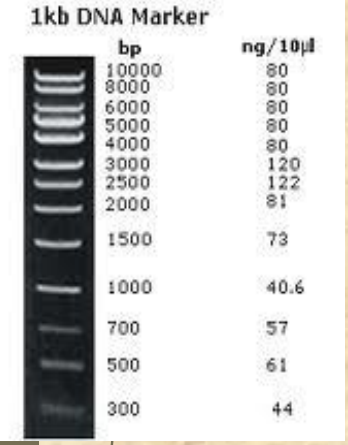
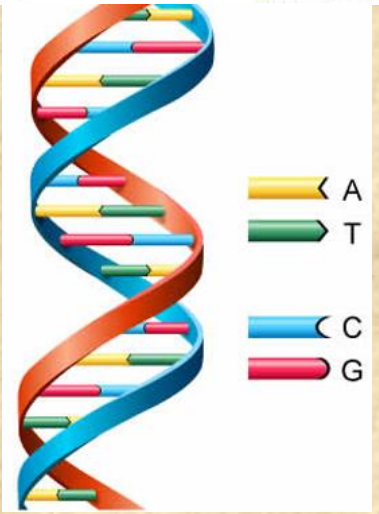


Teknikker til forædling af frø



Temamøde i

Økologisk Landsforening

7/3-2015

Hans Henrik Kampmann

VEGINOVA IVS

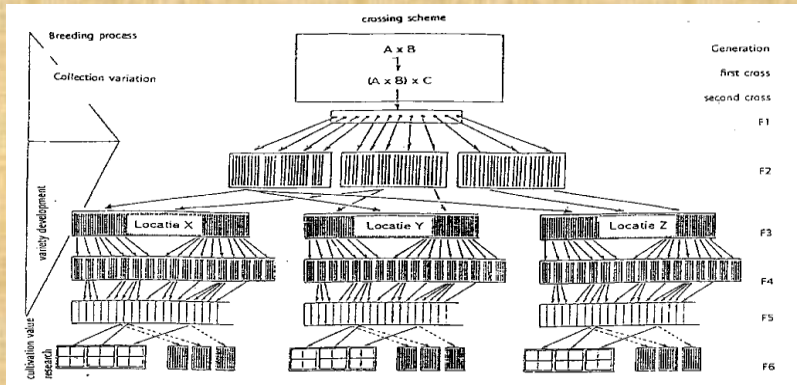
Rytmen i et forædlingsprojekt

- Analysere markedet og markeds trends
- Analysere hvad der er muligt:
  - Genetisk - finde egenskaber, sorter, gen-banker etc.
  - Teknisk og økonomisk – hvad har vi til rådighed – genetik, ressourcer, tid
- Opsætte realistiske mål for programmet –
  - Lav produkt profil – beslut hvad fokus skal være
  - Design program
    - **Valg af forædlingsteknikker - først til mølle, minimum omkostninger og maximum effekt**
    - Styr på jura'en og etikken – patenter, rettigheder, udgangsmateriale,
- Tilpas løbende til ændrede forudsætninger
- Identificér potentielle sorter, test dem, markedsfør dem

Forædlingsteknikker, generelt

- **Teknikker til at kombinere naturlige egenskaber (eng.: "Native Traits")**
  - Klassisk krydsningsforædling
  - Artskrydsninger, herunder brug af embryo rescue
- **Teknikker til at renavle forældre linjer og sorter**
  - Klassisk selvbestøvning, indavl
  - Dobbelte haploider
  - DNA-markør baseret fixering
- **Teknikker til bedre selektion**
  - Stress-test, udsætte for stress – sygdomme, insekter, varme/kulde etc
  - Selektion ved brug af DNA-markører
- **Teknikker til at lave F1-hybrider**
  - Emaskulering, håndbestøvning
  - Selvinkompatibilitet, andet
  - Han-sterilitet – NMS, CMS
- **Teknikker til at frembringe nye egenskaber der ikke kan findes naturligt**
  - Mutationsforædling,
  - GMO

Teknikker til at kombinere naturlige egenskaber (”Native traits”)



- **Klassisk krydsningsforædling**
  - Stadig den alt-dominerende basis i planteforædling
  - Brugt målrettet siden Mendel’s opdagelser af arveligheds reglerne
  - Anvendes overalt og stort set uændret
- **Artskrydsninger,** herunder brug af **embryo rescue** og **kromosomfordobling**
  - Mange naturlige egenskaber er hentet fra nært beslægtede arter
  - Nogen gange kræves det, at det befrugtede embryo udtages og dyrkes i vævskultur
  - Nogen gange kræves fordobling af kromosomer med kemikalier for at gennemføre fortsatte krydsninger og overførsel af den ønskede egenskab

- Alle ovenstående teknikker er lovlige i henhold til EU lovgivning og ingen er under kritik fra NGO’er

Teknikker til at renavle forældrelinjer og sorter

- **Klassisk selvbestøvning, indavl**
  - Fortsat selvbestøvning indavl fører til rene forældrelinjer og dermed til hybrid sorter. Dette er langt den mest anvendte teknik til frembringelse af rene forældre linjer
- **Dobbelt haploider (se figur)**
  - I flere og flere arter anvendes teknikken dobbelt haploider. Herved opnås helt rene linjer på kort tid
  - Dobbelt haploider giver en tidsgevinst og kan frembringe rene forældrelinjer hurtigt. Men teknikken giver begrænset ny variation. Den anvendes mest ved kopiering af eksisterende sorter
  - I nogle vigtige arter benyttes teknikken rutinemæssigt: Peber, agurk, Brassica, løg, porre,
- **DNA-markør baseret fixering (se figur)**
  - Brugen af DNA-markører i grønsagsforædling er eksploderet de senere år
  - DNA markører bruges til at fixere de vigtigste egenskaber og til hurtig renavling af linjer og til at kikke efter nye kombinationer af egenskaber

- Alle ovenstående teknikker er fuldt lovlige i henhold til EU lovgivningen og ingen er under kritik fra NGO'er
- DNA teknikker er fremhævet af Greenpeace som fuldt acceptabelt og anbefales som en erstatning for GMO

Dobbelt haploid teknik

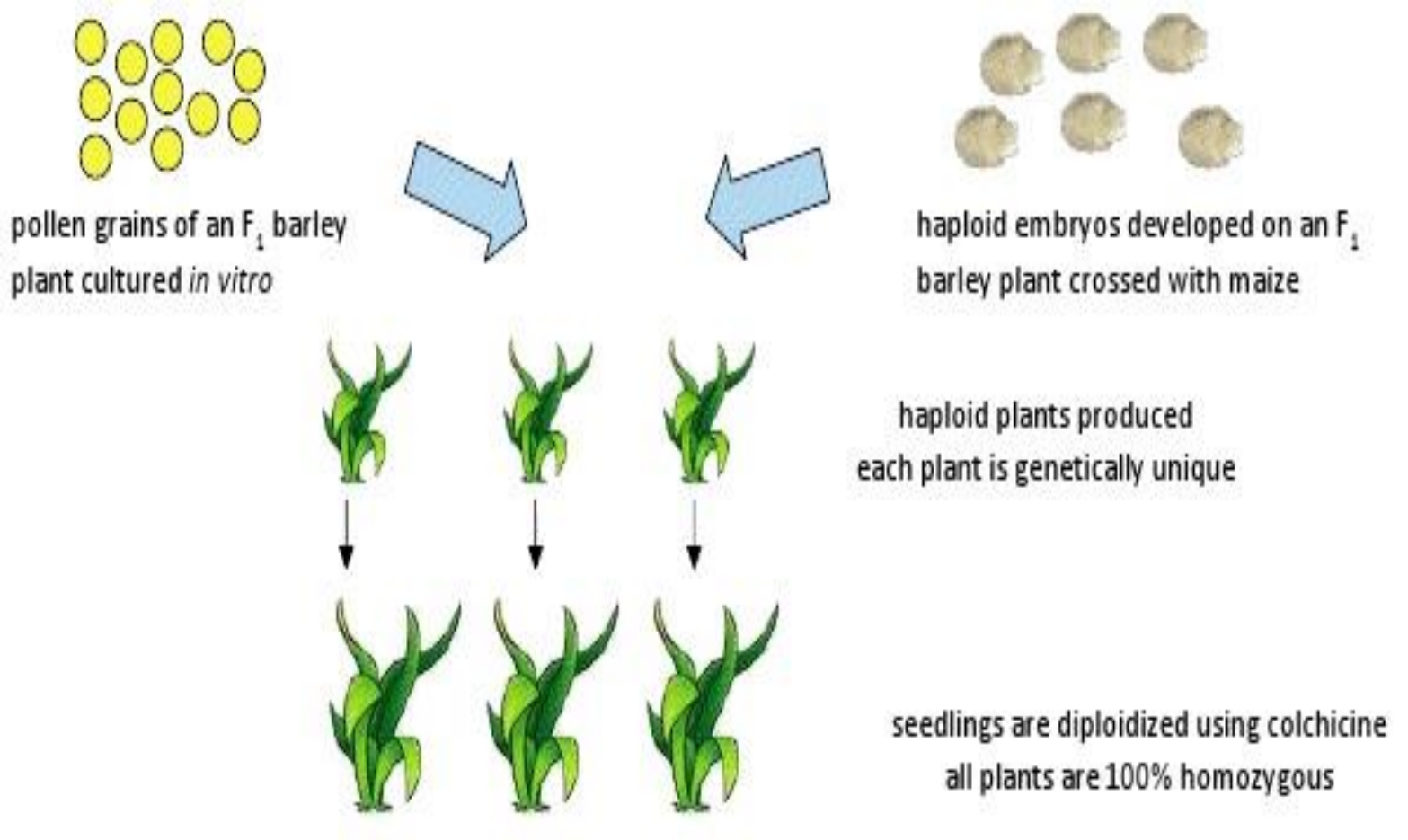


Figure 4 – Differences in leaf arrangement of haploid and diploid individuals.

DNA til renavling

Forskellige markører

Plante	INCO_071 TOM	INCO_101 TOM	INCO_102 TOM	INCO_103 TOM	INCO_111 TOM	INCO_112 TOM	INCO_113 TOM	INCO_114 TOM	INCO_115 TOM	INCO_011 TOM	INCO_121 TOM	INCO_122 TOM	INCO_123 TOM	INCO_124 TOM	INCO_012 TOM	INCO_013 TOM	INCO_014 TOM	INCO_015 TOM	INCO_021 TOM	INCO_022 TOM	INCO_023 TOM	INCO_031 TOM	INCO_032 TOM	INCO_033 TOM	INCO_034 TOM	INCO_041 TOM	INCO_042 TOM	INCO_043 TOM	INCO_044 TOM	INCO_045 TOM	INCO_051 TOM	INCO_052 TOM	INCO_053 TOM	INCO_054 TOM	INCO_055 TOM	INCO_061 TOM	INCO_062 TOM	INCO_063 TOM	INCO_072 TOM	INCO_073 TOM	INCO_081 TOM	INCO_082 TOM	INCO_083 TOM	INCO_084 TOM	INCO_085 TOM	INCO_091 TOM	INCO_092 TOM	INCO_093 TOM	Renhed
1	B	B	B	A	A	B	B	B	B	B	A	A	A	B	A	A	A	B	B	A	A	A	B	A	B	A	B	B	A	B	B	A	A	B	B	B	A	A	B	A	B	A	A	A	A	A	A	A	100%
2	H	B	B	A	H	A	A	A	A	B	H	H	B	H	B	A	H	B	H	H	B	A	B	B	A	A	H	H	H	B	B	A	A	B	A	B	A	B	H	B	B	A	A	H	B	A	A	H	63%
3	H	B	B	A	H	A	A	A	A	B	H	H	B	H	B	A	H	B	H	H	B	A	B	B	A	A	H	H	H	B	B	A	A	B	A	B	A	B	H	B	B	A	A	H	H	A	A	H	62%
4	H	B	B	A	H	A	A	A	A	B	H	H	B	H	B	A	H	B	H	H	B	A	B	B	A	A	H	H	H	B	B	A	A	B	A	B	A	B	H	B	B	A	A	H	B	A	A	H	63%
5	H	B	B	A	H	A	A	A	A	B	H	H	B	H	B	A	H	B	H	H	B	A	B	B	A	A	H	H	H	B	B	A	A	B	A	B	A	B	H	B	B	A	A	H	B	A	A	H	63%
6	H	B	B	A	A	A	A	A	A	B	B	A	B	A	B	A	H	B	B	A	B	A	B	B	A	A	A	H	H	B	B	A	A	B	A	B	A	B	H	B	B	A	A	H	B	A	A	H	68%
7	H	B	B	A	H	A	A	A	A	B	H	H	B	A	B	A	A	B	H	H	B	A	B	B	A	A	B	B	H	B	B	A	A	B	A	B	A	B	H	B	B	A	A	H	H	A	A	H	65%
8	B	?	B	B	B	B	B	B	B	B	A	B	B	B	A	A	B	B	B	A	B	A	H	B	A	A	B	B	A	A	A	A	A	B	B	B	A	A	A	B	A	B	A	B	A	A	A	B	98%
9	B	?	B	A	A	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	A	B	B	H	H	B	B	H	B	H	A	B	B	A	A	B	A	A	B	B	A	B	B	B	B	B	B	A	B	A	B	B	A	90%
10	B	?	B	A	H	A	A	A	A	A	B	A	B	B	A	B	H	B	B	A	B	B	H	A	B	A	B	B	A	A	B	A	A	B	B	A	B	B	B	A	H	B	A	B	A	B	B	A	90%

A – gen A; B – gen B, H – heterozygot – ”uren”

Konklusion – Plante 1 er genetisk ren og kan være en forældre linje

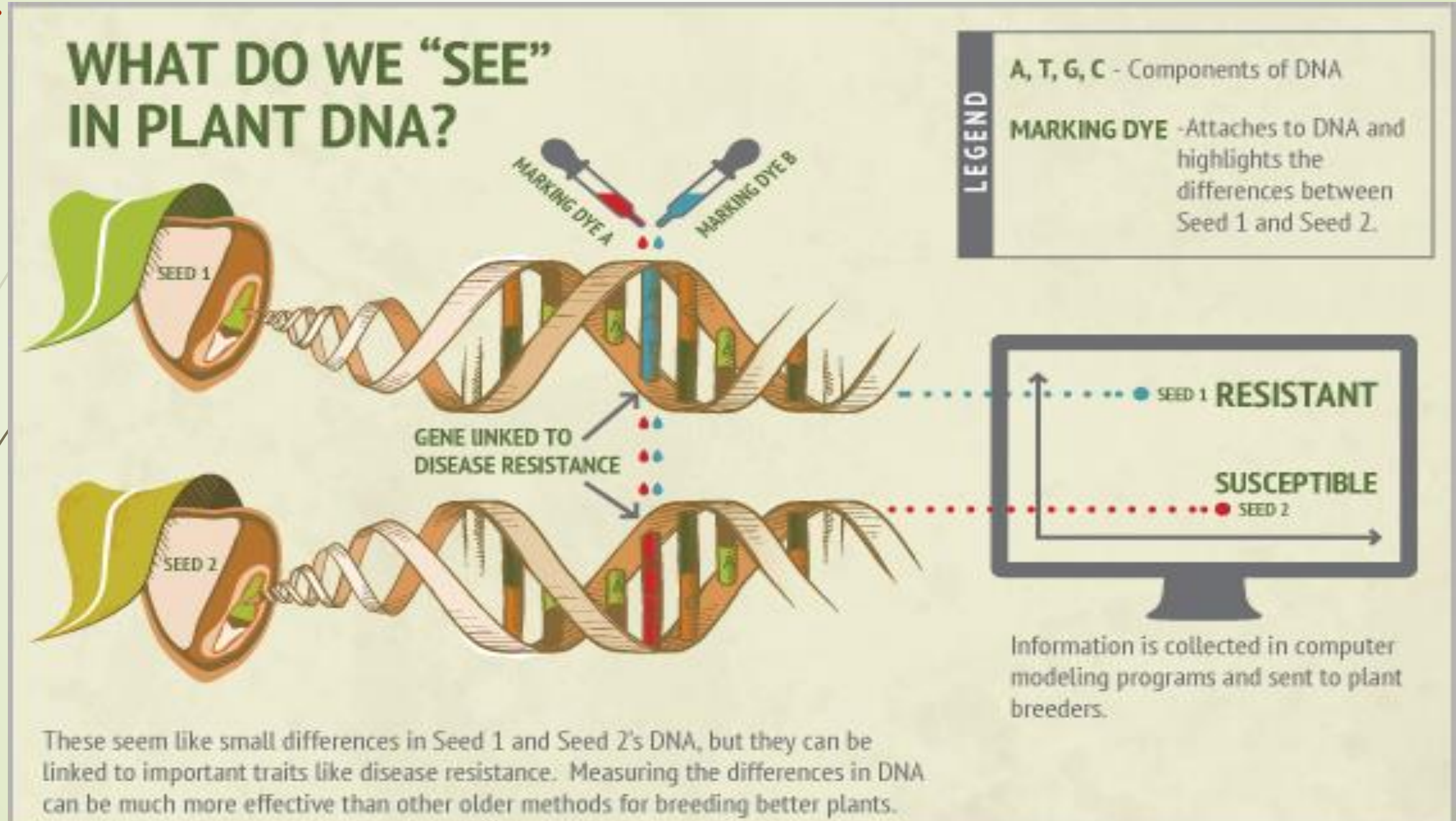
Teknikker til bedre selektion

- **Stress-test, udsætte for stress – sygdomme, varme/kulde etc**
  - Traditionelt er vigtige egenskaber blevet selekteret i stress tests
    - Sygdoms- og insekt-resistens er selekteret ved smitning med skadevolderne
    - Tolerance mod stress – kulde/varme/tørke etc. er udvalgt i specielle stress-tests

- **Selektion af egenskaber med DNA-markører**
  - Ved at sammenligne nedarvningen af stress-resistens med nedarvningen af DNA markører kan man finde de DNA-markører, der kan påvise egenskaben
  - Se figur med resistens-markør association
  - DNA markører bruges i stærkt stigende omfang til påvisning af stress-resistens i alle de vigtige arter

- Begge ovenstående teknikker er lovlige i henhold til EU lovgivning og ikke under kritik fra NGO'er
- DNA teknikker er fremhævet af Greenpeace som fuldt acceptabelt og anbefales som en erstatning for GMO

Selektion med DNA-markører



Teknikker til at lave frø af F1-hybrider

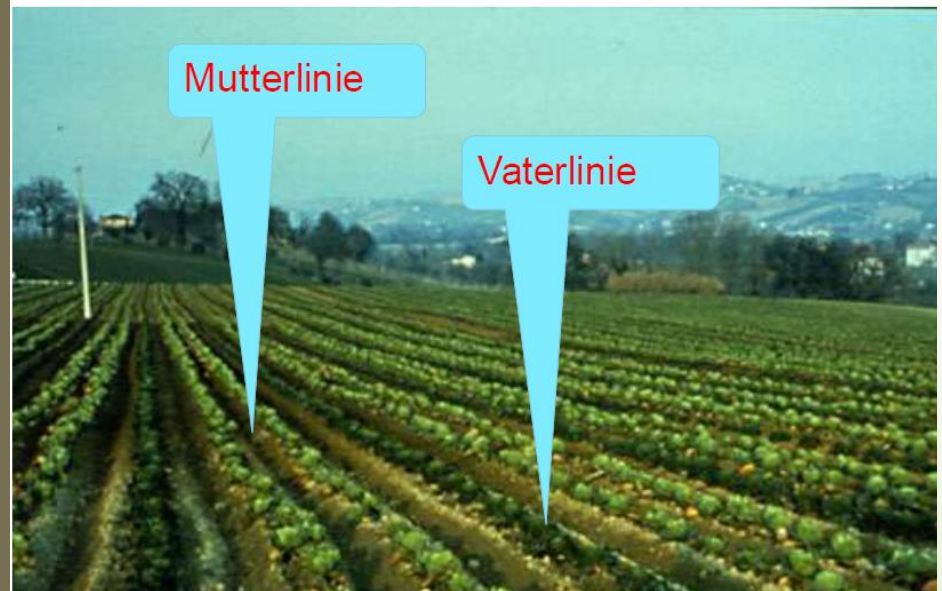
- **Traditionel emaskulering, håndbestøvning**
  - Benyttet i de store arter – tomat,agurk, peber, vandmelon, melon, aubergine
- **Selvinkompatibilitet (planten genkender eget pollen og afviser det)**
  - Historisk brugt til hybrider i Brassica-familien
- **Han-sterilitet – NMS/GMS, CMS**
  - **NMS/GMS** (genet for han-sterilitet sidder i Nukleus og moder-linjen formeres vegetativt)
    - Er benyttet i bl.a. peber og porre
  - **Naturlig CMS** (gen for han-sterilitet sidder i mitokondrierne i celle cytoplasmaet (se figur)
    - Er benyttet i bl.a. gulerod og løg
  - **Celle fusioneret CMS** (se figur)
    - Naturligt forekommende CMS er forbedret gennem cellefusion
    - Teknikken benyttes i de fleste moderne sorter af Brassica og Cikorie - **kun** i disse to arter

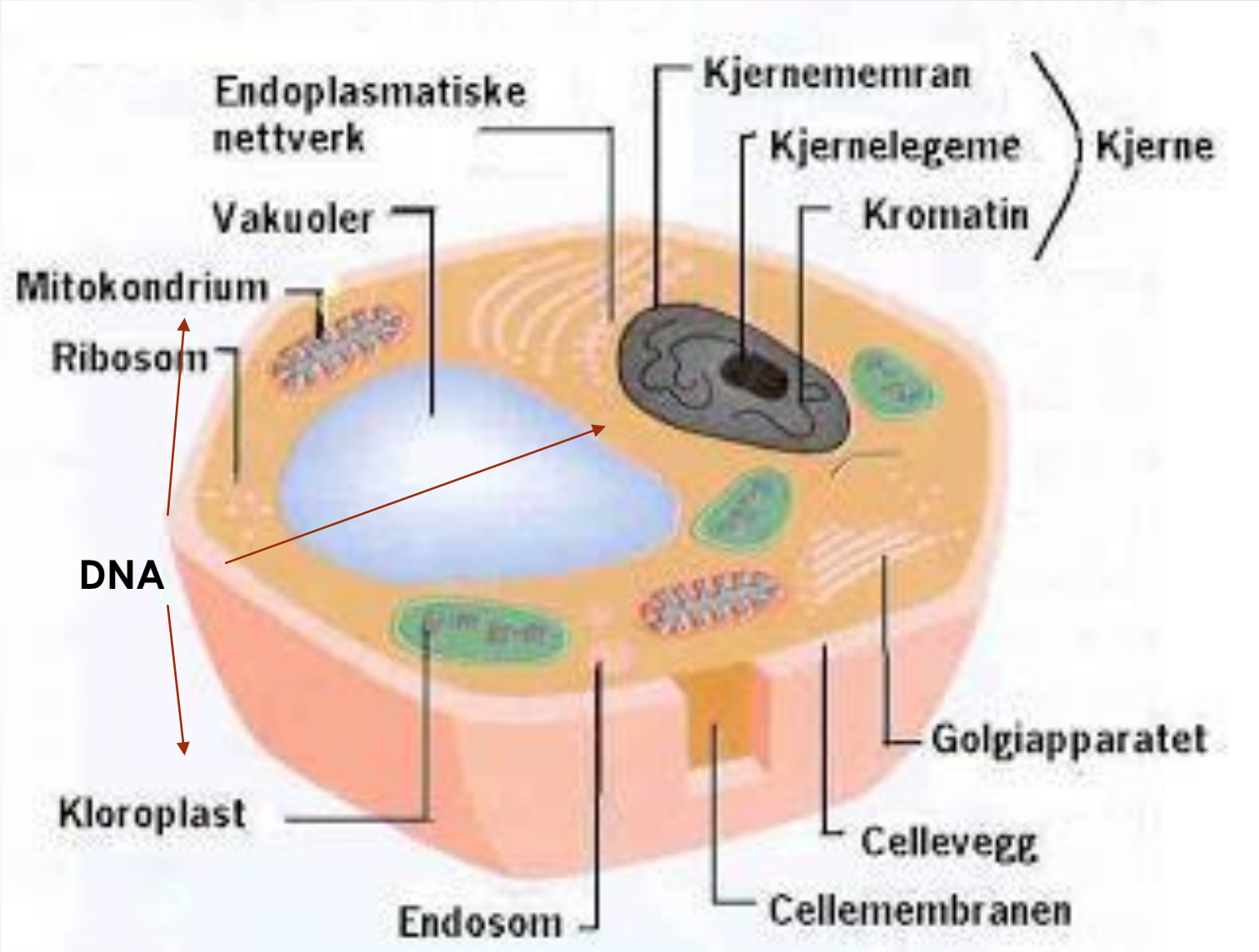
- Ovenstående teknikker er alle fuldt lovlige i henhold til EU-lovgivningen. **Teknikken"celle-fusioneret CMS" er under kritik fra NGO'er og Producent sammenslutninger**

CMS forklaring

Han steril

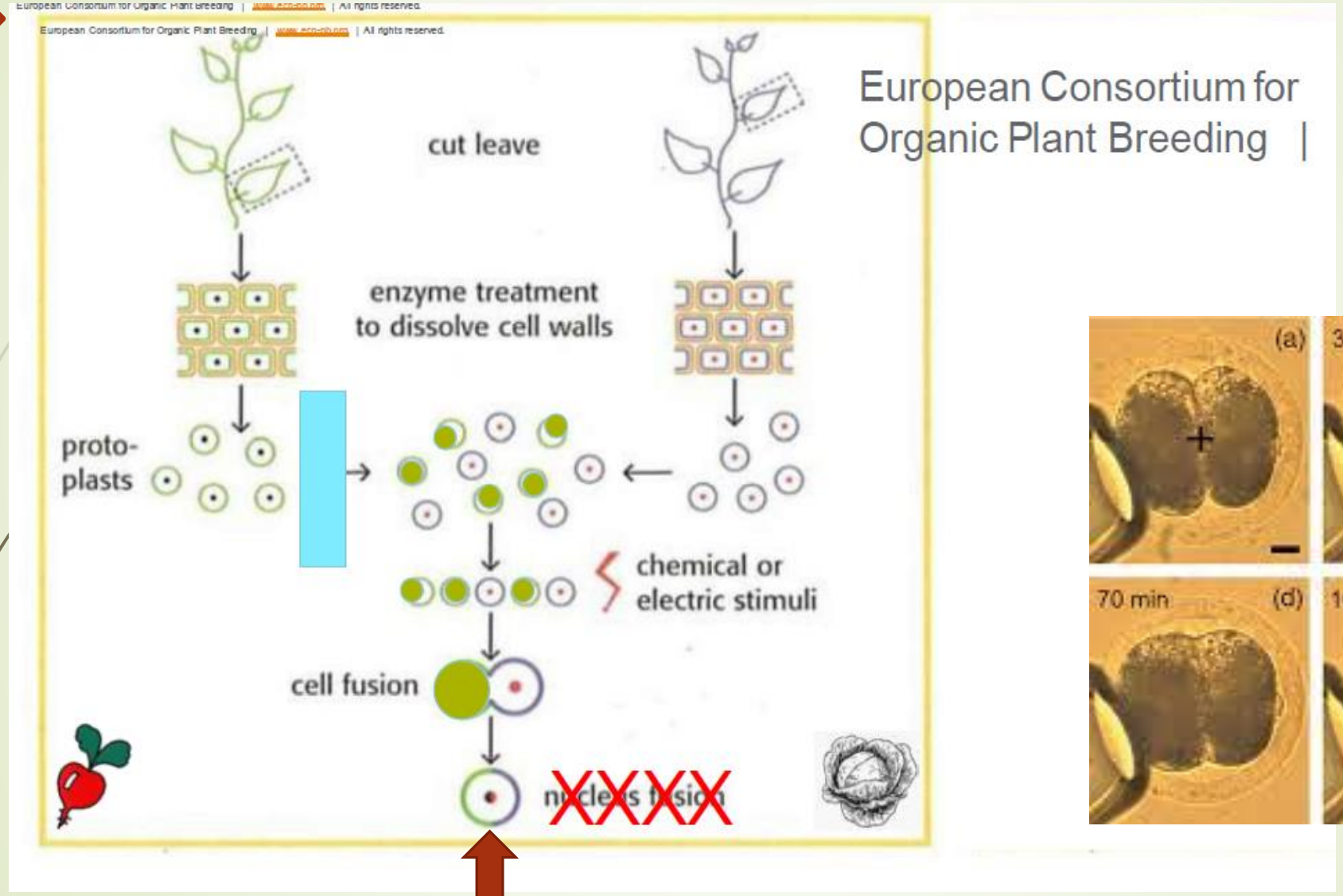
Han fertil



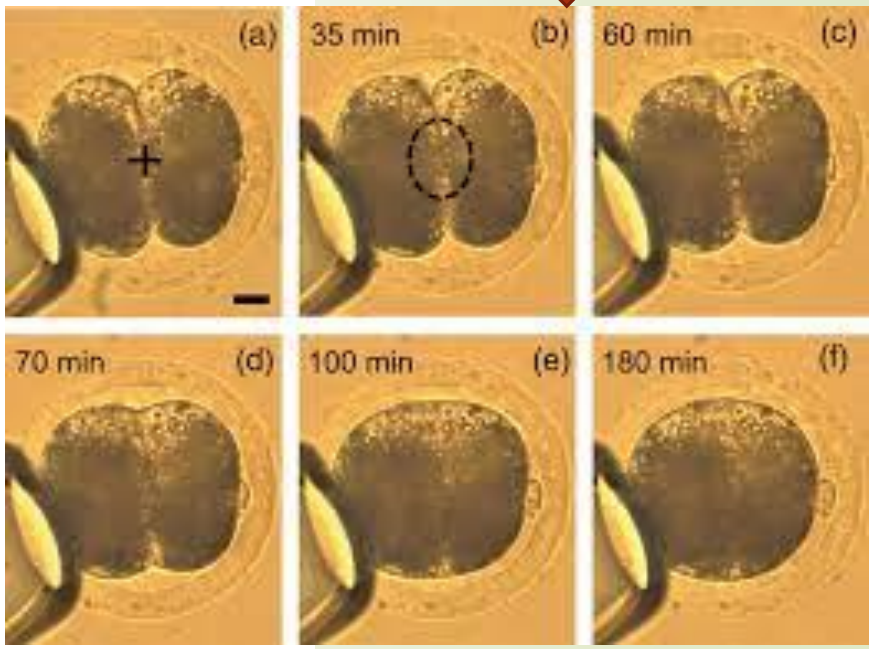


Frøproduktion, hvidkål

Celle fusioneret CMS



Celle fusion



Radis mitochondrier + Brassica kloroplaster og kerne

Celle fusioneret CMS i Brassica, historie

- Mangel på egnede CMS-kilder i Brassica betød, at man benyttede cellefusioner til at forbedre de eksisterende kilder
- Den cellefusion der skaber "artshybriden" med Radis mitokondrier og Brassica kerne og kloroplaster er lavet i 1987
- Patenteret d. 14/12-1988, GB19880029201 af "Zaadunie" (=Syngenta)
- Første patent indenfor grønsagsforædling
- Basis for al moderne brug af CMS i Brassica
- Lovligt i henhold til EU lovgivning og fremhævet i EU regulativet EC 834/2007 der vedrører økologisk produktion som i fuld overensstemmelse hermed
- I EU-lovgivningen sidestilles cellefusion ikke med GMO
- De senere år stigende kritik af brug af sorter fra cellefusion i økologisk/biodynamisk produktion
- 4 tyske økologiske producent organisationer (Demeter, Bioland, Naturland, IFOAM) har forbudt brugen af Brassica-sorter med CMS fra cellefusion
- Hovedargument er at "cellens integritet" tabes ved fusionen
- Alle gener er naturlige, men teknikken er ikke naturlig

Cellefusioneret CMS i Cikorie, historie

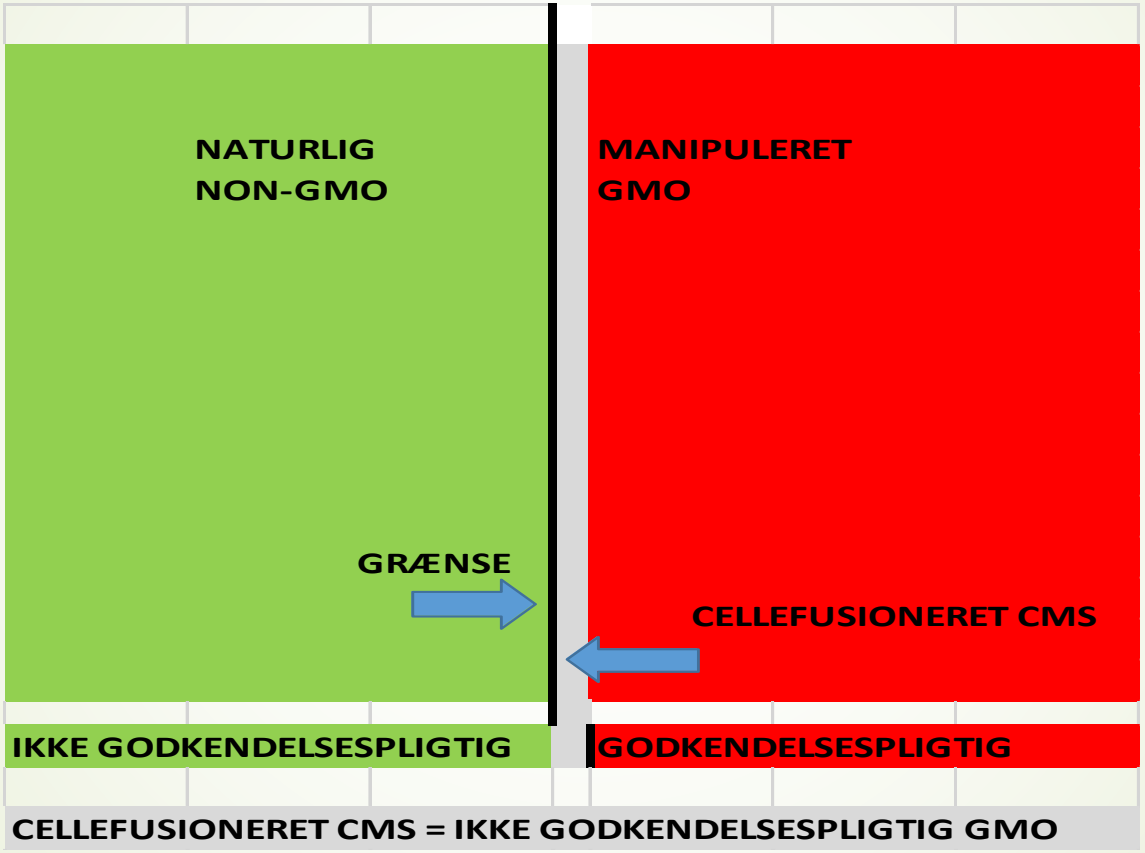
- Forædlerne kunne ikke finde egnede CMS-cytoplasmaer i Cikorie (julesalat, cikorie salat (Endivie), radicchio, industriel cikorie (bruges til inulin produktion og kaffe erstatning)
- Et godt CMS cytoplasma eksisterer i Solsikke, men disse to arter kan i praksis ikke krydses naturligt - derfor valgtes cellefusion
- I 1990 lykkedes det den franske forsknings institution INRA at overføre CMS fra solsikke til Cikorie ved protoplastfusion
- Dette CMS cytoplasma blev udbredt og benyttes i dag i mange sorter af cikorie salat og julesalat

Cellefusioneret CMS og EU's GMO lovgivning

- EU Direktivet 2001/18/EC er basis for GMO lovgivningen
- Cellefusionerede CMS kilder falder under dette direktiv, men er undtaget for godkendelse:
- **Teksten i direktivet vedr. cellefusioner:**
- **Exemptions**
  1. This Directive shall not apply to organisms obtained through the techniques of genetic modification listed in Annex I B.

  ANNEX I B
  TECHNIQUES REFERRED TO IN ARTICLE 3
  Techniques/methods of genetic modification yielding organisms to be excluded from the Directive, on the condition that they do not involve the use of recombinant nucleic acid molecules or genetically modified organisms other than those produced by one or more of the techniques/methods listed below are:
  (1) **mutagenesis**,
  (2) **cell fusion** (**including protoplast fusion**) of plant cells or organisms which can exchange genetic material through traditional breeding methods.

Dilemmaet


NATURLIG
NON-GMO
MANIPULERET
GMO
GRÆNSE
CELLEFUSIONERET CMS
IKKE GODKENDELSESPLIGTIG
GODKENDELSESPLIGTIG
CELLEFUSIONERET CMS = IKKE GODKENDELSESPLIGTIG GMO

Teknikker til at frembringe helt nye egenskaber

- **"Eco-tilling" - mutationsforædling**
  - Præcise DNA metoder bruges til at lede efter interessante naturlige mutationer i meget store naturlige populationer, et vækstområde
- **"Tilling" - mutationsforædling**
  - Mutations populationer opnået gennem bestråling eller mutagene kemikalier screenes for interessante mutationer ved hjælp af DNA diagnosticering
    - Resultaterne af kunstige mutationer har været stærkt begrænsede indenfor grønsagsforædling
  - Udviklingen indenfor meget præcis DNA diagnosticering af interessante mutationer kan ændre dette, det er et område i stor vækst
    - Teknikker som f.eks. Talens, KeyBase ODM, CRISPr er under hastig udvikling
- **GMO – bioteknologisk overførsel af gener**
  - Cis-genetics – bioteknologisk overførsel af naturlige gener mellem individer der kan krydse
  - Trans-genetics – overførsel mellem individer der ikke kan krydse, inklusive kunstige gener

- Mutations teknikker er pt under overvejelse i EU-systemet for deres lovmæssige status
- GMO-teknikker er underkastet en streng EU-lovgivning og pt ikke benyttet i grønsagsforædling. Der er en enkelt GMO majs-sort der er godkendt i EU

Hvordan kan økologer vælge forædlingsteknologi?

- Nogle af de pt benyttede og fuldt lovlige planteforædlingsteknikker udfordrer grundtanken bag Økologien
  - GMO, diskussion siden 90'erne – pt. ikke relevant i grønsagsforædling i EU
  - CMS fra celle-fusion, diskussion de senere år
  - Inducerede mutationer, diskussionen er kun ved at starte
- Som økologisk producent eller producent organisation må man deltage i diskussionen
- Et nej til en teknik kan betyde, at man mister adgang til nogle af de mest moderne sorter og dermed konkurrence evne og rentabilitet
- Der er igangværende initiativer til egentlig økologisk forædling (ex. Louis Bolk Instituttet)
  - http://www.louisbolk.org/ - dog pt. mest industrielle afgrøder
  - http://www.eco-pb.org/ - Eurpean Consortium for Organic Plant breeding arbejder med regler for økologisk forædling
- Økologisk grønsags produktion har markeds power nok til at efterspørge forædling, der følger 100% økologiske godkendte principper
- De større frøfirmaer er meget profitable og kunne godt have 100% økologisk baseret forædling som en del af deres strategi
- Mærkning af problematiske sorter..?