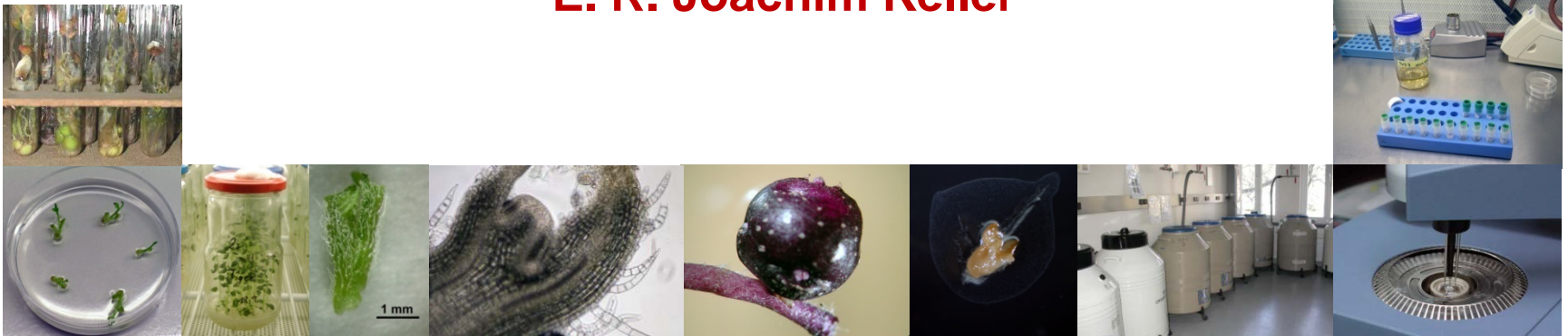


Die Geschichte der Kryokonservierung in Gatersleben

E. R. Joachim Keller



GPZ, Braunschweig, 30. 3. 2017

Was ist Kryokonservierung?

- Gr. κρύος, *kryós* „Kälte“ + Lat. *conservare* „erhalten, bewahren“**
Lagerung von lebendem Gewebe bei ultra-tiefen Temperaturen
- im flüssigen Stickstoff (-196 °C)
- in der Gasphase über flüssigem Stickstoff (-135 °C bis -196 °C)



Vorstellungen über Kryokonservierung

Google-Recherche 28. 2. 2017

Kryokonservierung | familienplanung.de ✓

www.familienplanung.de > Kinderwunsch > Behandlung ▾

Unter Kryokonservierung (vom griechischen „kryos“, Kälte) versteht man das Tiefgefrieren von Körperzellen in flüssigem Stickstoff. Der Stickstoff kühlt die Zellen ...

Kryokonservierung - DocCheck Flexikon ✓

flexikon.doccheck.com/de/Kryokonservierung ▾

★★★★★ Bewertung: 5 - 3 Abstimmungsergebnisse

Als Kryokonservierung bezeichnet man die zu Aufbewahrungszwecken erfolgende Konservierung von Zellen und organischen Geweben durch Einfrieren.

Kryokonservierung - Ablauf & Kosten| VivaNeo ✓

www.vivaneo-kinderwunsch.de/kinderwunschzentrum.../kryokonservierung.html ▾

Kryokonservierung. Wenn nach einer IVF oder ICSI viele geeignete vorbefruchtete Eizellen zur Verfügung stehen, besteht die Möglichkeit der ...

Kryokonservierung Eizellen - VIF Kinderwunschpraxis ✓

www.vif-kinderwunsch.de/kryokonservierung.html ▾

Die Kryokonservierung (Tiefgefrieren) von Eizellen in der Kinderwunschtherapie ermöglicht den Embryotransfer ohne vorherige hormonelle Stimulation und ...

Kryokonservierung - Kinderwunschzentrum ✓

www.kinderwunschzentrum.org/leistungen/kryokonservierung/ ▾

Kryokonservierung. Wenn bei einer IVF- oder ICSI-Therapie mehr befruchtete Eizellen entstehen, als für den Embryotransfer vorgesehen sind, können diese ...

However, we note with continuing frustration that inflicting massive gross, histological, and ultrastructural **disruption as a result of cryoinjury is still unavoidable (Report 1997).**

Ulrich Kutschera, Kassel
Daran gibt es nichts zu rütteln:
Lebewesen sind Sterbewesen

Reale Möglichkeiten
Spermabanken, Eizellen-Lagerung,
Organbanken, Gewebebanken, Pflanzenbanken
und große Illusionen

Cryonics



ALCOR
LIFE EXTENSION
FOUNDATION
Home About Cryonics Contact Alcor M

Cryopreservation
of
James Gallagher

CryoCare Patient #1000
by Mike Danilov



James Gallagher in 1988

Note: This exciting and informative report is from CryoCare Report Number 6, January 1996, and CryoCare Report Number 9, October 1996. This is the first online version that is complete with all figures and graphs which were made available courtesy of Mike Danilov and Charles Platt. This patient was the first man cryopreserved by CryoCare, which is no longer in business. The patient (now designated as Alcor #1000) was transferred to Alcor on January 24, 2001.

<http://chronopause.com/chronopause.com/index.php/2011/07/30/science-fiction-double-feature/>

Warum Pflanzen-Kryokonservierung?

Die Hauptmethode der Genbank-Erhaltung,
die Saatgutlagerung, kann nicht genutzt werden, wenn ...

- keine Samen oder zu wenige Samen gebildet werden, **Banane, Ananas, Sisal, Knoblauch**, viele Mutanten und Produkte der Biotechnologie, z.B. Transformanten; Pflanzenarten an Fremdstandorten mit zu wenig Samenansatz,



- die Samen nicht gelagert werden können (rekalzitrannte Samen), **Kakao, Kokosnuss, Mango, Kautschukbaum, Brotfruchtbaum**,



- die Samen-Nachkommenschaften nicht elterngleich sind, aber identische Erhaltung gebraucht wird (z.B. bei Klonsorten), **Kartoffeln, Obstbäume, viele Zierpflanzen, Produkte der Gentechnik**.



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Die Kryo-Prozedur

Langsames
(Zweistufen-)
Einfrieren

Einkapselung-
Vitrifikation

Einkapselung-
Deydrierung

Vitrifikation

DMSO-Tröpfchen-
Methode

Tröpfchen-
Vitrifikation

Gesunde /
adaptierte Pflanze

Explantat-
isolation

Dehydrierung

Kryo-
protektion

Herunter-Kühlen
(meistens schnell)

**LAGERUNG IN // ÜBER
FLÜSSIG-STICKSTOFF
- 196 °C // -135 bis - 196 °C**

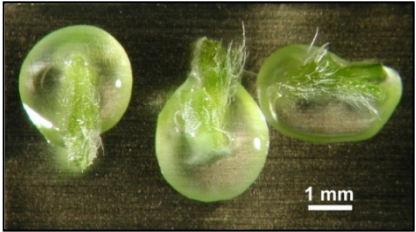
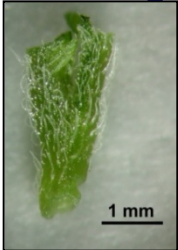
Winter-
Knospen-
-Methode

Wieder-Erwärmung
(meistens schnell)

Entfernung des
Kryoprotektors

Absenkung des
osmotischen
Wertes

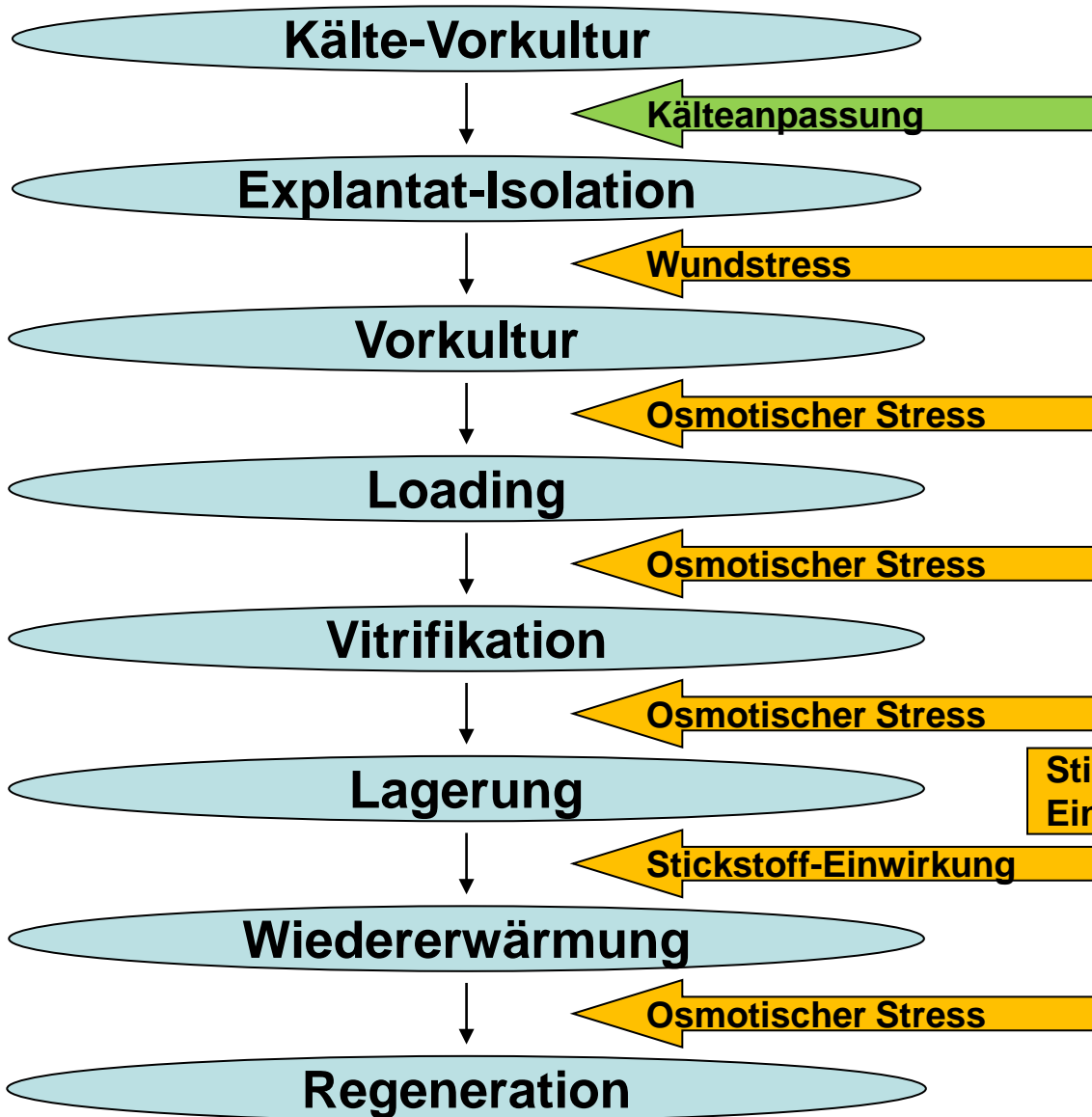
Regeneration



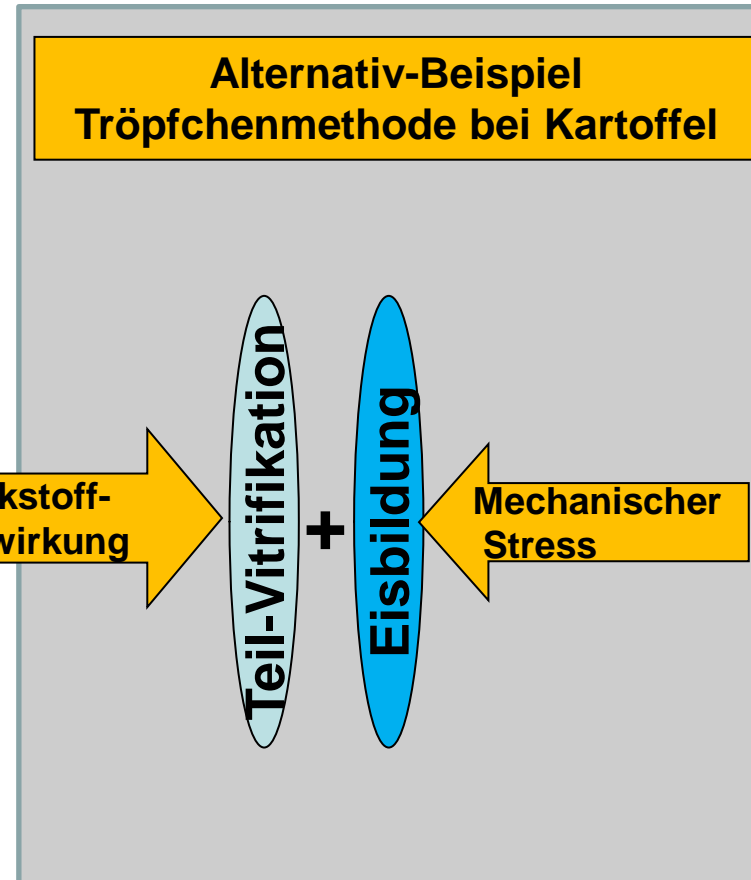
Reed (ed) (2008) Plant cryopreservation. A practical guide. Springer Science+Business Media LLC, ISBN 978-0-387-72275-7.

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Kryo ist viel mehr als Kälte



Beispiel Vitrifikation von Knoblauch



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Weltweite Vorgeschichte

Züchtung beinhaltet Erhaltung

DNA-Banken

Sprossspitzen

Pollen
1976

Somatische Embryonen bei -196 °C
1973

Zellkulturen bei -50 °C
1968

SYNTHETISCH

Dormante Knospen

DMSO 1960
1959

Glyzerol für Samenzelllagerung
1949

Zellkulturen
1939

Zwei-komponenten-Theorie des Frostschadens
1965

Vitrifikation
1937

Kälteresistenz von Meeresalgen
1917

Kryoprotektive Substanzen
1912

Totipotenz
1902

Kulturpflanzen-Feldkollektionen
USA 1898,
Russland 1920er Jahre

Samenlager
1970er Jahre

In-vitro-Sammlungen
1983

Kryobanken
Fort Collins
USA, 1990

Botanische Gärten
Leipzig 1539
Padua 1545

Antike Gärten
Ägypten 1500 v. Chr.

Landwirtschaft /
Gartenbau

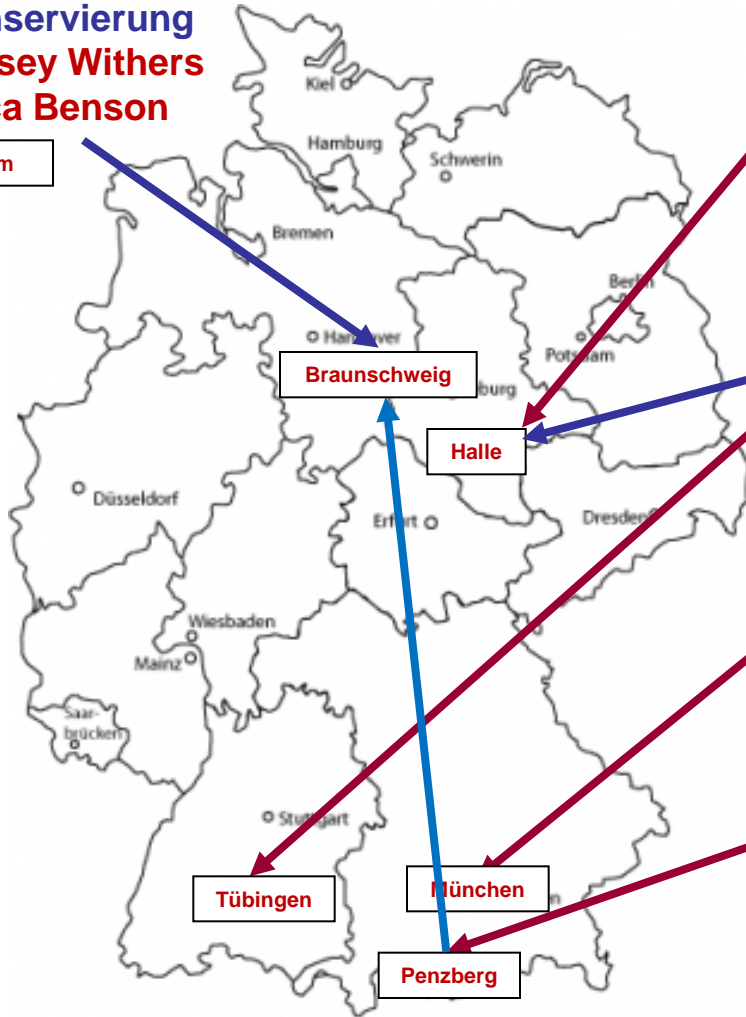
Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Pflanzenkryokonservierung in Deutschland

Erste Anfänge in den 80er Jahren → >30 Jahre Kryokonservierung

Einführung in die
Kryokonservierung
bei **Lindsey Withers**
und **Erica Benson**

Nottingham



Beate Diettrich, Martin Luckner, Halle (seit den 70er Jahren): Kryokonservierung von

- *Digitalis*-Zellkulturen und Sprossspitzen 1986,
- Kamille-Sprossspitzen 1990 (mit **R. Butenko** und **A. S. Popov**)

Moskau

Ingrid Reuff, Ursula Seitz, Ernst Reinhard, Tübingen: Kryokonservierung von Sekundärstoff produzierenden Zellkulturen (*Berberis*, *Coleus blumei*, *Panax ginseng*) 1987-1990

Brigitte Deus-Neumann, Meinhard H. Zenk, München: Sekundärstoff produzierende Zellkulturen (*Catharanthus*, *Berberis*, *Eschscholtzia*, *Panax ginseng*) 1977-1984, später deren Kryokonservierung

Hans-Willi Krell, Eva M. Göldner, Boehringer in Penzberg, gemeinsam mit **U. Seitz & E. Reinhard**: Zellkultursammlung 1991

Heinz-Martin Schumacher
Transfer nach Braunschweig 1989

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Entwicklung im Westen

Lindsey Withers

wechselt 1989 von der Universität Nottingham an **das IBPGR, Rom**

Sie entwickelt die Idee einer Kryo-Bank für Kartoffeln und initiiert ein **Projekt (finanziert durch GTZ, vermittelt durch IBPGR)**

Zwei Standorte stehen zur Auswahl

- Braunschweig (Gunda Mix-Wagner, Martin Schumacher)
- Tübingen (Ursula Seitz, Liselotte Schilde)

Kryokonservierung von Kartoffeln von 1991 – 1996 in Braunschweig

Kooperationspartner:

- Gunda Mix-Wagner, Ellruth Bittner, Institut für Pflanzenbau, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Braunschweig-Völkenrode (FAL): Vermehrung und Regeneration
- Angelika Schäfer-Menuhr, Martin Schumacher (DSMZ): Kryokonservierung



Angelika Schäfer-Menuhr

Schäfer-Menuhr et al. (1996) Potato Res. 39:507-513

Hauptresultat: DMSO-Tröpfchen-Methode

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Entwicklung im Osten

Quedlinburg: Institut für Züchtungsforschung (IfZ, Vorläufer des JKI)

- **Axel Zarske** (Leiter der AG *In-vitro*-Vermehrung und Langzeitlagerung): **1. 12. 1981**
Vortrag „Probleme und Aufgaben der Langzeitlagerung“ (Kryokonservierung)
- **R. G. Butenko**: **29. 2. 1983**
Kolloquium im IfZ: Tiefgefrierlagerung Suspensionen / Kallus
- **A. Zarske**: Dissertation „Methoden der Langzeitlagerung axenischer Kulturen ausgewählter Gemüsearten in Verbindung mit der *In-vitro*-Pflanzenproduktion“
(1985)

Gatersleben: Zentralinstitut für Genetik und Kulturpflanzenforschung (ZIGuK)

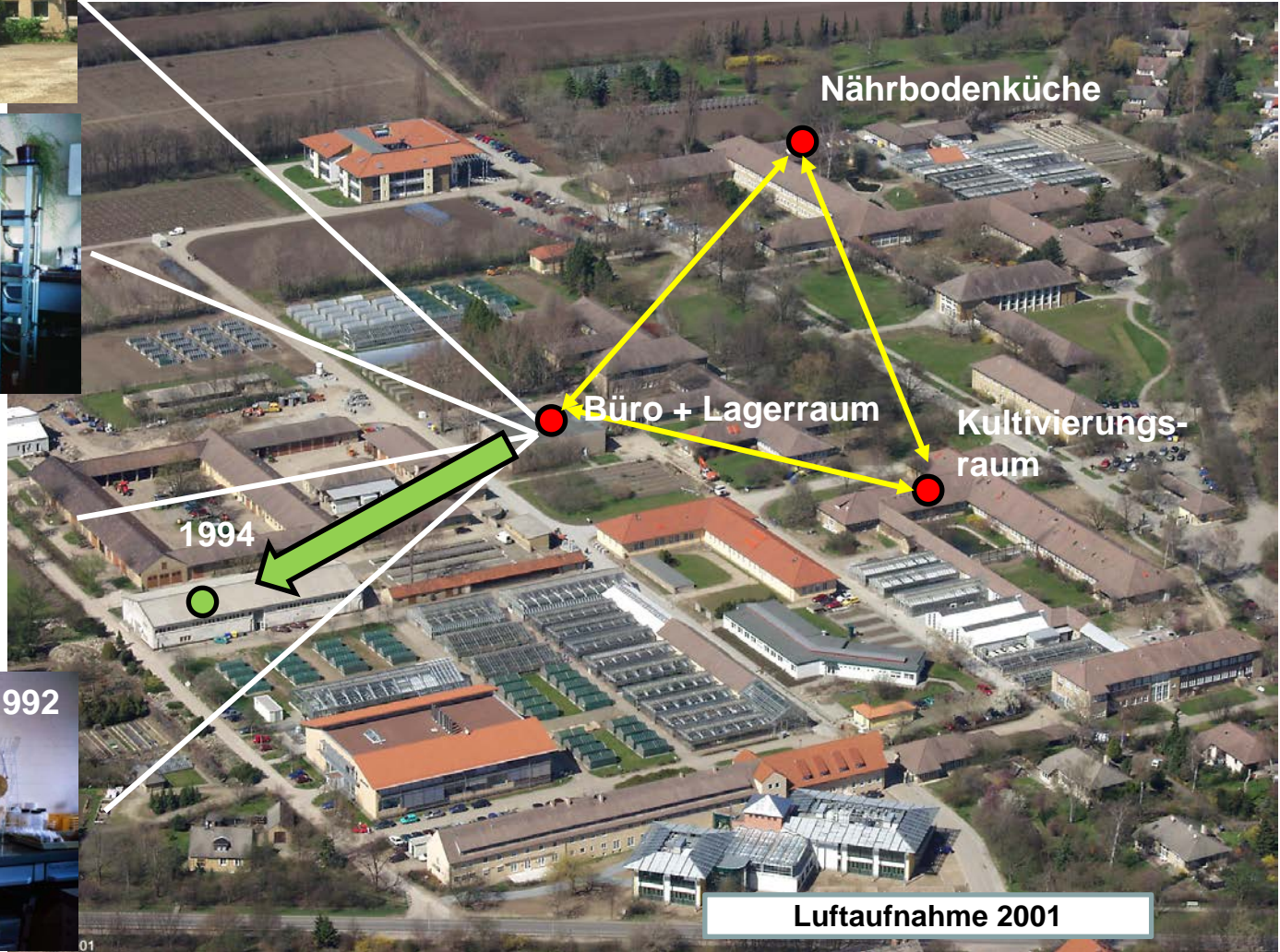
- **Helmut Koblitz (1969-1984)** Zell- und Gewebezüchtung
- **Joachim Keller**: Arbeitsbeginn in der Genbank Gatersleben
- (Genbankleiter **Christian Lehmann**, später **Karl Hammer**) **1. 9. 1989**
Arbeitsaufgaben Saatgutlagerung und Entwicklung neuer Erhaltungsmethoden in der Genbank (*In-vitro*-Kultur, Kryokonservierung)
- **1. 1. 1992 Neugründung** des Instituts für Genetik und Kulturpflanzenzüchtung (IPK), AG Saatgutlagerung und Langzeiterhaltung gegründet (AG-Leiter: J. Keller)
- **1994**: Der *In-vitro*-Teil der AG bekommt ein erstes **Laborprovisorium** im „Weißen Haus“
- **1. 1. 1996** „Ausgründung“ der selbständigen **AG *In-vitro*-Erhaltung und Cryo-Lagerung** (AG-Leiter J. Keller)
- **Sommer 1997** Beginn der Arbeiten zur Kryokonservierung
- **2002** „Genbank-Vereinigung“: alles Braunschweiger Material kommt zu uns
- **Winter 2005/2006** Umzug der AG in das heutige Labor

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Der Anfang in Gatersleben

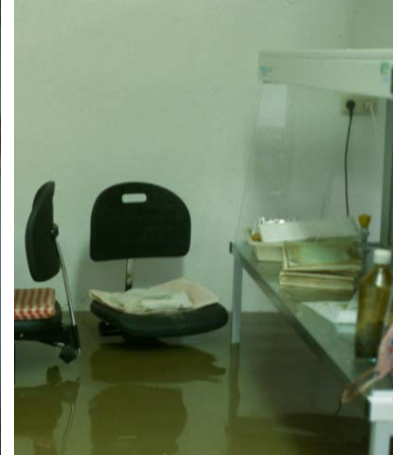


1989 bis 1994
Materialtransporte in Pappkartons durch das ganze Institut



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Das „Weiße Haus“



13. 4. 1994
Umzug ins Weiße Haus



14. 4. 1994
Hochwasser in Gatersleben



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Aufbau der technischen Basis



Sterilwerkbenke



Kühlzelle, außen



Vorkulturschänke



Kultivierungsraum



Kühlzelle, innen



Kryotechnik in Vorbereitung



ELISA-Technik



Kryotechnik, aufgebaut

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Die Arbeitsgruppe *In-vitro*-Erhaltung und Cryo-Lagerung IVC

1996 bis 2015

Permanentes
„Kern-Personal“



Dr. Joachim Keller
AG-Leiter



Dr. Angelika Senula



Kryokonservierung
***Allium*, Minze, andere Labiaten**
Pollen-Kryokonservierung

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Doris Büchner



Kryokonservierung und
In-vitro*-Erhaltung *Allium

Dipl.-Agrar Ing. Marion Grube



Kryokonservierung Kartoffeln
***In-vitro*-Erhaltung Minze,**
***Artemisia, Dioscorea* etc.**

Startlehrgang 1997 in Rom

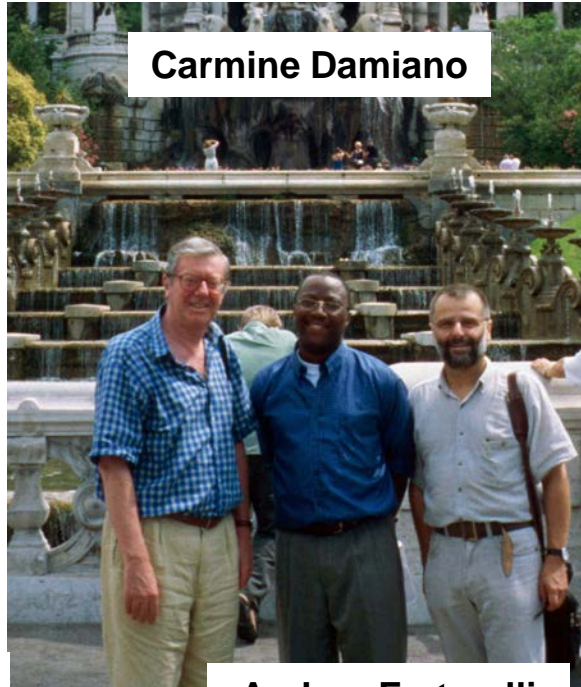
Die Hilfe kam aus Rom
(wieder ein IPGRI-Projekt)
14 Tage Intensivkurs

Istituto Sperimentale
per la Frutticoltura
Roma - Ciampino



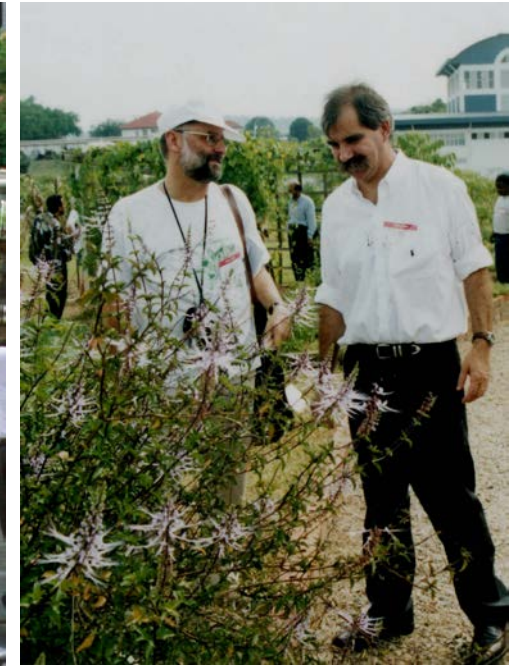
Zanetta Makowska

Gemüseinstitut Skierniewice, Polen



Carmine Damiano

Andrea Fraterelli



Florent Engelmann, IPGRI



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17



Erste Schritte mit Gästen

Weiteres Projekt
zugunsten des
polnischen Instituts
(weitere Unterstützung
durch das IPGRI) 1999



Kryokonservierung
von Knoblauch



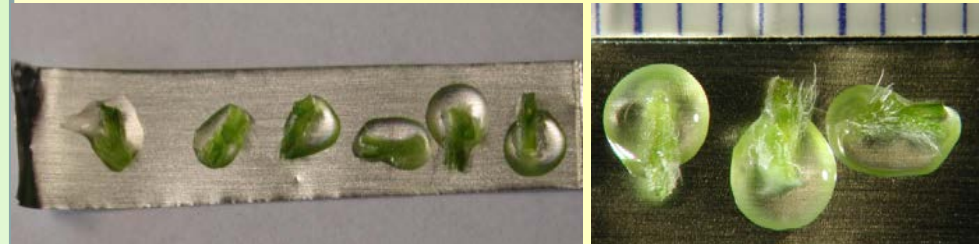
Zanetta Makowska
Gast 1997 bis 1998
(erste gemeinsame
Veröffentlichung)
Makowska et al. (1999)
CryoLetters 20:175-182

1997 bis 1999

Angelika Schäfer-Menuhr

Schäfer-Menuhr et al. (1998) Abstr. 35. Ann. Meet. Soc. Cryobiol. p. 4.

Kryokonservierung
von Kartoffeln



DMSO-Tröpfchenmethode
Sprossspitzen, auf
Aluminiumfolie-Streifen platziert

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

2005/2006 Umzug ins Vavilov-Haus

Das neue Labor



Nährbodenküche



Sterilarbeitsplätze



Klimaschränke

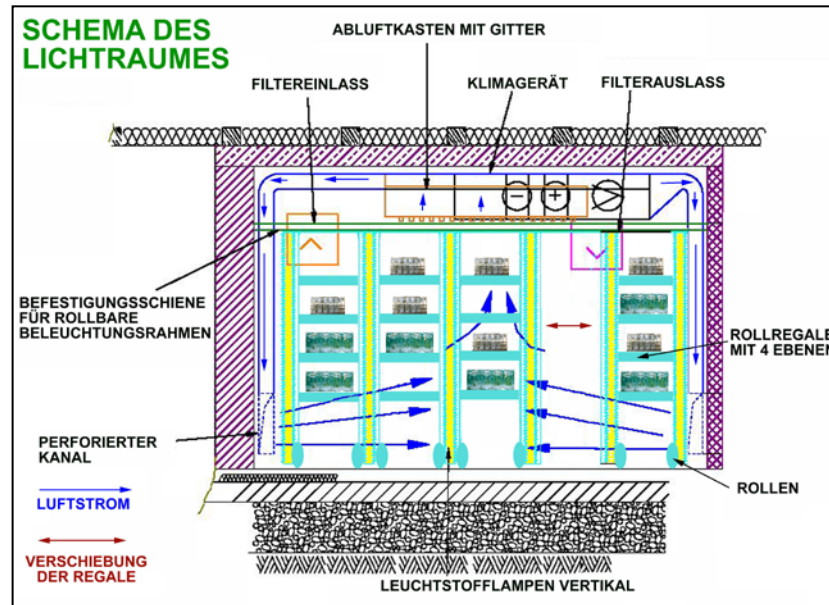


Mikroskopie- und Geräteraum



Lichträume
20 °C und 25 °C

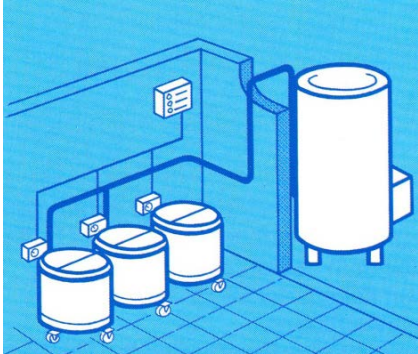
Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17



Kühlräume
2 °C und 10 °C

Die Kryobank

Kryo-System 2001 vollautomatisch,
ab 2008 halbautomatisch



Phasen-
abscheider



2000-I-Vorratstank

supraisolierte
Stickstoff-Leitungen



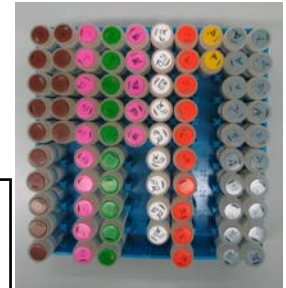
5 handbefüllte Tanks
4800 RS (Harsco)
für je 4800 Röhrrchen

7 handbefüllte Tanks CryoSystem
6000 (MVE) für je 6000 Röhrrchen
(+ 3 Sicherheitstanks in DSMZ
Braunschweig)

tankspezifische
Lagersysteme

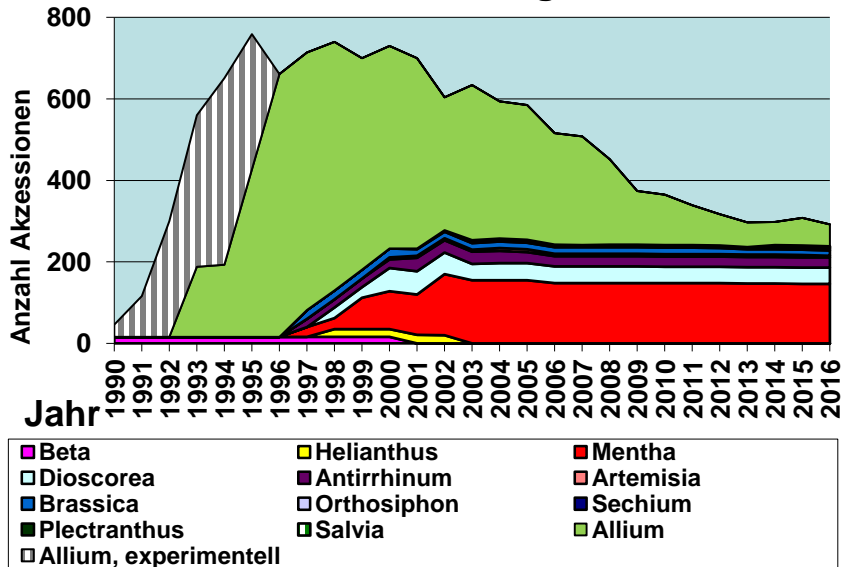


Kryo-Boxen mit
farbmarkierten Röhrrchen



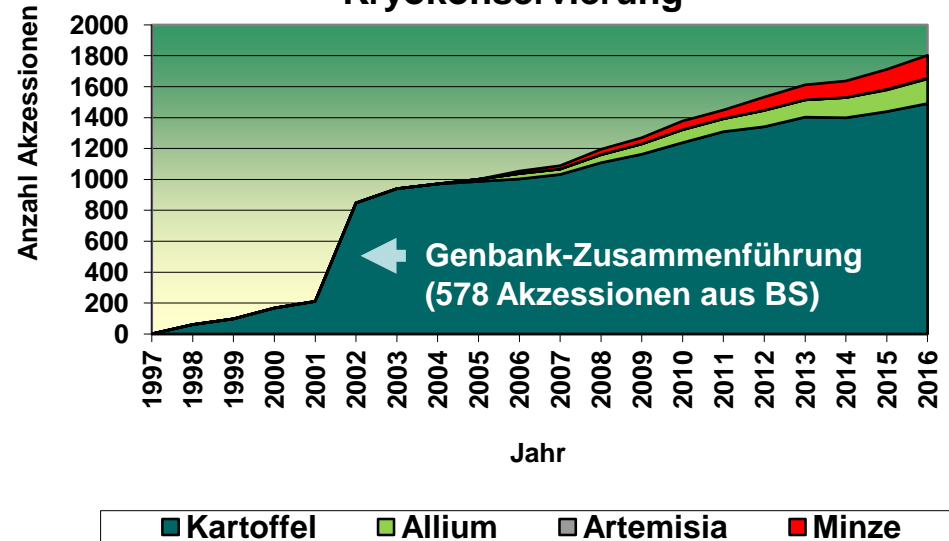
Bestandsentwicklung

Bestandsentwicklung In-vitro-Erhaltung



**Größter Posten
Minze 148**

Bestandsentwicklung Kryokonservierung



**Größter Posten
Kartoffeln 1491**

Keller & Dreiling (2003) Acta Hort. 623: 193-200
 Keller et al. (2006) Cryobiology 53: 401
 Kaczmarczyk (2008) Physiological, biochemical, histological and ultrastructural aspects of cryopreservation in meristematic tissue of potato shoot tips. Diss. MLU Halle
 Kaczmarczyk et al. (2011) Potato Research 54: 45-79

Schrittweise Methodenoptimierung

Beispiel Kartoffeln

Kaczmarczyk et al. (2008) CryoLetters 29: 79; (2010) ;
CryoLetters 31: 91-92; Keller et al. 2014 Acta Hort. 1039:249-263

Ein Protokoll beizubehalten gewährleistet die langfristige Vergleichbarkeit.
Vorsicht deshalb bei Veränderungen!

Das Protokoll: Schäfer-Menuhr et al. (1996)

April 2006. Vorher ohne Temperatur-Vorkultur: Veränderung nach **460 Vergleichen**

Dezember 2003. Vorher 3 x 100 mit 3 x 20 Kontrollexplantaten: Veränderung nach **527 Vergleichen**

Oktober 2004. Vorher hormonhaltiges Medium: Veränderung nach **487 Vergleichen**

April 2006. Vorher Halbflüssigmedium: Veränderung nach **460 Vergleichen**

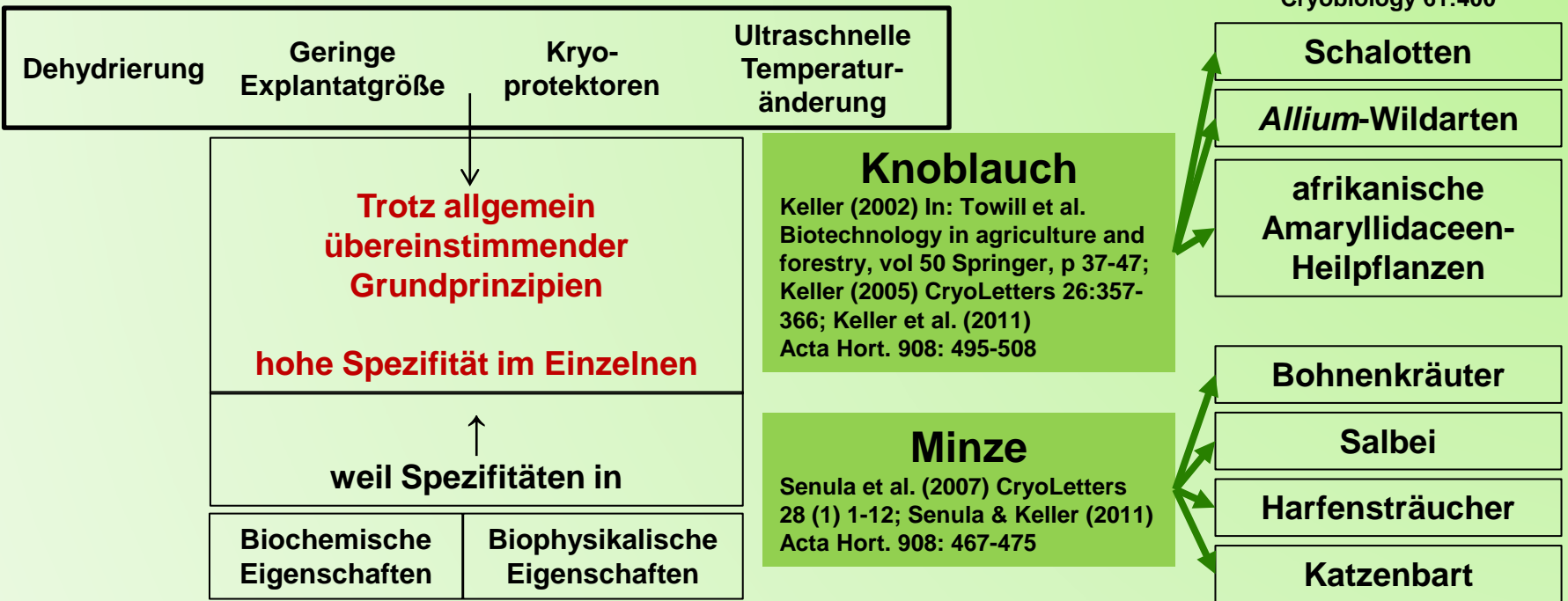
- Ankunft von Mikroknollen oder Sprosskulturen
- 3-7 Wochen Vorkultur in Gläsern, abhängig vom Genotyp
- **1-2 Wochen Vorkultur in Wechseltemperaturen 22 / 8 °C bei 8 h Licht**
- Schneiden und Isolieren der Sprossspitzen, **2 x 150** Explantate
- Übernachtinkubation auf **hormonfreiem Flüssigmedium**
- 2 h Inkubation auf Flüssigmedium mit 10 % DMSO
- Platzierung der Explantate in 2,5-µl-Tröpfchen von Flüssigmedium mit 10 % DMSO auf Aluminiumfolien
- Direktes Einführen der Folien in Kryoröhrchen mit Flüssigstickstoff
-
- Wiederwärmen von **2 x 50** Explantaten (Kontrolle) durch direktes Einwerfen der Röhrchen ins Wasserbad bei Raumtemperatur
- Platzierung der Explantate auf **Festmedium MS + 0,5 mg/l Zeatinribosid + 0,5 mg/l IES + 0,2 mg/l GA₃** (MSTo - Towill, 1983) und Weiterkultur in 3,5-cm-Petrischalen

August 2016. Übergang zu Methode Droplet Freezing: Anderer Kryoprotektor **PVS3**, 1-3 Wochen Vorkultur **bei 5 °C im Dunkeln**, Kryoröhrchen **luftgefüllt**: Veränderung nach **32 Vergleichen**.
Ergebnis: unerwünschte Kallusbildung reduziert, bessere Regeneration bei Infektionen.

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

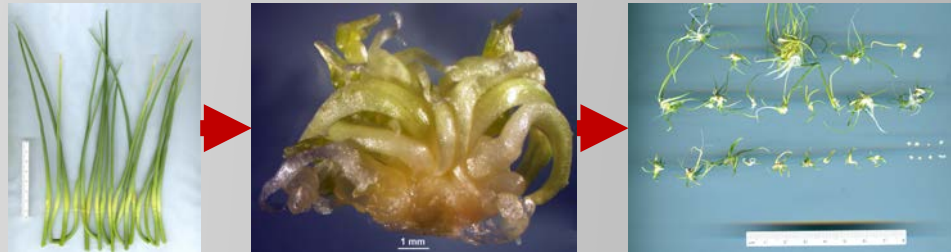
Neue Arten/ neue Explantattypen

Wesenszug der Kryokonservierung



Kleines AEGIS Projekt Deutschland - Polen - Portugal (2010-2011)

Keller et al. (2011) Bioersivity NewsI Europe 53:9



Kim et al. (2006)
CryoLetters 27:143-153

Sprossspitzen

Pollen

- Blütenstandsbasen
- Zwiebelböden
- Mikroknollen

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Pollen-Lagerung

Beginn: 2010

Vorteile

- Alternative bei Pflanzen mit Problemen bei der Saatgutkeimung
- Wegen Kleinheit der Pollen können größere Populationen gesammelt werden
- "Orthodoxer" Pollen ist gut lagerbar

"Positive Nebeneffekte"

- Überbrückung von Blühzeitdifferenzen für Kreuzungsstrategien
- Pollen als Quelle der Haploidenerzeugung
- Pollenpopulationen direkt für Resistenzselektion gegen abiotischen Stress nutzbar

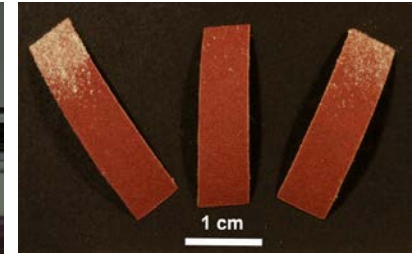
Nachteile

- Pollenmengen oft zu klein zum Sammeln (z. B. bei Kleistogamen)
- Keine Erhaltung des Plastoms
- Kurze Lebensdauer der Pollen erfordert schnelles Handeln
- „Wiedergewinnung“ der Genressourcen erfordert Kreuzungen
- Manche Pflanzenfamilien haben "rekalzitranter" Pollen: Poaceae, Cucurbitaceae, Araceae

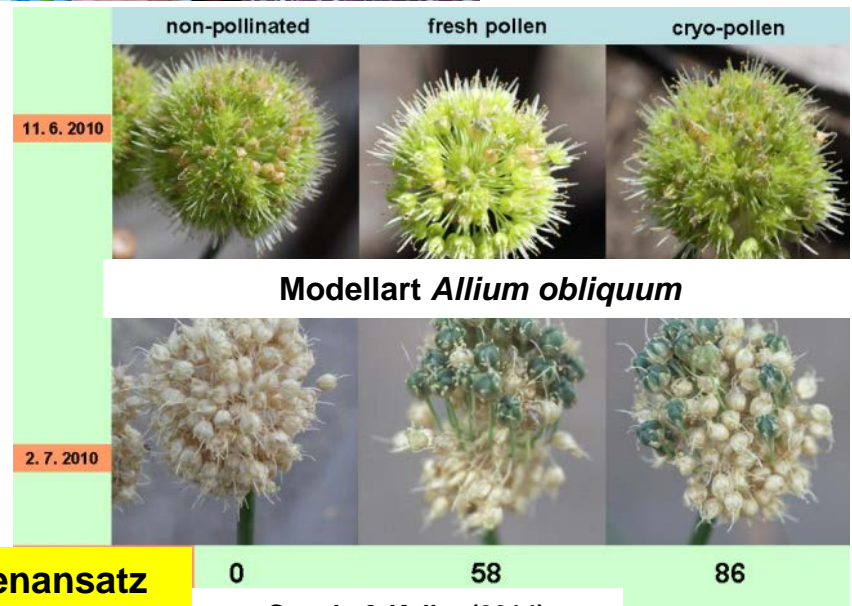


Allium fistulosum (All 195)
Modifizierte BK-Lösung
mit 15 % Saccharose

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17



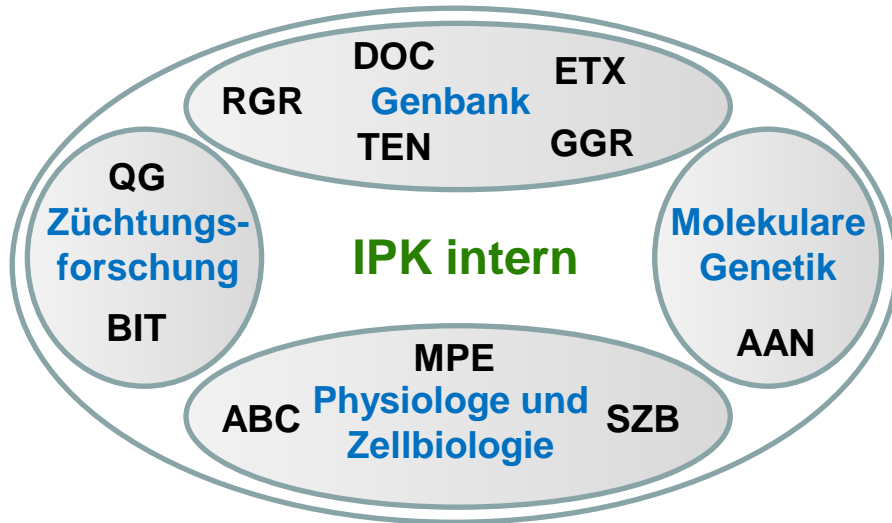
176 Akzessionen
von 81 *Allium*-Arten
23 Arten direkt verglichen:
Mittlere Keimrate
42.5 % Frischpollen
25.8 % Kryopollen
(35,000 Pollen gezählt)



**Samenansatz
pro Blütenstand**

Senula & Keller (2014)
Acta Hort. 1039: 290-296

Deutsche Kooperationen



Arbeitskreis Deutsche *In-vitro*-Kulturen ADIVK
(Zentralverband Gartenbau e.V.)
AG Langzeitlagerung

Institutsmitgliedschaft seit 1997

33 Wissensch. Institutionen + 37 Unternehmen

Julius-Kühn-Institut, Deutsche Genbank Obst
Dresden-Pillnitz (M. Höfer)

Gemeinschaft Deutscher Kryobanken GDK
Vorstandsmitglied 2013-2015; 17 Institutionen

Institut für Mehrphasenprozesse, LU Hannover
(B. Glasmacher)

DSMZ Braunschweig (AG H.M. Schumacher)
88 % der Gaterslebener Kartoffel-Kryobank ist dort
sicherheitsdupliziert

18. 8. 2009 Abholung der Sicherheitsduplikate



KALT

Verbundprojekt der Leibnizgemeinschaft
2013-2017 „Kryostress – Anpassungsmechanismen
der Zelle an Tiefsttemperaturen“

- **Koordinator DSMZ Braunschweig**
- Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. - Hans-Knöll-Institut HKI Jena
- **IPK Gatersleben**
- Georg-August-Universität Göttingen, Experimentelle Phykologie / Algenkulturen
- Biozentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München LMU

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Die internationale Zusammenarbeit

Die wissenschaftliche Community ist relativ klein. Wir kennen uns fast alle.
“Wir sind eine große Familie“

Zahlreiche Gäste (nur eine Auswahl)

Sheron Weerasuriya,
Sri Lanka, 2003



Barbara Reed,
USA, 2003



Takao Niino,
Japan, 2003



Marcos Martinez, Kuba, 2005



Florent Engelmann,
Frankreich, 2008

Längere Aufenthalte bei uns

DFG

Nataliya Shvachko,
Yulia Lupysheva, Russland,
2006

LEIBNIZ-STIPENDIUM

Karthikeyan Subbarayan,
Indien, 2012-2013

ERASMUS-PROGRAMM

Elena Rey Mazon, Spanien, 2012

EU-PROJEKT EURALLIVEG 2007-2008

Marta Olas, Polen
Luciana Altieri, Italien
Renata Kotkova, Tschechische
Republik

LOKALE PROJEKTE

Arumugam S. Kantharajah, Australien, 2004
Artur Kryszczuk, Polen, 2004
Alfia Khairullina, Pia Ohlsson, Nordische
Genbank, Schweden, 2007
Veli-Matti Rokka, Finnland, 2009
Magfrat Muminova, Usbekistan, 2011
Vinod Kumar, Indien, 2012
Andrea Kodym, Österreich, 2015

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

EU-Projekt CRYMCEPT 2002-2005



*establishing CRYopreservation Methods for
Conserving European PlanT germplasm collections*

Aufgabe: Entwicklung von Kryoprotokollen zur Anwendung in Europäischen Genbanken

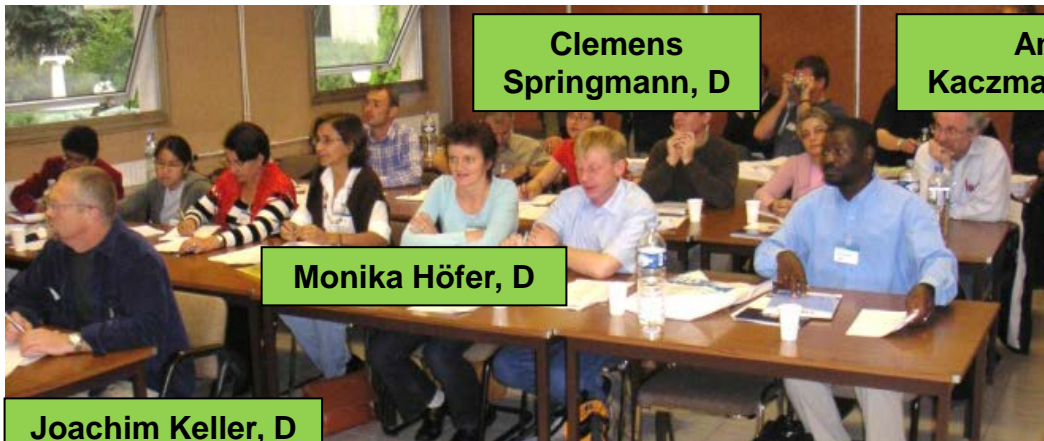
**Messung der
pflanzlichen Reaktion
auf
Kryokonservierung**

**Physikalisch-
biochemische
Grundlagen der
Kryotoleranz**

**Entwicklung neuer
Protokolle**

**Methodenvalidierung
und Einführung in die
Genbanken**

Lehrgang in Montpellier - 2 Wochen Oktober 2005



**Clemens
Springmann, D**

**Anja
Kaczmarczyk, D**

Monika Höfer, D

Joachim Keller, D

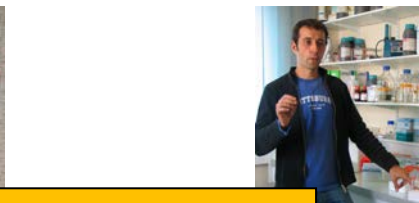


Keith Harding, UK

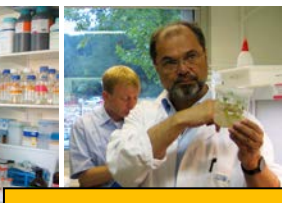
Erica Benson, UK



Keller, Kryokonse



**Stephane Dussert,
Frankreich**



**Heinz-Martin
Schumacher, D**



**Bart Panis,
Belgien**



Paul Lynch, UK

Crop Research Institute Prag 2003-2005



Bilaterale Zusammenarbeit
 BMBF-Finanzierung,
 wechselseitige
 Arbeitsbesuche

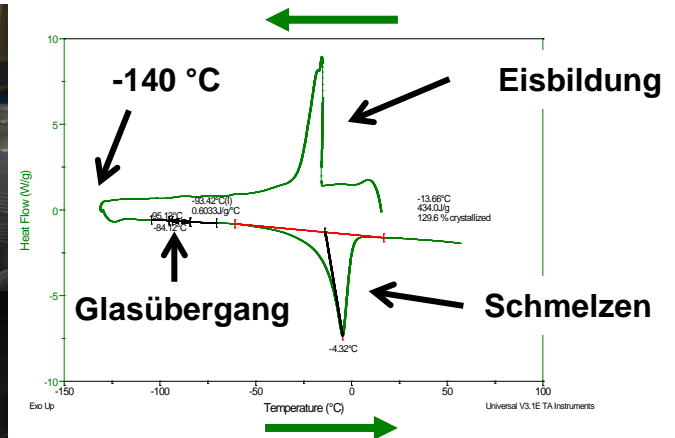
Neue Impulse:

- **Methodenaustausch** bei Kartoffeln und Knoblauch
- Erlernen der **DSC** (Dynamische Differenzkalorimetrie)



Charakteristisches Kalorigramm

1. Schritt: Abkühlen



2. Schritt: Erwärmen

Jiří Zámečník



Alois Bilavčík

Miloš Faltus



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

EU – GenRes-Projekte

2 EU-Projekte zu *Allium*

1996-2000 (Sub-Projektleiter Vegetative Alliums)

2007-2011 (Koordinator) → EURALLIVEG

WEBSEITE

<http://euralliveg.ipk-gatersleben.de>

Genetische Analyse – Kryokonservierung – Virusfreimachung
bei Knoblauch und Schalotten

Hauptergebnis: 202 Akzessionen Knoblauch kryokonserviert

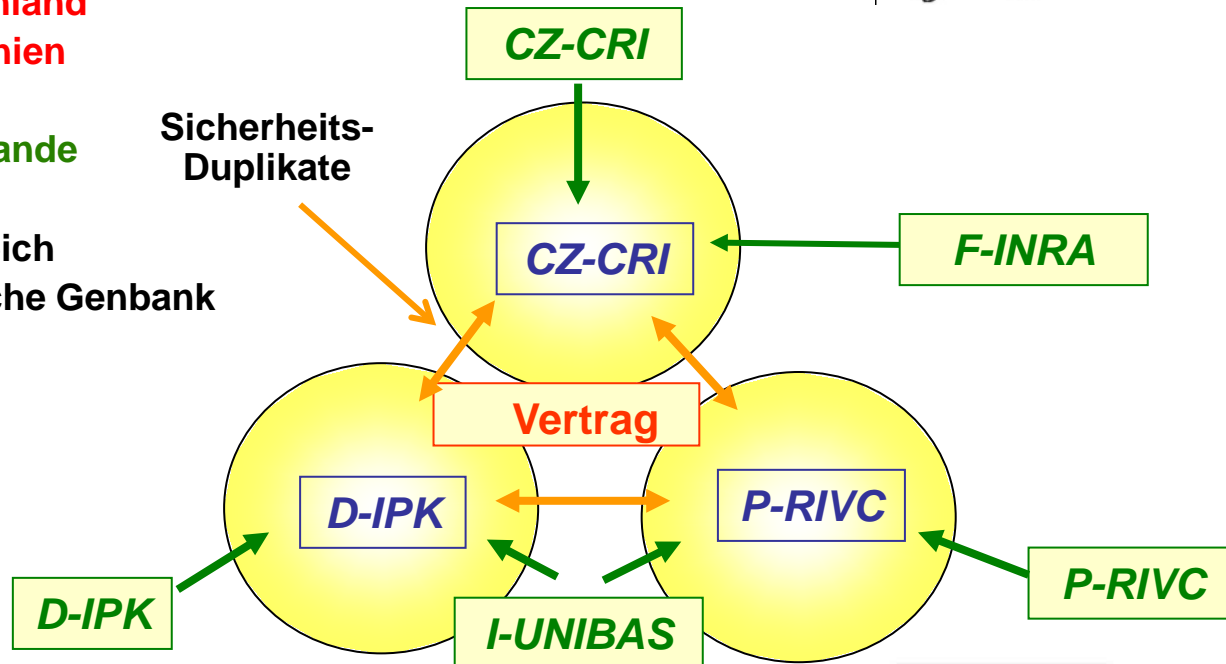
Neue Kryobank-Struktur aus 3 Teilnehmerländern geschaffen.

Weltneuheit auf dem Pflanzensektor



- Deutschland
- Tschechien
- Polen
- Niederlande
- Italien
- Frankreich
- Nordische Genbank

Sicherheits-
Duplikate



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Society of Low Temperature Biology SLTB

Eine von drei großen internationalen Kryobiologie-Gesellschaften [gegründet 1964]
(die anderen: Society of Cryobiology [1964], International Institute of Refrigeration [1908])

Mitglied seit 1996; Tagungssekretär 2006-2009

2009 Tagung in Gatersleben organisiert

Teilnehmer aus 20 Ländern



Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

COST und ISHS

International Society for Horticultural Science

European **CO**operation in the field of **SC**ientific and **TE**chnical research

Mitarbeit im Management-Komitee

Kommission Biotechnologie

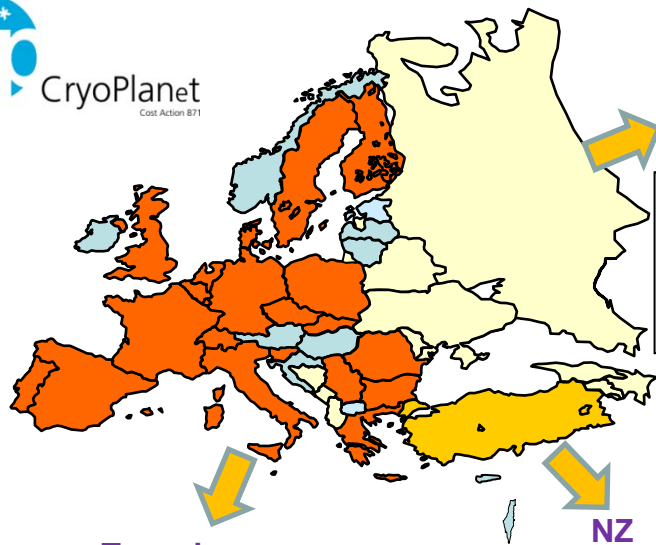
AG Kryokonservierung

Mitarbeit in wissenschaftlichen Komitees
1. Symposium in Leuven, 7. - 8. 4. 2009

Laufzeit 2007-2010, Abschlussmeeting Februar 2011

COST-Aktion 871

Kryokonservierung von Kulturpflanzen in Europa



RU

Grapin et al. (2011)
Cryopreservation of crop species in Europe. COST Office, Brussels 233 pp.

Tunesien

NZ

Ökonomische Dimension: 38 Millionen €

6 Stipendiaten aus Finnland, Frankreich, Polen und Spanien

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17



Panis & Lynch (eds.)
Proc. First IS on Cryopreservation in Hort. Species
Acta Hort. 908, ISHS 2011



Reed (ed.) Proc. II. IS on Plant Cryopreservation
Acta Hort. 1039, ISHS 2014



2nd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON
PLANT CRYOPRESERVATION
Fort Collins, Colorado, USA
August 11-14, 2013

Internationales Genbankwesen

Integration der Kryokonservierung

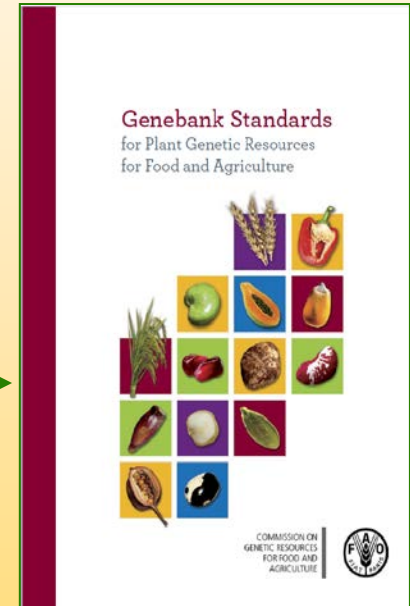
Europäisches Kooperativprogramm für Pflanzengenetische Ressourcen

ECPGR

<http://www.ecpgr.cgiar.org/>

Arbeitsgruppe *Allium* 1995-2014
(Chairman 2012-2014)

Berateraktionen zur Standardisierung
der Kryokonservierungsempfehlungen
2008; 2012-2013



Weltreuehandfonds für Kulturpflanzenvielfalt Global Crop Diversity Trust

- Unterstützt die 15 Zentren der Beratungsgruppe für Internationale Agrarforschung CGIAR
- Hauptdonor des Global Seed Vault in Svalbard (Spitzbergen)

Biodiversity
International

<https://www.croptrust.org/?lang=de>

Berater- und
Gutachtertätigkeit
2011-2013

Bananen-Kryobank
in Leuven, Belgien

Qualifikation

Zwei Dissertationen (MLU Halle)



**Semuel Leunufna,
Indonesien 2001-2004**

Yamswurzel



**Anja Kaczmarczyk
2005-2009**

Kartoffeln

(Physiologie, Histologie, Ultrastruktur)

Teiletappen von Dissertationen

**Biao Wang, China,
2013-2014
Kryotherapie
Kartoffeln**

**Leila Gaffarzadeh-Namazi,
Iran, 2014
Kryokonservierung
*Satureja***

Noch laufende Dissertationen

**Johanna Stock,
2014-2017
Kryostress
Arabidopsis / Kartoffeln**

**Kamatchi Ulagappan,
Indien, 2014-2017
Genexpression bei
Kryostress Knoblauch**

Master- und Bachelorarbeiten

**Andreas Breuing
Bachelor/Master
TIS-Systeme /
Kryo-Kostenabschätzung**

**Maria Patschin
Bachelor
Endophyten-
Problematik**

Studenten-Praktikum

**MLU Landwirtschaft ab 2001 jährlich
MLU Pharmazie / Univ. Osnabrück / Magdeburg
(1998-2011)**

Vorlesungen MLU Halle & DSE Tschortau

1-2 Lehrlinge pro Jahr

DEUTSCHE STIFTUNG FÜR ENTWICKLUNG DSE 1995-2007

**>15 Praktikanten aus Philippinen, Pakistan, Indonesien,
Äthiopien, Mali, Bangladesh, Nepal, Sambia, Sri Lanka,
Mongolei, Bolivien, Ägypten**

IAEA Teaching Programm 2002

**Sutarto / Yuliasti, Indonesien
In-vitro-Kultur und Kryokonservierung Knoblauch
(Jakarta und Gatersleben)**

Heutiger Stand in Deutschland



Bundesministerium für
Verbraucherschutz, Ernährung
und Landwirtschaft

Nationales Fachprogramm

zur Erhaltung und nachhaltigen
Nutzung pflanzengenetischer
Ressourcen landwirtschaftlicher und
gartenbaulicher Kulturpflanzen



Verabschiedung durch die
Agrarministerkonferenz 2002

Handlungsbedarf

- ▶ Identifizierung vorhandener Sammlungsschwerpunkte anhand bestehender Kollektionen;
- ▶ Auffinden und Eliminieren von unerwünschten Duplikaten insbesondere auch hinsichtlich der europaweiten und internationalen Duplikation;
- ▶ Erhaltung einer geeigneten Anzahl genetisch verschiedener Muster einzelner Arten in verschiedenen Botanischen Gärten (keine Klone!) zur Wahrung oder Bildung eines Genpools insbesondere bei Taxa, die nicht generativ reproduziert und vegetativ erhalten werden.
- ▶ Mitarbeit beim Aufbau einer arbeitsteiligen Erhaltungsstruktur in Europa durch verteilte Verantwortlichkeiten für bestimmte Akzessionen oder Arten; eine Beschreibung und Offenlegung des Qualitätssicherungssystems der Partnergenbanken sowie ihrer

Zugangs- und Abgaberegeln für die entsprechenden Sammlungen sind dabei unbedingte Voraussetzung;

- ▶ Artspezifische Optimierung von Erhaltungsverfahren einschließlich der Langzeitlagerung von Saat- und Pflanzgut; Entwicklung neuartiger sowie Optimierung vorhandener Keimtestmethoden, in Botanischen Gärten und vergleichbaren Einrichtungen ggf. auch Aufbau von Erhaltungskulturen;
- ▶ Etablierung und Optimierung von Methoden der *In-vitro*-Erhaltung und **Kryokonservierung** sowie ggf. Forschung im Bereich der Saat- und Keimungsphysiologie, Entwicklungsphysiologie von Organen während der Lagerung unter reduzierten Wachstumsbedingungen sowie zur Kryobiologie; und
- ▶ Etablierung, Vervollkommnung und Abgleich von phytosanitären Methoden inkl. Quarantäne-Regelungen.

**Zweites deutsches Kryokonservierungszentrum:
JKI Dresden (Monika Höfer)
Obstarten (Apfel, Erdbeere)**

Weitere wünschenswerte Entwicklungen, besonders für Weinreben und Zierpflanzen
(Rose, *Rhododendron* etc.) **lassen auf sich warten.**

Entwicklungsetappen

Fazit

- Vorgeschichte (außerhalb)
 - Kryoforschung in Deutschland seit **ca.1985** (in Ost und West parallel)
 - Praktische Kryokonservierung von Sprossspitzen in Braunschweig **1992 - 2002**
 - Vorarbeiten in Gatersleben
 - *In-vitro*-Kultur-Forschung **ab 1969**
 - Arbeit im Saatgutlager
 - Einführung der *In-vitro*-Kultur in die Genbank als Voraussetzung **1989 - 1994**
 - Eigenes Labor - Vorbereitung der technischen Basis für Kryokonservierung **1994 - 1997**
 - Einführung der Kryokonservierung von Sprossspitzen durch schnelles Abkühlen **1997 - 1999**
 - Routine-Einlagerung Kartoffeln, Knoblauch, Minze **2000 - heute**
 - Genbank-Zusammenführung **2002 - 2003**
 - Neues Labor **2006 - heute**
 - Erste Grundlagenuntersuchungen **2006 - 2010**
 - Kältevorbehandlung
 - Ultrastruktur
 - Genetische Stabilität
 - Vertiefte Grundlagenuntersuchungen **2010 - 2015**
 - DSC
 - Molekulargenetische Untersuchungen
 - Ökonomische Abschätzungen
 - Pollen-Lagerung
 - Einführung GBIS / LIMS
 - Kryomikroskopie
 - Neue Arbeitsgruppenleiterin **2016 - heute**
 - Cryo- und Stressbiologie
- Anwendungsorientierte Fragestellungen und Forschungsansätze**
- Stressphysiologie
 - Biophysik des Zellwassers
 - Molekulare Genetik
 - Ökonomie/Organisation (größte Kartoffel-Kryobank)
- ~ 180 Publikationen**

Zukunft

AG Cryo- und Stressbiologie [CSB]

Leiterin Dr. Manuela Nagel
Genbankerfahrung, bisher an
Saatgutlagerung, -trocknung und
-keimung gearbeitet



Service

Kartoffeln

Auch verstärkt
Knoblauch

Forschung

Molekulare Mechanismen
beim Kryostress

Stressmechanismen und
Trockentoleranz

Zwei laufende Dissertationsprojekte (Johanna Stock, Kamatchi Ulagappan)
Molekulargenetische Untersuchungen zum Kryostress bei *Arabidopsis*, Kartoffeln und Knoblauch

Neues Dissertationsprojekt (Daniela Impe)
Vitalität und Lagerbarkeit von Weizenpollen (2016 - 2019)

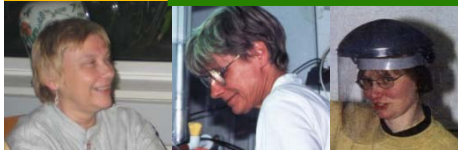
Master-Projekt (Claudia Koepnick)
"Biochemische Veränderungen bei der Kartoffel-Kryokonservierung"

Bachelor-Projekt (Shao Yu Wang, China)
"Qualitative und quantitative Analyse der Regeneration bei Kartoffeln auf verschiedenen Regenerationsmedien nach Kryokonservierung"

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

Erica Benson

DSMZ Braunschweig



Angelika Schäfer-Menuhr
Ellruth Bitter
Gunda Mix-Wagner



Heinz Martin Schumacher



Elke Heine-Dobbernack

Hans-Peter Mock



Mohamad-Reza Hajirezaei



IPK AG MPE

Michael Melzer

IPK AG SZB



Danke

Und viele andere



Miloš Faltus

CRI Prag



Jiří Zámečník



Biao Wang



IPK AG HET

Hardy Rolletschek



Johanna Stock

IPK AG ABC

IPK AG TEN

Klaus Dehmer Kerstin Diekmann



MPI Golm

Dirk Hinch



Anja Kaczmarczyk



Kamatchi Ulagappan



Karthikeyan Subbarayan



Angelika Senula



Doris Büchner



E. R. Joachim Keller



Marion Grube

Keller, Kryokonservierung, GPZ, 30.3.17

**DANKE FÜR IHRE
AUFMERKSAMKEIT**

