt

For de fleste af træarterne vurderes de interessante egenskaber som vækst, biomasseproduktion og udbytte, hårdførhed, udspring og sygdomstolerance at være baseret på mange gener (Quantitative traits loci, QTLs) og har derfor en relativ lav til mellem heritabilitet. Ændring af enkeltgener vil derfor forventes kun at ændre disse egenskaber relativt begrænset, men der er begrænset viden om dette i de fleste afgrøder. Poppel er brugt som forskningsmodelplante og her er meget genetisk viden kendt. Dette er dog ikke anvendt i praktisk dyrkning i Danmark, da popler ikke har været i fokus i dansk skovtræforædling. Den mest dyrkede poppelklon i Danmark er OP42, som er en over 60 år gammel udvalgt klon fra USA.

For de genetisk brede frøkluder vurderes at det vil være svært at introducere signifikante positive ændringer med mutationer. For poppelkloner til energiskov, som baseres på enkeltklonsdyrkning, er brugen af mutanter en større mulighed.

For juletræer, især hvis klonformering i fremtiden slår igennem, vil potentialet for mutationsforædling være større. Mutationer af skovtræer i form af vækst (eks kompakt dværgvækst) og bladfarve (grøn, rød, gullig) mv. er f.eks. kendt i planteskolebranchen både for løv og nål. Genetikken bag dette vurderes kun at være sparsomt belyst. Disse mutationer har ikke haft betydning for skovbruget.

Genetisk variation i sygdomsresistens er i nogle tilfælde baseret på ret få gener, der styrer ekspresion af bestemte stoffer, som hæmmer sygdommen. Askesyge og elmesyge, som er forårsaget af svampe er undersøgt og resistente eller modstandsdygtige kloner fundet. Resistens mod askesyge ser ud til at være styret meget af genetik (høj heritabilitet) (McKinney et al., 2014). Molekylære metoder kan dermed forventes at bruges til identifikation og fremtidig forædling frem mod sunde frøkluder.

Inden for prydpflanter er en af de store begrænsninger i brugen af GM-teknikker at der er store omkostninger til godkendelse af den enkelte GM-plante og til brug af patenter og licenser (Müller 2011) samtidig med at der løbende er en stor udskiftning i sortimentet for at tilfredsstille kundernes ønske om nyheder. Desuden er der stor skepsis blandt forbrugerne og regulering af brugen af GM-planter i Europa (Lütken et al., 2012). NBT kræver ligesom GM-teknikkerne, og ofte også kemisk og fysisk mutationsbehandlinger, at man kan danne nye planter fra en enkelt eller nogle få celler i in vitro kultur. Det er ofte vanskeligt i træagtige plantearter, men der findes mere eller mindre velfungerende regenereringssystemer for mange prydpflanter. Med præcisionsforædling vil det være muligt at introducere mange af de egenskaber der er interessante for prydpilanteindustrien så som blomsterfarver, ethylentolerance og kompakthed.

Referencer

Anon. 1997. Beschreibende Sortenliste 1997. Bundessortenamt, Osterfelddamm 80, 30627 Hannover Verlag: Landbuch Verlagsgesellschaft mbH Kabelkamp 6. 30179 Hannover.

Anon. 2001. Beschreibende Sortenliste 2001. Bundessortenamt, Osterfelddamm 80, 30627 Hannover Verlag: Landbuch Verlagsgesellschaft mbH Kabelkamp 6. 30179 Hannover.

Azadi P, Bagheri H, Nalouisi AM, Nazari F, Chandler SF. 2016. Current status and biotechnological advances in genetic engineering of ornamental plants. *Biotechnology Advances* **34**, 1073-1090.

- Bergougnoux V.** 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* **32**, 170-189.
- Christensen B, Müller R.** 2009. The use of *Agrobacterium rhizogenes* and its rol-genes for quality improvement of ornamentals. *European Journal of Horticultural Science* **74**, 275-287.
- Ditlevsen B, Nielsen UB.** 2009. Stor frøhøst i nye danske nordmannsgran frøplantager. *Nåledrys* **69**, 5-12.
- Ditlevsen B, Christensen CJ.** 2010. Nordmannsgran frøplantager: Forbedret genetik giver bedre dyrkningsøkonomi. *Nåledrys* **71**, 40-43.
- Evrenosoglu Y, Mertoglu K.** 2017. Evaluation of pear (*Pyrus communis* L.) hybrid combinations for the transmission of fire blight resistance and fruit characteristics. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* doi: 10.17221/17/2017-CJGPB
- Fakta om dansk gartneri** 2016/17. Dansk Gartneri, 1-8) (udleveret på dansk gartneris generalforsamling)
- Find J.** 2016. Fra forskning til faktura – vegetativ formering af elitetræer i produktion af juletræer. *Nåledrys* **97**, 40-45.
- Quero-Garcia J, Campoy JA, Castede S, et al.** 2017. Breeding sweet cherries at INRA-Bordeaux: from conventional techniques to marker-assisted selection. *Acta Horticulturae* **1161**, 1-13.
- Golabadi M, Golkar P, Eghtedary A.** 2015. Combining ability analysis of fruit yield and morphological traits in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Canadian Journal of Plant Science* **95**, 377-385.
- Hansen OK, Nielsen UB, Jensen M.** 2013a. Næste generation i forædlingsprogrammet for nordmannsgran – ved hjælp af pollenmikskrydsninger. *Nåledrys* **84**, 18-23.
- Hansen, OK Nielsen UB.** 2013b. En opdatering af forædlingsprogrammet for nordmannsgran. *Nåledrys* **84**, 13-16.
- Jamieson AR.** 2006. Developing fruit cultivars for organic production systems: A review with examples from apple and strawberry. *Canadian Journal of Plant Science* **86**, 1369-1375.
- Jørgensen BB, Proschowsky GF.** 2015. Skovfrø til det danske marked. *Skoven* 2015, 22-24.
- Laurens F, Aranzana MJ, Arus P, et al.** 2018. An integrated approach for increasing breeding efficiency in apple and peach in Europe. *Horticultural Research* doi: 10.1038/s41438-018-0016-3
- Krogh M, Glud M.** 2018. Frøplantager skal sikre den fremtidige frøproduktion til de danske skove. *Skoven* **3**, 96-100.

Kuligowska K, Lütken H, Müller R. 2016. Towards development of new ornamental plants: status and progress in wide hybridization. *Planta* **244**, 1-17.

Lal RK. 2014. Breeding for new chemotypes with stable high essential oil yield in *Ocimum*. *Industrial Crops and Products* **59**, 41-49.

Li DD, Qin ZW, Lian H, et al. 2015. Inheritance and quantitative trait locus analysis of low-light tolerance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Genetics and Molecular Research* **14**, 10609-10618.

Liu PN, Miao H, Lu HW et al. 2017. Molecular mapping and candidate gene analysis for resistance to powdery mildew in *Cucumis sativus* stem. *Genetics and Molecular Research* **16**, 10.4238/gmr16039680

Lütken H, Clarke JL, Müller R. 2012. Genetic engineering and sustainable production of ornamentals: current status and future directions. *Plant Cell Reports* **31**, 1141-1157.

McKinney LV, Nielsen LR, Collinge DB, et al. 2014. The ash dieback crisis: genetic variation in resistance can prove a long-term solution. *Plant Pathology* **63**, 485-499.

Müller R. 2011. Physiology and genetics of plant quality improvement. Doctoral Dissertation, University of Copenhagen.

Nielsen UB, Rasmussen HN, Jensen M. 2009. Rooting Nordmann fir cuttings for Christmas trees? Paper fremlagt ved Vegetative propagation of conifers for enhancing landscaping and tree breeding, Punkaharju, Finland. 10. - 11. september. Working papers of the Finnish Forest Research Institute 114 METLA - Finnish Forest Research Institute.

Nielsen UB, 2000. Forædling af nordmannsgran og nobilis: Status og muligheder. 15, 1-54. Hørsholm, Forskningscentret for Skov & Landskab. Pyntegrøntserien.

Nielsen UB. 2007. Juletræskvalitet i nordmannsgran – effekt og samspil af genetik og klima for vækst og kvalitet. Produktionsafgiftsfonden for Juletræer og pyntegrønt. Rapport fra projekt 2003-0007. 22s. link: http://www.naturstyrelsen.dk/NR/rdonlyres/52080812-1DC3-4F97-8576-EEE1C302758A/42800/Projektrapport_2003_0007juletraskvalitet_ngr.pdf

Pers. com. Karsten Worsøe, SeedCom A/S

Proschowsky GF, Jørgensen BB. 2015. Forsyning med skovfrø 1996-2014. De enkelte træarter. *Skoven* **1**, 26-29.
Qin Y, Teixeira da Silva JA, Zhang L, Zhang S. 2008. Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. *Biotechnological Advances* **26**, 219-232.

Rasmussen HN, Nielsen UB, Jensen M. 2009. Stiklingeformering i nordmannsgran? *Nåledrys* **68**, 42-45.

Rasmussen HN, Nielsen UB, Jensen M, Hansen-Møller J. 2010. Cutting production in Nordmann fir: Rooting, plagiotropism, and hormonal background. In J. Hart, C. Landgren, G. Chastagner (eds.) 2010. Proceedings of the 9th International Christmas Tree Research & Extension Conference, IUFRO Working Group Unit 2.02.09 - Christmas Trees, held in Corvallis, Oregon and Puyallup, Washington, September 13-18 2009. pp 20-25.

Roemer P. 2010. Selection of basil (*Ocimum basilicum* L.) breeding material with improved tolerance to low temperature. *Zeitschrift für Arznei- & Gewürzplanzen* **15**, 178-181.

Roemer P, Grosch R, Kofoet A et al. 2010. Selection of basil (*Ocimum basilicum* L.) breeding material resistant against downy mildew (*Peronospora* sp.) and tolerant to low temperature. *Acta Horticulturae* **860**, 147-152.
Tal om Gartneriet 2017. Dansk gartneri

Vagiri M. 2012. Black currant (*Ribes nigrum* L.) – An insight into the crop. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.

Volz RK, Rikkerink E, Austin P, Lawrence T, Bus VGM. 2009. "Fast-breeding" in apple: a strategy to accelerate introgression of new traits into elite germplasm. *Acta Horticulturae* **814**, 163-168.

Xiong J-S, Ding J, Li Y. 2015. Genome-editing technologies and their potential application in horticultural breeding. *Horticultural Research* doi: 10.1038/hortres.2015.19

9. Økonomiske forhold vedrørende NBT

Morten Gylling, seniorrådgiver, Institut for Fødevare- og Ressourceøkonomi, Københavns Universitet

9.1. Eksisterende markedsconcentration inden for udsæd

Der er inden for de seneste år sket en væsentlig koncentration på det internationale for udsæd og plantebeskyttelse. Hvor der før var tale om 6 store virksomheder der dominerede det globale marked for udsæd, plantebeskyttelse og bioteknologi, har disse nu fusioneret til 3 stærkt vertikalt integrerede firmaer. De europæiske virksomheder Syngenta og Bayer har deltaget i fusionerne, og det forventes at Monsanto-Bayer Crop Science vil få status som et tysk selskab.

De øvrige store europæiske frø- og agrokemikalie firmaer er langt mindre vertikalt integrerede end de fusionerede selskaber

- DLF (efter fusionerne det 6.-største frøfirma i verden) har kun aktiviteter i frøsektoren.
- Tyske KWS Saat (4.-største frøfirma i verden) har ligeledes udelukkende aktiviteter inden for frø og planteforædling.
- Franske Vilmoran bliver verdens 3.-største og Europas største planteforædlingsfirma. Dette firma har næsten udelukkende fokus på planteforædling og frø (og i beskedent omfang også frørelaterede produkter).
- Det hollandske Rijk Zwaan (8.-største i verden inden for frø) er også meget specialiseret inden for dette område.

Disse er således alle meget specialiserede inden for frø, udsæd og planteforædling, den vertikale integration ind i den kemiske industri er meget lille eller ikke-eksisterende (Hansen, H. O. 2017).

9.2. Strukturen for den danske forædlingssektor

Den danske forædlingssektor har også gennem årene gennemført en række sammenlægninger og fusioner, den største forædlingsvirksomhed er frøforædlingsfirmaet DLF, der er det 6. største på verdensplan inden for markfrø.

Ud over mark og havefrø inklusive roefrø og cærter er hovedområderne for den danske forædlingssektor korn og kartofler. Der foregår også en del forædling inden for potteplanter og udplantningsplanter enten som en del af de store gartnerier eller tilknyttede forædlingsvirksomheder. En stor del af eksporten består af nyhedsbeskyttede stiklinger.

Der er ikke nogen vertikal integration i den danske forædlingssektor.

Den danske forædlingssektor har en samlet årlig omsætning i størrelsesordenen godt 5 milliarder kr. hvor markfrø mm. tegner sig for godt 80 - 85 %.

Det samlede danske fremavlsareal udgør i størrelsesordenen 130.000 ha, hvoraf markfrø udgør langt det største areal på godt 80.000 ha og korn godt 40.000 ha. (Sortinfo. 2018)

9.3. Betydningen af valg af regulering

I forbindelse med anvendelsen af nye præcisionsforædlingsteknikker er det endnu ikke fastlagt, om afgrøder frembragt gennem NBT skal reguleres gennem den fulde EU GMO regulering eller gennem den såkaldte mutagenese undtagelse. Valget af regulering vil have stor betydning for forædlerens omkostninger til at markedsføre nye NBT sorter.

Anvendes mutagenese undtagelsen, vil omkostningerne til markedsføring i EU skulle dække en optagelse af den nye sort på EU sortliste inklusive plantenyhedsbeskyttelse. Dette er estimeret til 140.000 kr. som omfatter 2 års afprøvning a 60.000 kr. samt 20.000 til plantenyheds-beskyttelse i EU. I det følgende eksempel for mutagenese undtagelsen anvendes der en reguleringsomkostning på 140.000 kr. pr. sort for korn.

Anvendes den fulde EU GMO regulering er det vanskeligt at give et eksakt estimat over omkostningerne, Phillips McDougall (2011) estimerer omkostningerne ved introduktion af en ny GMO afgrøde i Europa til 35.100.000 USD (Regulatory Science, Registration & Regulatory Affairs) svarende til ca. 220.000.000 kr. med dagens kurser. Klaus K. Nielsen (2014) angiver på baggrund af Monsanto vurderinger omkostningerne til at være i størrelsesordenen 50 – 200 mio. kr.

Den økonomiske betydning af valg af regulering bliver her eksemplificeret gennem markedsføring af NBT korn til udsæd. Markedsføringen antages at foregå dels på et dansk marked dels på et europæisk marked, således at størrelsen af markedet kan afspejles i eksemplet. Ved salg til Europa er der forudsat samme regulering og omkostninger som i DK.

Da der er en væsentlig forskel på de ovenstående to estimater, er der også vist et eksempel på betydningen af stigende markedsføringsomkostninger fra 50 mio. kr. til 300 mio. kr.

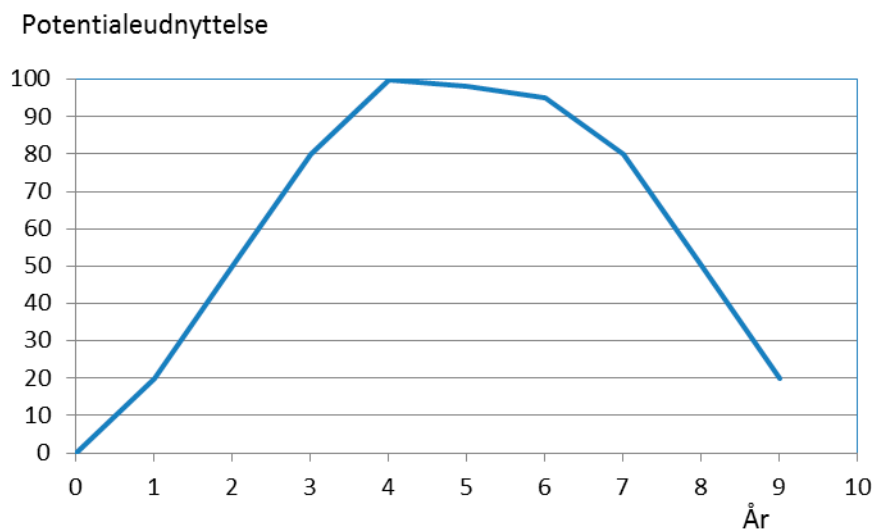
Det forudsættes, at der for begge reguleringer kun er tale om de rent "administrative" omkostninger og det forudsættes også at de administrative omkostninger for begge reguleringer er uafhængige af mængden af solgt frø/udsæd, således at omkostningen i begge tilfælde kan betragtes som en fast omkostning pr. sort. Omkostningen ligger hos forædleren og forudsættes i de nedenstående beregninger dækket gennem løbende licensbetalinger pr. solgt enhed.

Analyserne er foretaget som investeringsberegninger hvor omkostningerne til markedsføring af den enkelte kornsort betragtes som en investering der skal tilbagebetales over en 10-årig periode af de løbende licensbetalinger. Resultatet opgøres som en nutidsværdiberegning (NPV) hvor investeringen er reguleringsomkostningerne og indtjeningen er den tilbagediskonterede værdi af licensindbetalingerne for den givne sort. Der er anvendt en kalkulationsrente på 5 % svarende til en estimeret 10-årig erhvervsrente og en inflation på 2 %.

Den årlige pengestrøm regnes som de løbende licensindbetalinger pr. solgt ton for hvert år (Gylling, 2018).

Beregningerne er foretaget for en enkelt sort med den i beregningerne angivne potentielle udbredelse.

Som illustreret i nedenstående figur 9.1, antages det at en ny sort har en introduktionsperiode, hvor det årlige salg for en ny sort i år ét vil være 20% af det samlede (maksimale) potentiale for den givne sort. Det fulde potentiale antages at blive indfriet i år fire (100%), i de efterfølgende år antages det at markedsandelen aftager en smule grundet nye afgrøder og dermed en øget konkurrence.



Figur 9.1. Den samlede potentialeudnyttelse ser derfor ud som følger (20%, 50%, 80%, 100%, 98%, 95%, 80%, 50% og 20%).

9.4. Korn til udsæd

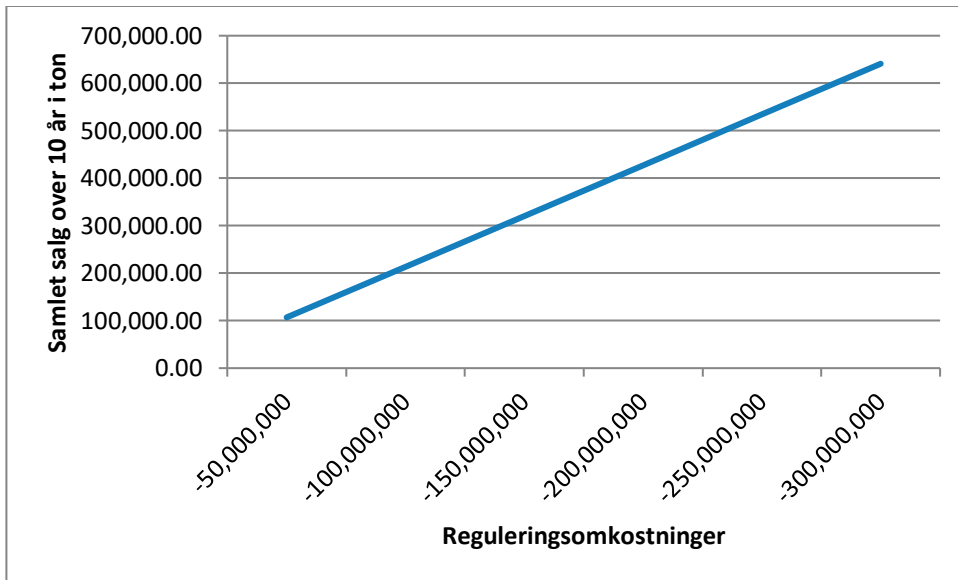
Nedenstående analyseres de økonomiske muligheder for at introducere en ny NBT kornsort dels på det danske marked, dels på det europæiske marked. Analyserne sammenligner den økonomiske betydning at de to reguleringer, den fulde EU GMO regulering og mutagenese undtagelsen. Det antages at det potentielle marked bliver dækket af en sort, enten byg eller hvede. Det danske forbrug af udsæd til korn, regnet som summen af udsæd til hvede og byg, er her estimeret til 220.000 tons/årligt, der er dog er en del variation mellem årene (Statistikbanken). På det danske marked antages det konservativt, at en enkelt sort vil kunne dække 20% svarende til 44.000 tons årligt. På det europæiske marked antages det at en enkelt dansk sort vil kunne dække 10% af markedet, svarende til 240.000 tons årligt.

Licensbetalingen er på 550 kr. pr. ton (Danske sortsejere).

Beregningerne viser at der for mutagenese undtagelsen er et positivt resultat over 10 år med de givne forudsætninger både for det danske marked og for det europæiske marked.

Anvendes den fulde EU GMO regulering vil det ikke være muligt at få et positivt resultat hvis der kun skal markedsføres i Danmark, da markedet ikke er stort nok til at dække omkostningerne. Hvis der markedsføres på det europæiske marked er der med de givne forudsætninger et positivt resultat over 10 år som følge af markedets størrelse, da der skal sælges mindst 470.000 tons.

I nedenstående figur 9.2 er der vist sammenhængen mellem reguleringsomkostninger og det nødvendige marked for at opnå et positivt afkast af en investering i markedsføring. Som det fremgår af figuren betyder regulerings omkostningerne særdeles meget for størrelsen af det nødvendige marked.



Figur 9.2. Nødvendigt samlet salg over 10 år for at markedsføring af en NBT sort bliver rentabel under den fulde EU GMO regulering ved stigende reguleringsomkostninger.

Høje administrationsomkostninger i form af faste beløb pr. produktenhed kan især virke hæmmende for små produktsegmenter og mindre og mellemstore virksomheder. Resultatet kan derfor blive en forstærket koncentration, hvor få store virksomheder har meget store markedsandele. En for stærk koncentration kan også indebære, at de store virksomheder får så stor markedsmagt, at de kan påvirke priserne på markedet. Dermed kan priserne - på kortere eller længere sigt - holdes på et kunstigt højt niveau, og konkurrencen bliver ikke fuldkommen, hvilket medfører økonomiske velfærdstab. Også innovationsindsats og -risiko kan blive negativt påvirket.

Det ovenstående eksempel på rentabiliteten af markedsføring af en ny NBT kornsort viser, at en anvendelse af den fulde EU GMO regulering, under de givne antagelser, vil betyde, at det ikke er muligt at markedsføre NBT sorter med et positivt økonomisk resultat på det danske marked, mens det i visse tilfælde er muligt på det europæiske marked hvis markedsandelen bliver høj nok for en enkelt sort. Ved regulering efter mutagenese undtagelsen vil markedsføring af NBT sorter være rentabel både på det danske og det europæiske marked. Omkostningerne ved den fulde EU GMO regulering må således anses at være prohibitivt høje for de fleste mindre og mellemstore forædlingsvirksomheder. Selv for store forædlingsvirksomheder som DLF som har mange sorter, kan det være vanskeligt at have en enkelt sort som har et stort nok volumen til at dække omkostningerne ved den fulde EU GMO regulering.

Det skal understreges, at investeringsberegningerne kun omfatter omkostningerne til opfyldelse af kravene til regulering i forbindelse med markedsføring af en given NBT sort og at alle omkostningerne skal dækkes af den enkelte sort.

Med store up front administrationsomkostninger vil især de mindre og mellemstore virksomheder være mindre tilskyndet til at udvikle og lancere nye produkter. Hvis et produkt ikke får den ønskede afsætning, vil tabene være relativt store, og de mindre og mellemstore virksomheder kan ikke forudsætte, at disse tab bliver afbalanceret af andre succesfulde lanceringer. Kun virksomheder med en tilpas størrelse kan absorbere tab ved enkelte mislykkede lanceringer. Også store virksomheder kan være tilbageholdende med satsninger på innovation og nye produkter, hvis omkostningerne inden lancering er store, idet risikoen dermed er relativt stor.

Hvis Danmark indfører den fulde EU GMO regulering til at regulere NBT kan det skabe udfordringer ved samhandel med lande hvor der vælges at regulere efter mutagenese undtagelsen. Vælges den fulde EU GMO regulering skal alle NBT produkter/afgrøder mærkes inden de kan placeres på det danske marked, denne mærkning vil ikke være et krav i lande der vælger mutagenese undtagelsen. Dette vil reelt betyde at der skal opstilles et "værn" for import af ikke mærket NBT frø/udsæd og andet vegetabilsk materiale fra disse lande. UK har som det første europæiske land godkendt udsætning af en NBT afgrøde efter mutagenese undtagelsen.

Indføres den fulde EU GMO regulering af NBT er der en stor risiko for, at den danske forædlingssektor vil miste sin internationale konkurrencedygtighed og det vil som sådan heller ikke være muligt at forsyne det danske marked med nye innovative afgrøder.

9.5. Miljømæssig og økonomisk gevinst ved udvikling af total resistens mod meldug i vinterhvede

Den samlede indsats med fungicider er i høj grad bestemt af afgrødens modtagelighed for meldug. Når der behandles mod meldug, giver det nemlig mulighed for at starte behandling mod andre sygdomme tidligere. Valget af midler mod meldug vil derfor i høj grad være styret af afgrødens modtagelighed for andre sygdomme, og af hvilke midler der, af resistenshensyn, bedst kan/skal anvendes mod disse sygdomme senere på sæsonen.

Til valg af fungicidstrategier med og uden udvikling af total meldug resistens for de aktuelt dyrkede vinterhvede sorter er benyttet et beslutningsstøttesystem, der er under udvikling til Spot-IT projektet og bl.a. er anvendt ved den igangværende evaluering af pesticidafgiften. (Ørum et al., 2018). For at reducere risikoen for resistensudvikling og med henblik på at udnytte varierende rabatter på fungiciderne, er det antaget at bedrifterne benytter et gennemsnit af de strategier, der har et nettoudbytte på (plus/minus) 50 kr. pr. ha i forhold til den mest rentable strategi.

Der er ved beregningerne antaget følgende sammensætning af modtagelighedsgrupper, hvor grupperne er karakteriseret ved deres potentielle merudbytte ved en maksimal, ikke nødvendigvis økonomisk rentabel, fungicidbehandling mod meldug (MEL), septoria (SEP) og rust (RST):

vægt	Max mer:			Udbytte UBEH	UBEH, men meldug res.
	MEL	SEP	RST		
5%	0	5	25	70	70
15%	0	20	0	80	80
30%	3	15	0	82	85
15%	10	5	0	85	95
15%	3	15	5	77	80
20%	3	10	5	82	85
100%	3,45	12,75	3	80,8	84,3

Udbredelsen af modtagelighedsgrupperne er vægtet med mellem 5 % og 30 %, i alt 100 %. Der er antaget et sygdomsfrit udbytte på 100 hkg pr. ha for alle grupperne. I alt er antaget et vægtet ubehandlet udbytte på 80,8 hkg pr. for aktuelle sorter, og 84,3 hkg pr. ha for aktuelle sorter, med antagelse af total meldugresistens.

Der er anvendt følgende pris/udbytte forudsætninger

Kernepris: 110 kr. pr. hkg

Udbringning: 70 kr. pr. ha

Sygdomsfrit udbytte: 100 hkg pr. ha

Fungicidpriser jf. Vejledning Planteværn, Middeldatabasen og Oversigt over landsforsøgene.

9.6. Optimal tildeling med nuværende modtagelighed

I gennemsnit for de aktuelt dyrkede sorter kan der ved økonomisk optimal tildeling af fungicider forventes et merudbytte på 1,9; 9,5 og 2,8 hkg. kerne for bekæmpelse af hhv. meldug, septoria og rust. Fungiciderne koster 491 kr. pr. ha. Med 2,05 udbringninger giver det et gennemsnitligt nettomerudbytte på 787 kr. pr. ha samt et gennemsnitligt udbytte og nettoudbytte på hhv. 94,9 hkg pr. ha og 9.809 kr. pr. ha.

9.7. Udvikling af total resistens

Ved antagelse af total meldugresistens for alle de dyrkede sorter vil såvel den samlede indsats med fungicider, som merudbyttet for bekæmpelse af de øvrige sygdomme reduceres ved en økonomisk optimal tildeling af

fungicider. Ved total meldugresistens vil fungiciderne koster 409 kr. pr. ha og antal udbringninger reduceres til 1,95 hvilket giver et gennemsnitligt nettomerudbytte på 736 kr. pr. ha samt et gennemsnitligt udbytte og net-toudbytte på hhv. 95,9 hkg pr. ha og 10.004 kr. pr. ha.

Total meldugresistens for de aktuelt dyrkede sorter vil således i gennemsnit medføre en gevinst på 194 kr. pr. ha. For de mest modtagelige sorter dog en gevinst på godt 500 kr. pr. ha.

9.8. Behandlingshyppighed og pesticidbelastning

Antal udbringninger reduceres fra 2,05 til 1,95 og også valget af fungicider ændres. Ved total resistens reduceres den samlede behandlingshyppighed således fra 1,43 til 1,11 BI pr. ha, mens pesticidbelastningen øges marginalt fra 0,96 til 0,97 B pr. ha. Ved udvikling af total resistens mod meldug sprøjtes der således i gennemsnit mindre, men med lidt mere belastende midler (Ørum 2018).

9.9. Sammendrag

Den danske forædlingssektor opererer på et internationalt marked der er domineret af 3 meget store vertikalt integrerede virksomheder. De tilbageværende virksomheder i den europæiske forædlingssektor er lige som de danske ikke vertikalt integrerede.

Disse forædlingsvirksomheder vil kunne med stor fordel kunne anvende NBT i forbindelse deres forædlingsprogrammer.

De danske forædlingsvirksomheder står i den situation, at de ikke ved hvilken regulering NBT vil blive underlagt. Som det fremgår af det ovenstående vil valget mellem den fulde EU GMO regulering og mutagenese undtagelsen have en voldsom betydning for virksomhedernes muligheder for markedsføring af nye sorter.

Den nuværende situation, hvor virksomhederne gennem længere tid ikke har vidst hvilken regulering NBT vil blive underlagt indebærer en stor risiko for videnstab og tab af konkurrenceevne. De danske forædlingsvirksomheder ønsker forståeligt nok ikke at tage risikoen for større investeringer i NBT så længe reguleringsregimet ikke er kendt.

Referencer

Danske sortsejere. 2017. Licensafgift af certificeret såsæd.

Gylling M. 2018. Hvilken betydning har det for introduktionen af nye afgrøder, om NBT er omfattet af mutagenese undtagelsen eller den fulde EU GMO regulering? Institut for Fødevarer- og Ressourceøkonomi (IFRO). Københavns Universitet. Upubliceret notat, 2018.

Hansen HO. 2017. Personlig meddelelse.

Nielsen KK. 2014. Moderne genteknologiske metoder som konkurrenceparameter i planteforædlingen.

Phillips McDougall. 2011: Cost of Bringing a Biotech Crop to Market.

Sortinfo.dk/Oversigt.asp.

Ørum JE, Ståhl L, Kudsk P, & Jørgensen LN. 2018. Analyser til brug for evaluering af pesticidafgiften: En beskrivelse af ændringer i pesticidernes priser, forbrug og belastning. IFRO Udredning, Nr. 2018/01.

Ørum, JE. 2018. Personlig meddelelse.

10. Sammendrag for den landbrugs-, gartneri- og skovbrugsfaglige del

Birte Boelt, Karen Koefoed Petersen, Morten Gylling

I afsnittene om udfordringer i danske landbrugs- og havebrugsafgrøder er der en gennemgang af dyrkningsudfordringer og de mest relevante/interessante egenskaber i forædlingen af de største afgrøder inden for hvede og byg, græs og kløver, raps, frilands- og væksthushgrøntsager, frugt og bær, prydplanter og skovtræer. For de fleste afgrøder går egenskaber som sygdomsresistens, bedre tolerance overfor abiotisk stress (tørke, ekstreme temperaturer, vind, næringsstofmangel), udbytte (væksthastighed) og kvalitet igen foruden en række specifikke egenskaber for de enkelte afgrøder.

Både kemisk og fysisk mutagenese, der medfører mange vilkårlige mutationer, og naturligt opståede mutationer anvendes i stor udstrækning i forædlingen og har resulteret i mange kommercielle sorter. Der er ingen tvivl om at introduktion af teknikker, der kan introducere præcise mutationer, vil være meget attraktive i fremtidige forædlingsprogrammer også for danske forædlingsfirmaer.

Som anført i afsnit 4 "Precision breeding" er der allerede eksempler på landbrugs- og havebrugsafgrøder med forbedret sygdomsresistens, udbytte, kvalitet og abiotisk stress via præcisionsforædling.

Dansk landbrug står over for en række udfordringer i relation til at reducere miljøbelastningen med næringsstoffer og pesticider. Hertil kommer klimabelastningen i relation til udledning af drivhusgasser. Samtidigt er der øget behov for fødevarer, foder og plantemateriale til erstatning af fossile materialer. Det stiller store krav til afgrødernes og sorternes dyrkningsegenskaber, udbyttepotentiale og produktkvalitet. For både konventionel og økologisk produktion gælder, at øget sygdomsresistens vil have meget positiv indflydelse på produktionen, ligesom andre egenskaber som stråstivhed, mindre tilbøjelighed til aksnedknækning mm. vil være værdifulde. Overordnet set er det dog stadig udbyttet, som er den mest afgørende faktor for bedriftens økonomi – alternativt skal der være specifikke kvalitetsegenskaber, som honoreres særskilt.

Sammenfattende vurderes dyrkningsudfordringer i vores landbrugsafgrøder at løses bedst gennem en aktiv planteforædling og afprøvning af sorter målrettet og/eller tilpasset danske dyrkningsforhold. Præcisionsforædling kan være et bidrag hertil, eksempelvis i relation til sygdomsresistens. Af international litteratur fremgår det, at præcisionsforædling også søges udnyttet til introduktion af herbicidresistens. Da vi aktuelt ser udvikling af herbicidresistens i nogle af vore tabsgivende ukrudtsarter, kan anvendelse af herbicidresistente afgrøder få u hensigtsmæssige konsekvenser. Det skal dog nævnes, at herbicidresistente afgrøder også kan fremkomme ved mange andre forædlingsteknikker.

Inden for prydplanter, hvor et af kravene til branchen er en konstant strøm af nyheder, dvs. planter med nye farver, former og dufte samt mere robuste og holdbare planter vil præcisionsforædling være et meget nyttigt redskab. For producenterne (gartnerne) er det et drømmescenarie at have en serie af sorter, der kun adskiller sig mht. farve, da det vil sikre, at sorterne har samme produktionskrav og produktionstid, så der kan leveres et helt sortiment i samme størrelse og udviklingstrin til kunderne. Det kan lade sig gøre med de nye præcisionsteknikker, men i ringere grad med traditionel forædling og mutationsforædling, hvor uønskede egenskaber også vil være tilstede.

I træagtige afgrøder, hvor generationstiden er relativ lang, vil der, i de plantearter hvor der findes egnede vævskultursystemer, være mulighed for at forbedre eksisterende sorter ved at introducere f.eks. sygdomsresistens eller forbedret abiotisk stress tolerance. Et eksempel kunne være introduktion af skurvresistens i modtagelige æblesorter.

Med adgang til de nye præcisionsforædlingsteknikker beskrevet i denne rapport uden GMO-regulering forventes de danske forædlingsvirksomheder hurtigt at tage disse nye metoder i brug. Præcisionsforædling vil bidrage med en forventelig mere effektiv, hurtigere og dermed billigere frembringelse af nye sorter og dermed produkter til videre markedsføring, afsætning og praktisk anvendelse. Hvis præcisionsforædling derimod kun kan anvendes med GMO-regulering, forventes disse metoder kun at blive anvendelige for nogle få, store internationale forædlingsvirksomheder, som næppe finder det økonomisk attraktivt at udvikle nye forbedrede sorter til danske dyrkningsforhold.

For korn til udsæd vil omkostningerne alene til markedsføring af en sort til udsæd adskille sig væsentligt afhængigt af hvilken type godkendelse de nye præcisionsforædlingsteknikker falder ind under. Anvendes mutagenese-undtagelsen er omkostningerne estimeret til ca. 140.000 kr. og med fuld EU GMO-regulering vil de ligge på 50-220 mio. kr. En fuld EU GMO-regulering vil derfor især hæmme små produktsegmenter og små- og mellemstore virksomheder og forstærke koncentrationen af store virksomheder med store markedsandele. Det kan betyde at den danske innovationsindsats og – risiko kan blive negativt påvirket og at der er stor risiko for at den danske forædlingssektor mister sin internationale konkurrencedygtighed og evne til at forsyne det danske marked med nye innovative afgrøder.

Ordliste

Construction specifik metode (på dansk konstruktions specifik): Metoder der genkender en kombinationen af flere elementer der er brugt i konstruktionen af den indsatte DNA sekvens.

Deoxyribonukleinsyre (DNA): Cellens arvemateriale der er bestemmende for alle genetiske egenskaber en organisme kan have.

Element specifik metode: Metoder der genkender et enkelt af de genetiske elementer der er brugt i konstruktionen af den indsatte DNA sekvens.

Enhancer: Genelement der fortæller, hvor meget protein der skal produceres. Det kan bruges til at få produceret store mængder af et ønsket protein.

Event specifik metode: Metode der er helt specifik for en enkelt hændelse, hvor en fremmed DNA sekvens er blevet inkorporeret i et genom. Det betyder at metoden påviser en enkelt navngiven GMO.

Gen: Et stykke DNA der kan aflæses af cellen, som der ud fra kan producere et protein.

Genetisk modificeret organisme (forkortet GMO): Organisme (typisk en plante), hvor generne er ændret ved hjælp af genteknologiske metoder. Den klassiske GMO har fået indsat gener fra ubeslægtede organismer.

Insektresistens: Evnen til at modstå angreb fra insekter, enten specifikke arter eller grupper af insekter.

Intron: Gensekvens der ikke er med i det færdige protein, men er nødvendigt for produktionen af proteinet.

Polymerase kæde reaktion (PCR): Metode hvorved en bestemt gensekvens kan genkendes i en blanding af mange forskellige sekvenser og kopieres til mange eksemplarer. Disse kopier kan påvises enten mens processen kører (realtime PCR) eller når processen er kørt til ende (endpoint PCR/konventionel PCR).

Promotor: Genelement der fortæller cellen, at her begynder et gen, der skal aflæses så der kan produceres et protein. Promotorsekvensen bliver ikke selv til et protein, men er genelementet, som er nødvendigt for at cellens proteinsyntese kan gå i gang.

Reference gen: Gen der altid er i planten uanset om planten er genetisk modificeret eller ej. Genet er typisk kun tilstede i en kopi i genomet og kopianallet er stabilt i alle sorter inden for plantearten. Referencegenet benyttes til at kvantificere, hvor meget af en bestemt plante der er i en prøve, og udregne det procentvise indhold af en navngiven GMO.

Terminator: Genelement der fortæller at proteinet er færdigt, og der ikke skal syntetiseres mere.

DCA - Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug er den faglige indgang til jordbrugs- og fødevarerforskningen ved Aarhus Universitet (AU). Centrets hovedopgaver er videnuddveksling, rådgivning og interaktion med myndigheder, organisationer og erhvervsvirksomheder.

Centret koordinerer videnuddveksling og rådgivning ved de institutter, som har fødevarer og jordbrug, som hovedområde eller et meget betydende delområde:

Institut for Husdyrvidenskab
Institut for Fødevarer
Institut for Agroøkologi
Institut for Ingeniørvidenskab
Institut for Molekylærbiologi og Genetik

Herudover har DCA mulighed for at inddrage andre enheder ved AU, som har forskning af relevans for fagområdet.

RESUME

Vidensyntesen om nye planteforædlingsteknikker og deres effekt på dansk landbrug består af en teknisk del (kapitlerne 1-5) med baggrund om planteforædling, mutationer, teknologi inden for mutationsforædling før og nu, konkrete eksempler på præcisionsforædling ved nye planteforædlingsteknikker i afgrøder og mulighederne for detektion af præcisionsforædlede afgrøder, hvis det besluttes, at de skal reguleres som en GM afgrøde. Herefter kommer en jordbrugsfaglig del (kapitlerne 7-9), hvor der fokuseres på konkrete udfordringer i danske landbrugsafgrøder, gartneri og skovbrug og på, om NBT potentielt vil kunne bidrage. Til sidst i afsnittet kigges på økonomiske forhold vedrørende et dansk landbrug med og uden nye planteforædlingsteknikker. I kapitel 6 sammenfattes den tekniske del og der gives en sammenligning af præcisionsforædling med konventionelle forædlingsteknologier og i kapitel 10 gives en sammenfattende analyse af potentialerne for NBT for den jordbrugsfaglige del.

Samlet giver vidensyntesen en kortlægning af et område, der er politisk kontroversielt og følsomt, med fokus på effekter på dansk landbrug, hvilket afhænger af den status de nye planteforædlingsteknikker får i forhold til EU's GMO-lovgivning.

