

# Cryopreservering: een techniek met toekomst

Han Bouman

© 2004 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.

PPO Publicatienr. 717; € 10,00



Projectnummer: 330513

**Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.**

Bloembollen en Bomen

Adres : Prof. van Slogterenweg 2  
2160 AB Lisse  
Tel. : 0252 – 46 21 21  
Fax : 0252 – 46 21 00  
E-mail : [infobollen.ppo@wur.nl](mailto:infobollen.ppo@wur.nl)  
Internet : [www.ppo.wur.nl](http://www.ppo.wur.nl)

# Inhoudsopgave

|                                                                                | pagina    |
|--------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 ALGEMENE INLEIDING                                                           | 9         |
| <b>1.1 Waarom dit onderzoek?</b>                                               | <b>9</b>  |
| <b>1.2 Voorgeschiedenis</b>                                                    | <b>9</b>  |
| <b>1.3 Voor- en nadelen van cryopreservering</b>                               | <b>10</b> |
| 2 CRYOPRESERVERING: DE TECHNIEK                                                | 11        |
| <b>2.1 Inleiding</b>                                                           | <b>11</b> |
| <b>2.2 Overzicht methoden</b>                                                  | <b>11</b> |
| <b>2.3 Voorkweek: inductie van koudetolerantie en andere voorbehandelingen</b> | <b>12</b> |
| <b>2.4 Ontdooien, herstel en normale doorgroei</b>                             | <b>13</b> |
| 3 ONDERZOEK                                                                    | 15        |
| <b>3.1 Inleiding en opzet onderzoek</b>                                        | <b>15</b> |
| 3.1.1 Inleiding                                                                | 15        |
| 3.1.2 De opzet van het onderzoek                                               | 16        |
| <b>3.2 Het protocol voor leliemeristemen</b>                                   | <b>16</b> |
| 3.2.1 Inleiding                                                                | 16        |
| 3.2.2 Materialen en methoden                                                   | 16        |
| 3.2.3 Experimenten, resultaten en discussie                                    | 18        |
| 3.2.4 Conclusie                                                                | 32        |
| <b>3.3 Ander uitgangsmateriaal voor lelie-cryopreservering</b>                 | <b>32</b> |
| 3.3.1 Inleiding                                                                | 32        |
| 3.3.2 Schubplakjes                                                             | 32        |
| 3.3.3 Wortelpuntjes                                                            | 35        |
| 3.3.4 Callus                                                                   | 40        |
| 3.3.5 Test op doorlaatbaarheid van celwanden                                   | 40        |
| <b>3.4 Cryopreservering van andere gewassen</b>                                | <b>42</b> |
| 3.4.1 Inleiding                                                                | 42        |
| 3.4.2 Hyacint                                                                  | 42        |
| 3.4.3 Zantedeschia                                                             | 45        |
| 3.4.4 Tulp                                                                     | 46        |
| 3.4.5 Iris                                                                     | 46        |
| 3.4.6 Wortelpuntjes van andere gewassen                                        | 46        |
| <b>3.5 Economische aspecten van cryopreservering</b>                           | <b>47</b> |
| 3.5.1 Extra investeringen                                                      | 47        |
| 3.5.2 Modelberekening                                                          | 47        |
| 3.5.3 Investerings in apparatuur                                               | 47        |
| 3.5.4 Arbo                                                                     | 48        |
| 3.5.5 Arbeidskosten                                                            | 48        |
| 3.5.6 Mogelijkheden zelf cryopreserveren                                       | 48        |
| 4 CONCLUSIE                                                                    | 51        |
| 5 LITERATUUR                                                                   | 53        |
| BIJLAGE 1 PROJECTBESCHRIJVING CRYOPRESERVERING BOLGEWASSEN                     | 57        |
| BIJLAGE 2 PROJECTVERSLAG CRYOPRESERVERING                                      | 63        |

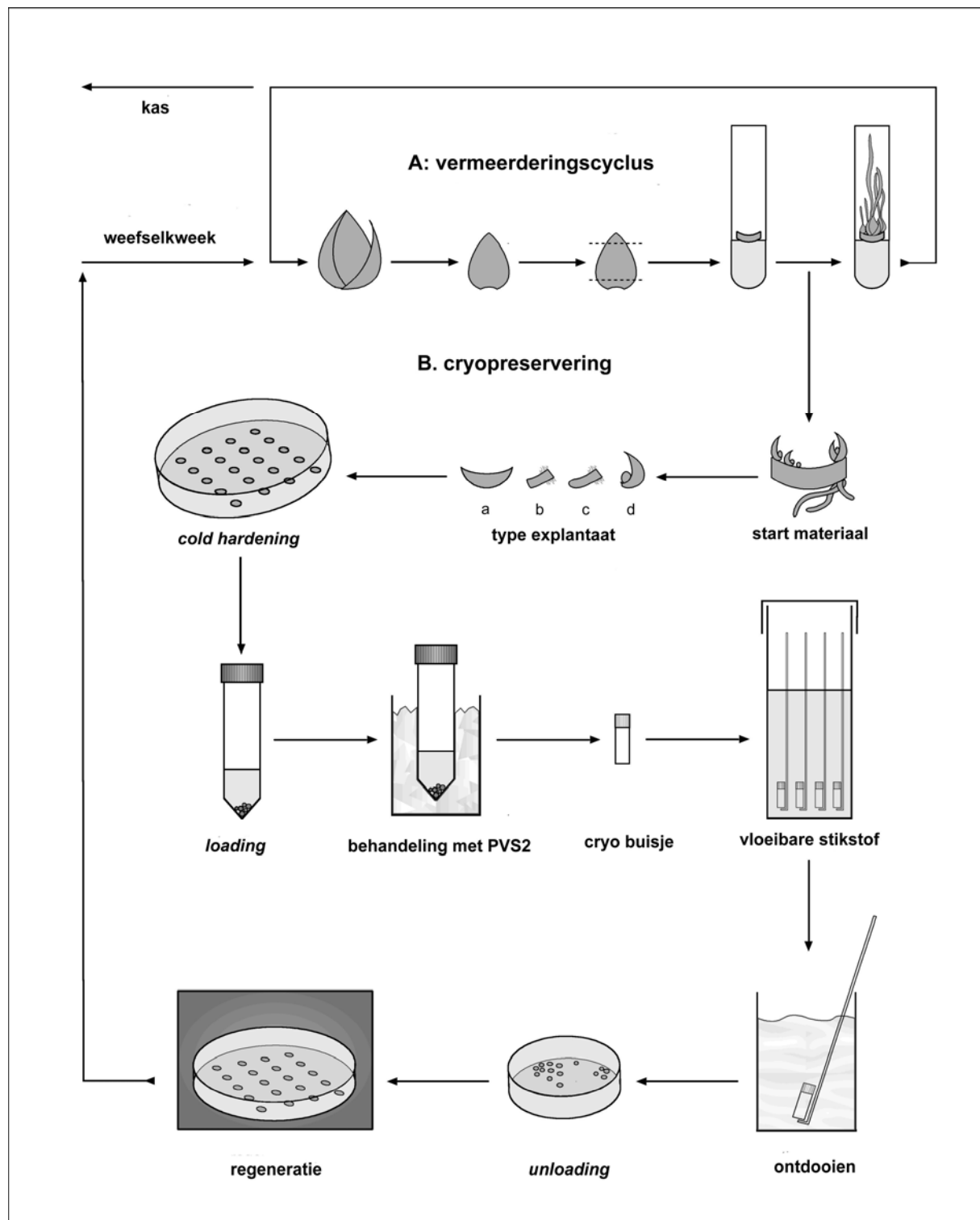
# Samenvatting

Voor veredelaars en kwekers is langdurige bewaring van interessante genotypen essentieel. Dit betreft kruisingsouders, unieke kruisingsproducten, via biotechnologische technieken verkregen materiaal en ziektevrij materiaal. De beste manier is bewaren van zaad maar dat is niet mogelijk als het materiaal sterk heterozygoot is of het zaad niet uitdroogbaar is. Bol- en knolgewassen zijn bij uitstek voorbeelden van materiaal dat niet middels zaad kan worden bewaard. Bij vegetatief vermeerderde gewassen als bollen wordt voor langdurige instandhouding het materiaal elk jaar opgeplant, geoogst en bewaard. Dit betekent veel werk en brengt grote risico's mee. Er is een grote kans op uitval door ziektes en weersomstandigheden. Andere gewassen als fruitbomen moeten in grote opstanden bewaard worden. Ook deze bewaring brengt grote risico's met zich mee van ziektes en klimaatinvloeden. Naast bewaring op het veld is ook bewaring in weefselkweek mogelijk waarbij voor omstandigheden gekozen wordt waarbij de groei zo traag mogelijk is. Deze manier van bewaren kost minder tijd en heeft daarmee voordelen, maar er kunnen besmettingen optreden waardoor het materiaal verloren gaat. Cryopreservering (invriezen in vloeibare stikstof) kost éénmaal tijd, en daarna kan ingevroren materiaal voor onbepaalde tijd en zonder risico bewaard worden. Als het weer gebruikt moet worden, kan het na ontdooien direct in weefselkweek weer vermeerderd worden. Cryopreservering is niet alleen voor veredelaars van belang. Ook voor de langdurige opslag van virusvrij materiaal is deze techniek zeer geschikt. Calluslijnen en ander plantmateriaal, geschikt voor transformatie, kan ook ingevroren worden totdat het nodig is; of na transformatie ingevroren bewaard worden tot het moment dat het verder in weefselkweek geselecteerd kan worden.

In dit project is een protocol voor cryopreservering van adventieve meristemen bij lelie ontwikkeld dat breed in het assortiment toepasbaar is. Het voldeed voor cultivars uit de groepen van Aziaten, Oriëntals en longiflorum hybriden plus een aantal cultivars. Met dit protocol, gebaseerd op de vitrificatiemethode, werden overlevingspercentages bereikt van 50 % of meer. Berekeningen leerden dat cryopreservering goedkoper is dan in-vitro bewaring vanaf een aantal van ca. 80 cultivars. Bij grotere aantallen ligt de prijs tot 40 % lager dan voor in-vitro bewaring, afhankelijk van de apparatuur.

Bij de ontwikkeling van het protocol voor meristemen zijn veel experimenten uitgevoerd die van belang waren voor de ontwikkeling van verdere protocollen. Zo wordt in dit rapport beschreven hoe via cryopreservering van wortelpuntjes of schubschijfjes de eerste aanzetten geleverd zijn om de methode voor lelie nog goedkoper en zekerder te maken. Vooral wortelpuntjes lijken zeer geschikt als er een regeneratieprotocol gevonden wordt. Dit zou ook interessant zijn voor andere soorten planten. Schubschijfjes lijken nog wat problematisch.

Tot besluit worden in dit verslag experimenten behandeld om het protocol toepasbaar te maken voor andere gewassen. Voor hyacint zijn eerste experimenten uitgevoerd die veelbelovend waren.



# Vooraf

Langdurige bewaring van waardevolle levende weefsels is duur, maar erg belangrijk. Voor plantmateriaal geldt dit ook. Voor bewaren zijn verschillende methoden, elk met hun voor- en nadelen, waarover in de inleiding gesproken wordt. Cryopreservering is een relatief onbekende methode, zeker voor planten. Onbekend maakt onbemind. Dit geldt ook voor de bewaring van waardevol plantmateriaal via deze techniek. Toch wordt cryopreservering al tientallen jaren gebruikt in de medische en dierwetenschap. Het langdurig bewaren van stamcellen, sperma, eicellen en bepaalde typen weefsels zou onmogelijk zijn zonder deze techniek. Indien het nodig is, kan materiaal uit de vloeibare stikstof gehaald worden en na ontdooiing voor de vereiste doeleinden gebruikt worden.

Cryopreservering kan ook van grote waarde zijn en vooral worden in de plantenwereld voor verschillende doeleinden, met als hoofddoel langdurige bewaring van waardevol materiaal. Het is niet alleen veiliger dan de andere opslagtechnieken, maar in vele gevallen ook goedkoper. Er zijn in de plantenwereld al toepassingen, maar op kleine schaal. Deze worden in het rapport genoemd. Uitgewerkt wordt hier de techniek voor lelie. Maar de succesvolle methode van lelie geeft de mogelijkheid om aan de hand hiervan ook andere toepassingen te vinden. In dit rapport worden een paar voorbeelden gegeven. Ik hoop dat dit onderzoek ertoe bijgedragen heeft en zal bijdragen dat in de nabije toekomst de toepassing van cryopreservering in de plantenwereld zich zal uitbreiden.

Tot besluit rest mij een aantal personen te bedanken die een belangrijke rol hebben gespeeld bij de tot standkoming van dit rapport. Een groot deel van het praktische werk en de uitwerking hiervan is voortreffelijk verzorgd door Annemiek Tiekstra. Een niet te overschatten bijdrage is geleverd door Elena Petutschnig. Zij bewerkte in Lisse haar M. Sc. Thesis: Cryopreservation of lily by vitrification (Universität für Bodenkultur, Wenen). Deze thesis kon als goede basis dienen voor dit rapport. Geert-Jan de Klerk maakte mij opmerkzaam dat nieuwe cryopreserveringstechnieken openingen boden om een succesvol project te starten. Verder leverden Ben Morris en Marga Dijkema nog praktische bijdragen. Fred Geers was van grote waarde voor de uiteindelijke totstandkoming van het rapport.

# Opzet van het rapport

In de algemene inleiding komt het waarom van het onderzoek en de geschiedenis van het cryopreserveringsonderzoek in Lisse naar voren. Daarna volgt een voorstelling van verschillende cryopreserveringstechnieken en hun voor- en nadelen, en hun toepassingsmogelijkheden. Het onderzoeksgedeelte start met een eigen inleiding, waarin de gebruikte techniek schematisch wordt voorgesteld.

Vervolgens wordt het optimale protocol voor cryopreservering van leliemeristemen volgens dit schema gegeven. De overwegingen, gegevens en proeven die tot dit protocol geleid hebben worden daarna per schemastap behandeld.

In een volgend hoofdstuk wordt ingegaan op resultaten behaald met *ander uitgangsmateriaal* (wortelpuntjes en callus) voor lelie.

Daarna volgen de experimenten die voor andere gewassen (iris, hyacint, Zantedeschia) uitgevoerd zijn om cryopreserveringsprotocollen te ontwikkelen.

Resultaten van onderzoek dat in samenwerking met bedrijfskunde PPO Lisse is uitgevoerd, laten in een economische paragraaf zien dat cryopreservering economisch een zeer aantrekkelijke methode voor bewaring van leliemateriaal is.

Een algemene conclusie en een literatuurlijst sluiten dit rapport af. Ter informatie is de oorspronkelijke projectaanvraag als bijlage toegevoegd.





# 1 Algemene inleiding

## 1.1 Waarom dit onderzoek?

Voor veredelaars en kwekers is langdurige bewaring van interessante genotypen essentieel. Dit betreft met name kruisingsouders, unieke kruisingsproducten, via biotechnologische technieken verkregen materiaal en ziektevrij materiaal. De beste manier is bewaren van zaad maar dat is alleen mogelijk als het gaat om homozygoot materiaal en als het zaad uitdroogbaar is. Bol- en knolgewassen zijn bij uitstek voorbeelden van materiaal dat niet middels zaad kan worden bewaard. Bij vegetatief vermeerderde gewassen als bollen wordt voor langdurige instandhouding het materiaal elk jaar opgeplant, geoogst en bewaard. Dit betekent veel werk en brengt grote risico's mee op uitval door ziektes en weersomstandigheden. Andere gewassen als fruitbomen moeten in grote opstanden bewaard worden. Ook deze bewaring brengt grote risico's met zich mee van ziektes en klimaatinvloeden. Bewaring in weefselkweek kost minder tijd en heeft daarmee voordelen, maar er kunnen besmettingen optreden waardoor het materiaal verloren gaat. Cryopreservering (invriezen in vloeibare stikstof) kost éénmaal tijd, en daarna kan ingevroren materiaal voor onbepaalde tijd en zonder risico bewaard worden. Als het weer gebruikt moet worden, kan het na ontdooien direct in weefselkweek weer vermeerderd worden. Deze 'eeuwige' bewaring is niet mogelijk bij temperaturen boven -100 à -120°C is. Dan vindt nog steeds afbraak en/of verandering van levend materiaal plaats. Daarom moet bewaard worden in vloeibare stikstof. Dat heeft een temperatuur van -197 °C

Behalve bij veredeling, zijn er meer toepassingsmogelijkheden: langdurige opslag van virusvrij materiaal om weer snel een nieuwe stock op te bouwen met virusvrij materiaal; bewaring van materiaal uit éénmalige kruisingen of andere uniek 'gebeurtenissen' totdat selectie mogelijk is. Plantmateriaal kan tijdens lang aanhouden bij temperaturen boven 0°C onderhevig zijn aan (epi-)genetische veranderingen: suspensies, calluslijnen en ander plantmateriaal, geschikt voor transformatie of al getransformeerd, kunnen ingevroren worden totdat het nodig is. Of het is mogelijk dat het in vloeibare stikstof bewaard wordt tot selectie noodzakelijk is.

## 1.2 Voorgeschiedenis

Vijftien jaar geleden werd in Lisse al onderzoek aan cryopreservering bij lelie gedaan, maar de overleving was maximaal slechts 20 %. Lelie was toen het eerste bolgewas dat succesvol ingevroren werd. Het was een veel belovend resultaat, maar nog niet voldoende om op dat moment de techniek in de praktijk toe te passen. Erg belangrijk was dat bloeiproeven van 500 planten op het veld geen enkele afwijking vertoonden. Daarmee werd aangetoond dat cryopreservering geen variatie induceerde.

Intussen zijn de (arbeids-)kosten voor instandhouding op het veld alleen maar gestegen. Voeg daarbij dat de invriestechieken recent verbeterd (goedkoper en eenvoudiger) zijn geworden, en dat de voordelen van cryopreservering nog hetzelfde zijn, en het leek logisch om opnieuw onderzoek te starten. Wereldwijd wordt de methode steeds meer toegepast, o.a. voor het bewaren van suspensieculturen van coniferen in de bosbouw, genenbanken van bijvoorbeeld fruitsoorten, aardappel en enkele tropische gewassen, en het bewaren van getransformeerd plantmateriaal.

Allereerst is op het COWT begonnen met het ontwikkelen van een cryopreserveringsmethode voor lelie, zodat binnen enkele jaren bij de bewaring van waardevol genenmateriaal geld gespaard en risico's sterk verminderd kunnen worden. Later gedurende het onderzoek zou de leliekennis gebruikt worden om voor andere gewassen ook protocollen.

### 1.3 Voor- en nadelen van cryopreservering

De economische voordelen die de methode heeft zijn tweërlei. Ten eerste is de bewaring goedkoper, en wordt voor elk nieuw monster goedkoper, omdat de faciliteiten dan al aanwezig zijn. De startinvestering van cryopreservering is vrij hoog; daarna zijn er nauwelijks investeringskosten meer. De arbeidskosten worden ook lager bij grotere aantallen. Ten tweede is het risico op verlies van waardevol materiaal bijna afwezig: dat is moeilijk direct in geld uit te drukken, maar des te belangrijker.

Er zijn echter ook voorwaarden en nadelen: allereerst moet voor het in te vriezen gewas een weefselkweekprotocol bestaan, voordat aan de ontwikkeling van de cryopreserverings-methode begonnen kan worden. Weefselkweekmethoden voor de belangrijke bolgewassen zijn er; alleen voor tulp zijn nog verbeteringen nodig. Daarnaast moeten de faciliteiten voor weefselkweek en invriezing beschikbaar zijn. Investeringskosten voor invriezen zijn echter niet hoog, als er al een weefselkweeklaboratorium staat. Anders valt te denken aan een uitbesteding van dergelijke opgaven, zoals ook gebeurt voor embryo-rescue, doorbreking kruisingsbarrières en weefselkweekvermeerdering.

Een minpunt is dat, in tegenstelling tot bij bewaring op het veld, het materiaal niet direct weer beschikbaar is om te gebruiken voor bijvoorbeeld kruisingen. Eerst moet het via een weefselkweekfase en verdere groei op het veld weer de grootte van een bloeibare bol bereiken. Voor sommige gewassen kan dat een paar jaar duren. Als het om het sortiment gaat wat (bijna) jaarlijks gebruikt wordt in veredelingsprogramma's, is cryopreservering dus niet de enige bewaarmethode, maar kan daarnaast wel als extra zekerheid gebruikt worden. Een voordeel is natuurlijk wel dat het materiaal direct weer steriel beschikbaar is om een snelle vermeerdering in weefselkweek te starten.

## 2 Cryopreservering: de techniek

### 2.1 Inleiding

Voor cryopreservering bestaan verschillende methoden die in de loop der jaren verder ontwikkeld zijn. Vooral het in te vriezen materiaal bepaalt de keuze van de techniek en daarmee vaak ook de kosten. Verder is de beschikbaarheid van apparatuur soms een factor

Een paar algemene principes gelden voor alle methoden. Een algemene stelregel is dat hoe kleiner de in te vriezen eenheid des te groter het slagingspercentage (d.w.z. overleving en normale doorgroei). Verder is materiaal dat toegerust om koude te weerstaan (bijvoorbeeld winterknoppen) eenvoudiger in te vriezen dan tropische planten. Cellen met veel cytoplasma en weinig vacuoles zijn beter bestand tegen de cryopreserveringsprocedure dan cellen met grote vacuoles. Georganiseerde weefsels (bijvoorbeeld meristemen) zijn moeilijker intact in te vriezen dan losse celverbanden (embryogeen callus) of cellen in suspensie. Bij hergroei van meristemen zorgen soms slechts kleine groepjes meristematische cellen voor de hergroei. Voor welke doeleinden het materiaal ingevroren wordt en hoe snel het weer beschikbaar moet zijn, is bepalend voor de keuze van de te volgen methode. Voor alle technieken geldt dat het materiaal soms voorbehandeld moet worden tijdens de groei om het geschikt te maken voor invriezen.

### 2.2 Overzicht methoden

Voor cryopreservering kunnen vier methodes onderscheiden worden, die verschillen in invriesmethode en voorbehandeling. De indeling is enigszins willekeurig, omdat er overlap inzit, en combinaties bestaan. Zij hebben alle tot doel dat er geen intracellulaire ijskristallen ontstaan tijdens het bevriezen en ontdooien. Deze ijskristalvorming wordt algemeen gezien als de oorzaak voor de celschade die tot het mislukken van cryopreservering kan leiden. De vier zijn:

#### 1. Geprogrammeerd invriezen.

Deze techniek is veel duurder dan de volgende drie als echte programmering moet plaats vinden. Hiervoor staan dure apparaten ter beschikking die temperatuurtrajecten met precieze afkoelingssnelheden kunnen bereiken. Hierbij wordt via gedoseerd koelen met vloeibare stikstof volgens een vastgesteld traject van temperatuurdalingen in etappes naar het definitieve invriezen gewerkt. Door verschillende instellingen te kiezen en de temperatuur trajecten te variëren wordt het optimale protocol gezocht. De ontwikkeling van een dergelijk programma kost veel tijd en moet voor elk soort en type materiaal opnieuw ontwikkeld worden. In ons onderzoek in 1990 werd deze techniek gebruikt. Er bestaan eenvoudige methoden die echter weinig flexibiliteit (één vaste snelheid van temperatuurdaling) hebben. Zij voldoen slechts voor eenvoudig in te vriezen plantmateriaal als suspensies.

#### 2. Inkapselen/drogen, soms gecombineerd met vitrificatie (methode 3)

Ook deze methode vergt veel tijd en arbeidshandelingen en is daardoor duurder dan de volgende twee. Plantmateriaal wordt voorzichtig ingedroogd tot een bepaald watergehalte. Dit duurt uren en tussentijds moet steeds gewogen worden. Bij een bepaald watergehalte kan het materiaal dan ingevroren worden. Om het drogen gedoseerd en niet te snel te laten verlopen worden, bij voorbeeld, meristemen eerst nog ingekapseld in een omhulsel van calciumalginaat, een polymeer die het beschermt tegen beschadigingen. Hoewel het gecompliceerd en duur is, zijn er plantensoorten en -weefsels die tot op heden alleen met deze methode gecryopreserveerd zijn. Vaak bleek in latere experimenten echter dat methode 3 ook voldeed voor deze planten.

### 3. Vitrificatie.

Vitrificatie is een relatief goedkope methode die ruim toepasbaar is en waaraan in het vervolg van dit hoofdstuk de meeste aandacht besteed wordt. Hierbij wordt door voorbehandeling met bepaalde chemicaliën water onttrokken en deels vervangen door andere stoffen. Bij snel invriezen gaat de waterige oplossing dan niet over in kristalijns maar in een glasvormige toestand (vitrum = glas). Ijskristalvorming zorgt voor beschadigingen van de cellen, en daarmee voor afsterven.

### 4. 'Droplet-freezing', soms gecombineerd met vitrificatie (methode 3)

Een methode die vooral door zijn techniek zeer snelle invries- en ontdooisnelheden bereikt. Vooral van belang voor bij voorbeeld meristemen die snel last hebben van langere invries en ontdooitijden. Hierbij worden de plantendelen direct aan de vloeibare skistof blootgesteld, dus niet in een buisje of iets dergelijks ingevroren.

Bij methode 2 en 3 hoort bijna altijd een behandeling met cryoprotectantia, maar ook bij de andere drie methodes worden bijna altijd een of meer stappen uitgevoerd met dergelijke stoffen.

Er kunnen grof ingedeeld drie basistechnieken voor de voorbehandeling bij cryopreservering onderscheiden worden:

- a. geen voorbehandeling, maar selectie van materiaal dat zonder meer geschikt is
- b. invriezen na wateronttrekkende behandelingen
- c. invriezen na behandeling met chemicaliën die deels water onttrekken en het overgebleven water in de cellen in een glasachtige toestand doen overgaan bij invriezen (vitrificatie)

Meestal worden combinaties van de laatste twee toegepast om tot succesvolle protocollen te komen, terwijl in speciale gevallen mogelijkheid a werkt. Afhankelijk van het in te vriezen materiaal wordt dus voor een bepaalde methode gekozen.

Voor het invriezen zelf bestaan twee methoden:

1. directe dompeling in de vloeibare stikstof (LN), waarbij de temperatuur dus zo snel mogelijk moet dalen
2. geprogrammeerd invriezen waarbij tot ca. - 50°C de temperatuurdaling volgens een vast traject gebeurt (bijv 0,5°C per minuut). In dit geval dus gecombineerd met methode 2,3 of 4

Ook hierbij is het materiaal bepalend welke methode gekozen wordt, terwijl daarnaast de voorbehandeling een grote rol speelt in de keuze.

De kosten, zowel qua arbeid/tijd als technische voorzieningen, zijn verschillend per methode. Voor geprogrammeerd invriezen bestaan dure invriesapparaten die nauwkeurig het temperatuurdalingstraject in etappes kunnen regelen. Er zijn eenvoudige apparaten en opstellingen die een vaste temperatuurdaling kunnen geven van 1°C per minuut.

Bij geprogrammeerd invriezen wordt, doordat het water in de extracellulaire ruimte langzaam bevroert, de resulterende oplossing in de te bevroren cellen steeds geconcentreerder. Hierdoor ontstaat in het materiaal water verlies door osmose (cryo-dehydratering) en zullen bij het bevroren geen intracellulaire ijskristallen ontstaan. Problemen kunnen ontstaan door te ver gaande dehydratering. Op enkele aspecten van een goed protocol wordt hieronder nog ingegaan.

## 2.3 Voorkweek: inductie van koudetolerantie en andere voorbehandelingen

Plantdelen die gecryopreserveerd moeten worden, kunnen aan een voorbehandeling onderworpen worden die de overleving na cryopreservering bevordert. Zo worden al stoffen aan het groeimedium toegevoegd die tijdens het eigenlijke cryopreserveringsprotocol ook gebruikt worden. Daarnaast wordt door kweek bij lage temperatuur al een zekere koudetolerantie geïnduceerd. Waarschijnlijk worden al planteigen beschermende stoffen aangemaakt zoals bepaalde eiwitten, polipeptiden en aminozuren (proline).

Een voorkweek kan ook nog dienen om een wondreactie/-heling te laten verlopen voordat de

cryopreservering begint. Dit geldt als plantendelen als meristemen eerst gesneden moeten worden voordat ze gebruikt kunnen worden voor het invriezen.

### **Cryoprotectantia (=beschermingsstoffen tegen bevroeringschade)**

Er is een groot aantal chemicaliën in gebruik om bevroeringsschade te voorkomen. Zij kunnen ingedeeld worden in twee groepen. De stoffen die snel de cel binnendringen en degenen die dit niet doen, ook wel genoemd de colligatieve en de osmotische groep van stoffen.

De eerste hebben geen invloed op het celvolume, maar door hun aanwezigheid in hoge concentraties in de plantencellen voorkomen ze te veel dehydratering en daarnaast ook ijsvorming. Zij zorgen dat bij bevriezen de oplossing overgaat in de glastoestand, het proces van vitrificatie. De meest gebruikte stoffen zijn dimethylsulfoxide (DMSO) en glycerol.

De tweede groep werkt door dehydratering via de hoge osmotische waarde van de omringende vloeistof. Zij maken daarnaast ook de omringende oplossing viskeus, waardoor het bevriezen daarvan gelijkmatig en ook zonder ijskristalvorming gebeurt. Tot deze groep behoren polymeren als polyethyleenglycol (PEG), polyvinylpyrrolidon (PVP), maar ook suikers als de behandeling slechts kort duurt. Sacharose wordt vaak al tijdens voorkweken (bijvoorbeeld tijdens koudetolerantie-inductie) verhoogd, waarbij de plantencel op twee manieren reageert. Ten eerste zal er al dehydratering door de hogere osmotische waarde van het medium plaatsvinden, en ten tweede zal er na opname een verhoging van de glucose en fructose concentratie in de cel zijn wat ook een positief effect op de overleving na cryopreservering heeft. Deze hogere interne suikerconcentratie voorkomt teveel dehydratering en maakt dat het bevriezen via vitrificatie gaat en zonder ijskristalvorming.

## **2.4 Ontdooien, herstel en normale doorgroei**

Het ontdooien wat via een waterbad van 37°C of via een directe onderdompeling in een 'unloading' oplossing plaats vindt, moet snel gebeuren om wederom ijskristalvorming te voorkomen. Verdere 'unloading' van cryoprotectantia vindt meestal plaats in de volgende 24 tot 48 uur op een weefselkweekmedium, waarna het medium verversd wordt.

Voor controle op behoud van de eigenschappen van het ingevroren weefsel zal een verdere kweekfase nodig zijn, als eenmaal overleving is vastgesteld. Als er eerst callusgroei wordt waargenomen bij de hergroei van 'meristemen', zal men extra alert moeten zijn op eventueel later optredende variatie. Callus en vervolgens adventieve regeneratie hebben een hoger risico op variatie dan directe regeneratie van meristematische cellen.

Omdat meestal niet alle meristematische cellen deelnemen aan de hergroei zullen chimere planten weliswaar gecryopreserveerd kunnen worden, maar bestaat een risico op verlies van hun chimere eigenschappen. Immers de organisatie van het meristeem zal verloren raken als niet het hele, georganiseerde meristeem bijdraagt aan de hergroei. Dit zal per soort en cultivar getest moeten worden.



## 3 Onderzoek

### 3.1 Inleiding en opzet onderzoek

#### 3.1.1 Inleiding

In het voorgaande hoofdstuk werden de verschillende beschikbare technieken behandeld met hun voordelen en toepassingen. Hieruit blijkt dat de vitrificatie- methode de meeste mogelijkheden biedt. Het is ook de goedkoopste methode. Deze methode kan onderverdeeld worden in 6 stappen:

##### **1. Keuze en voorbehandeling plantmateriaal**

Het gaat hierbij om het type plantenweefsel wat ingevroren wordt. Het ene plantenweefsel kan makkelijker cryopreservering overleven dan het andere. Ook is het ene weefsel geschikter om weer van uit cryopreservering tot een plant uit te groeien. Dit weefsel kan daarbij nog op een speciale manier voorbehandeld of voorgekweekt worden, of op een speciaal tijdstip geoogst worden om de cryopreservering meer kans op succes te geven.

##### **2. Cryoprotectie, de beschermingsbehandeling tegen invriesschade**

Er bestaat veel stoffen die het plantmateriaal extra bescherming geven tegen invriesschade. In het voorgaande hoofdstuk werd hierop ingegaan. De meest gebruikte combinatie is een 'loading' stap met hoog sacharose; (gebruikelijk is 2 M glycerol met 0,4 M sacharose), gevolgd door een behandeling met PVS2. Dit mengsel van een aantal stoffen zorgt ervoor dat bij invriezen de glazige toestand ontstaat in het planten weefsel. Dit gaf de methode zijn naam van vitrificatie.

##### **3. Het invriezen zelf**

Bij de vitrificatie methode gebeurt dit bijna zonder uitzondering via 'plunging', het plantmateriaal in de vloeibare stikstof 'plonzen'.

##### **4. Bewaren**

In containers met vloeibare stikstof worden de verschillende monsters in houders goed gelabeld en geordend bewaard.

##### **5. Ontdooien**

Het ontdooien moet zo snel mogelijk gebeuren. Meestal vindt dit plaats via onderdompeling in een waterbad van 35–40°C. Van groot belang bij deze kritische stap is de snelheid, en de voorbehandeling en cryoprotectie van stap 1 en 2.

##### **6. Nabehandeling en verdere opkweek tot plant geschikt voor verdere doeleinden**

De antivriesstoffen (cryoprotectantia) moeten weggewassen worden daar zij de verdere opkweek kunnen remmen en zelfs het materiaal kunnen doen sterven. Daarnaast kan door de keuze van de groeiomstandigheden (medium, licht, temperatuur, e.d.) de hergroei en/of regeneratie beïnvloed en bevorderd worden. Aan de hand van dit schema is met het onderzoek gestart.

### 3.1.2 De opzet van het onderzoek

Het onderzoek in het project cryopreserving van bolgewassen is begonnen met lelie. Voor dit gewas worden belangrijke en grote collecties aangehouden van soorten, unieke kruisingen en andere cultivars. Het onderzoek werd direct begonnen met drie cultivars Pésaro, Mont Blanc en Snow Queen uit de drie belangrijkste hoofdgroepen: een Oriëntal, een Aziaat en een longiflorum. Op deze wijze kon de methode direct ontwikkeld en getest worden voor cultivars uit deze groepen.

Bij deze methode is er binnen de diverse stappen ruimte voor variatie. Nadat gekozen is voor uitgangsmateriaal, waarin ook gevarieerd is, komt de ontwikkeling van het optimale protocol. Speciaal in de stappen 1, voorbehandeling, en 6, nakweek, zijn er veel alternatieven. Bij de voorbehandeling kunnen variaties in de tijdsduur, medium en kweektemperatuur de succesfactor bepalen. Voor stap 6 gelden de zelfde variatiemogelijkheden. Voor stap 2, de cryoprotectie, is veel variatie mogelijk in de tijdsduur en temperatuur van behandeling. Stap 3, 4 en 5 liggen wat meer vast, hoewel ook hiervoor nog experimenten mogelijk zijn.

Algemeen wordt een overlevings- en hergroeipercentage van rond 50% of beter nog meer als streefgetal gezien. Voor een succesvolle toepassing voor een soort of geslacht moet dit getal dan gehaald worden voor het merendeel van soorten en cultivars uit het sortiment. Daarom is het protocol dat ontstond ook getest voor een aantal andere soorten en cultivars dan alleen de eerstgenoemde drie. In samenwerking met de bedrijfskunde groep is de globale berekening die al in de projectbeschrijving stond uitgebreid naar een rekenmodel waarin de exacte kosten van cryopreserving vastgesteld kunnen worden. Hierbij kunnen een aantal parameters gevarieerd worden waardoor het model ook geschikt is voor andere cryopreservingprotocollen dan dat voor lelie.

Het ontwikkelen van een cryopreserveringsprotocol van leliemeristemen zou tevens een handvat zijn voor de ontwikkeling van protocollen van andere uitgangswefsels, en andere (bol-)gewassen. In het vervolg worden zowel de ontwikkeling van een protocol voor leliewortelpuntjes en schubplakjes als een protocol van hyacint behandeld.

## 3.2 Het protocol voor leliemeristemen

### 3.2.1 Inleiding

Om lelie te cryopreserveren is gekozen voor de ontwikkeling van een vitrificatieprotocol. Het hoofdargument was dat dit de goedkoopste en eenvoudigste methode is. Bij de opstelling van het project, bleek dat in een Japanse publicatie (Matsumoto et al, 1995) ook lelie gecryopreserveerd te zijn via de vitrificatiemethode. Deze Japanse methode zou aanpassingen en vereenvoudigingen vergen om hem geschikt te maken voor praktische toepasbaarheid. Uiteindelijk zou de methode op een breed sortiment van cultivars en soorten getest moeten worden.

Op deze plaats wordt eerst onder materialen en methoden het uiteindelijke protocol beschreven dat na veel experimenten als het beste naar voren kwam. In de paragraaf experimenten, resultaten en discussie worden de experimenten beschreven en bediscussieerd die als eindresultaat deze procedure gaven. Deze experimenten uit deze paragraaf zijn ook van belang als basis voor de ontwikkeling van protocollen voor ander materiaal van lelie dan meristemen en protocollen voor andere soorten dan lelie.

### 3.2.2 Materialen en methoden

#### *Plantmateriaal:*

Een aantal soorten en cultivars van lelie werden in weefselkweek gebracht of waren in weefselkweek



aanwezig. Een aantal soorten werd verkregen van Plant Research International via dr J. van Tuyl. Het materiaal werd in weefselweek aangehouden volgens de normale methode (Langens en De Klerk, 1998).

### **Cryopreserveringsprotocol (definitieve vorm):**

- *Voorbehandeling:*

Meristemen werden geïnduceerd op bolschubjes van weefselweekbolletjes. Zij werden gesneden als ze een grootte hadden tussen 1 en 2 mm, en vervolgens 4 tot 8 dagen verder gekweekt op lage petrischalen (9cm diameter ca.15 ml medium). De schalen waren gevuld met leliemedium- MS met 0,25  $\mu$ M NAA-, waarvan de sacharoseconcentratie verhoogd was tot 0.3 M (= ca.10 %). Normaal leliemedium heeft een concentratie van 3 %.

- *Behandeling met 'loading' oplossing en cryoprotectantia oplossing:*

De oplossingen hadden de volgende samenstelling:

1. loading: MS medium (mineralen) met 2 M glycerol en 0.4 M sacharose
2. cryoprotectantia: PVS 2 oplossing (Sakai et al, 1990): MS medium (mineralen) met 30 % (w/v) glycerol, 15 % (w/v) ethyleenglycol, 15 % (w/v) dimethylsulfoxide (DMSO) en 0,4 M sacharose. PVS is de Engelse afkorting voor *plant vitrification solution*.

De meristemen zijn verzameld van de petrischalen in een 30 ml plastic buisje met puntbodem (tot maximaal 10 per buisje). 4 ml van de oplossing 1 is hieraan toegevoegd. De meristemen bleven gedurende 20 min bij kamertemperatuur (ca. 20°C) in deze oplossing 1. Hierna werd de oplossing verwijderd met een 'zacht-puntige' polypropyleen pipet. De meristemen bleven achter in de punt van de buis door de pipetpunt op de bodem van de buis te zetten tijdens het opzuigen van oplossing 1. De vloeistof werd dan wel opgezogen; de meristemen liggen op de buisbodem op grensvlak van pipet en buisje.

Vervolgens werd 4 ml ijskoude PVS2 oplossing toegevoegd en de buis in ijs gezet. Na 80 min 0°C werden de meristemen met een zelfde type pipet selectief opgezogen met zeer weinig PVS2. Dit gebeurde door alle meristemen op te zuigen met PVS2 en dan de PVS uit de pipet te blazen, terwijl deze op de bodem van de punt buis stond. Dit vereist enige handigheid om te lange blootstelling aan kamertemperatuur te voorkomen. Na enige oefening en ervaring blijkt de overleving vaak beter te worden.

- *Invriezen:*

Met enkele 100-en  $\mu$ l's PVS werden de meristemen daarna overgebracht in een cryo-buisje. Het buisje werd snel in de houder geplaatst en daarna ondergedompeld in de vloeibare stikstof van een transportvat. Later werd dit volume zo klein mogelijk gehouden door bovengenoemde werkwijze. Beide technieken van overbrengen van de meristemen in de cryo-buisjes gaven goede resultaten.

Hierna kan de houder met cryobuisjes overgebracht worden naar het bewaarvat voor de eigenlijke opslag. Een alternatieve methode is de 'droplet' -methode die bij experimenten, resultaten en discussie behandeld wordt.

- *Ontdooien:*

Na opslag moeten de meristemen ontdooid worden. In de praktijk zal dit na jaren zijn. Voor experimenten was 1 uur bewaring in het transportvat genoeg omdat dit hetzelfde effect heeft op de overleving als jarenlange bewaring. Ontdooien gebeurde op twee manieren: de eerste methode was onderdompelen in een waterbad van 37°C gedurende 30 tot 60 sec. Vervolgens werden de meristemen snel voor de volgende nabehandeling gebruikt. De tweede methode was direct toevoegen van ca 4 ml 1,2 M sacharose aan de ingevroren meristemen in het buisje en vervolgens het geheel uitgieten in een kleine petrischaal, diameter ca 3 cm. Ook aan deze beide gelijkwaardige methoden wordt in de volgende paragraaf aandacht besteed.

- *Nabehandeling:*

De nabehandeling ('un-loading') start door de meristemen in de bovengenoemde oplossing te brengen, MS mineralen met 1,2 M sacharose. Als in het waterbad ontdooid is, werden de meristemen voorzichtig uit het cryo-buisje in een petri-schaal met deze oplossing overgebracht. Bij de tweede methode begon de behandeling al tijdens het ontdooien; zo werden deze twee stappen deels gecombineerd. De behandeling duurde 20 minuten bij kamertemperatuur, ca 20°C.

- *Nakweek:*

Na de voorgaande stap werden de meristemen overgebracht op laagrandige petrischalen met normaal leliemedium (diameter 9 cm, 15 ml agar). Na 1 of 2 dagen werden de meristemen dan overgezet op vers medium in hoograndige petrischalen (diameter 9 cm, 25 ml agar). Hierop konden ze uitgroeien tot kleine bolletjes die of uitgeplant of verder vermeerderd kunnen worden. In latere experimenten werd deze stap

vereenvoudigd en werden de meristemen direct na de nabehandeling in de hoograndige petriscalen verder gekweekt.

- *Veldgroei voor controle op behoud van soortechtheid:*

Van verschillende cultivars werden bolletjes opgeplant in gaaskas en op het veld. De groei en bloei werden vergeleken met opgeplante bollen van niet-gecryopreserveerde meristemen.

### 3.2.3 Experimenten, resultaten en discussie

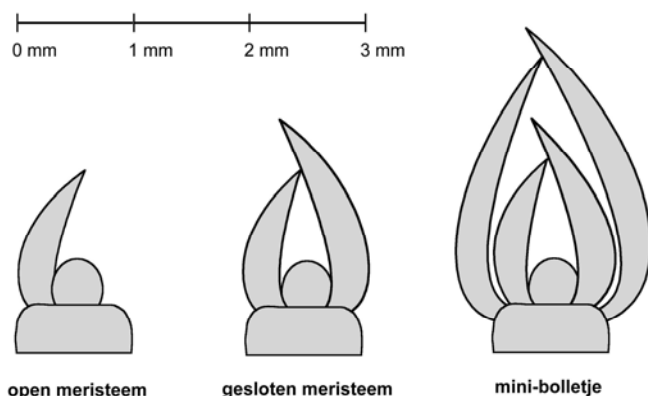
#### Het protocol

In dit gedeelte zullen verschillende stappen uit het bovenstaande protocol behandeld worden. Grotendeels worden hierbij de verschillende stappen chronologisch gevolgd. De resultaten van deze experimenten hebben geleid tot de keuze voor behandelingstijden, behandeltemperaturen, media, e.d. in het bovenstaande, definitieve protocol. Tevens maakten zij duidelijk waar kritische stappen in een cryopreserveringsprotocol zijn en waar stappen zijn die minder strikt zijn.

- *Invloed van meristeemgrootte*

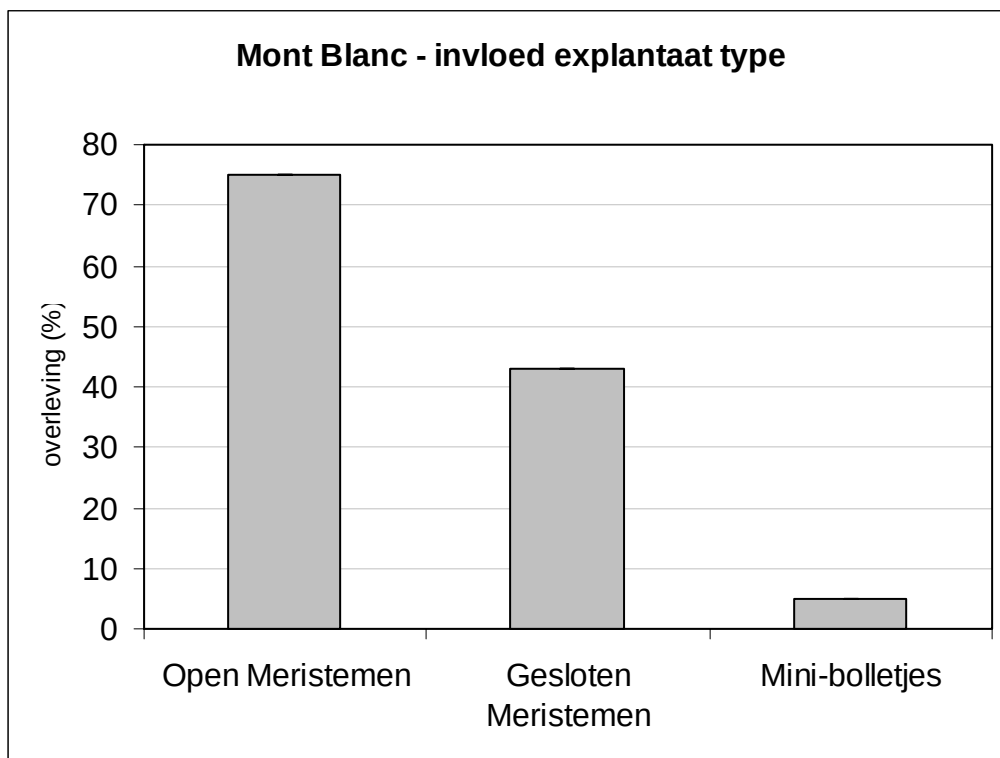
Alvorens in te gaan op de behandeling van experimenten die de verschillende stappen van het protocol aangaan, wordt hier een experiment behandeld waarbij naar de invloed van de meristeemgrootte op de overleving gekeken is.

Wanneer de eerste adventieve meristematische groepen cellen verschenen op de lelieschubben na 2 tot 4 weken, waren deze aanvankelijk zichtbaar als witte puntjes op de groene (bij longiflorums en Aziaten) tot bruingroene schub (bij Oriëntals). De bolschubben werden altijd in het licht gekweekt zodat de witte of lichtgele meristemen duidelijk zichtbaar waren op de donkerder gekleurde schubben. De tijd van ontstaan van meristemen strekte zich over 5 tot 8 weken uit, zodat van één inzetting met lelieschubjes uit weefselkweek over een zelfde aantal weken meristemen gesneden konden worden. Als alle meristemen verwijderd waren, kon zelfs de regeneratie van meristemen opnieuw beginnen. De vorm van deze meristemen was soms wat afwijkend. Vervolgens groeiden deze eerste aanduidingen van het adventieve meristeem door en namen de vorm van een duidelijk adventief meristeem aan. Daarna (vanaf 1 week later) werden vanaf een grootte van ca. 1,5 mm de eerst bladprimordia afgesplitst vanuit het ontstane scheutmeristeem. Het meristeemtopje werd omsloten door de eerste twee blaadjes en het meristeem had nu een grootte van 2 à 3 mm. Weer later na ca. 2 weken omhulden nog 2 à 3 bladprimordia het eigenlijke meristeem. Het nu ontstane kleine, adventieve minibolletje had een grootte van 4 tot 6 mm (zie figuur 1).



**Figuur 1**  
**Meristeemtypes gebruikt voor cryopreservering (tekening Elena Petustschnig)**

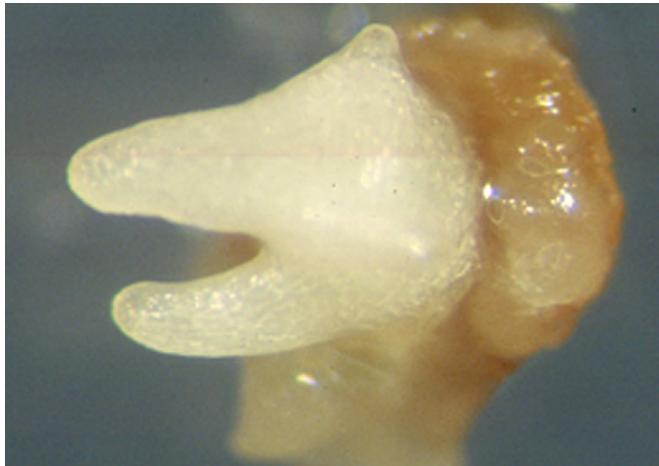
Met het hierboven beschreven standaardprotocol werden deze drie groepen van 'meristemen' van de Aziatische cultivar Mont Blanc gecryopreserveerd. De percentages overleving werden per groep bepaald zie figuur 2.



**Figuur 2**  
Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Mont Blanc; invloed van type meristeem op overleving na cryopreservering.

Het was duidelijk dat de open meristemen die toegankelijk zijn voor de loading en cryoprotectantia oplossingen veel beter overleefden dan gesloten meristemen en minibolletjes. De aanwezige minischubjes (vooral bij de minibolletjes) waren na cryopreservering erg zacht, wat op beschadiging duidde. Zij stierven ook grotendeels af. Het type cel in de schub zal door zijn eigenschappen minder geschikt zijn voor overleving na invriezen. Het zijn immers grote cellen voor opslag van reservestoffen en geen meristematische cellen.

- Voorbehandeling, koudegewenning
- 



**Figuur 3**  
**Meristeem gesneden van lelieschub**

### **Controle-experimenten – voorbehandelingen zonder invriezen**

Met meristemen van 1 tot 2 mm grootte (Figuur 3) werden de volgende controles uitgevoerd aan het begin van het project:

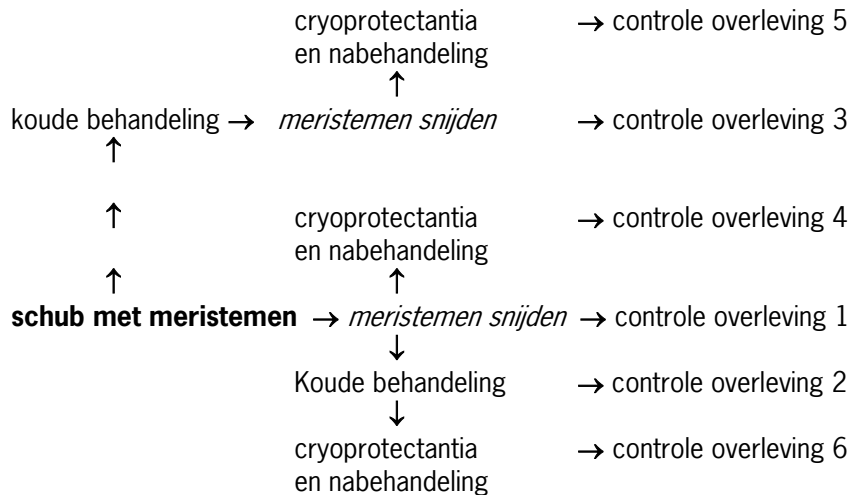
1. Doorgroei van meristemen zonder behandelingen, dus direct op petrischalen met lelievoedingsbodem.
2. Doorgroei van meristemen met koude voorbehandeling van meristemen.
3. Doorgroei van meristemen met koude voorbehandeling van schubben met meristemen, waarna meristemen gesneden werden.
4. Doorgroei van meristemen van schubben zonder koude behandeling die direct na snijden de totale cryoprotecterende -behandeling en nabehandeling hebben ondergaan behalve de invriesstap.
5. Doorgroei van meristemen die koude voorbehandeling op de schub ondergaan hebben direct na snijden de totale cryoprotecterende -behandeling en nabehandeling hebben ondergaan behalve de invriesstap.
6. Doorgroei van meristemen die de koude voorbehandeling als gesneden meristeem ondergaan hebben, de totale cryoprotecterende -behandeling en nabehandeling hebben ondergaan behalve de invriesstap.

Het geheel wordt hieronder nog eens schematisch voorgesteld.

De koude voorbehandeling vond plaats gedurende 6 dagen bij 4°C op leliemedium met verhoogd sacharose (i.p.v. 3 % [=0,088M] werd 0.3 M toegevoegd). Op dit verhoogde suikergehalte wordt in de volgende paragraaf teruggekomen. Meristemen van 1 tot 2 mm grootte werden gebruikt.

## Schema.

### Overzicht overleving van meristemen van controlebehandelingen



Behandeling 1, 2 en 3 gaven overlevingspercentages die altijd op of net onder 100 % waren. Dit was geen verrassing. Het meristeemmateriaal had geen extreme omstandigheden ondergaan, zo was het niet blootgesteld aan de PVS2 oplossing.

Behandelingen 4, 5 en 6 (zie ook tabel 1 hieronder voor controle 4 en 5) waar wel PVS2 blootstelling plaats vond, gaven een ander beeld. Vooral behandeling 4 was bij twee van de drie cultivars slecht voor een goede overleving. Als echter een koude behandeling was gegeven, werd de overleving veel hoger. Controle 6 gaf het zelfde beeld als 5.

### Eerste cryopreserveringsexperimenten

Aanvankelijk was de overleving die bereikt werd met een nieuw invriesprotocol zeer laag, speciaal voor Mont Blanc en Snow Queen. Bij Oriëntal Pésaro waren de resultaten beter. De behandeling zelf met cryoprotectantia (de stoffen die de plant tegen vriesschade beschermen) bleek de overleving van de meristemen speciaal bij Mont Blanc en Snow Queen ook zonder invriezen negatief te beïnvloeden: kennelijk zijn de verse snijwonden een goede ingang voor een schadelijke invloed van de beschermende antivriesstoffen. Op zich zijn deze, en speciaal DMSO, enigszins giftig voor de plant. Een koude voorkweek van de schubben met de meristemen had geen positieve invloed op de overleving na invriezen; wel overleefden de meristemen nu beter de behandeling met de beschermende cryoprotectantia op zich. Echter, als de meristemen na het snijden een koudegewenning plus wondheling ondergingen, bleek de overleving drastisch verbeterd. Tijdens de koudebehandeling van het gesneden meristeem werd dus zowel koude(vries-)tolerantie geïnduceerd terwijl daarnaast wondherstel op het snijvlak optrad. Dit zou erop wijzen dat een wondreactie en een open meristeem (ingang voor DMSO) samen met de cryopreserveringsbehandeling 'te zwaar' zijn voor de meristemen om een goede overleving te verkrijgen.

**Tabel 1.**

**Overlevingspercentages van leliemeristemen. De resultaten zijn bereikt in een representatief experiment, met 20 of meer meristemen per behandeling.**

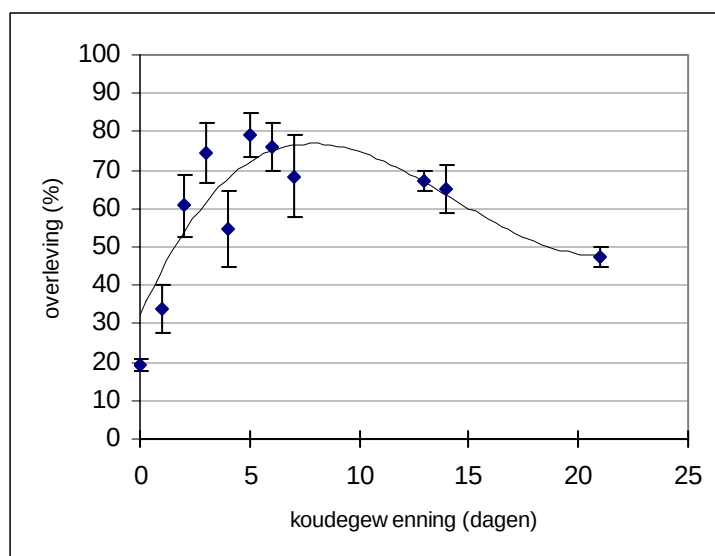
| Behandeling                                                              |                              | Pésaro    | Mont Blanc | Snow Queen |
|--------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-----------|------------|------------|
| Zonder koude behandeling                                                 | Controle 4, zonder invriezen | 72        | 25         | 33         |
|                                                                          | Na invriezen                 | 25        | 8          | 9          |
| Met koudebehandeling van schubben met meristemen: 2 tot 3 weken bij 4 °C | Controle 5, zonder invriezen | 70        | 100        | 100        |
|                                                                          | Na invriezen                 | 0         | 17         | 8          |
| Met koudebehandeling van gesneden meristemen: 6 dagen 4 °C               | Na invriezen                 | <u>53</u> | <u>56</u>  | <u>59</u>  |

In tabel 1 staan de overlevingspercentages die bereikt werden voor de drie geteste cultivars aan het begin van het project. Voor alle drie werden overlevingsaantallen bereikt die boven de “vereiste” 50 % lagen. In latere experimenten waarbij nog enkele (technische) verbeteringen in het protocol aangebracht waren, werden hogere overlevingspercentages gevonden.

In de volgende subparagrafen waarbij al technische verbeteringen ingepast zijn, blijkt dat ook sommige controles een hogere overleving gaven. Zelfs inclusief invriezen kwamen overlevingspercentages soms hoger uit dan bij de hierboven behandelde controles zonder invriezen. Voor een deel zal hier ook de verkregen vaardigheid een rol spelen.

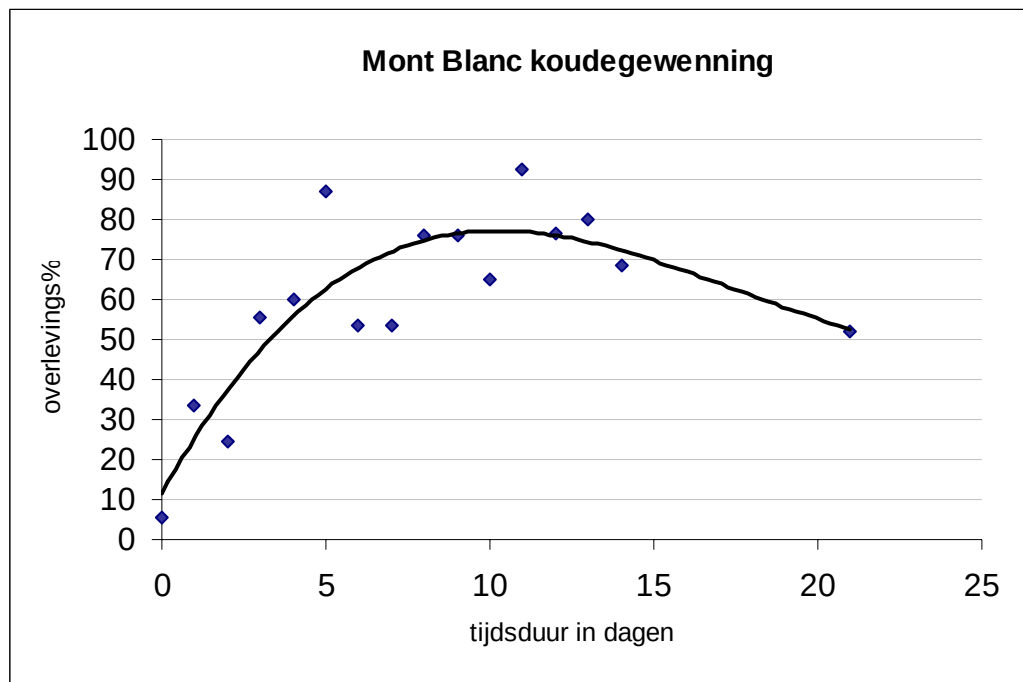
#### **Invloed van tijdsduur koudebehandeling op overleving**

Standaard werd de procedure uitgevoerd door de afgesneden meristemen gedurende 5 tot 7 dagen in het donker bij 5°C op leliemedium met 0,3 M sacharose te laten staan. Gevarieerd werd in de tijd met periodes van ‘0’ (binnen enkele uren invriezen na afsnijden) tot 21 dagen. In plaats van Snow Queen is hier de longiflorum Snow Cap gebruikt (figuur 4). Voor Pésaro werd een soortgelijke overlevingscurve gevonden. (



**Figuur 4.**

**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Snow Cap; invloed van periode van koudegewenning op overleving na cryopreservering**



**Figuur 5**  
**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Mont Blanc; invloed van periode van koudegewenning op overleving na cryopreservering.**

De '0' behandeling resulteerde in lage overleving voor alle drie geteste cultivars, Pésaro, Mont Blanc en Snow Cap, variërend van 10 tot 40 %. De overleving nam toe tot een periode van ca. 7 dagen en bleef dezelfde tot 14 dagen, waarna de overleving licht afnam. Deze afname kon grotendeels verklaard worden door verdere groei van het meristeem, zelfs bij 5 °C. Het open meristeem ontwikkelde zich tot een gesloten meristeem met lagere overlevingskans. Een periode van ca. 1 week lijkt dus zeer geschikt om aan te houden voor de voorbehandeling, i.e., koudegewenningsperiode

Er was een belangrijk voordeel van een optimum plateau voor deze behandeling. Dit gaf de mogelijkheid om op meerdere dagen meristemen te snijden en deze toch op één dag in een volgende proef te gebruiken. Ook voor praktijktoepassingen zou dit zeer belangrijk zijn, omdat het zo een grote mate van flexibiliteit aan het werk geeft.

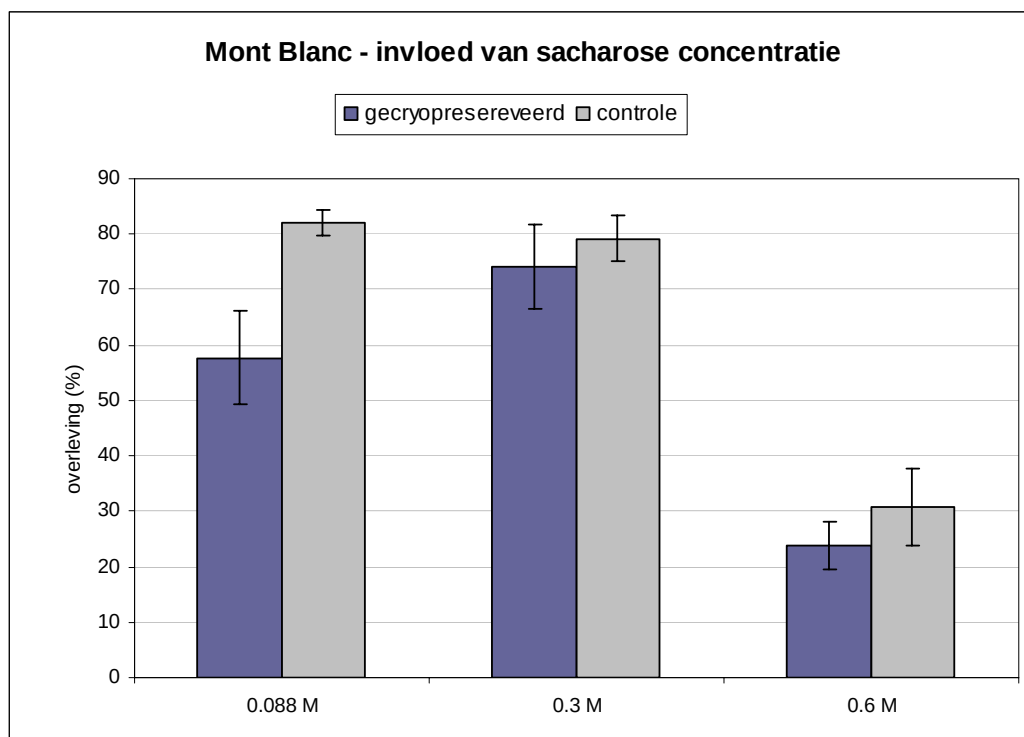
#### **Invloed van temperatuur tijdens koudevoorbehandeling op overleving**

Als de voorbehandeling in de vorm van een voorkweek bij normale kweektemperatuur (20°C in plaats van 5 °C) werd uitgevoerd, waren de resultaten verschillend bij twee geteste cultivars Pésaro en Mont Blanc. Bij Pésaro was de overleving meer dan 30 % lager; bij Mont Blanc daarentegen ongeveer gelijk.

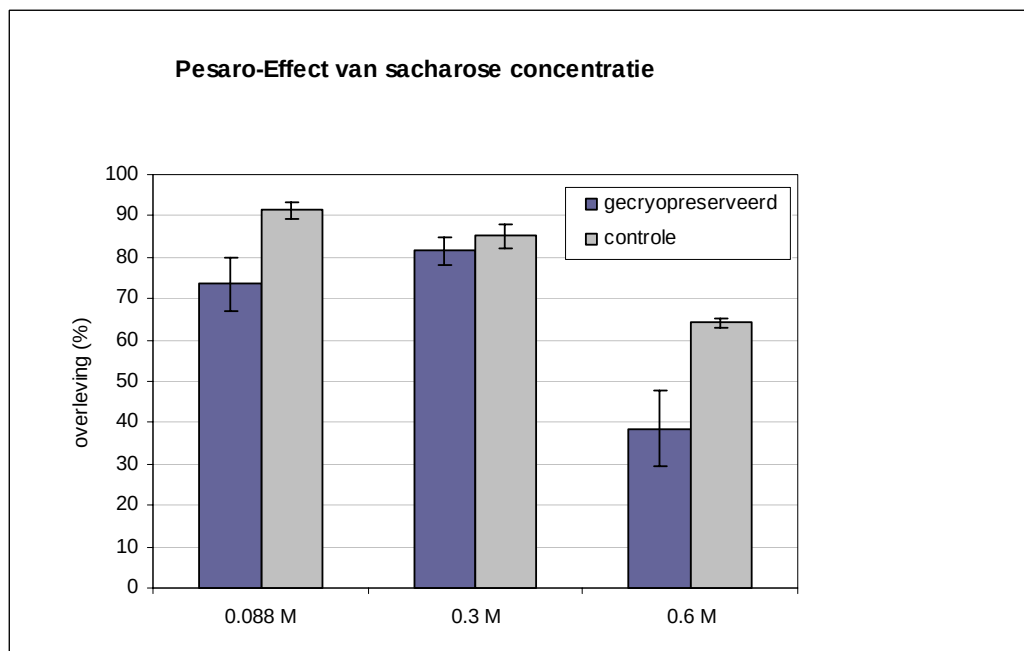
Hieruit bleek dat de wondheling en blootstelling aan hoog suiker zeker zo belangrijk was voor de overleving als de temperatuur. De suikerconcentratie en de invloed van wondheling komen in de volgende paragrafen aan de orde.

#### **Invloed van suikerconcentratie in het voorbehandelingsmedium op overleving**

De invloed van de suikerconcentratie van het medium tijdens de koudegewenning werd vergeleken door deze behandeling op drie media uit te voeren: 3 % sacharose (=0,088 M) zoals in normaal leliemedium, het gebruikelijke 0,3 M, en een verhoogde concentratie van 0,6 M.



**Figuur 6**  
**Cryopreserving van leliemeristemen, cultivar Mont Blanc; invloed van de sacharose-concentratie in het koude gewinningsmedium op overleving van meristemen met en zonder cryopreserving.**



**Figuur 7**  
**Cryopreserving van leliemeristemen, cultivar Pésaro. Invloed van de sacharose concentratie in het koude gewinningsmedium op overleving van meristemen met en zonder cryopreserving**



Duidelijk werd dat verhoging van de suikerconcentratie tot 0,6 M een negatief effect op overleving had vergeleken met 0,3 M (figuren 6 en 7). Bij een verlaging tot 0,088 M was dit effect niet duidelijk voor de cultivar Mont Blanc, maar wel voor Pésaro. Hoog suiker bleek echter op zich al een negatief effect op overleving te hebben, dus zonder de invriesprocedure. Kennelijk is de osmotische waarde van het medium dan te hoog voor overleving van meristemen. Het is dus aan te raden bij leliecultivars een medium met 0,3 M sacharose te gebruiken voor de koudegewinning.

#### **Verschil tussen voorbehandeling van losse meristemen en meristemen nog op schubben.**

In bovenstaande subparagraaf over controles werden al een aantal experimenten genoemd waarbij de schubben met nog niet afgesneden meristemen aan de koudegewinning en voorkweek onderworpen werden. De eerste resultaten werden al in tabel 1 getoond. In deze latere experimenten werden meristemen en schubben met meristemen van Pésaro en Mont Blanc getest zowel op 0,3 als 0,088 M sacharose, gedurende 1 week bij 5°C. De overleving was altijd 30 tot 50 % lager bij voorkweek op laag suiker. Bij voorkweek op hoog suiker vonden we bij Pésaro slechts een lichte afname van ca. 10 % in overleving; bij Mont Blanc was deze 25 %.

Bij langere behandeling van meristemen nog op het schubexplantaat nam de overleving snel af. Doordat de meristemen zich veel sneller van open naar gesloten meristemen ontwikkelden op het schubexplantaat dan losgesneden van de schub, is de meristeemgrootte en vorm dan een negatieve factor voor overlevingssucces.

Het is dus aan te raden om losse meristemen te gebruiken voor de koudegewinning en voorkweek, omdat het altijd één van de beste behandelingen en meestal de beste, was én meer flexibiliteit in de tijdsplanning van invriesprocedures geeft.

#### **Behandeling met 'loading' en cryoprotectantia oplossingen:**

##### ***Loading***

De stoffen die gebruikt kunnen worden voor cryoprotectie werden al genoemd (paragraaf 2.2). Van belang zou de tijdsduur van en de temperatuur tijdens de toediening, en de samenstelling van het mengsel. In het artikel van Matsumoto et al (1995) wordt ook al uitgebreid aandacht besteed aan de eerste twee aspecten, en het belang hiervan aangetoond.

Wij hebben ter bevestiging een aantal experimenten met verschillende cultivars gedaan. De samenstelling van zowel de 'loading' (2M glycerol met 0,4 M sacharose) als de cryoprotectantia oplossing PVS 2 was steeds dezelfde (zie Materialen en Methoden).

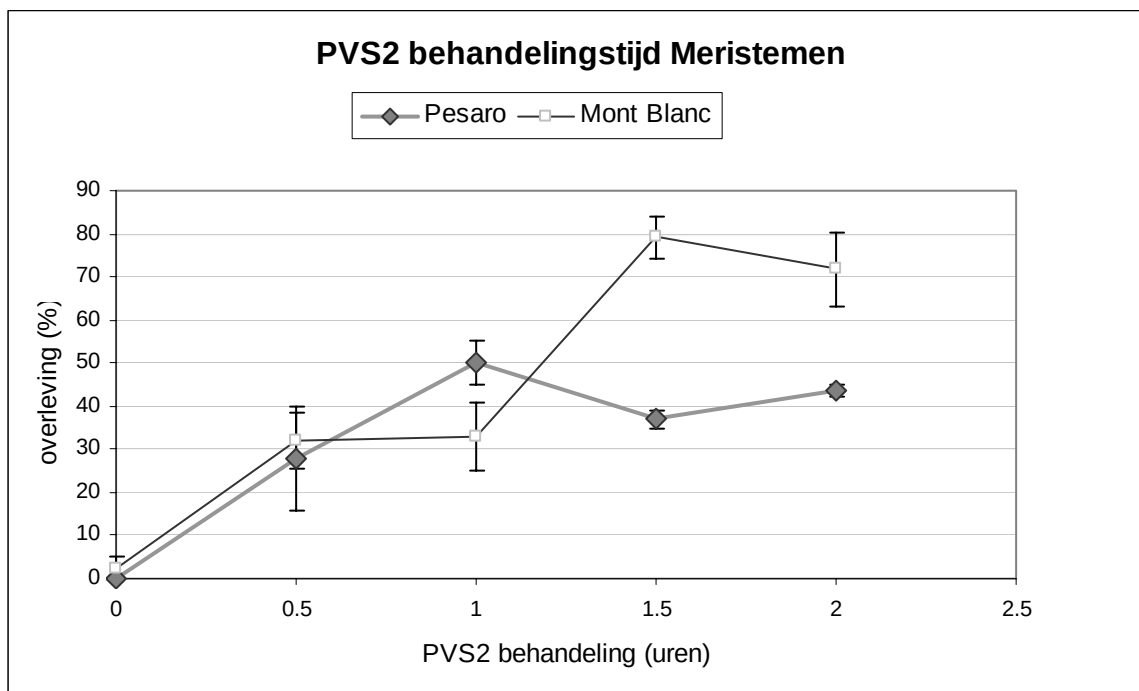
In deze experimenten werden geen nieuwe bevindingen gedaan. De 'loading'-tijd werd gevarieerd van 10 tot 30 minuten. Normaal wordt in alle gepubliceerde protocollen voor meristemen een behandel tijd van ca. 20 min aangehouden. Wij vonden geen verschillen als wij deze tijd varieerden bij de cultivars Pésaro, Mont Blanc en Snow Queen. Bij Pésaro hadden ook langere tijden tot 75 min geen invloed op de overleving. Panis (mondelinge mededeling) had dezelfde ervaring met meristemen van banaan, een soort die verder veel kritischer is ten aanzien van verschillen in behandelings tijden.

Het was een groot voordeel voor flexibele tijdsplanning tijdens de invriesprocedure dat variatie in deze stap mogelijk bleek.

##### ***Cryoprotectantia***

Matsumoto et al (1995) laten zien dat een PVS 2 behandeling bij een temperatuur van 25°C een scherp optimum van 20 min heeft voor overleving en scheutvorming bij *Lilium japonicum*. Verder is te verwachten dat door verschillen per cultivar, en meristeemgrootte en -vorm de optimale behandel tijd bij 25°C kan verschuiven. Bij een keuze van 0°C werd een plateauvormig, breed optimum bereikt van 60 tot 110 minuten. Andere tijden en temperaturen zijn niet getest.

Voor de incubatie-experimenten met PVS 2 werd daarom als behandeltemperatuur uitsluitend gekozen voor 0°C. Getest werden een reeks van behandelings tijden.



**Figuur 8**  
**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivars Mont Blanc en Pésaro; invloed van duur van PVS2 behandeling op overleving van meristemen na cryopreservering**

Bij de drie onderzochte cultivars, Snow Queen, Mont Blanc en Pésaro werd vanaf 30 minuten al een overleving gevonden van ca. 40 %. Van de beide laatstgenoemde cultivars toont de figuur de toename in overleving afhankelijk van de behandelingsduur; voor Snow Queen was dit beeld hetzelfde. Bij 60 minuten was de overleving al boven de 50 % en waarna het nog op kon lopen tot 60 tot 90 % afhankelijk van het experiment. Tussen 60 en 90 minuten werd het maximum bereikt, zodat in verdere experimenten altijd gekozen werd voor 75 à 80 min. Na 2 uur werd een lichte afname in overleving gevonden. Deze resultaten gaven de mogelijkheid tot enige flexibiliteit in tijd tijdens een invriesexperiment.

### ***Invriezen van meristemen***

Het invriezen is bij de vitrificatiemethode een kwestie van de temperatuur zo snel mogelijk naar beneden brengen. Hierin was weinig variatie mogelijk. Het cryo-buisje met de meristemen werd direct in een transporthouder met LN gedompeld. Na één uur werden ze dan ontdooid. Indien nodig konden houders met de cryobuisjes dan voor langere bewaring (vanaf 4 uur tot dagen en maanden) overgebracht worden naar een bewaarvat met LN.

Een alternatieve methode was om de PVS druppel met de meristemen op een stukje aluminiumfolie te brengen dat op vloeibare stikstof gehouden wordt. De druppel bevroor direct. Het stukje aluminiumfolie werd dan vervolgens in het cryobuisje gedaan en dan via de transporthouder overgebracht naar het bewaarvat of bewaard in het transportvat.

Deze laatste invriesmethode zal nog sneller zijn dan het toch al snelle invriezen door onderdompeling. Voor de meristemen van sommige kritische planten zou dit nodig kunnen zijn. Bij lelie waren de resultaten niet zodanig dat op deze methode is overgestapt. De overlevingspercentages waren meestal gelijk, terwijl deze methode meer manuele handigheid vereiste. Slechts éénmaal werd bij de cultivar Snow Queen een significante hogere overleving gevonden voor deze 'druppel-methode' t.o.v. het invriezen met enige 100-en µl's PVS. In andere experimenten, ook die met andere cultivars was het verschil verwaarloosbaar. Nadat het invriezen met het kleinere volume PVS (zie Materialen en methoden) was ingevoerd werd dit verschil nooit meer gevonden.

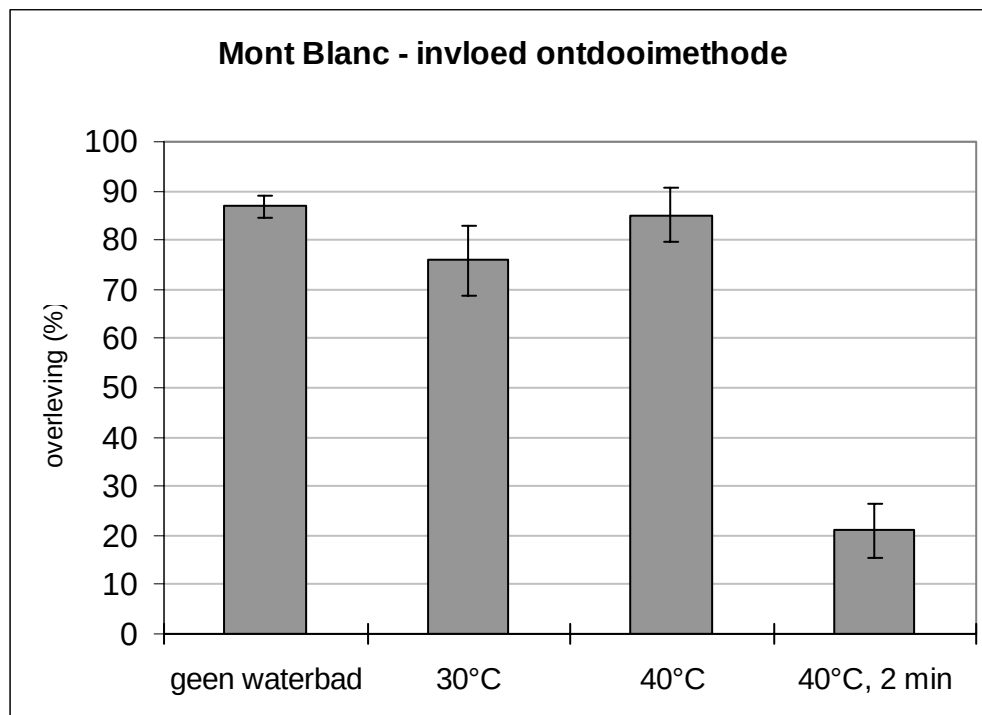
Uit deze resultaten blijkt dat snel invriezen een vereiste is voor succesvolle cryopreservering van meristemen volgens de vitrificatiemethode. Door het volume van de in te vriezen groep meristemen te verkleinen kon dit verbeterd worden ten opzichte van andere protocollen waarbij meestal in enkele 100-en

µl's PVS ingevroren werd. Invriezen in een groter volume kan ook nadelige invloed hebben op de volgende stap.

### ***Ontdooien van de meristemen***

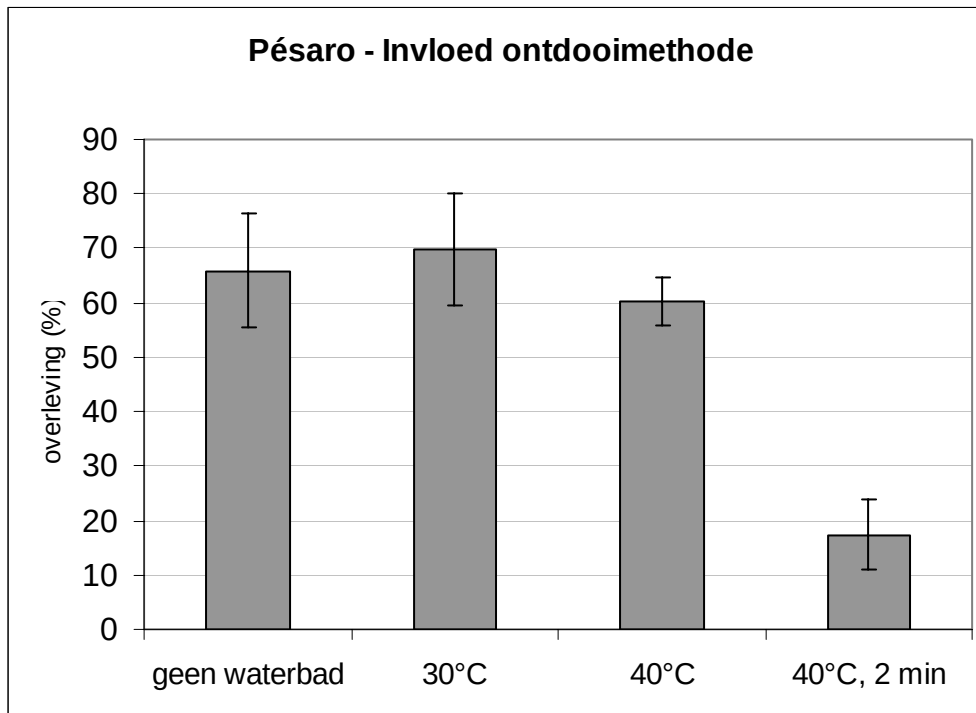
Net als bij het invriezen is het van belang dat het ontdooien zo snel mogelijk gebeurt. Dit geldt voor alle cryopreserveringsprotocollen. De meest gebruikte methode is onderdompeling van het cryobuisje met inhoud in een warmwaterbad van ca. 37°C gedurende zo exact mogelijk de tijd die nodig is om het ontdooien te voltooien. Een kortere duur zou het ontdooien verlangzamen en daardoor ijskristalvorming tijdens dit proces mogelijk maken. Een langere duur zou een blootstelling van de kwetsbare meristemen aan PVS bij 37°C betekenen. Omdat het ontdooien slechts visueel gevolgd werd, was er de mogelijkheid van te lange en te korte ontdooitijden. Hoge temperaturen zijn niet bevorderlijk voor hergroei van de nog 'zwakke', net ontdooide meristemen. Verder betekent het dat de schadelijke invloed van stoffen als DMSO veel intensiever is (vergelijk het scherpe optimum van 25 minuten voor de PVS behandeling bij 25°C gevonden door Matsumoto et al, 1995).

Er werd een experiment uitgevoerd waarbij ontdooit werd via waterbaden van 30°C en 40°C (visuele controle; duur ca. 20 tot 40 seconden), 2 minuten blootstelling aan 40°C, en direct ontdooien via toevoeging van de 'unloading' oplossing.



**Figuur 9**

**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Mont Blanc; invloed van methode van ontdooien (direct in 1,2 M sacharose) of waterbad, en temperatuur en duur waterbad op overleving, na opslag in vloeibare stikstof.**



**Figuur 10**  
**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Pésaro; invloed van methode van ontdooien (direct in 1,2 M sacharose) of waterbad, en temperatuur en duur waterbad op overleving, na opslag in vloeibare stikstof.**

De resultaten waren duidelijk voor beide geteste cultivars (fig 9 en 10). Zowel Pésaro als Mont Blanc gaven dezelfde overleving met de drie ontdooimethoden, maar de overleving viel sterk terug bij langere blootstelling aan 40 °C. De spreiding tussen 50 tot 90 % die vaak gevonden werd bij succesvolle cryopreservering werd daarom toegeschreven aan verschillen in ontdooisnelheid. Deze verschillen zouden kunnen komen door onderscheid in de volumina van PVS2 waarin ingevroren was en door de situering van de meristemen in het cryo-buisje. In grotere volumina van PVS zouden de meristemen dicht tegen de wand van het busje snel ontdooit zijn en dan de temperatuur van 37°C in PVS2 ondervonden hebben. Meristemen verder van de wand liepen juist het risico op celbeschadiging doordat er ijskristalvorming plaats vond door te langzaam ontdooien. Wij hebben deze risico's eerst verkleind door in een zo klein mogelijk volume in te vriezen, zodat alle meristemen tegen de wand lagen. Uit bovenstaand experiment blijkt dat direct ontdooien via toevoeging van de 1,2 M sacharose zeker net zo goed werkte. Hiermee werden ook bovenstaande risico's verkleind. Vanwege zijn eenvoud, tijdswinst en risicoverkleining werd dit de in het vervolg gebruikte methode.

#### ***Nabehandeling na ontdooien van de meristemen, 'unloading'***

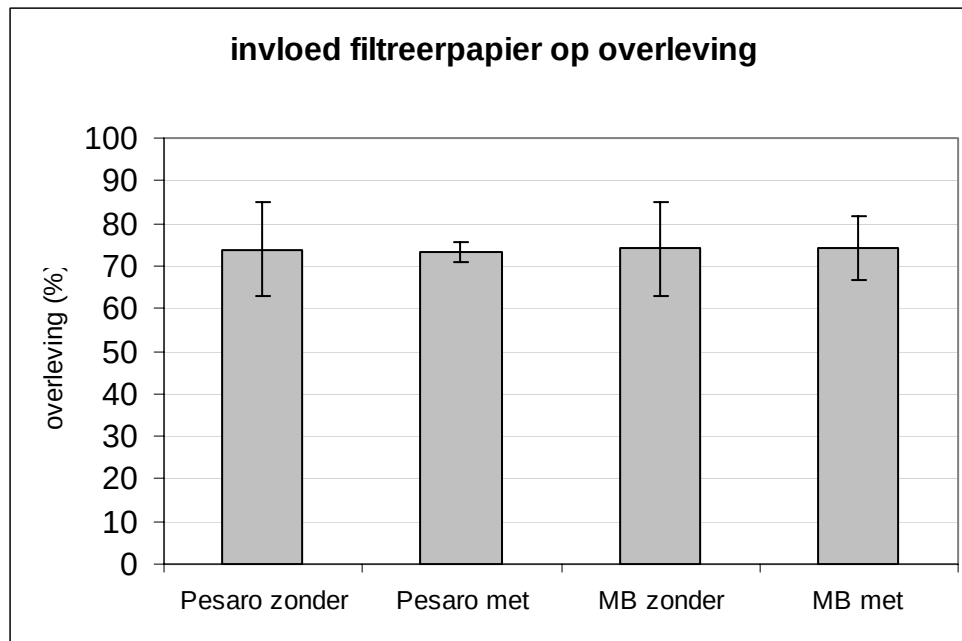
De giftige PVS2 bestanddelen moeten zo snel mogelijk weggewassen worden na ontdooien. Om een te grote osmotische schok te voorkomen gebeurt dit bijna altijd met een 1,2 M sacharose oplossing. De nabehandeling met de 'unloading'-oplossing van 1,2 M sacharose duurt normaal ca. 20 minuten bij 20°C. Voor lelie werd normaliter dezelfde tijd aangehouden. Bij een aantal experimenten bleek dat deze tijd gevarieerd kon worden. Er werden geen verschillen gevonden tussen tijden van 15 tot 35 minuten. Deze variatiemogelijkheid gaf weer enige flexibiliteit in het hele proces van ontdooien en 'unloading'.

#### ***Nakweek van de ontdooide meristemen***

Ook na het wassen met 1,2 M sacharose zullen gedurende enige tijd nog PVS2 bestanddelen uit de meristemen verdwijnen. Om deze bestanddelen na ca. 24 uur te verwijderen worden ingevroren

plantenorganen in de meeste protocollen direct na de vorige stap op een agarvoedingsbodem overgezet. Op deze bodem liggen dan één of twee filtreerpapier rondjes, waarop de meristemen geplaatst worden. Na 24 uur worden ze dan op een vers medium overgezet, eventueel weer op filtreerpapier. Als de groei start wordt daarna op normale manier verder gekweekt.

Voor leliemeristemen is aanvankelijk hetzelfde gehandeld. Het effect van weglaten van de filtreerpapierstap inclusief overzetten op vers medium werd getest met Pésaro en Mont Blanc meristemen. Er werd geen verschil in overleving gevonden, zodat met weglaten van deze stap opnieuw de methode vereenvoudigd kon worden en minder arbeid besteed hoefde worden.



**Figuur 11**  
**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivars Pésaro en Mont Blanc; invloed van toepassing van filtreerpapier bij de eerste dagen hergroei op overleving na cryopreservering**

Het weglaten van de medium-verversingsstap had dus geen ongunstige gevolgen. Heiruit werd geconcludeerd had dat tijdens de nabehandelingstap de DMSO al voldoende verwijderd werd, en/of dat de resterende concentratie DMSO geen negatieve invloed op de hergroei had. Het weglaten van filtreerpapier tijdens de hergroei start op had ook geen gevolgen. Bij de grootte van het leliemeristemen is er geen gevaar voor 'verstikking' door aanhangende 1.2 M sacharose, wat wel kan optreden bij kleinere plantendelen (zoals bij wortelpuntjes, zie volgend hoofdstuk).

De verdere hergroei in weefselkweek kan het beste aan de hand van de volgende figuren geïllustreerd worden. Figuur 12 laat regeneratie zien aan die zeer regelmatig verlopen is. Uit één meristeem van Snow Queen is het begin van één bolletje ontstaan dat hierna verder gebruikt kan worden. Ook waren al wortels geregenereerd. De nog aanwezige schubbasis is afgestorven.



**Figuur 12**  
**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Snow Queen; regeneratie van één meristeem, ca. 5 weken na cryopreservering, regelmatige regeneratie.**

Het tweede voorbeeld (figuur 13) van hergroei is ook een foto van de situatie bij Snow Queen. Hier zijn twee gecryopreserveerde meristemen uitgegroeid. Links is slechts één scheutmeristeem aan het uitgroeien begeleid door slechts weinig callusgroei. Deze laatste groei was waarschijnlijk afkomstig van regeneratief weefsel dat meegesneden werd en dat naast het afgesneden meristeem lag. Rechts is een voorbeeld van minder eenduidige regeneratie. Er was veel callusweefsel ontstaan, maar er waren ook minstens drie scheutmeristemen. Waarschijnlijk werden twee of meer kleine meristemen gesneden met daartussen regeneratief weefsel, dat nog niet georganiseerd was tot een meristeem. Dit type regeneratie was uitzondering.



**Figuur 13**  
**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Snow Queen. Regeneratie van twee meristemen, ca. 9 weken na cryopreservering.**

Het laatste voorbeeld is hergroei bij de cultivar Pésaro. Hier zijn ongeveer dezelfde beelden te zien als bij Snow Queen. Links op de foto een zelfde eenduidige vorming van één bolletje uit één meristeem zoals bij Snow Queen in figuur 12. Rechts op foto een soortgelijke regeneratie als bij Snow Queen in figuur 13. Ook hier was scheutuitgroei en bolvorming van zeker twee meristemen, begeleid door regeneratie van callus.



**Figuur 14**  
**Cryopreservering van leliemeristemen, cultivar Pésaro. Hergroei van meristemen na cryopreservering: links één bolletje ontstaan uit één meristeem, rechts een groepje meristemen en meristematische clusters.**

In vroeger cryopreservering onderzoek (Bouman & De Klerk 1990) werd vaak regeneratie van scheutvormend callus gevonden. Van dit callus zijn de hierop ontstane bolletjes apart gevolgd. Bij tientallen werd indertijd geen enkele groei en/of bloei afwijking gevonden. Uit deze resultaten en de groei resultaten uit de volgende paragraaf kan een belangrijke conclusie getrokken worden. Er is geen risico aangetoond op afwijkingen ontstaan door cryopreservering, zelfs als de regeneratie niet verloopt van één meristeem naar één bolletje. Eventuele callusvorming gevolgd door bolvorming heeft nooit geleid tot afwijkingen

### Veldgroei voor controle op behoud van soortechtheid

De meristemen werden verder gekweekt tot bolletjes waarna ze na 8 tot 12 weken koudebehandeling bij 4°C, in kistjes met grond uitgeplant werden. Na de oogst in het eerste ex-vitro groejaar werden ze volgens de normale teeltmethoden voor elke cultivar bewaard en weer opgeplant. Een deel van de longiflorum bollen bloeide al in het 2<sup>e</sup> jaar, ; de bollen van de Aziaten en Oriëntals hebben 2 (soms 3) jaar op het veld gestaan tot ze bloeigrootte bereikt hadden. Parallel werden bolletjes opgeplant ontstaan uit meristemen die niet ingevroren waren geweest. Vergeleken werden zo de 'longiflorums' Snow Cap and Snow Queen, de Aziaten Mont Blanc en Shiraz, en de Oriëntals Pésaro en Le Rêve. Er werden geen verschillen in groeiwijze geconstateerd bij aantallen die varieerden van 25 tot enige honderden. Variërend van 1 tot 3 jaar later, werd ook bij de bloei nooit een afwijking gesignaleerd.

### Resultaten bij verschillende cultivars en soorten

Het is van groot belang dat het protocol algemeen toepasbaar is voor het hele sortiment aan soorten en cultivars lelies. Daarom werden de meeste experimenten al begonnen met drie cultivars, één uit elk van de drie belangrijkste groepen. Tijdens het project werden hier nog enkele cultivars en soorten aan toegevoegd om de algemene toepasbaarheid breder te testen.

Voor alle soorten en cultivars werd het protocol gebruikt zoals het in zijn einduitvoering onder materialen en methoden beschreven wordt.

**Tabel 2**

**Overlevingspercentages van een aantal leliecultivars en –soorten. Getoond worden de hoogste en laagste overlevingspercentages uit een reeks experimenten. Bij de soorten werden slechts twee experimenten uitgevoerd.**

| Lelie soort/type | cultivar   | overleving % |
|------------------|------------|--------------|
| Oriëntal         | Pésaro     | 56-79        |
|                  | Le Reve    | 53-80        |
|                  | Siberia    | 56-93        |
| Aziat            | Mont Blanc | 65-85        |
|                  | Shiraz     | 58-86        |
| longiflorum      | Snow Queen | 59-82        |
|                  | Snow Cap   | 53-89        |
| L. formosanum    |            | 49-71        |
| L. henryi        |            | 5-19         |
| L. auratum       |            | 51-66        |

Uit tabel 2 blijkt dat op de soort *Lilium henryi* na alle onderzochte lelies goed gecryopreserveerd konden worden. Het was niet duidelijk waarom *L. henryi* één uitzondering was. De groeiwijze van deze soort was niet duidelijk afwijkend van de anderen. Ook zijn de normale culturomstandigheden niet zodanig dat zij een slechtere overleving kunnen verklaren. Omdat slechts twee experimenten voor *L. henryi* gedaan zijn, zou het mogelijk kunnen zijn dat deze uitzondering toeval was.

De resultaten als geheel lieten echter zien dat het protocol breed toepasbaar is in het lelieassortiment.

### 3.2.4 Conclusie

Bovenstaand hoofdstuk laat uitgebreid zien hoe het definitieve cryopreserveringsprotocol voor lelie tot stand gekomen is. De algemene toepasbaarheid van een goed toepasbaar protocol dat geen gecompliceerde apparatuur of ingewikkelde handelingen vereiste, werd aangetoond.

Met de uitgevoerde experimenten werd ook veel informatie verzameld die inzicht geeft hoe met de ontwikkeling van een protocol voor andere plantorganen van lelie of andere plantensoorten te beginnen. Hiervan zijn in de volgende hoofdstukken voorbeelden te lezen.

## 3.3 Ander uitgangsmateriaal voor lelie-cryopreservering

### 3.3.1 Inleiding

Ondanks het feit dat het protocol voor leliemeristemen zeer goed voldeed, is er nog gezocht naar methoden om de werkwijze nog efficiënter te maken. In het protocol zelf, vanaf koudegewinning tot invriezen en daarna ontdooien, zijn nauwelijks meer mogelijkheden. In het induceren, prepareren en snijden van meristemen zou eventueel tijd te winnen zijn. Daarvoor hebben wij twee wegen bewandeld:

- Het invriezen van schubplakjes met meristemen in vroeg stadium
- Het invriezen van wortelpuntjes

Verder wordt in dit hoofdstuk nog aandacht besteed aan het cryopreserveren van leliecallus. Afsluitend wordt een experiment behandeld dat een aanzet geeft hoe de doorlaatbaarheid getest kan worden van plantencellen voor PVS2.

### 3.3.2 Schubplakjes

Het snijden van de meristemen is een nauwkeurige zaak. Om grote beschadigingen tijdens het snijden te voorkomen moet dit geschieden met behulp van een binoculair. Ook is dit noodzakelijk om niet te veel omringend schubweefsel mee te snijden. Dit weefsel zou doordat het afsterft de overleving nadelig kunnen beïnvloeden. De schubjes worden eronder gelegd en de meristemen van de juiste grootte werden eraf gesneden (zie voorgaand hoofdstuk). Dit kost veel tijd. Allereerst is er gezocht naar een methode waarbij deze tijdrovende arbeidsstap verkort of weggenomen zou kunnen worden.

Er bestaat een methode die gebruikt wordt bij de transformatie van lelie. Voor het transformeren van lelie worden ca. 1 mm dunne overlangse plakjes gesneden van schubjes van in-vitro bolletjes. Deze worden dan beschoten met het nieuwe DNA dat in de lelie ingebracht moet worden. De schubplakjes produceren dan na enige tijd meristemen of callus al naar gelang de weefselkweek omstandigheden. Deze plakjes zouden ook als uitgangsmateriaal voor cryopreservering kunnen dienen als de regeneratie. Een gunstig stadium zou het moment zijn als juist de meristeemvorming op gang is gekomen. Het invriezen van deze plakjes na koudegewinning zou tijdsbesparend zijn omdat de plakjes eenvoudig zonder binoculair gesneden kunnen worden en zeer handzaam zijn. Per plakje ontstaan er meerdere meristemen. Na ontdooien en na regeneratie staan daardoor per eenheid van invriezen direct meer bolletjes ter beschikking.

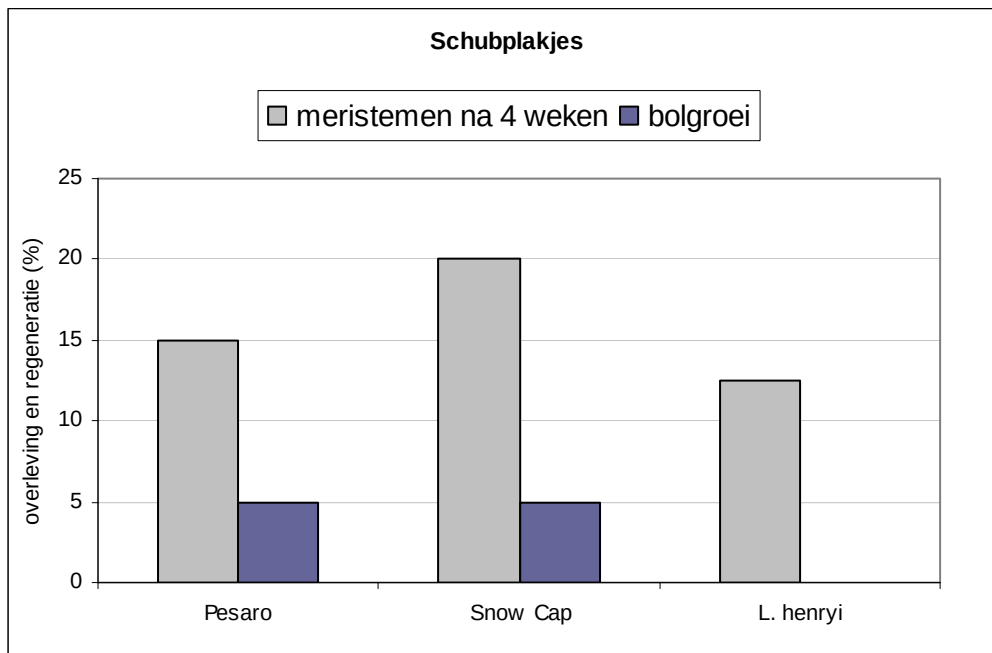
#### **Materiaal en methoden**

Van jonge weefselkweekbolletjes van de cultivars Pésaro, Snow Cap en *Lilium henryi* werden dwarse plakjes gesneden van ca. 1 mm dikte. Deze werden 3 tot 4 weken bij 20°C gekweekt op leliemedium; eerst 3 dagen in het donker en de resterende tijd in het licht. Vervolgens werden deze plakjes aan dezelfde koudegewinning onderworpen als gesneden, enkelvoudige meristemen. Ook het verdere invries- en hergroeiprotocol was gelijk aan dat van deze meristemen.

#### **Resultaten en discussie**



Na de groei bij 20°C was met het blote oog al duidelijke meristeemvorming zichtbaar op ongeveer de helft van de plakjes. Bij de andere helft waren al aanduidingen van meristeemgroei te zien (verkleuringen en verdikkingen op de randen van de snijvlakken). Ook per individueel plakje was de ontwikkeling verschillend en kwamen hierop meristemen in verschillende stadia van groei voor. Er waren dus verschillen in het uitgangsmateriaal op het moment van de start van de invriesprocedure.



**Figuur 15**  
Cryopreservering van schubplakjes, cultivars Pésaro, Snow Cap en *Lilium henryi*. Zichtbare overleving van meristemen 4 weken na cryopreservering, en vervolgens overleving en regeneratie na 9 weken.

De hergroei na cryopreservering werd beoordeeld na 4 weken. Op dat moment vertoonde tussen 12 en 20 % van de plakjes verdere meristeemuitgroei. Echter bij de volgende beoordeling na 9 weken, bleek dat slechts bij de twee cultivars er nog materiaal in leven was dat ook verder nog doorgroeide naar bolletjes (Figuur 15). Er was niet vergeleken of er meer of minder ver uitgroeide meristemen op het plakje aanwezig bij invriezen waren.



**Figuur 16**  
Cryopreservering van schubplakjes, cultivar Pésaro. Afgestorven en bijna afgestorven meristemen op schubplakje na 9 weken.

Hoewel dit geen tevredenstellend resultaat is, moet deze methode niet direct afgeschreven worden. Uit nadere observaties gedurende de hele hergroefase (Figuur 16) bleek dat op alle plakjes meristemen of beginnende meristemen de cryopreservering overleefd hadden. Na beginnende uitgroei stierven zij echter grotendeels samen met het schubplakje af. Ook bij het wel overlevende materiaal (figuur 17) stierf het schubplakje na de cryopreserveringsbehandeling weliswaar, maar overleefden een groot aantal meristemen de behandeling wel en groeiden door.



**Figuur 17**  
**Cryopreservering van schubplakjes, cultivar Pésaro; regeneratie na 9 weken op schubplakje: groeiende meristemen, callusgroei en afgestorven meristemen**

Het plantenweefsel van het schubplakje zelf is reserveweefsel en de cellen hiervan hebben niet de eigenschappen die hen geschikt maken voor cryopreservering. Zij konden dus deze cryopreservering niet overleven, maar beïnvloedden daarbij de erop groeiende meristemen zodanig dat deze ook afstierven. Oorzaken zouden tweeërlei kunnen zijn: 'giftige' exsudaten uit het plakje, en/of gebrek aan contact met het medium (doordat contactweefsel dood is). Juist kleine, nog jonge meristemen zouden hier gevoeliger voor kunnen zijn dan oudere met meer 'eigen' weefsel. Het lijkt dus dat het protocol voor schubplakjes verbeterd zou kunnen worden door de meristemen op de plakjes wat langer door te laten groeien tot een redelijk aantal een grootte heeft bereikt die rond 1 mm ligt.

### **Conclusie**

Hoewel met het huidige uitgangsmateriaal nog onvoldoende overleving werd bereikt, heeft de methode toch mogelijkheden. 'Losse' meristeen-cryopreservering van *L. henryi* gaf een slechte overleving (zie vorig hoofdstuk). Maar de waarneming dat *Lilium henryi* op deze manier wel overleving vertoonde in de eerste weken na cryopreservering en regeneratie vergelijkbaar met de andere twee cultivars, liet zien dat op deze manier ook moeilijke soorten of cultivars succesvol ingevroren zouden kunnen worden. Ook andere gewassen die adventief meristemen regenereren op kleine weefseldelen zouden op deze wijze gecryopreserveerd kunnen worden (bijvoorbeeld Saintpaulia, begonia, hyacint).

### **3.3.3 Wortelpuntjes**

Een andere tijdrovende stap, waarbij weliswaar niet veel werkinzet gevraagd wordt, is na de inductie het wachten op de scheutmeristemen. Natuurlijk zijn er scheutmeristemen in bollen of weefselkweekbolletjes aanwezig. Maar het prepareren van deze scheutmeristemen is zeer tijdrovend en daarmee duurder dan snijden van nieuw geïnduceerde. Vroeger onderzoek in 1989 van Bouman en De Klerk heeft daarnaast al uitgewezen dat dit type meristemen slecht gecryopreserveerd kan worden. Echter bij de weefselkweekvermeerdering van lelie worden altijd worteltjes gevormd. Deze hebben meristemen, de wortelpuntjes, die zeer snel zonder gebruik van binoculair te isoleren zijn. Voorwaarde voor succesvolle toepassing is dat vanuit dit materiaal efficiënte regeneratie van bolletjes mogelijk zal zijn.

### **Materiaal en methoden**

Proeven werden uitgevoerd met de cultivars Pésaro en Mont Blanc. Bolletjes geïnduceerd op schubjes in weefselkweek, vormden na enige weken wortels. Van de groeiende wortels werden wortelpuntjes gesneden van ca. 4 mm lengte. De cryopreserveringsbehandeling was gelijk aan die voor leliemeristemen met

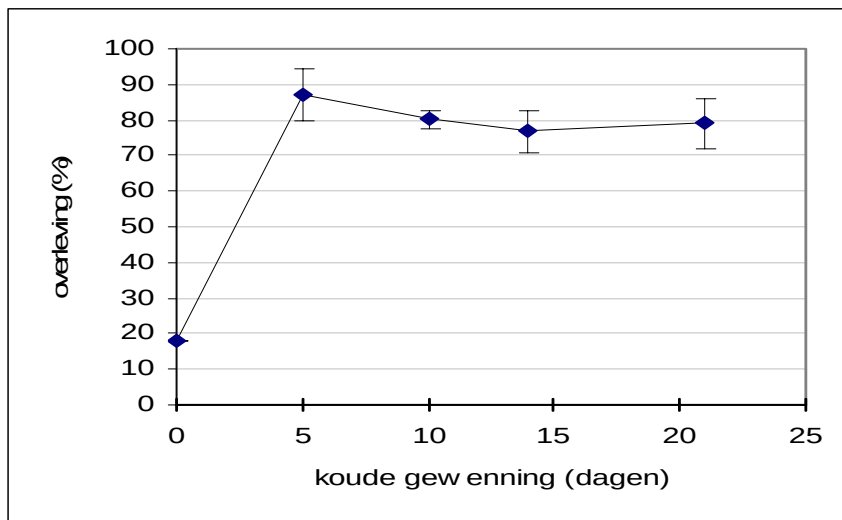
uitzondering van de PVS 2 behandeling die slechts 10 min duurde.

Na ontdooien werden de wortelpuntjes altijd op filtreerpapier op de agarbodem geplaatst. Na één dag of soms twee dagen werden de groeiende wortelmeristemen overgezet op vers medium met filtreerpapier. Om vanuit de wortelpuntjes weer vermeerderbaar materiaal te regenereren werden verschillende regeneratieproeven uitgevoerd, waarbij vooral in de hormoonsamenstelling van het medium gevarieerd werd. Grotendeels werden deze proeven met niet-gecryopreserveerde wortelpuntjes uitgevoerd.

## Resultaten en discussie

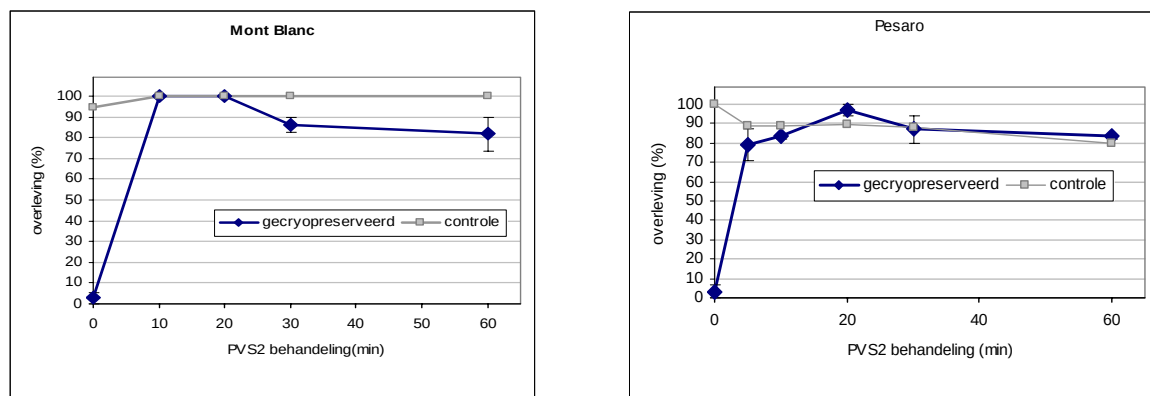
Tijdens het grootste deel van de weefselkweekfase zijn groeiende wortels aanwezig. Dit maakte de keuze om cryopreserving van wortelpuntjes te proberen erg aantrekkelijk. Immers meestal zullen er geen nieuwe inzettingen gedaan hoeven te worden als actief groeiend weefselkweekmateriaal aanwezig is.

Net als voor de scheutmeristemen werd voor de wortelpuntjes een experiment opgezet om allereerst de optimale koudegewenningsperiode te bepalen.



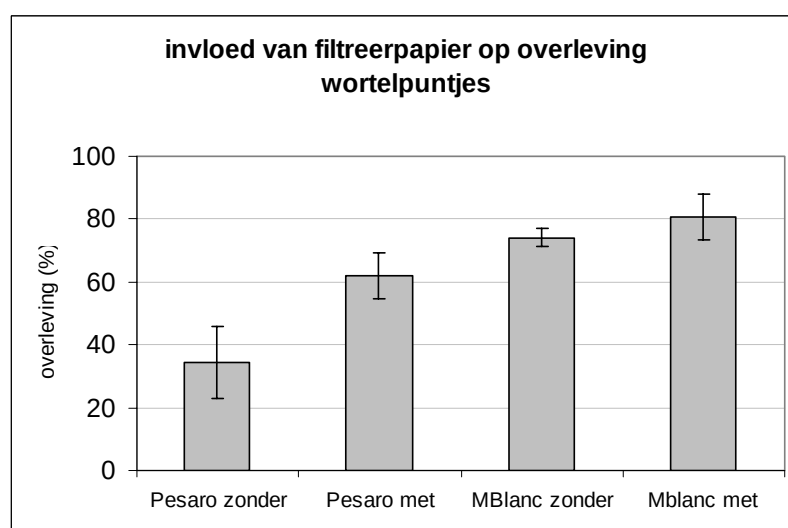
**Figuur 18**  
**Cryopreserving van leliewortelpuntjes, cultivar Pésaro; invloed van periode van koudegewenning op overleving na cryopreserving**

Na 5 dagen werd al een optimum bereikt bij Pésaro (figuur 18) en dit is vergelijkbaar met de tijdsduur gevonden voor de scheutmeristemen. Voor de cultivar Snow Queen werd een zelfde optimum gevonden. Uit de resultaten is niet op te maken of een kortere tijd van 1 tot 4 dagen ook al voldoende zou zijn voor optimale overleving. Na nog langere tijd nam de overleving iets af, maar niet significant. Dit maakt het mogelijk om ook voor wortelpuntjes een effectief werkschema op te zetten door flexibiliteit in deze koudegewenningsperiode.



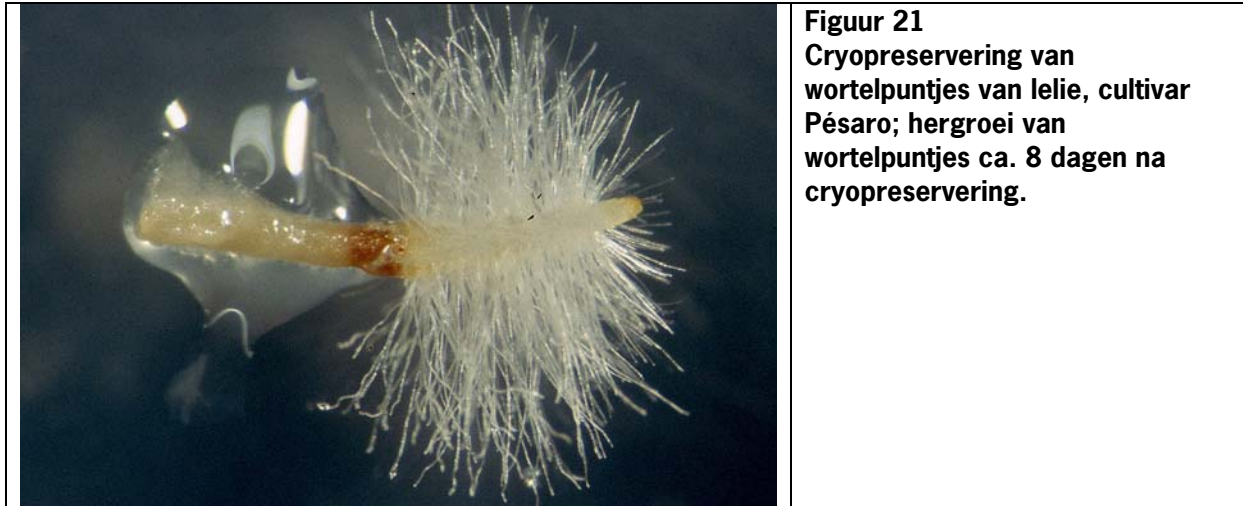
**Figuur 19**  
Cryopreservering van leliewortelpuntjes, cultivars Mont Blanc en Pésaro. Invloed van duur van PVS2 behandeling op overleving na cryopreservering.

De minimale tijd van de PVS2 behandeling (bij 0°C) nodig voor optimale overleving werd bepaald bij zowel Pésaro als bij Mont Blanc (figuur 19). Het is duidelijk dat voor deze meristemen een veel kortere tijd van incubatie al voldoende is voor optimale overleving. Aan de hand van deze gegevens is besloten om de PVS2 behandelingsduur op 10 minuten te stellen. Na meer dan 20 minuten bleek voor Mont Blanc de overleving terug te lopen; bij Pésaro niet. Een duidelijke reden voor dit verschil lag niet voor de hand. Na ontdooien werden de wortelpuntjes op petrischalen met agarmedia geplaatst met en zonder filtreerpapier rondje. In tegenstelling tot bij de scheutmeristemen bleek nu het toepassen van filtreerpapier de overleving te bevorderen zodat deze extra handeling voordelig was (figuur 20).



**Figuur 20**  
Cryopreservering van leliewortelpuntjes, cultivars Pésaro en Mont Blanc; invloed van toepassing van filtreerpapier bij hergroei op overleving na cryopreservering

De overleving van wortelmeristemen lag onveranderlijk erg hoog en benaderde de 100%. De wortelpuntjes groeiden verder en ontwikkelden wortelharen (Figuur 21).



**Figuur 21**  
**Cryopreservering van**  
**wortelpuntjes van lelie, cultivar**  
**Pésaro; hergroei van**  
**wortelpuntjes ca. 8 dagen na**  
**cryopreservering.**

De regeneratiestap is echter de stap die het verdere succes bepaalt. Overlevende scheutmeristemen groeiden bijna allemaal uit tot bolletjes die verder gebruikt kunnen worden zij het voor verdere vermeerdering of voor uitplanten. Voor wortelpuntjes was dit een probleem. Na 1 dag werden zij op vers medium met filtreerpapier geplaatst voor verdere groei en regeneratie. Op het standaard leliemedium ontwikkelden zich nauwelijks bolletjes; hoogstens 3 %. Omdat dit veel te laag was om de methode toepasbaar te maken, werden er regeneratieproeven gedaan met Pésaro. Gekozen werd voor cytokininehoudende media om de regeneratie te bevorderen. Overleving op zich na 3 weken is slechter op een leliemedium met 0,44 $\mu$ M BA in plaats van 0,27  $\mu$ M NAA zoals in het medium gebruikt voor scheutmeristemen (figuur 21). Als de overlevende wortelpuntjes zouden reageren met regeneratie tot bolletjes, was deze overleving nog ruim voldoende om de methode verder te ontwikkelen. Dit was echter niet het geval.

In een uitgebreider experiment (tabel 3) werden wortelpuntjes alleen op standaard leliemedium, en direct of na enige weken op medium met BA werden geplaatst. Verder werd een deel van de regeneratie in het licht voortgezet. Beoordeeld werd tot 15 weken na de start van de regeneratie.

**Tabel 3**

**Cultivar Pésaro; overlevingspercentage, bolvorming en callusvorming van wortelpuntjes, zonder (=controle) en na cryopreservering op verschillende media en lichtregimes (normaal is donker).**

| Medium en<br>behandeling                                      | overleving<br>(%) | vorming in % van overlevende<br>explantaten |            | vorming in % van ingezette<br>explantaten |            |
|---------------------------------------------------------------|-------------------|---------------------------------------------|------------|-------------------------------------------|------------|
|                                                               |                   | bolletjes                                   | callus     | bolletjes                                 | callus     |
| 1 Standaard Lelie Medium                                      |                   |                                             |            |                                           |            |
| Gecryopreserveerd                                             | 90.3 ± 2.7        | 3.1 ± 2.1                                   | 21.2 ± 6.4 | 2.8 ± 1.9                                 | 19.1 ± 5.8 |
| Controle                                                      | 90.9 ± 1.8        | 1.9 ± 1.9                                   | 20.4 ± 8.0 | 1.68 ± 1.68                               | 18.6 ± 7.3 |
| 2 Standard Lelie medium, van donker naar licht na 3 weken     |                   |                                             |            |                                           |            |
| Gecryopreserveerd                                             | 90.2 ± 5.2        | 0                                           | 10.9 ± 2.9 | 0                                         | 9.5 ± 2.2  |
| Controle                                                      | 94.4 ± 0          | 0                                           | 11.7 ± 0   | 0                                         | 11.1 ± 0   |
| 3 Standard Lelie medium, over op 0.44 µM BA medium na 3 weken |                   |                                             |            |                                           |            |
| Gecryopreserveerd                                             | 90.3 ± 2.7        | 0                                           | 7.4 ± 2.5  | 0                                         | 6.7±2.3    |
| Controle                                                      | 90.9 ± 1.8        | 0                                           | 11.5 ± 4.5 | 0                                         | 10.0 ± 4.1 |
| 4 Standard Lelie medium, over op 0.44 µM BA medium na 1 dag   |                   |                                             |            |                                           |            |
| Gecryopreserveerd                                             | 62.4 ± 3.2        | 0                                           | 3.3 ± 3.3  | 0                                         | 2.2 ± 2.2  |
| Controle                                                      | 72.5 ± 7.0        | 0                                           | 10.0 ± 0   | 0                                         | 6.7 ± 0    |
| 5 Direct op Lelie medium met 0.44 µM BA                       |                   |                                             |            |                                           |            |
| Gecryopreserveerd                                             | 62.4 ± 5.4        | 0                                           | 3.3 ± 3.3  | 0                                         | 1.8 ± 1.8  |
| Controle                                                      | 70.0 ± 0          | 0                                           | 7.1 ± 0    | 0                                         | 5.0 ± 0    |

De regeneratie tot bolletjes was in alle gevallen zeer laag tot nul. Alleen op het standaard NAA-medium werd bolvorming gevonden en dan nog slechts in 2 % van de inzettingen. Er werd wel callusgroei gevonden in ca. 20 % van de overlevende meristemen. Dit geeft aan dat na enige tijd wortelgroei er veranderingen optreden die tot callusgroei leiden, en in enkele gevallen tot bolvorming. De tijdsduur plus het lage percentage zijn beide zodanig dat dit in deze vorm geen optie voor cryopreservering van lelie is. Licht is duidelijk een remmende factor voor callusvorming en verdere regeneratie. Ook op het BA media of combinaties van media is callusvorming altijd lager dan op standaardmedium. Het maakte hierbij nauwelijks uit of de wortelpuntjes gecryopreserveerd waren of niet.

Er zijn geen verdere experimenten gedaan om de regeneratie te verbeteren. Als ooit een effectief en goedkoop regeneratieprotocol vanuit wortels beschikbaar komt, wordt deze methode voor bewaring van lelie weer aantrekkelijk. Cryopreservering via wortelmeristemen zou ook aantrekkelijk voor andere planten kunnen zijn (zie paragraaf 3.4).

### Conclusie

Cryopreservering van wortelpuntjes/-meristemen was zeer goed mogelijk en bereikte overlevingspercentages die zelfs hoger lagen dan voor scheut meristemen. Problemen traden op bij regeneratie van dit materiaal om bolletjes te verkrijgen, een voorwaarde voor verdere toepassing. Dit is niet in voldoende mate gelukt. Er is geen verder onderzoek aan dit deel van het project gedaan. Mogelijkheden voor betere regeneratie zouden kunnen liggen in een andere hormoonsamenstelling van het regeneratiemedium. Vaak blijken combinaties van auxines en cytokinines goede resultaten te geven.

### 3.3.4 Callus

Voor cryopreserving van genetische variatie is callusbewaring uiteraard niet geschikt. Callusinductie zal meestal een behoorlijke tijd in beslag nemen. Verder zou het al methodisch onderzocht moeten zijn: allereerst hoe callus te induceren en vervolgens ook nog weer de regeneratieweg vinden tot plantje. Voor de bewaring van callusmateriaal voor andere doeleinden zou de methode wel zeer waardevol kunnen zijn, bijvoorbeeld callus geschikt voor transformatie maar ook al getransformeerd callusmateriaal. Getransformeerd callusmateriaal kan zo veilig bewaard worden tot het beschikbaar moet zijn voor het testen op de inbouw van nieuwe eigenschappen of voor de regeneratie. Ook callus geschikt voor het starten van suspensiecultures zou zo bewaard kunnen worden. Langdurig doorkweken als bewaringsmethode voor callus heeft immers het risico dat er langzaam afwijkingen insluipen die het regeneratievermogen verminderen en daarmee de soortechtheid bedreigen.

#### **Materiaal en methoden**

Van lelie was callusmateriaal aanwezig van de cultivar Snow Queen. Hiermee is één oriënterend experiment uitgevoerd. Stukjes callus van ca. 2 mm doorsnede werden gebruikt. Er werden 4 buisjes met elk 5 stukjes callus ingevroren. De invriesprocedure inclusief koudegewenning was verder dezelfde als voor adventieve, afgesneden leliemeristemen, behalve een verkorting van de PVS 2 behandeling tot 20 minuten. Na ontdooien werden de callusstukjes 1 dag op leliemedium zonder hormonen gezet en vervolgens verder gekweekt op callusmedium. Per stukje werd de hergroei beoordeeld. Er werden geen regeneratieproeven uitgevoerd.

#### **Resultaten en discussie**

Van de ingezette callusstukjes overleefden alle stukjes (in ieder geval gedeeltelijk) de cryopreserving. Bij de hergroei bleek dat niet alle callusmateriaal aan de hergroei meedeed; delen van het callus verkleurden naar donkerbruin en werden verwijderd na enkele weken. In regeneratie-experimenten in parallelle projecten is gebleken dat het gebruikte callus zeer goed regenereerde. In dit geval is niet systematisch gekeken of de cryopreserveringsbehandeling hierop nadelige invloed had. Er werd op enkele stukjes wel regeneratie van scheutachtig plantmateriaal waargenomen, maar dit is niet verder vervolgd.

#### **Conclusie**

Cryopreserving zou een zeer goede methode kunnen zijn voor de bewaring van callusmateriaal geschikt voor transformatie. Ook het gemodificeerde callus zou op deze wijze veilig bewaard kunnen worden zonder gevaar op verlies van eigenschappen. In een ander experiment werd dit nog eens bevestigd met iriscallus (zie volgend hoofdstuk).

### 3.3.5 Test op doorlaatbaarheid van celwanden

Zoals uit voorgaande hoofdstukken en paragrafen blijkt is de PVS 2 behandeling zeer belangrijk. De functie van deze behandeling is tweeledig: enerzijds ontrekt het water aan de cellen door de hoge concentratie van sacharose, en polyethyleenglycol, anderzijds vergemakkelijkt het mengsel het binnendringen in de cellen van de beschermende stoffen DMSO en glycerol. Omdat DMSO één van de bestanddelen is van dit mengsel en deze stof nadelige invloeden heeft op plantencellen, moet de tijdsduur van blootstelling aan dit mengsel zo kort mogelijk zijn. Bovendien kan de invloed verminderd worden door de behandeling bij lage temperatuur uit te voeren. Dit laatste werd bereikt door alle PVS behandelingen bij 0°C uit te voeren.

In een oriënterend experiment werd een methode ontwikkeld om het binnendringen van methyleenblauw met en zonder invloed van deze stoffen zichtbaar te maken. Dit zou een hulpmiddel kunnen zijn om eventuele schade te beperken omdat zo getest kan worden hoe doorlaatbaar de cellen zijn voor methyleenblauw onder invloed van DMSO. De hypothese luidt dan: De snelheid waarmee methyleenblauw de cel binnendringt, is ongeveer gelijk aan die waarmee DMSO binnendringt. De behandel tijd is dan voltooid als de



maximale blauwkleuring bereikt is.

### **Materiaal en methoden**

Meristemen en wortelpuntjes werden behandeld met 0,03 % methyleenblauw opgelost in gedemineraliseerd water of PVS 2. De behandeling duurden 10 of 80 minuten.

### **Resultaten en discussie**

Bij de meristemen drong de kleurstof alleen via de het wondvlak binnen (figuur 22) als hij toegediend werd in water. Opgelost in PVS 2 begon het meristeem blauw te kleuren (al zichtbaar na 20 minuten) en was na 80 minuten het explantaat nagenoeg geheel blauw. Wortelpuntjes kleurden ook aan het wondoppervlak en bovendien waren de wortelharen en het wortelkapje ook enigszins blauw (de figuur laat dit laatste niet duidelijk zien) bij kleuring met de waterige oplossing. De PVS 2 oplossing met methyleenblauw kleurde de wortelpuntjes al na 10 minuten volledig.



**Figuur 22**

**Explantaten geschikt voor cryopreservering gekleurd met methyleenblauw. Boven: scheut meristemen; onder: wortelpuntjes. Links: gekleurd met methyleenblauw in PVS2; rechts gekleurd met methyleenblauw in water. Kleuringstijd voor scheutmeristemen 80 minuten; voor wortelpuntjes 10 minuten.**

Dit komt dus overeen met de door ons toegepaste tijden voor de PVS 2 behandeling. Of 60 minuten of 5 minuten voor resp. meristemen of wortelpuntjes ook genoeg zou zijn voor een zelfde blauwkleuring lijkt waarschijnlijk, als we de invloed van de PVS behandelingstijd op de overleving zien. Een tijdscurve van de kleuring zou een aanvulling van deze eerste gegevens opleveren.

### **Conclusie**

Uit dit kleine experiment bleek dat het mogelijk was om een aanknopingspunt te vinden voor de minimale PVS behandelingstijd nodig om het materiaal vriesbestendig te maken. Voor een zekerder bepaling is het maken van een tijdscurve het meest geschikt, waarbij dan de blauwkleuring gevolgd kan worden.

## 3.4 Cryopreservering van andere gewassen

### 3.4.1 Inleiding

De cryopreserveringstechniek kan van belang zijn voor een groot aantal andere (bol- en knol-)gewassen. Zowel voor de bewaring van kruisingsouders of waardevol genetische materiaal uit kruisingen (ook als back-up voor weefselkweekbewaring) als voor de bewaring van genetisch gemodificeerd callus of calluslijnen die geschikt zijn voor modificatie (zie inleiding en voorbeeld lelie) zijn grote mogelijkheden. In dit hoofdstuk komen allereerst inleidende experimenten voor bewaring van genetische diversiteit bij twee gewassen aan de orde, nl. hyacint en *Zantedeschia*. Kort wordt ook de tulp aangestipt. Daarnaast is een experiment gedaan waarbij iriscallus geschikt voor genetische modificatie is ingevroren. Verder worden kort de mogelijkheden voor cryopreservering van wortelpuntjes bij een aantal andere gewassen dan lelie verkend.

### 3.4.2 Hyacint

Voor hyacint wordt een groot aantal nieuwe en oude cultivars aangehouden op het veld. Als back-up bestaan voor sommige hiervan weefselkweekinzettingen. De risico's hieraan verbonden zijn bekend. Cryopreservering zou hier een grotere zekerheid bieden tot behoud van deze genetische diversiteit.

#### **Materiaal en methoden**

**Uitgangsmateriaal:** Van de hyacintencultivars Carnegie en Pink Pearl was weefselkweekmateriaal aanwezig. Voor hyacint werden scheutmeristemen gebruikt die ontstaan waren op: 1. overlangs doorgesneden blaadjes, en 2. dwarsgesneden blaadjes.

**Weefselkweek:** Voor meristeeminductie gebruikten we het medium: MS mineralen, sacharose 3 %, vitaminen - thiamine 0,4 mg/l en m-inositol 100 mg/l, IBA 1,48 µM, BA 4,44 µM (komt overeen met resp. 0,3 en 1 mg/l), 0,6 % agar, pH 6,0.

Scheutjes werden overlangs doorgesneden. Vooral het onderste deel van 1 cm werd gebruikt als het blad langer dan 1 cm was. Deze werden op hyacint-vermeerderingsmedium gelegd. Afhankelijk van de leeftijd van het uitgangsmateriaal ontstonden na 3 tot 6 weken meristemen. Deze meristemen werden per stuk afgesneden of soms 2 of 3 bijeen, als ze dicht opeen zaten. Zij werden vervolgens op dezelfde manier behandeld als leliemeristemen; koude gewinning, loading, PVS2 behandeling, etc. Gevarieerd werd in de PVS behandelingstijd. Vervolgens werd om de groei van de meristemen na de cryopreservering te stimuleren in de opkweektemperaturen gevarieerd.

Een tweede bron voor meristemen waren overlangs gesneden scheutjes. Dit resulteerde in bladschijfjes (plakjes) van ca. 1 mm doorsnede die rondom meristemen vormde. Na ca. 5 weken hadden de plakjes die gebruikt werden ca. 3 tot 10 meristemen of meristeemaanzetten. De grootte varieerde van 0,1 tot 0,5 mm. Deze stukjes werden in hun geheel voor cryopreservering gebruikt (vergelijk schubplakjes bij lelie) op dezelfde wijze als de gesneden meristemen. In sommige gevallen werden ze ook losgesneden als bij de overlangs gesneden blaadjes.

#### **Resultaten en discussie**

De vorm van de hyacintscheut meristemen is niet erg uniform vergeleken met lelie. Hoewel bij lelie het ontstaan in de tijd ook niet gelijk was konden daar bij afsnijden grote aantallen meristemen geselecteerd worden die min of meer hetzelfde waren. Bij hyacint was dit niet het geval. De meristemen waren onderling vaak verbonden en maakten min of meer deel uit van een gemeenschappelijke meristematische zone. De basisdoorsnede van de meristemen was variabel van enkele tienden van mm's tot 3 mm; bij lelie is de basis meestal wel gelijk van grootte. Dit maakte het moeilijk om gelijkwaardige vergelijkingsexperimenten te doen.

Voor beide typen uitgangsmateriaal werden zonder dat verdere behandelingen zijn uitgevoerd andere overlevingsresultaten gevonden dan bij lelie. De laatste had bijna altijd 100 % overleving; de overleving van hyacint meristemen of schijfjes varieerde sterk. De overleving was dus al variabel zonder dat controlebehandelingen zijn uitgevoerd. Met controlebehandelingen was deze afhankelijk van de PVS2

behandelingstijd, de kweektemperatuur na de controlebehandeling. Ook cultivarinvoer was aanwezig (Tabel 4). In het vervolg worden alleen de schijfjes verder besproken, omdat de resultaten daarmee beter waren. Voor de 'losse' meristemen werd slechts in incidentele gevallen overleving na cryopreservering gevonden.

**Tabel 4**

**Overleving en doorgroei tot plantjes van hyacintbladschijfjes met meristemen na controlebehandelingen. De percentages zijn afkomstig van verschillende experimenten met minimaal 20 plakjes.**

| Cultivar   | PVS2<br>behandelingstijd | opkweek bij     | overleving %<br>in aantal experimenten |
|------------|--------------------------|-----------------|----------------------------------------|
| Pink Pearl | 30 min                   | 20°C            | 100 - 100                              |
|            |                          | 2 wk 20°C > 5°C | 30 - 80 - 90                           |
|            | 60 min                   | 20°C            | 30                                     |
|            |                          | 2 wk 20°C > 5°C | 30 - 50 - 59                           |
| Carnegie   | 10 min                   | 2 wk 20°C > 5°C | 100                                    |
|            | 30 min                   | 20°C            | 50 - 100                               |
|            |                          | 2 wk 20°C > 5°C | 20 - 55 - 62 - 80 - 90                 |
|            | 60 min                   | 20°C            | 30 - 70                                |
|            |                          | 2 wk 20°C > 5°C | 20 - 30 - 50 - 50                      |

De overlevingsresultaten waren zeer variabel, waarvoor de verschillen in meristeemeigenschappen waarschijnlijk grotendeels verantwoordelijk waren. De hergroei van meristemen na controlebehandelingen was zeer langzaam. Vanaf week 3 op zijn vroegst, maar zelfs nog na 8 weken kon dit starten. Een complicatie was dat de meristemen, dus ook de dode, hun witte kleur meestal behielden. Dit belemmerde een snelle beslissing, of de meristemen de behandeling ja dan nee overleefd hadden. Bij andere gewassen treedt bij afsterven vaak binnen enkele dagen en bruinkleuring op door polyfenolvorming.

Er was een volgende complicatie. Vaak leek de overleving in de eerste 10 weken redelijk, maar na meer dan 12 weken stopte de groei en stierven veel meristemen voor dat ze uitgroeiden tot scheutjes. Dit bleek duidelijk beïnvloed te worden door de lengte van de PVS2 behandeling. Een korte PVS2 behandeling had geen invloed; bij langere perioden was het beeld zeer wisselend, maar resulteerde een 60 minutenbehandeling gemiddeld in een lagere overleving dan een 30 minutenbehandeling. Dit maakte de juiste keuze voor de lengte bij de eigenlijke cryopreservering moeilijk. Een te korte inwerking van PVS2 zou er toe leiden dat de meristemen niet voldoende beschermd zijn, een te lange tijd zal al afsterven ten gevolge hebben door de PVS2 behandeling op zich.

Het in de tabel aangegeven regime van 2 wk 20°C > 5°C betekende dat na 10 weken 5°C de explantaten weer naar 20°C werden gebracht voor verdere groei. Hoewel dit bij controle-experimenten geen positief effect had ten opzichte van doorgroei bij 20°C, bleek in latere experimenten dat na cryopreservering de overleving zo vaak beter was. Dit was de aanleiding om deze twee doorgroeiregimes ook te testen.

Wij hebben voor de cryopreserveringsprocedure beide cultivars gebruikt. Er werden drie tijden van PVS2-behandeling getest en vaak beide doorgroeiregimes (Tabel 5). Tien minuten PVS2 behandeling was duidelijk niet genoeg voor overleving. Voor Pink Pearl bleek 30 minuten het beste resultaat te geven; bij Carnegie was dit 60 minuten, hoewel de overleving op zich voor deze cultivar hier veel lager was. Hierbij moet niet vergeten worden dat er nog geen eenduidig, goed protocol is. De grote variabiliteit in de resultaten toonde dit duidelijk. Een verklaring was ook hier de heterogeniteit van het uitgangsmateriaal, die hierboven reeds genoemd werd.

**Tabel 5**

**Maximum gevonden overleving (<12 weken) en doorgroei tot plantjes (>12 weken) van hyacintbladschijfjes met meristemen na cryopreservering. De percentages zijn afkomstig uit verschillende experimenten met 15 plakjes of meer.**

| <b>Cultivar</b> | <b>PVS2<br/>behandelingstijd</b> | <b>opkweek bij</b> | <b>max. overleving %<br/>tot 12 weken</b> | <b>overleving %<br/>na 12 weken</b> |
|-----------------|----------------------------------|--------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|
| Pink Pearl      | 10 min                           | 2 wk 20 °C > 5 °C  | ? *)                                      | 0                                   |
|                 | 30 min                           | 20 °C              | 50 + ?                                    | 20                                  |
|                 |                                  | 2 wk 20 °C > 5 °C  | 16 + ?                                    | 47                                  |
|                 | 60 min                           | 20 °C              | 21 + ?                                    | 15                                  |
|                 |                                  | 2 wk 20 °C > 5 °C  | 22 + ?                                    | 9                                   |
|                 | 10 min                           | 2 wk 20 °C > 5 °C  | 19 + ?                                    | 0                                   |
| Carnegie        | 30 min                           | 20 °C              | ?                                         | 6                                   |
|                 | 60 min                           | 2 wk 20 °C > 5 °C  | 30 + ?                                    | 0                                   |
|                 |                                  | 20 °C              | 10                                        | 5                                   |
|                 |                                  | 2 wk 20 °C > 5 °C  | 30 + ?                                    | 10                                  |

\*) : ? betekent dat overleving van (rest van) de plakjes (nog) niet vast te stellen was

### **Conclusie**

Voor hyacint is nog geen algemeen toepasbaar cryopreserveringsprotocol beschikbaar. Wel blijkt uit de hoogst behaalde overlevingspercentages dat de mogelijkheden hiervoor zeker aanwezig zijn. Een betere mogelijkheid van selectie van het goede startmateriaal is waarschijnlijk een belangrijke voorwaarde.

### 3.4.3 Zantedeschia

Lange tijd aanhouden in weefselweek lijkt bij Zantedeschia het risico op afwijkingen te verhogen. Voor Zantedeschia zou cryopreservering aantrekkelijk kunnen zijn om van nieuwe cultivars materiaal in te vriezen, op het moment dat de weefselweek begonnen wordt. Uit deze stock zou dan geregeld een nieuwe weefselweekcyclus opgezet kunnen worden.

#### **Materiaal en methoden**

Uit een ander project was weefselweekmateriaal van twee cultivars van Zantedeschia aanwezig. Met deze beide cultivars, Schwarzwaller en Florex Gold, zijn enkele experimenten uitgevoerd.

Uit de weefselweekplantjes werden scheuttopjes geïsoleerd van ca. 2 mm met nog enkele blaadjes op een voetje bestaande uit 'knol'-bodem. Een protocol gebaseerd op het lelieprotocol werd gebruikt. Gevarieerd werden zowel voor de controle behandeling als in de cryopreserveringsexperimenten de voorkweekfase van de meristemen (aantal dagen en temperatuur) en de PVS2 behandelingstijd.

#### **Resultaten en discussie**

Het prepareren van de meristemen uit de weefselweekplantjes bleek niet eenvoudig. Bij het 'afpellen' van de hoofdscheutknop bleef een zacht meristeem over met enkele, slecht zichtbare bladaanleggen. Dit meristeem is erg gevoelig voor beschadigingen bij het prepareren.

Als voorbereidend experiment werd daarom allereerst de overleving en doorgroei getest van het uitgeprepareerde meristeem bij 20°C. Doorgroei van de meristemen zonder verdere behandelingen was nagenoeg 100 %.

Ook werd gekeken of een voorkweek bij 5°C overleefd werd of dat deze voorkweek bij 20°C zou moeten plaats vinden, als voorbereiding op de cryopreservering. Bij dit laatste experiment zijn de resultaten te fragmentarisch om uitsluitsel te geven. De koudebehandeling werd overleefd.

Hoewel de ideale voorkweek nog niet bekend was, werden toch enkele cryo-experimenten uitgevoerd waarbij voor PVS2 tijden 10, 20 en 30 minuten genomen werd. Langere tijden lijken gezien het zachte waarschijnlijk zeer 'open' weefsel niet nodig. De resultaten waren teleurstellend. Er werd nauwelijks een overlevend meristeem gevonden: van ca. 150 slechts één.

Van Zantedeschia was ook callusmateriaal beschikbaar. Met de leliemethode werden callusstukjes ingevroren. Hierbij werd slechts in 3 van de 40 stukjes overleving gevonden. Waarschijnlijk was in dit geval de gebruikte PVS2 behandelingstijd met 80 minuten veel te lang. De resultaten van lelie en iris lieten zien dat PVS2 behandelingstijden van rond 15 minuten voldoende geweest zouden kunnen zijn, en meer succes hadden kunnen opleveren.

#### **Conclusie**

Een cryopreserveringsprotocol voor Zantedeschia-meristemen is nog niet binnen direct bereik. Hiervoor is nog onderzoek nodig zowel ten behoeve van de optimale voorkweek als de behandelingstijden met cryoprotectantia.

#### 3.4.4 Tulp

Van tulp worden grote collecties kruisingsouders en cultivars aangehouden op het veld. Evenals voor lelie zou cryopreservering hiervan een goed alternatief voor zekere (back-up) bewaring zijn. Hoewel weefselkweek nog een probleem is voor een groot deel van het tulpsortiment, is er toch een klein experiment gedaan.

Van tulp werd meristeeemateriaal en regeneratief callus, geïnduceerd op bloemstengelschijfjes (beschikbaar uit een ander project), gebruikt. Van de twee cultivars Gander en Apeldoorn werden 10 meristemen en 10 stukjes regeneratief callus gecryopreserveerd. Na cryopreservering volgens het lelieprotocol waren de meristemen bruin gekleurd en groeiden niet verder. Na 4 weken was bij het callus bij Gander één stukje wat groei vertoonde. Maar liefst meer dan 15 weken later was bij Apeldoorn enige callusgroei zichtbaar op alle stukjes; bij Gander was er meer callusgroei, dit maal ook op de rest van de stukjes. Het experiment is niet verder voortgezet.

Callus lijkt dus goed invriesbaar. Voor meristemen is nog onderzoek nodig om voor een succesvol protocol.

#### 3.4.5 Iris

In de algemene inleiding werd de mogelijkheid genoemd om cryopreservering te gebruiken voor het bewaren van calluslijnen die geschikt zijn voor genetische modificatie. Als calluslijnen aangehouden worden over langere tijd is het risico groot dat (epi-)genetische veranderingen optreden waardoor het callus zijn regeneratievermogen verliest of andere genetische eigenschappen van de plant veranderen.

Van iris was regeneratief callusmateriaal beschikbaar uit een project voor iristransformatie. Callusstukjes van ca. 3 mm doorsnede werden gebruikt. Dit callus werd ingevroren via het lelieprotocol waarbij de PVS2 incubatietijd verkort werd tot 20 minuten. Na ontdooien werden de stukjes op een iris-callusmedium verder gekweekt. Overleving was 100 % per callusstukje, hoewel soms wel delen van het callusstukje slechter doorgroeiden. Het regeneratievermogen was niet afgenomen. Dit experiment liet, evenals bij tulp en lelie, dat callusmateriaal zeer goed gecryopreserveerd kan worden met het vitrificatieprotocol.

#### 3.4.6 Wortelpuntjes van andere gewassen

Wortelpuntjes vormen ideaal materiaal voor cryopreservering, omdat zij bestaan als 'open' meristemen en daardoor gemakkelijk te cryopreserveren zouden moeten zijn. In de paragraaf over cryopreservering van ander leliemateriaal werd hier reeds op gewezen. Aan het probleem van regeneratie na de bewaring werd daar ook al aandacht besteed.

In een kort, inleidend experiment werden van een aantal gewassen wortelpuntjes gesneden en ingevroren zoals bij lelie. Getest werden wortelpuntjes van weefselkweekwortels van roos, Cymbidium, gerbera en appel.

De resultaten waren erg wisselend, maar over het geheel niet goed. Voor roos was het wortelmateriaal erg zwak en groeide ook zonder enige behandeling niet door en stierf. Van Cymbidium zijn vrij dikke wortelpunten getest die zonder behandeling langzaam doorgroeiden; de voorbehandeling bij 20°C en behandeling gedurende 10 min met PVS2 werd goed overleefd. Cryopreservering gelukte slechts bij 2 van de 30 wortelpuntjes. Gerberaplantjes maakten op hormoonvrije media mooie, goed groeiende wortels. Geïsoleerde wortelpuntjes groeiden goed door, maar na 20 minuten PVS2 behandeling was de overleving slechts 20 %. Cryopreservering werd niet overleefd. Voor appel gold hetzelfde. Ten tijde van deze experimenten was de elders beschreven methyleenblauw testmethode voor de minimaal nodige PVS2 behandelingstijd nog niet bekend. Juist voor dit onbekende materiaal zou het raadzaam zijn om eerst de methyleenblauw test uit te voeren. Voor al deze gewassen geldt dat er geen regeneratie-experimenten zijn gedaan van uit wortelpuntjes.

## 3.5 Economische aspecten van cryopreservering

Als er voor cryopreservering als bewaarmethode gekozen wordt, zal een belangrijke overweging naast de grote zekerheid de kostenfactor zijn. De vraag is of er een evenwicht is met de eventuele winst van zekerheid en verlies van direct gebruik van het materiaal. Hiervoor is al bij de projectaanvraag en globale kostenanalyse gemaakt (zie bijlage1). Voor een definitieve afweging is een diepgravende kostenberekening nodig.

In het kader van het onderzoek zijn de kosten van cryopreservering van lelie berekend. Remco Schreuder en Martijn Homan van PPO Bollen (expertisegroep bedrijfskunde) hebben de eigenlijke berekeningen gemaakt. Gegevens hiervoor zijn grotendeels ontleend aan de ervaringen uit dit onderzoek, en aan gegevens (in dit geval de bewaarprijs voor een leliecultivar) verstrekt door een weefselkweekbedrijf.

Dit onderzoek is ook al eerder als projectverslag gepubliceerd door beide genoemde auteurs; dit is bijgevoegd als bijlage 2.

Eigen gegevens die ook in volgende subparagrafen nog genoemd worden zijn tijden nodig voor verschillende handelingen tijdens weefselkweek en cryopreservering. Ook de beslissingen over hoeveelheden meristemen per buisje, aantal buisjes per cultivar en hoe vaak en welk deel van de collectie ontdooien zijn genomen op basis van eigen ervaring. Verder zijn prijzen van apparatuur gebaseerd op opgaven van bedrijven anno 2002.

### 3.5.1 Extra investeringen

Ten opzichte van weefselkweek vraagt cryopreservering om een aantal extra investeringen (zie kader). Deze zijn sterk afhankelijk van de hoeveelheid te bewaren materiaal. Om te kijken of en zo ja wanneer cryopreservering ook economische voordelen heeft is een vergelijking gemaakt met bewaring in weefselkweek voor lelie. Hierbij is uitgegaan van kleinschalige opslag (max. 126 soorten/cultivars) tot grootschalige opslag (max. 2.400). De kosten van weefselkweekbewaring zitten vooral in arbeid en zijn geschat op ca. € 60 per cultivar per jaar. Alternatief voor het zelf bewaren is centrale opslag. De schaalvoordelen bieden een duidelijke kostenverlaging. De, deels psychologische, nadelen van centrale opslag zijn het uit handen geven van waardevol bedrijfsmateriaal en het niet direct kunnen beschikken over dit materiaal voor vermeerdering.

### 3.5.2 Modelberekening

Bij de berekening voor de kosten van het bewaren door middel van cryopreservering is uitgegaan van een collectie lilies. Omdat dit via een modelberekening is gedaan, kan dit rekenmodel ook toegepast worden voor de kosten van cryopreservering van andere gewassen. De verschillende parameters kunnen dan gewijzigd worden. Voor lelie is dit vergeleken met de kosten voor bewaring in weefselkweek bij temperaturen boven 0°C. In onze kostenanalyse is er ook vanuit gegaan dat al een eenvoudige weefselkweekfaciliteit ter beschikking staat.

### 3.5.3 Investerings in apparatuur

Welke factoren zijn van belang en wat zijn hun kosten? Allereerst kunnen de kosten onderverdeeld worden in een aantal groepen. Allereerst de investeringen in apparatuur met afschrijving over een aantal jaren, Om het weefselkweekmateriaal te kunnen opslaan zijn diverse opslagbenodigdheden noodzakelijk. Zo zijn er bewaarvaten nodig voor de opslag van het materiaal, en voorraadvaten voor stikstof. De hoogte van de investering in deze apparatuur hangt af van het te bewaren aantal cultivars. Voordeel van de kleine bewaarvaten tegenover grotere vaten is de geringere verdamping van stikstof. Hierdoor worden er minder kosten gemaakt t.a.v. de hoeveelheid stikstof en is een voorraadvat met stikstof niet noodzakelijk. Als gevolg van de grotere verdamping van stikstof bij de grotere bewaarvaten is het interessant om een geautomatiseerd vulsysteem te gebruiken. Hierdoor is vrijwel geen arbeid nodig voor het bijvullen van de bewaarvaten.

### 3.5.4 Arbo

Vanuit de ARBO wetgeving is het verplicht om voor de opslag en toepassing van stikstof een bewakingsysteem te hanteren. Dit systeem meet continu het zuurstofgehalte en zal bij het bereiken van bepaalde, minimum- zuurstofwaarden een alarm in werking laten treden. Daarnaast is een meet- en regelsysteem handig om het meten, regelen en bewaken van vloeibare stikstofniveaus in de bewaarvaten te automatiseren. Het omgaan met stikstof vraagt om het gebruik van speciale cryobeschermkleding. Verder zijn er jaarlijkse kosten wat betreft stikstofinkoop en –bezorging en onderhoudskosten van de apparatuur. Enkele kleine posten worden hier niet genoemd maar zijn wel in het rekenmodel meegenomen.

### 3.5.5 Arbeidskosten

De grootste kostenpost is zoals bij alle weefselweektechnieken arbeid. Daarom is het belangrijk om hiervan een duidelijk beeld te krijgen. Wij hebben voor de berekening een hoog uurloon gebruikt van 110 euro. Het aantal meristemen en het aantal per eenheid van bewaring (cryobuisje) is ook belangrijk, omdat het aantal ook de tijdsduur van het werk bepaalt.

Daarnaast is uitgegaan van het gebruik van leliebollen van het veld, m.a.w. de hele weefselweek moet gestart worden om meristemen in vitro te verkrijgen. Het zou een grote besparing opleveren van enkele 10-tallen euro's per cultivar/soort bij de start, als het materiaal voor de cryopreservering al in weefselweek aanwezig is. Uitgesmeerd over een aantal jaren zou daarmee de bewaarprijs enkele euro's per jaar lager worden.

### 3.5.6 Mogelijkheden zelf cryopreserveren

Bij lelie is gekeken bij welke aantallen cryopreservering minder kost dan weefselweek. Voor een vertaling naar andere gewassen moet worden bedacht dat de meristemen bij lelies gemakkelijk zijn te snijden en dat er voor lelies een goed weefselweekprotocol bestaat. Om een goede kostenvergelijking te maken is een rekenmodel gemaakt uitgaande van bestaande kosten en tarieven voor weefselweeklaboratoria. Deze kosten zijn ca. € 60 per jaar.

Bij minder dan 80 cultivars bewaren zijn de kosten per opgeslagen cultivar voor cryopreservering groter dan bewaren in weefselweek. Vanaf 80 cultivars is cryopreservering goedkoper. De kosten per opgeslagen cultivar zijn afhankelijk van het type opslag en het totaal opgeslagen aantal.

**Tabel 6**

**Vergelijking van kosten voor cryopreservering van lelie bij verschillende aantallen.**

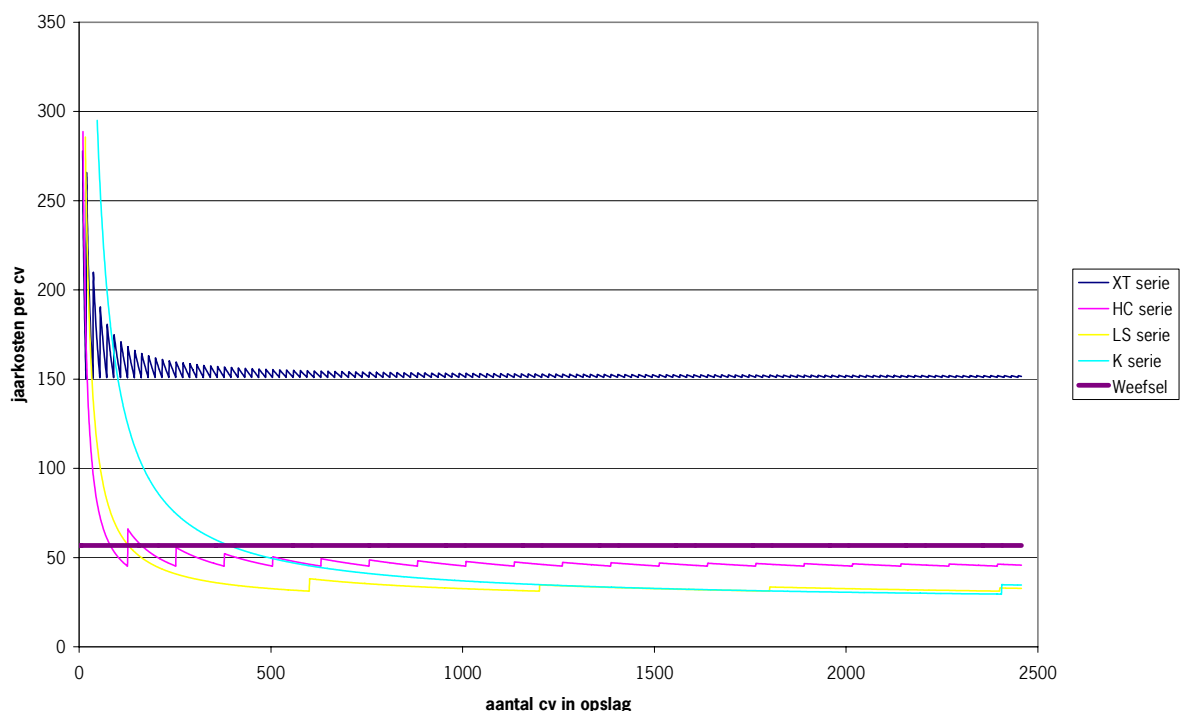
| Aantal soorten in opslag | jaarkosten in € per soort | apparaat -type*) | investering in € | onderhoud in € |
|--------------------------|---------------------------|------------------|------------------|----------------|
| 100                      | 50,70                     | XT 180           | 8.100            | 1.300          |
| 250                      | 40,90                     | HC 1260          | 21.400           | 1.200          |
| 600                      | 31,20                     | LS 6000          | 21.400           | 1.200          |
| 2.400**)                 | 29,50                     | K 24050          | 37.200           | 8.100          |

\*) getal in type nummer geeft aantal buisjes aan waarvoor apparaat maximaal geschikt is

\*\*) hier wordt uitgegaan van een apparaat voor 2400; bij aantallen groter dan 600 zou ook de voorkeur gegeven kunnen worden aan 2 of meer apparaten geschikt voor 600.

De jaarkosten voor bewaring kunnen bij grote aantallen dalen tot bijna de helft van de jaarkosten van weefselweek wanneer gekozen wordt voor cryopreservering. De investeringen bedragen in dit geval € 37.000 met daarbij jaarlijkse kosten voor onderhoud € 8.100,-.





**Figuur 23**

**Kosten van bewaring van lelie via cryopreservering ten opzichte van weefselweekbewaring, bij oplopende aantallen eenheden. Vergeleken wordt met verschillende apparaten met oplopende capaciteit: XT 180, HC 1260, LS 6000 en K 24050**

In figuur 23 is af te lezen hoe de kosten bij gebruik van de verschillende apparaten afnemen bij toenemende aantallen ingevroren cultivars. Duidelijk wordt dat de LS 6000 of apparatuur met een zelfde soort capaciteit van 6000 buisjes meestal het goedkoopst is. Verder is het meer flexibel voor hogere aantallen enkele kleinere te gebruiken dan één grote, omdat bij kleiner worden van aantallen dan één apparaat tijdelijk niet operatief hoeft te zijn.

De frequentie van uithalen beïnvloedt de kosten voor cryopreservering sterk. De berekeningen zijn uitgevoerd bij de aanname dat het materiaal eens in de 5 jaar wordt uitgehaald en opgekweekt. Als dit 4 jaar wordt dan stijgen de jaarkosten bij 250 cultivars tot € 47,-, maar nog steeds lager dan weefselweekbewaring. Bij eens in de 6 jaar uit nemen zijn de jaarkosten € 37,-.

### Bewaarprogrammatuur

Voor het beheer van grote aantallen te bewaren eenheden bestaan er computerprogramma's die hun nut al bewezen hebben in de cryo-opslag van dierlijke en menselijke weefsels (bijvoorbeeld stamcellen, zaadbanken, weefseltransplantaten).

### Cryopreservering van andere gewassen

De arbeidskosten voor het prepareren van meristemen voor lelie liggen vrij laag, terwijl het invriesprotocol van bepaalde boomsoorten eenvoudiger is dan bij lelie. Zo heeft elk gewas zijn specifieke eigenschappen die in het model betrokken kunnen worden. Hoewel voor veel gewassen al cryopreserveringsprotocollen bestaan, kan het nodig zijn om voor bepaalde gewassen eerst een nieuw of verbeterd protocol te ontwikkelen, wat natuurlijk extra kosten meebrengt. PRI Wageningen heeft de expertise om een nieuw protocol te ontwikkelen.

et PPO rekenmodel (verkrijgbaar bij Remco Schreuder, PPO Bollen en Bomen te Lisse) geeft de mogelijkheid snel de kosten van verschillende bewaarmethoden met elkaar te vergelijken.



## 4 Conclusie

De bewaring van waardevol genetisch materiaal ('genenbank') in vloeibare stikstof kan een goed alternatief voor veld- of weefselkweekbewaring zijn. Voor lelie wordt dit duidelijk aangetoond in dit rapport. Het is veiliger en goedkoper. Met betrekking tot de 'actieve' collectie kan cryopreservering als zekerheidbiedende aanvulling ('back-up') dienen voor veredelaars.

In de literatuur wordt voor een groot aantal gewassen cryopreservering beschreven. Vrijwel altijd ontbreekt hier een financiële paragraaf die kostenvergelijkingen maakt met weefselkweek- en/of in-vivo bewaring. Voor andere (bol-)gewassen moet onderzoek dus nog aantonen dat cryopreservering mogelijk is, en -als het kan- of het financieel aantrekkelijk is. Voor zeer zeldzaam materiaal zal de zekerheid die een 'back-up' collectie in vloeibare stikstof kan bieden voldoende reden zijn om cryopreservering toe te passen.

Cryopreservering is dus een zeer waardevolle techniek met de mogelijkheid voor een groot aantal toepassingen bij de bewaring van waardevol genenmateriaal. In de toekomst lijken zich de mogelijkheden hiervoor alleen nog maar uit te breiden. Een belangrijk initiatief zou een centrale 'bewaarplaats' kunnen zijn zoals die al bestaan voor cryo-bewaring bij andere toepassingen (donortransplantaten, ei- en zaadcellen) dan in de plantwetenschappen. Centrale faciliteiten voor invriezen en/of bewaring maken deze bewaarmethode goedkoper en dus haalbaar voor meer belanghebbenden.



## 5 Literatuur

### Algemeen

- Benson. E.E., 1999, Cryopreservation. In: Plant Conservation biotechnology, ed. Benson. E.E., Taylor and Francis, Londen VK
- Benson, E. E., *et al.*, 1998, Advances in plant cryopreservation technology: current applications in crop plant biotechnology. *AgBiotech*, 10: 5, p 133N-141N
- Engelmann, F., 1991a, In vitro conservation of horticultural species, *Acta Horticult.*, 298, 327-334.
- Engelmann, F., 1991b, In vitro conservation of tropical plant germplasm - a review. *Euphytica*, 57, 227-243.
- Engelmann, F. 1997, Present development and use of *in vitro* culture techniques for the conservation of plant genetic resources, *Acta Horticult.*, 447, 471-475.
- Engelmann, F., 1998, Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Cryopreservation of tropical germplasm - Current research progress and application, F. Engelmann and H. Takagi (eds.), Proceedings of the JIRCAS/IPGRI joint international workshop, Tsukuba, Japan
- Grout, B. W. W., 1990, In vitro conservation of germplasm. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations, Development in crop science 19, S. S. Bhojwani (ed.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Grout, B. W. W., 1995, Introduction to the in Vitro Preservation of Plant Cells, Tissues and Organs. In: Genetic Preservation of Plant Cells in Vitro, B. W. W. Grout (ed.), Springer-Verlag, Berlin
- Kartha, K. K., 1985, Meristem Culture and Germplasm Preservation. In: Cryopreservation of Plant Cells and Organs, K.K. Kartha (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kartha, K. K., and Engelmann, F., 1994, Cryopreservation and Germplasm Storage. In: Plant Cell and Tissue Culture, I. K. Vasil and T. A. Thorpe (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Mandal, B. B., 1997, Application of *in vitro* / cryopreservation techniques in conservation of horticultural crop germplasm, *Acta Horticult.* 447, 483-489.
- Panis, B. *et al.*, 2001, Cryopreservation of plant germplasm. *Acta Horticult.* 560, 79-86
- Reed B. M., *et al.*, 2001, Validation of cryopreservation protocols for plant germplasm conservation: a pilot study using *Ribes* L.. *Biodiversity and Conservation* 10, 939-949.
- Sakai, A., 1997, Potentially Valuable Cryogenic Procedures for Cryopreservation of Cultured Plant Meristems. In: Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro. Vol. 1: General Aspects, M. K. Razdan and E. C. Cocking (eds.), Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA
- Sakai, A., 1998, Development of cryopreservation techniques. In: Cryopreservation of tropical germplasm - Current research progress and application, F. Engelmann and H. Takagi (eds.), Proceedings of the JIRCAS/IPGRI joint international workshop, Tsukuba, Japan

### Speciaal

- Aronen T. S., *et al.*, 1999, Genetic fidelity of cryopreserved embryogenic cultures of open-pollinated *Abies cephalonica*. *Plant Science*, 142, 163-172.
- Benson E. E. en Hamill, J. D., 1991, Cryopreservation and post freeze molecular and biosynthetic stability in transformed roots of *Beta vulgaris* and *Nicotiana rustica*. *Plant Cell Tiss Org. Cult.* 24, 163-172
- Bomal C. en Tremblay, F. M., 2000, Dried Cryopreserved Somatic Embryos of Two Picea Species Provide Suitable Material for Direct Plantlet Regeneration and Germplasm Storage. *Ann Bot.* 86, 177-183.
- Bouman H. en De Klerk G.J. 1990, Cryopreservation of lily meristems. *Acta Horticult.* 266, 331-337
- Bouman H., Morris B. en Tiekstra A. 2000 Cryopreservation of lily meristems. First meeting COST 843, WG 2 Advanced propagation techniques. Tampere, Finland.

- Bouman H., Tiekstra A., Petutschnig E., Homan M. en Schreuder R., 2003, Cryopreservation of *Lilium* species and cultivars. Act.Horticult. 612,147-154
- Chang Y. en Reed, B. M., 1999, Extended cold acclimation and recovery medium alteration improve regrowth of *Rubus* shoot tips following cryopreservation. Cryo-Letters 20, 371-376
- Hirai D., *et al.*, 1998, Cryopreservation of in vitro-grown meristems of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) by encapsulation-vitrification. Euphytica, 101, 109-115.
- Hirai D., and Sakai A., 1999, Cryopreservation of in vitro-grown axillary shoot-tip meristems of mint (*Mentha spicata* L.) by encapsulation vitrification. Plant Cell Rep. 19, 150-155
- Jung D. W. *et al.*, 2001, Cryopreservation of *Hyoscyamus niger* adventitious roots by vitrification. J. Plant Physiol. 158, 801-805.
- Kohmura H. *et al.* 1994, Cryopreservation of apical meristems of Japanese shallot (*Allium wakegi* A.) by vitrification and subsequent high plant regeneration. Cryo-Letters 15, 289-298.
- Langens-Gerrits M.M. en De Klerk G.J. , 1998, Micropropagation of flower bulbs: lily and narcissus. In: Methods in molecular biology, vol 111: Plant cell culture (Hall R.D. ed) pp.141-147. Humana Press, Totowa.
- Makowska, Z., *et al.*, 1999, Cryopreservation of apices isolated from garlich (*Allium sativum* L.) bulbils and cloves. Cryo Letters, 20, 175-182.
- Martinez D., *et al.*, 1999, Cryopreservation of *in vitro* grown shoot-tips of *Olea europaea* L. var Arbequina. Cryo-Letters, 20, 29-36
- Martinez, D., and Angeles-Revilla, M., 1998, Cold acclimation and thermal transitions in the cryopreservation of hop shoot tips. Cryo-Letters, 19, 333-342
- Matsumoto T., Sakai A. en Yamada, K. ,1995, Cryopreservation of in-vitro grown apical meristems of lily by vitrification. Plant Cell Tiss.Org.Cult. 41, 237-241
- Mix-Wagner, G., *et al.*, 2000, Survival and recovery of asparagus shoot tips after cryopreservation using the "droplet method". New Zealand J. Crop Horticult. Sci.. 28, 283-287.
- Na, H., and Kondo, K., 1996, Cryopreservation of tissue-cultured shoot primordia from shoot apices of cultured protocorms in *Vanda pumila* following ABA preculture and desiccation. Plant Science, 118, 195-201.
- Ogawa, R., *et al.*, 1997, Cryopreservation of shoot primordia cultures of melon using a slow prefreezing procedure. Plant CellTiss.Org. Cult. 49, 171-177.
- Panis, B., *et al.*, 1996, Cryopreservation of banana (*Musa* spp.) meristem cultures after preculture on sucrose. Plant Science, 121, 95-106.
- Pennycooke, J. C., and Towill, L. E., 2000, Cryopreservation of shoot tips from in vitro plants of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] by vitrification. Plant Cell Rep. 19, 733-737.
- Pérez-Tornero, O., *et al.*, 1999, Medium-term Storage of Apricot Shoot Tips In Vitro by Minimal Growth Method. HortScience, 43, 1277-1278.
- Sakai, A., Kobayashi S. en Oiyama I. ,1990, Cryopreservation of nucellar cells of navel orange by vitrification. Plant Cell Rep. 9:30-33
- Schäfer-Menuhr, A., *et al.*, 1996, Cryopreservation: an alternative for the long-term storage of old potato varieties. Potato Res. 39, 507-513.
- Schäfer-Menuhr, A., *et al.*, 1997, Cryopreservation of potato cultivars - design of a method for routine application in genebanks. Acta Horticult.urae 447, 477-481.
- Thinh, N. T., 1999, Cryopreservation of *in vitro*-grown shoottips of banana (*Musa* spp.) by vitrification method. Cryo-Letters, 20, 163-174.
- Towill, L. E., 1991, Cryopreservation. In: *In Vitro* Methods for Conservation of Plant Genetic Resources, Dodds J. H. (ed.), Chapman and Hall, London, UK.
- Tsukazaki, H., *et al.*, 2000, Cryopresevation of Doritaenopsis suspension culture by vitrification, Plant Cell Reports, 19, 1160-1164.
- Vandenbussche, B., 1998, Cryopreservation of *in vitro* sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips using an encapsulation-dehydration technique. Doctoraatsproefschrift Nr. 356 aan de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium.
- Vandenbussche, B. en De Proft, M. P., 1998, Cryopreservation of in vitro subar beet shoot tips using the encapsulation-dehydration technique: influence of abscisic acid and cold acclimation. Plant Cell

- Rep. 17, 791-793.
- Vandenbussche, B., *et al.*, 1999, Changes in sugar content and fatty acid composition of in vitro sugar beet shoots after cold acclimation: influence on survival after cryopreservation. *Plant Growth Reg.* 28, 157-163.
- Vandenbussche, B., *et al.*, 2000, Cryopreservation of in vitro sugar beet (*Beta vulgaris* L.) shoot tips by a vitrification technique. *Plant Cell Rep.* 19, 1064-1068.
- Wang, Q., *et al.*, 2000, Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tiss.Organ Cult.* 63, 41-46.
- Wu, Y., *et al.*, 1999, Cryopreservation of apple shoot tips: Importance of cryopreservation technique and of conditioning donor plants. *Cryo-Letters* 20, 121-130.
- Yamada, T., *et al.*, 1991, Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Science* 78, 81-87.

## Internet

Via de zoekwoorden ***cryopreservation*** en ***plant\**** met mogelijke verdere inperkingen via extra zoekwoorden, is er toegang tot een groot aantal internetpagina's met een schat aan informatie.





# Bijlage 1

## Projectbeschrijving Cryopreservering bolgewassen

Dr. H. Bouman, COWT/ LBO, Ing. A. Tiekstra, COWT/ LBO

### Samenvatting

Bij vegetatief vermeerderde gewassen kunnen cultivars en ouderlijnen niet als zaad bewaard worden en wordt cryopreservering als de ideale techniek voor bewaring gezien en bij enkele gewassen reeds toegepast. Met behulp van cryopreservering is het mogelijk om plantmateriaal voor nagenoeg onbeperkte tijd te bewaren. Deze methode is bovendien betrouwbaar en relatief goedkoop. Bij veel gewassen kan cryopreservering ook gebruikt worden om ziektevrij materiaal te bewaren. In dit project wordt voor lelie een algemeen cryopreserveringsprotocol opgesteld. Vervolgens zal deze kennis bij andere bolgewassen worden toegepast.

### Plantmateriaal

Behoud en bewaring van waardevol plantmateriaal (virusvrije planten, waardevolle cultivars, ouderlijnen, genetisch gemodificeerde planten/weefsel) is van zeer groot belang voor de teelt en veredeling. Virusvrij materiaal kan bewaard worden via doorteelt, maar over het algemeen zijn veel extra teeltmaatregelen nodig. Bewaren van waardevolle genotypen via cryopreservering is goedkoper dan via aanhouden op het veld of in weefselweek. Dat geldt met name voor planten die niet direct bloeiend beschikbaar hoeven te zijn. Daarnaast zijn er mogelijkheden om stuifmeel op deze wijze langdurig te bewaren. Hierbij loopt de kiemkracht door de invriesprocedure nauwelijks terug. Voor genetisch gemodificeerd plantmateriaal geldt dat veel verschillende lijnen in stand gehouden moeten worden. Testprocedures van genetisch gemodificeerd materiaal kosten veel tijd en het gemodificeerde materiaal bestaat vaak uit callus waarin afwijkingen kunnen optreden tijdens de instandhouding. (Langdurige) bewaring via cryopreservering is de methode om het materiaal "stabiel" te bewaren totdat getest is hoe het resultaat van de transformatie is.

### Cryopreservering

Tot enkele jaren geleden vormden technische problemen (waardoor de hergroeipercentsages laag waren) en de noodzaak van dure apparatuur een grote belemmering voor algemene toepassing van cryopreservering. De afgelopen jaren zijn echter nieuwe, veel betere cryopreserverings-technieken ontwikkeld. Zij gaan uit van nieuwe cryoprotectantia (beschermings-/voorbehandelmengsels), en nieuwe conditioneringsmethoden (uitdroging en inbedding in alginaten). De hergroei na ontdooien is met deze technieken opzienbarend verbeterd. Een groot bijkomend voordeel is dat voor deze nieuwe technieken geen gecompliceerde apparatuur meer nodig is. Voor vele gewassen (bijvoorbeeld *Rubus*, aardappel) wordt nu al, dankzij deze nieuwe methoden, het genetisch materiaal via cryopreservering bewaard.

### Korte beschrijving van de methode

Er bestaan drie methodes voor cryopreservering:

1. geprogrammeerd invriezen (deze mogelijkheid wordt hier nog wel genoemd, maar is veel duurder dan de volgende twee). Deze techniek is in eerder COWT-onderzoek met enig succes gebruikt, toen de andere twee nog niet ontwikkeld waren.
2. inkapselen/drogen, soms gecombineerd met 3.
3. vitrificatie.

Cryopreserving bestaat altijd uit de volgende stappen:

- a. opkweken meristemen
- b. voorbehandelen meristemen (bijvoorbeeld inductie koudetolerantie, vitrificatie, indrogen)
- c. invriezen en bewaring in vloeibare stikstof (-196 °C)
- d. ontdooien en weer opkweken, wanneer het materiaal nodig is.

### **Bewaring uitgangsmateriaal van bolgewassen; stand van zaken**

Bij bewaring van bolgewassen via jaarlijks planten, rooien en bewaren kunnen verliezen en zelfs totale uitval optreden door ziektes, weersomstandigheden en teeltproblemen. Bovendien is de methode arbeidsintensief. De bewaartermijn kan enigszins verlengd worden tot twee (misschien meer) jaren door de bewaaromstandigheden zeer zorgvuldig te kiezen, waarna weer een uitplanting moet volgen. Het blijft echter een relatief dure methode.

Bewaring als weefselkweekmateriaal op speciale voedingsbodem is een alternatief dat enkele nadelen opheft (er is geen ziektedruk en het houdt minder werk in). Er blijven echter risicofactoren over als onverwachte infecties die de weefselkweek overwoekeren. Daarnaast moet het weefselkweekmateriaal geregeld overgezet worden, waarbij fouten gemaakt kunnen worden, en moet de hergroei gecontroleerd worden. Alleen voor lelie is hieraan onderzoek gedaan in het Urgentieprogramma. Dit onderzoek heeft niet tot praktische toepassingen geleid.

Op het ogenblik worden interessante cultivars nog steeds via in-vivo bewaring (collectietuinen) in stand gehouden. Voor bolgewassen is vanwege de technische doorbraken op cryopreserveringsgebied onderzoek naar cryopreserving als **de** lange termijn bewaarmethode voor uitgangsmateriaal nu zeer opportuun, omdat deze methode veel goedkoper en zekerder is.

#### **Projectinhoud:**

**Het ontwikkelen van nieuwe cryopreserveringstechnieken voor bolgewassen, voor langdurige bewaring van waardevol materiaal (virusvrij materiaal, interessante cultivars, ouderlijnen, genetisch gemodificeerd materiaal)**

Cryopreserving kan de nadelen van in-vivo en in-vitro bewaring van bolmateriaal wegnemen. Een kort project op het COWT gaf tien jaar geleden reeds deze mogelijkheden aan voor lelie, het eerste bolgewas dat toen wereldwijd gecryopreserveerd werd. Meristemen van schubben werden geprogrammeerd (methode 1) ingevroren, en na ontdooien en bolgroei werd in 500 bloeiende bollen geen afwijking gevonden. Het overlevings- en doorgroeipercantage van de meristemen was ca. 25 %.

De nieuwe technieken geven de mogelijkheden voor hogere overleving direct aan: in 1995 is door een Japanse groep bij enkele commercieel minder belangrijke lelies tot 50 (soms 80 %) overleving bereikt en normale doorgroei verkregen via methode 2 en 3. Daarnaast is uitgebreide kennis (o.a. uit rustonderzoek lelie) van de fysiologie van bolmateriaal aanwezig die toegepast kan worden om het uitgangsmateriaal de beste voorbehandeling te geven.

Met de nu aanwezige kennis van weefselkweektechnieken en de ervaring met cryopreserving op het COWT en LBO is het mogelijk om in een tweejarig project voor bolgewassen (lelie, en bijvoorbeeld narcis en hyacint) cryopreserving als bewaarmethode te ontwikkelen, of op zijn minst de (on)mogelijkheden (bijvoorbeeld iris, nerine, Hippeastrum en tulp) hiervoor aan te geven. De keus voor de gewassen naast lelie zal in overleg met het bedrijfsleven gedaan worden

## De resultaatverwachting

2000-2001

### - Ontwikkeling van protocollen

1. Cryopreserveringsprotocol voor leliecultivars uit verschillende groepen. Voor een werkbare, rendabele methode lijkt een overleving- en doorgroeipercentage van 50 of meer voldoende.
2. Haalbaarheid van een cryopreserveringsprotocol voor enkele andere bolgewassen (mogelijk narcis en hyacint).
3. Aanzet van een cryopreserveringsprotocol voor andere bolgewassen (mogelijk iris, tulp, nerine en Hippeastrum).

*Wat de punten 2. en 3. betreft zullen bolgewassen ingevuld worden na overleg met adviescommissies.*

## 2002-2003 (indien project verlengd wordt na evaluatie)

### - Ontwikkeling van protocollen

1. Verder onderzoek om het lelieprotocol te verbeteren. Evaluatie van de groei en bloei van gecryopreserveerd leliemateriaal in weefselkweek en op het veld.
2. Cryopreserveringsprotocol van gewassen, gestart onder 2.
3. Verdere ontwikkeling van cryopreserveringsprotocol van gewassen gestart onder 3.

### - Overdracht kennis.

### - Handleiding hoe te werk gaan bij de ontwikkeling voor een cryopreserveringsprotocol voor andere bolgewassen.

Deze twee onderdelen zullen aan het eind van het project plaatsvinden. Controle op doorgroei en bloei-eigenschappen van het materiaal uit cryopreservering zal een aantal jaren duren.

## Inpassing in praktijk

Naast de grote voordelen van cryopreservering voor langdurige bewaring, is het belangrijkste nadeel dat de beschikbaarheid van gecryopreserveerd materiaal voor bijvoorbeeld nieuwe kruisingen niet momentaan is. Na ontdooien zal het materiaal eerst weer opgekweekt moeten worden tot een bloeibare bol. Per gewas zal de tijdsduur hiervoor verschillend zijn: voor lelie lijkt twee jaar toereikend, voor tulp is dat wel vier jaar. Andere bolgewassen liggen ook in dit bereik. Dit is een nadeel omdat kruisingsmateriaal zo later beschikbaar is dan op het veld bewaard materiaal. Veel collectiemateriaal hoeft echter niet elk jaar bloeiend op afroep beschikbaar te zijn. Een bijkomend voordeel van cryopreservering is dat het bewaarde materiaal direct steriel beschikbaar is voor weefselkweekvermeerdering, zodat met inbouw van een vermeerderingsstap er in korte tijd over meer materiaal beschikt kan worden.

Als de methode éénmaal ontwikkeld is, zijn er twee mogelijkheden om de techniek verder toe te passen: bedrijven met een weefselkweeklaboratorium bewaren zelf hun materiaal, en alle bijkomende handelingen worden in eigen huis uitgevoerd.

er wordt op een centrale plaats ingevroren en bewaard. Ook het ontdooien en opwerken in weefselkweek tot plantbare bolletjes gebeurt daar.

Uit efficiencyoverwegingen lijkt mogelijkheid 2 aantrekkelijker; mogelijkheid 1 vraagt veel hogere investeringen en opleiding van personeel. Een immaterieel voordeel van 1 is het gevoel van veiligheid dat bewaring van eigen materiaal geeft.

Kosten voor bewaring worden lager naarmate meer cultivars/nummers tegelijk worden gecryopreserveerd.

### Voor mogelijkheid 1. betekent dat:

Een bedrijf moet éénmalig één of meer bewaarvaten, aanschaffen. Kosten bedragen, afhankelijk van de grootte, tot tienduizend gulden. Zeer grote bewaarfaciliteiten (voor 10.000-en inzettingen) zijn duurder. Daarbij komen maandelijks vaste kosten voor vloeibare stikstof, voor huur van een voorraadvat voor vloeibare stikstof, en kosten van het bijvullen (incl. voorrijden) van het voorraadvat. Deze vaste kosten zullen

enkele honderden guldens per maand bedragen, afhankelijk van het aantal bewaarvaten en invriesprocedures voor nieuw materiaal.

De rest van de kosten zal hoofdzakelijk bestaan uit arbeidskosten ten behoeve van voorbereidende weefselweek, invriezen en controle van het materiaal, en indien nodig ontdooien en kweken tot plantbaar materiaal.

Voor mogelijkheid 2. betekent dat:

Voor wat betreft de vloeibare stikstofvoorzieningen kan door deling van kosten veel bespaard worden (niet alleen bij aanschaf bewaarvaten [prijs is afhankelijk van de hoeveelheid te bewaren materiaal], maar vooral bij huur van een voorraadvat voor invriesprocedures en aanschaf van vloeibare stikstof). De kostenbesparing is afhankelijk van het aantal bedrijven dat meedoet, en het aantal ingebrachte cultivars. Verder wordt voor veel ander onderzoek ook vloeibare stikstof gebruikt, zodat de kosten verder gedeeld kunnen worden, als bewaring en invriezen bij grote onderzoekinstellingen plaats vindt . Door efficiëntere inzet van personeel zullen bij de factor arbeid ook belangrijke besparingen mogelijk zijn.

Globale raming van kosten cryopreservering lelie

De kosten voor de drie bovengenoemde methodes lopen uiteen door verschillen in apparatuurgebruik en arbeidstijd. Omdat methode 1. zowel duurder als gecompliceerder is en niet meer perspectief biedt dan 2. en 3., worden voor de rekenvoorbeelden alleen de laatste twee gebruikt. Er wordt van de aanwezigheid van een normaal uitgerust weefselweeklaboratorium uitgegaan.

**Apparatuur:**

|                                                                                                                                                   |       |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| voorraadvat stikstof                                                                                                                              | 8.000 |
| bewaarvat voor ingevroren materiaal, incl. nivo-alarm, verrijdbaar, etc.                                                                          | 6.000 |
| - een vat toereikend voor enkele 1000-en buisjes; 4 buisjes per cultivar;<br>er bestaan ook grotere vaten; verschillen in verbruik stikstof, etc. |       |
| kleine stikstofvaten                                                                                                                              | 1.200 |

**Materialen:**

Weefselweekmedia, invriesbuisjes, glaswerk, diverse chemicaliën, per 10 cultivars: 100-en stikstof

**Arbeid:**

Voor methode 2 en 3

|                                                                                                        |                   |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------|
| weefselweek tót meristemen:                                                                            | per 10 cultivars: | 6 uur |
| Meristemen, en afharden e.d.<br>(meristemen van lelies is relatief eenvoudig)                          | per 10 cultivars  | 3 uur |
| Invriezen:                                                                                             |                   |       |
| methode 2: inkapselen en drogen, invriezen<br>[geen ervaring, schatting] (verspreid over enkele dagen) | per 10 cultivar   | 8 uur |
| methode 3: vitrificatie, invriezen                                                                     | per 10 cultivar   | 2 uur |

Uit bovenstaande blijkt al dat methode 3 door zijn veel lagere arbeidskosten de aantrekkelijkste is; het onderzoek zal zich daarop ook in eerste instantie concentreren.

Wanneer een cultivar weer nodig is als geniteur:  
ontdooien en opkweken tot normale weefselkweekbolletjes, per 10 cultivar 5 uur  
(sterk afhankelijk van aantal bolletjes dat nodig is)

Daarna veldopkweek, in 2 tot 3 jaar bloeiend.

De meeste kosten zijn éénmalig tot het materiaal weer nodig is voor opplanting als geniteur.  
Nadat het materiaal ingevroren is, zijn er uitsluitend bewaarkosten (vloeibare stikstof bijvullen). Geen energiekosten, en ook geen risico bij electriciteituitval!  
Hoewel de schattingen van arbeid voor de eerste ca. 10 cultivars gedaan zijn, zal het aantal uren nodig voor cryopreservering per extra cultivar veel minder dan 1/10 van deze uren zijn. De meeste handelingen (bereiden van media, vitrificerings- en inkapseloplossingen, invriezen, etc) worden efficiënter. Speciaal voor cryopreservering geldt, hoe meer, des te goedkoper.

### Rekenvoorbeelden cryopreservering

#### *Op basis van honderden cultivars:*

|                                                                                            |            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Invriezen plantmateriaal eerste 10 cultivars, methode 2 en 3 (incl. arbeid en apparatuur): | ca. 20.000 |
| Per 10 cultivars extra                                                                     | ca. 2.000  |
| Daarna per 10 cultivars steeds minder.                                                     |            |

Bewaarkosten, voor 100-en cultivars per jaar (afhankelijk van grootte vat): enkele duizenden guldens

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| Dus per jaar, eerste jaar opgeteld | 30.000 |
| Per jaar daarna                    | 3.000  |

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| Voor langere perioden:        |        |
| 10 jaar (30.000 + 10 x 3.000) | 60.000 |
| 20 jaar „ „ + 10 x 3.000      | 90.000 |

#### *Op basis van 1000 cultivars:*

|                                                |                     |
|------------------------------------------------|---------------------|
| Invriezen                                      | 70.000 tot 120.000  |
| Daarna: per jaar alleen stikstof plus controle | 5.000 tot 10.000    |
| 10 jaar                                        | 120.000 tot 220.000 |
| 20 jaar 1                                      | 70.000 tot 270.000  |

Opkweken van materiaal zal hierbij meer kosten voordat het weer als geniteur gebruikt kan worden, dan bij instandhouding op het veld (zie urenschatting boven).

Veldbewaring kost elk jaar hetzelfde bedrag, wat uit zou komen op:

#### *Voor 1000 cultivars:*

Lage schatting:

|                     |                 |
|---------------------|-----------------|
| 10 jaar à f50.000,- | = f 500.000,-   |
| 20 jaar             | = f 1.000.000,- |

Hoge schatting:

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| 10 jaar à f200.000,- | = f 2.000.000,- |
| 20 jaar              | = f 4.000.000,- |

+ hogere risico's van ziekte-uitval, verwisselingen en verloop in populatie door onbewuste selectie (als materiaal niet volledig homogeen is), wat extra kosten meebrengt en onherstelbare verliezen kan veroorzaken.



## Bijlage 2

### Projectverslag cryopreservering

R. Schreuder (PPO) en M. Homan (PPO)

#### Inleiding

Cryopreservering is het invriezen van weefselweekmateriaal in vloeibare stikstof (-196° C). Het ingevroren materiaal kan daarna voor onbeperkte tijd bewaard worden, na slechts enkele arbeidshandelingen. Deze methode kan van nut zijn als alternatief voor de opslag van collecties van vegetatief vermeerderd materiaal. Tot nu toe worden dergelijke collecties in stand gehouden via jaarlijkse opplant (bollen bijv.) of via weefselweek.

Er zijn diverse voordelen van cryopreservering boven de traditionele methode van instandhouding. Zo vormen ziekten en weersomstandigheden niet of nauwelijks een bedreiging. Bovendien is de benodigde hoeveelheid arbeid bijna eenmalig en beperkt tijdens de bewaring. Een voorwaarde is wel dat er voor het in te vriezen gewas een weefselweekmethode bestaat.

Bij cryopreservering worden namelijk meristemen ingevroren. Via weefselweek groeien deze meristemen weer tot plantje als de plant weer beschikbaar moet zijn. Dit kost afhankelijk van het gewas enige tijd; bij lelie is dit 1 tot 3 jaar. Het materiaal dat uit de bewaring komt is dus niet direct beschikbaar voor bijvoorbeeld kruisingen. Het materiaal is wel steriel en direct bruikbaar voor vermeerdering in weefselweek. Om beide systemen goed te kunnen vergelijken is naast een technische vergelijking een kostprijsberekening nodig.

#### Materiaal en methode

PPO Bloembollen ontwikkelde een protocol voor het invriezen van lelie. Dit protocol is de basis voor de economische vergelijking tussen de bewaring in stikstof enerzijds en de bewaring in weefselweek anderzijds. Berekend is vanaf welke aantallen leliecultivars en/of -soorten cryopreservering minder kost dan weefselweek. Hiervoor is een rekenmodel gemaakt.

Om een goede kostenvergelijking te maken is in het rekenmodel uitgegaan van bestaande kosten en tarieven voor weefselweeklaboratoria. Verondersteld is dat bewaren in weefselweek € 56,72 per cultivar per jaar kost.

De voor cryopreservering benodigde apparatuur en de daarbij behorende handelingen zijn in dit rekenmodel opgenomen. De belangrijkste uitgangspunten staan hieronder vermeld.

#### *Bewaarvaten stikstof en weefselweekmateriaal*

Om het weefselweekmateriaal te kunnen opslaan zijn diverse opslagbenodigdheden noodzakelijk. Zo zijn er bewaarvaten nodig voor de opslag van het materiaal en voorraadvaten voor stikstof. De hoogte van de investering in deze apparatuur hangt af van het te bewaren aantal cultivars.

#### *Verdamping en vullen*

Voordeel van de kleine bewaarvaten t.o.v. de grotere vaten is de geringere verdamping van stikstof. Hierdoor worden er minder kosten gemaakt voor stikstof en is een voorraadvat met stikstof niet noodzakelijk. Als gevolg van de grotere verdamping van stikstof bij de grotere bewaarvaten is het interessant om een geautomatiseerd vulsysteem te gebruiken. Hierdoor is vrijwel geen arbeid nodig voor het bijvullen van de bewaarvaten.

#### *Bewakingsysteem zuurstofniveau*

ARBO-wetgeving verplicht bij de opslag en toepassing van vloeibare stikstof een bewakingsysteem te hanteren. Dit systeem meet continu het zuurstofgehalte van de lucht en zal bij het bereiken van bepaalde minimum zuurstofwaarden een alarm in werking laten treden.

### Overige kosten

Naast de investeringen in de apparatuur is het verstandig om op een verantwoorde wijze om te gaan met stikstof. Hiervoor wordt de aanschaf van speciale cryobeschermkleding aangeraden.

Omdat schaalgrootte een belangrijke rol speelt in de benodigde apparatuur en de daarbij behorende kosten, is in de berekeningen uitgegaan van 4 verschillende opslagsystemen met verschillende capaciteit: 180, 1260, 6000 en 24050 ampullen. Per soort/cultivar in opslag worden 10 ampullen gebruikt. Per 10 soorten/cultivars zijn 11 arbeidsuren nodig om te komen van weefselkweek tot invriezen. De arbeidskosten hiervoor zijn berekend op € 121 per in te vriezen soort.

## Resultaten

Als eerste zijn de jaarkosten berekend voor de verschillende opslagscenario's die verschillen in schaalgrootte.

Tabel 5.2:1 Jaarkosten bij verschillende opslagcapaciteit (€ per jaar)

| Opslag capaciteit (maximaal aantal invriesbuisjes)              | 180    | 1.260 | 6.000 | 24.050 |
|-----------------------------------------------------------------|--------|-------|-------|--------|
| inhoud (liters)                                                 | 34     | 35    | 165   | 365    |
| stikstofverbruik per dag (liters)                               | 0      | 0     | 1     | 16     |
| Voorraadvat stikstof                                            | -      | -     | 804   | 804    |
| Bewaarvat ingevroren materiaal                                  | 280    | 414   | 1.240 | 2.896  |
| Bewakingssysteem zuurstofwaarden                                | 473    | 473   | 473   | 473    |
| Computerprogramma voor opslag                                   | 187    | 187   | 187   | 187    |
| Draagbare vloeibare stikstofcontainers                          | 166    | 166   | 166   | 166    |
| Cryo beschermkleding                                            | 101    | 101   | 101   | 101    |
| Invriesbuisjes per cultivar                                     | 0      | 0     | 0     | 0      |
| Jaarlijkse afschrijvingskosten en rente investeringen           | 1.208  | 1.342 | 2.971 | 4.627  |
| Stikstofkosten (€ 1,10 /liter)                                  | 40     | 108   | 337   | 6,424  |
| Voorrijkosten                                                   | 320    | 480   | 160   | 960    |
| Onderhoudskosten jaarlijks                                      | 715    | 715   | 715   | 715    |
| Afschrijvingskosten en rente                                    | 1.208  | 1.342 | 2.971 | 4.627  |
| Jaarlijkse vaste kosten bewaring                                | 2.283  | 2.645 | 4.183 | 12.726 |
| aantal cultivars (maximum)                                      | 18     | 126   | 600   | 2.405  |
| Jaarlijkse vaste bewaarkosten per cultivar bij max. # cultivars | 127,04 | 21,22 | 7,20  | 5,52   |

De jaarkosten zijn bij een systeem met maximaal 180 cultivars fors hoger dan bij een systeem met maximaal 1260 cultivars. Voor kleine partijen lijkt cryopreservering niet interessant.

Uit de jaarlijkse kosten inclusief de eenmalige arbeidskosten is het break-evenpunt te berekenen.

Uit de berekeningen blijkt dat cryopreservering duurder is dan weefselkweek als minder dan ongeveer 80 soorten worden bewaard. Vanaf 80 cultivars is cryopreservering goedkoper. De kosten per opgeslagen



cultivar zijn afhankelijk van het type opslag (omvang en de daaraan gekoppelde automatische systemen, hoe groter het vat des te meer is er geautomatiseerd) en het totaal aantal opgeslagen soorten (zie tabel).

De jaarkosten voor bewaring in vloeibare stikstof bestaan uit de afschrijving van de apparatuur, berekende rente en onderhoud en de toegerekende kosten voor arbeid bij het invriezen.

Tabel 5.2:2: Berekening van investeringen , jaarlijkse kosten en kostprijs van cryopreservering bij eens in de 5 jaar uitnemen.

| Aantal soorten in opslag<br>(10 stuks per soort) | Jaarkosten per<br>opgeslagen soort | Totale investering |          | Jaarlijkse kosten<br>onderhoud<br>(levering vloeibare<br>stikstof en onderhoud<br>apparatuur) |
|--------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                  |                                    | Apparatuur         | Arbeid   |                                                                                               |
| 100                                              | € 50,70                            | € 8.100            | € 2.400  | € 1.300                                                                                       |
| 250                                              | € 40,90                            | € 21.400           | € 6.000  | € 1.200                                                                                       |
| 600                                              | € 31,20                            | € 21.400           | € 14.500 | € 1.200                                                                                       |
| 2.400                                            | € 29,50                            | € 37.200           | € 58.000 | € 8.100                                                                                       |

## Discussie en conclusie

Bij grote aantallen kunnen de jaarkosten bij cryopreservering dalen tot bijna de helft van de jaarkosten van weefselkweek. De investeringen in een opslagsysteem bedragen dan € 37.000, in arbeid € 58.000 en de jaarlijkse kosten (uitgaven) voor onderhoud (levering vloeibare stikstof en onderhoudskosten apparatuur) € 8.100,-.

De frequentie van uithalen beïnvloedt de kosten voor cryopreservering sterk. De berekeningen zijn uitgevoerd bij de aanname dat het materiaal eens in de 5 jaar wordt uitgehaald. Als dit 4 jaar wordt dan stijgen de jaarkosten bij 250 cultivars bijv. tot € 47,-, maar ze zijn nog steeds lager dan die van de weefselkweekbewaring. Bij eens in de 6 jaar uit nemen zijn de jaarkosten € 37,-.

## Producten

Stikstofbewaring snel goedkoper.

Bloembollencultuur nr. 25, pag 6., 2002

R. Schreuder en M. Homan.

Bewaring in stikstof interessant voor boomkwekerijgewassen.

De Boomkwekerij, juni 2004

R. Schreuder en H. Bouman.