

Gelukkig hebben we het zaad nog

H. Woelders

Livestock Research / Centrum voor Genetische Bronnen (CGN)

Lelystad



LIVESTOCK RESEARCH
WAGENINGEN UR

Centre for Genetic Resources,
The Netherlands (CGN)

Animal Breeding &
Genomics Centre

Deze voordracht

- I. Waarom behoud van genetische diversiteit?
De rol van genenbanken
- II. De biologie van invriezen en drogen.

Genenbanken

- In verschillende landen zijn genenbanken aangelegd
 - Belangrijke landbouwgewassen
 - Landbouwhuisdieren
 - Schimmelcultures, bacteriën of virussen
 - Natuurlijke flora en fauna

- Centrum voor Genetische Bronnen, Nederland (CGN) van Wageningen UR
 - Land- en tuinbouwgewassen
 - Bomen
 - Landbouwhuisdieren.

Genetische diversiteit

- Vroeger:
 - Heel veel verschillende ondersoorten, rassen, cultuurvariëteiten.
 - Geringe uitwisseling van zaadgoed of dieren.
- Nu: globalisering
- Voorbeeld tarwe
 - In 1949 in China 10.000 variëteiten tarwe.
 - Twintig jaar later nog maar één tiende daarvan.
- Voorbeeld Melkvee.
 - Vroeger ieder land eigen nationale melkveeras.
 - Nu wereldwijd gebruik van Holstein Friesian melkvee.

Verlies Genetische diversiteit

■ Verlies rassen

- Oude rassen veel minder gebruikt en in kleine populaties
- Risico bij uitbraak ziektes,
 - in 2001 met Mond en Klauwzeer
 - recent met Q-koorts.

■ Verlies genetische diversiteit binnen ras

- kleine rassen
- maar ook grote rassen:
 - (Sunny boy) meer dan een miljoen nakomelingen;
 - Bell (roodbont) in de helft van alle roodbont stieren
 - O-man



Sunny Boy

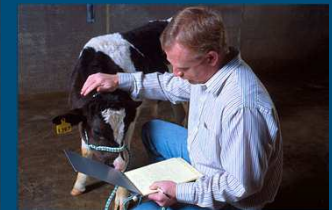
Is dat erg?

■ Verlies van oude rassen

- Verlies van unieke eigenschappen.
 - Adaptatie aan specifiek klimaat of terrein, of lokaal beschikbaar voer.
 - Producteigenschappen; Streekgebonden melk- of vleesproducten.
- Streekgebonden, landgebonden rassen: cultureel erfgoed.

■ Verlies genetische diversiteit binnen een ras

- Inteelt: → meer kans op erfelijke gebreken.
 - Europese vorstenhuizen: Haemofilie; Onvruchtbaarheid.
 - Runderen: BLAD
- Verlies van varianten van genen (allelen) .
 - Door te strenge selectie
 - Bij kleine populaties



■ Variatie = uitgangsmateriaal voor huidige en toekomstige fokkerij

- Selectie bij bestaande fokdoelen.
- Misschien straks andere fokdoelen.
- Of behoefte aan creëren van een nieuw ras.

Het besef groeit

- In 1992 werd in Rio de Janeiro de conventie voor biologische diversiteit (CBD) opgesteld
- en vele landen hebben deze conventie ondertekend.
- Ieder land belooft zich in te zetten voor behoud van genetische diversiteit van eigen landbouwgewassen en landbouwhuisdieren.

Hoe?

- Stimuleren gebruik van lokale rassen en voorkomen inteelt.
- Opslaan genetisch materiaal in een genenbank.
 - Zaad van planten.
 - Sperma of embryo's enz. van dieren.

Genenbanken voor planten

- Zaden van planten: Compleet embryo gereed om uit te groeien
- Maar toch jaren houdbaar
- Maar wel eindig



- In genenbank: zaden regelmatig vervangen.
- Na circa 10 jaar verlies kiemkracht bijvoorbeeld 20%.
- Afhankelijk van soort en bewaarcondities.
 - optimaal restvochtgehalte en gekoeld.
- 'Recalcitrante zaden' zijn niet houdbaar .

Svalbard Global Seed Vault

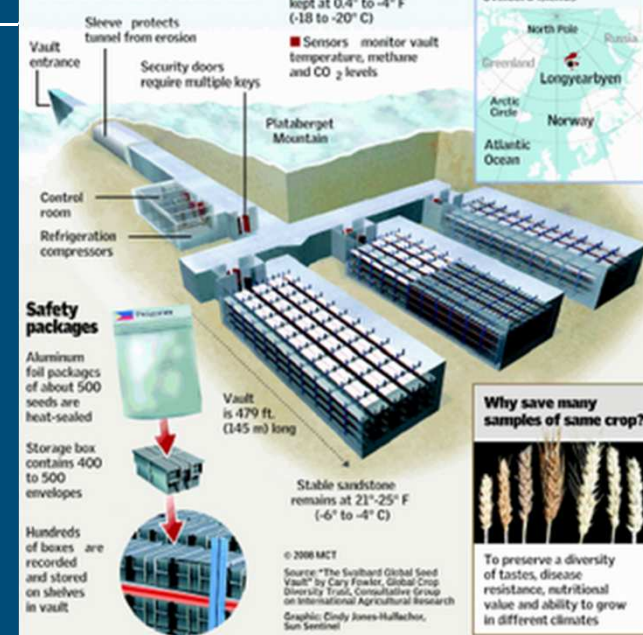
2008



Safe storage for crucial plant genes

On a frozen Arctic island, 4.5 million samples of seeds are being stored to protect the world's food supply from epidemics, disasters or wars that might wipe out irreplaceable seed varieties.

Svalbard Global Seed Vault



- Heel grote internationale genenbank voor plantenzaden
- Gebouwd binnenin een berg op Spitsbergen.
 - Veilige locatie.
 - Optimale lage vochtgehalte en temperatuur van -18 °C.
- Nu al een half miljoen unieke zaadmonsters.
- 4% afkomstig van CGN.
- 1/3 van de voedingsgewas-variëteiten van de wereld.
- Capaciteit 4,5 miljoen zaadmonsters.

Genenbanken voor dieren



Opslag genetisch materiaal in vloeibare stikstof, $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$



Genenbanken voor dieren



- Opslag in vloeibare stikstof, -196 °C
- Alles staat stil.
 - Geen biologische, chemische en fysische processen
 - Alleen DNA schade door cosmische straling. Geschat op meerdere duizenden jaren.
- Blijft dus 'altijd' goed
- In de praktijk:
 - Succesvol IVF met sperma na 37 jaar opslag.
 - Met sperma uit CGN Genenbank:
Succesvolle KI met sperma van 26 jaar oud.

Cryogene opslag, ook voor

- Plant:
 - Invriezen wortel- of scheuttopjes
 - Ook sommige zaden.
- (humane) reproductie
 - sperma, embryo's, eicellen, ovarium weefsel
- Medische toepassingen
 - bloed of stamcellen
 - Organen

Genenbanken voor dieren

CGN strategie: Zowel Korte- als Lange-termijn opslag

- Lange termijn: 'Oneindig' houdbaar...
Huidige genetische diversiteit vastleggen
 - Bij verlies van rassen of foklijnen .
 - Bij gevolgen van inteelt → inbrengen variatie
 - Voor ontwikkeling van een nieuw ras of foklijn.
 - Geen noodzaak om de collectie regelmatig te updaten.
- Korte termijn
 - Ondersteunen van de fokkerij van kleine populaties.
 - Hiermee wordt de effectieve populatiegrootte vergroot.
 - Actief gebruik dus ook regelmatige aanvulling en vernieuwing.

Welk materiaal?

- Sperma
- Sperma en eicellen
- Embryo's
- Somatische cellen: 'Gewone' lichaamscellen

Mogelijk?

Gemakkelijk?

Economisch?

Sperma

voordelen

- Bestaande 'infrastructuur' voor spermawinning en inseminatie voor een aantal diersoorten.
- Sperma is meestal goed invriesbaar.

nadelen

- Haploïd: Terugkruisen is nodig, voor tenminste 6 generaties.
- Mitochondriële genen gaan niet mee.
- In sommige soorten ontbreekt de 'infrastructuur'.

Sperma winning



- Kleine runderrassen: Vaak geen stieren op KI station, maar op boerderij.
- Spermawinning op de boerderij mag niet (EU)
- Vrijstelling voor genenbanken in VK, Italië en NL..

Andere soorten:

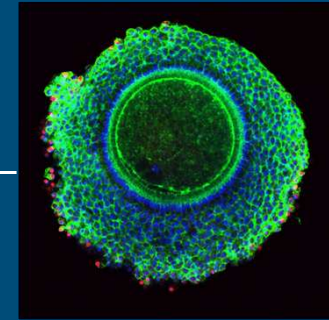
- Dieren soms te 'wild' voor spermawinning .
→ electroejaculatie, of epididymaal sperma.

Epididymaal ram sperma, sperma uit de bijbal

- Grote opbrengst uit de caudae epididymidis van geslachte rammen.
- Motiliteit én bevruchtend vermogen beter dan van geëjaculeerd sperma.
- **> 20 miljard bijbal-zaadcellen per ram**
> 100 inseminatiedoses.



Eicellen (plus sperma)



- Volledige complement chromosomale and mitochondriële genen.
- Flexibel in combineren van genotypes.
- Al heel veel mensen babies geboren uit diepgevroren eicellen.
- Met landbouwhuisdieren minder succes.
....Minder onderzoek gedaan?
- Maar... levend geboren jongen in rund en paard.

Embryo's

- Volledige complement chromosomale and mitochondriële genen.
- Levend geboren jongen in landbouwhuisdieren: Rund, schaap, varken, paard, geit, konijn.
- 'Gemakkelijk' in rund en schaap.
- In sommige soorten bestaat een 'infrastructuur' voor ET.



Somatische cellen → SCNT 'klonen'



- Winning weefsel (bijv. huid) is simpel
- Gemakkelijk in te vriezen.
- Met simpele apparatuur.
- Volledige set chromosomale, maar geen mitochondriële genen, na kerntransfer (klonen).
- Levend geboren jongen in: schaap, geit, rund, varken, paard, muilezel, muis, rat, konijn, fret, hond.

Somatische cellen (2)

- Voor rund en schaap slechts 0 - 5% van NT embryos geven levende geboren jong.
- Veel abortussen, veel afwijkende jongen.
- Varken en paard gaan beter, met vrijwel normale percentages geboorteafwijkingen.

Somatic cells (3)

- In algemeen: Huidige techniek nog niet voldoende veilig en efficiënt.
- Maar, verdere ontwikkeling zal ongetwijfeld tot verbeteringen leiden.
- Daarom zouden we nu al somatische cellen kunnen opslaan als een gemakkelijke en goedkope 'zekerstelling' van de huidige genetische diversiteit om (veel) later te kunnen gebruiken.

Welk materiaal?

CGN genenbank

- Voornamelijk sperma
- Kleine collectie embryo's (bedreigde runderrassen)
- Nu bezig met onderzoek naar somatische cellen

II. De biologie van invriezen en drogen



LIVESTOCK RESEARCH
WAGENINGEN UR

Centre for Genetic Resources,
The Netherlands (CGN)

Animal Breeding &
Genomics Centre

Leg het leven tijdelijk stil

Lang bewaren: Vertraag de levensprocessen.

- Schimmelsporen, plantenzaden, ingekapselde eitjes (watervlooien, enkele jaren in de modder)
- Vergaande uitdroging: mosbeertjes
 - vochtgehalte 1% van de normale waarde.
 - Trehalose in de cellen.
 - In deze toestand bestand tegen
 - Temperaturen tot bijna het absolute nulpunt
 - Hitte tot 151 °C
 - Overdruk (1200 atm) of juist vacuüm
 - Radioactieve straling.
 - 10 dagen in outer space!



Leg het leven tijdelijk stil

Of invriezen....

- Maar... intracellulaire ijsvorming is dodelijk
- Hoe gaat dat dan in de natuur
 - Amerikaanse boskikker → tot -8°C
 - Larve van kever uit Alaska tot -100°C → 'vitrificatie'



Antivries bij toeval ontdekt

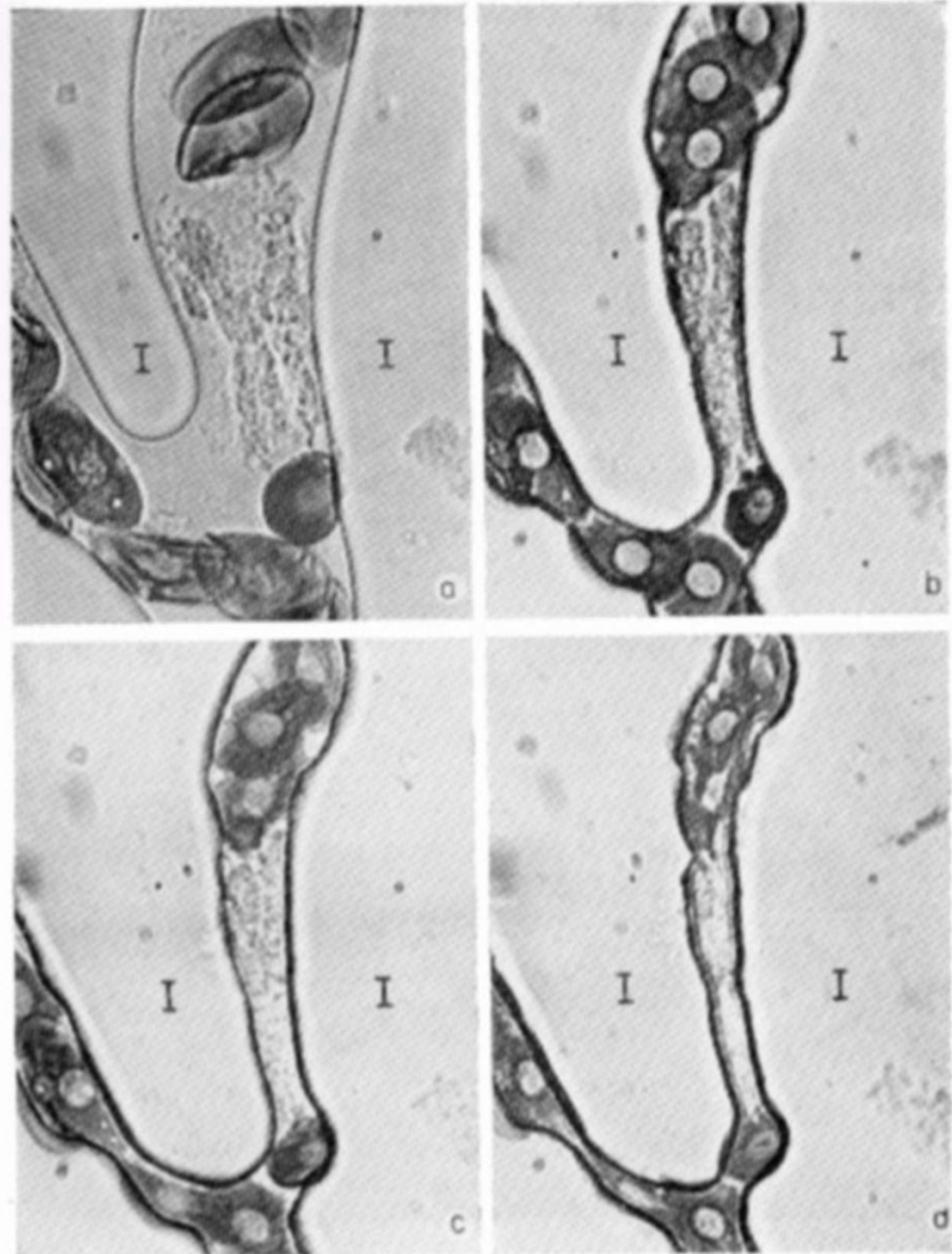
- Wat leren we van de natuur:
 - Intracellulaire ijsvorming is dodelijk
 - Eerst water onttrekken, dan invriezen
 - Dus parallellen tussen invriezen en drogen
- Polge, maakte in 1948 een foutje....
En ontdekte antivrieswerking van glycerol
- Eerste succes met invriezen van cellen van een
vertebraat: Zaadcellen van haan.

Slow Freezing

Rode
bloedcellen bij

-1,5 -5;
- 7 -10 °C.

Rapatz & Luyet,
1960



LIVESTOCK RESEARCH
WAGENINGEN UR

Cell
Ther

Slow Freezing

IJsvorming begint buiten de cellen. Het ijs bevat alleen water

→ Opgeloste stoffen in de niet bevroren vloeistof tussen de ijsmassa's

Bij verdere verlaging temperatuur:

- Volume van niet bevroren fractie ↓
- Water gehalte ↓
- Concentratie opgeloste stof ↑
- Osmotische druk ↑
- Viscositeit ↑

Langzaam!

Om IIF te voorkomen

Op een bepaald punt van temperatuur en concentratie → Glas transitie

Een 'glas' is stabiel omdat (per definitie) de moleculen niet meer verplaatsen.

De werking van glycerol

Om de glas toestand te bereiken moet de 'waterconcentratie' heel erg laag zijn

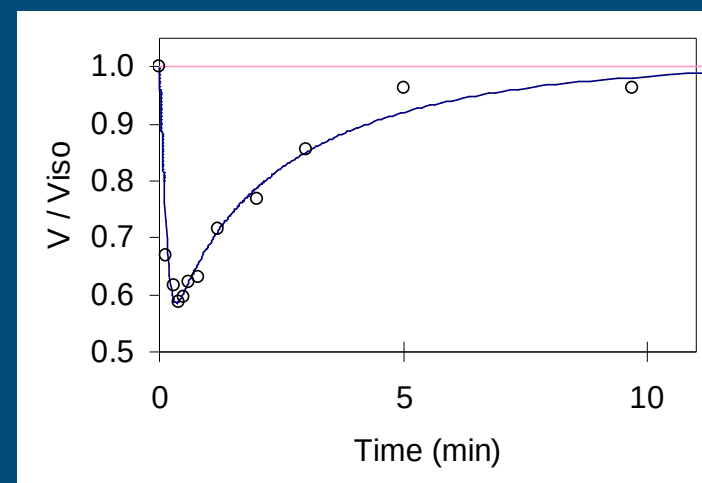
Of....Opgeloste stof concentratie moet heel hoog zijn

- De cellen krimpen te sterk → dood
- Zoutconcentratie geeft schade

- Glycerol kan door de celmembraan
- Water uit de cel glycerol erin
- Glycerol 'vervangt' het water



- De cel hoeft veel minder te krimpen
- De zoutconcentratie is veel minder



Niet alleen glycerol

Bekende cryoprotectantia:

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| ■ propane triol | glycerol |
| ■ propane diol | propylene glycol (PG) |
| ■ ethane diol | ethylene glycol |
| ■ butane diol | |
| ■ ethanol | |
| ■ methanol | |
| ■ dimethyl sulfoxide | DMSO |

Vitrificatie

De keverlarve overleeft -100°C

- Maakt in zijn cellen heel veel glycerol aan
- Kan daardoor al snel in glas toestand komen

Die truc kunnen wij ook toepassen:

- Eerst heel veel cryoprotectans geven
- → dan koelen
- “Vitrificatie methode”
 - geen krimp
 - Geen IIF
 - Wel glas toestand



Vitrificatie

- Hoge cryoprotectans concentraties vaak toxisch
 - Combinaties van verschillende cryoprotectantia
 - Ultrasnel koelen → minder cryoprotectans nodig
- Hiermee doorbraak voor invriezen eicellen
- Al heel veel mensen babies uit gevitricificeerde eicellen!
- Vitrificatie organen is haalbaar maar nog wel een uitdaging
 - Cryoprotectans wordt via bloedvaten in het orgaan gepompt
 - Nieren konijn ging al redelijk goed
- Vitrificatie hele mens? Het eeuwige leven?

Dank u voor uw aandacht

