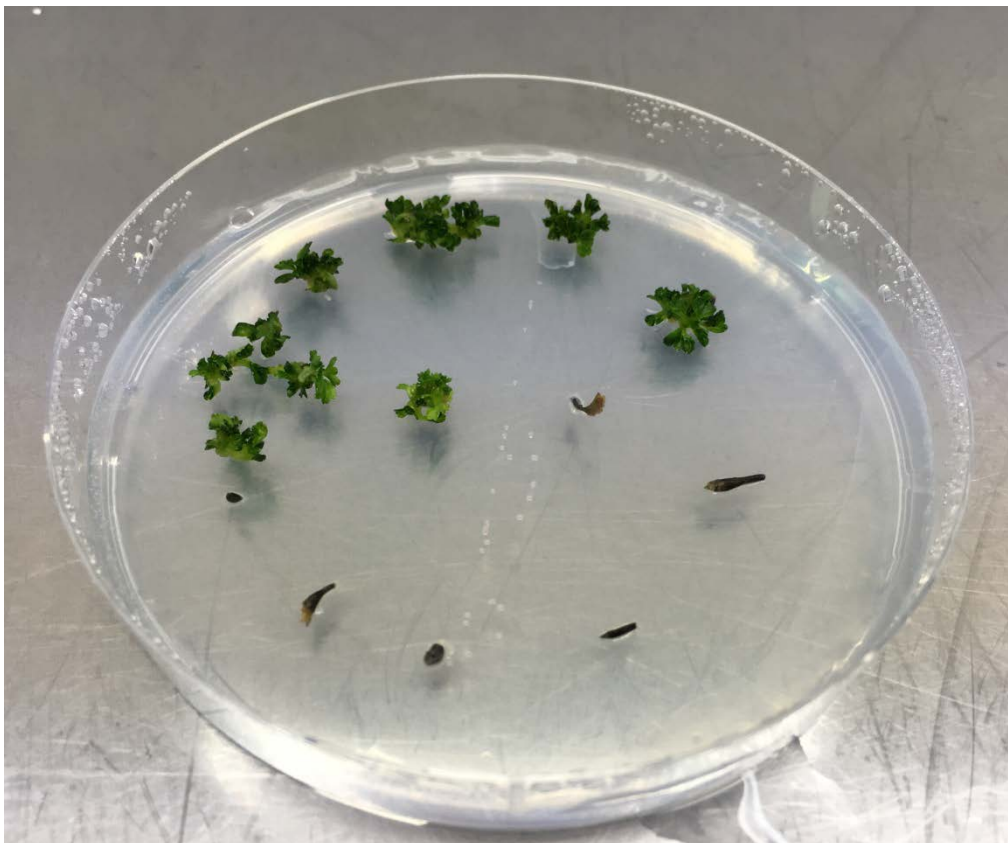


Cryokonservierung von Erdbeeren und
Himbeeren
ZHAW-Wädenswil
05-NAP-P67
Projektdauer 2016 – 2018

Statusbericht 2016



ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN (ZHAW)

Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen

Julia Angstl

Grüntal, Postfach, 8820 Wädenswil

26. Januar 2017

1 Projektziele 2016

Für das erste Projektjahr 2016 wurden folgende Ziele und Indikatoren definiert.

1.1 Teilprojekt A: Beurteilung von zwei publizierten Protokollen bei Erdbeeren und Anpassung an Schweizer Verhältnisse.

Indikator 1: Der Ploidiegrad der ausgewählten Sorten ist bestimmt und von ProSpecieRara durch Claudio Niggli in die nationale Datenbank eingetragen.

Indikator 2: Zehn Erdbeersorten sind cryokonserviert

Die Sorten wurden als *in vitro* Kulturen von der Agroscope Changins bereitgestellt. BE 248 und BE 274 (beides virusinfizierte Sorten) und *F. moschata* (BE433) konnten im Projektjahr 2016 nicht bzw. zu spät geliefert werden.

Indikator 3: Ein optimales Arbeitsprotokoll ist erstellt.

Anwendung der Protokolle:

- T. Niino et al. (2003): Cryopreservation of *in vitro*-grown apical shoot tips of strawberry by vitrification.
- S. Yamamoto et al. (2012): Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the Vitrification method using aluminum cryo-plates.

1.2 Teilprodukt B: Qualitätssicherung für eine langfristige Absicherung

Indikator 1: Das Qualitätsmanagement-Konzept ist erstellt

Indikator 2: Das QM-Konzept ist exemplarisch an einer Akzession durchgeführt und dokumentiert.

2 Resultate

2.1 Zusammenfassung der Ploidiegrad

Tab 1: Verwendete Erdbeersorten im Projekt 05-NAP-P67 und deren Ploidiegrad.

Datenherkunft: <http://strawberryplants.org/2011/02/genetics-of-strawberry-plants/>

Sorte	Offizieller Sortenname	Spezies	Ploidiegrad	Anzahl Chromosomen
BE 533	Mayqueen	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 332	Erdbeere von Tagelswangen	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 11	Erdbeere von Basel	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 21	Erdbeere von Urtenen-Schönbühl	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 458	Erdbeere von Blankenburg	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 257	Deutsch Evern	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 239	Mieze Schindler	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 433	Moschusbeere von Bern	<i>F. moschata</i>	hexaploid	42
BE 248	Surprise des Halles	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56
BE 274	Erdbeere von Lausanne	<i>F. x ananassa</i>	octoploid	56

2.2 Verwendete Sorten

Aufgrund der Wachstumseigenschaften bei der *in vitro* Kultur wurden in Zusammenarbeit mit der AG Beeren die Sorten in 2 Gruppen eingeteilt:

Tab 2: Einteilung der Wachstums-Gruppen, 05-NAP-P67

Guter Wuchs <i>in vitro</i>	Problematisch <i>in vitro</i>
BE 11	BE 239
BE 21	BE 257
BE 332	BE 433 (<i>F. moschata</i>)
BE 458	BE 248 (Versuchsdurchführung 2017)
BE 533	BE 274 (Versuchsdurchführung 2017)

Im Projektjahr 2016 konnten die Sorten BE 248 und BE 274 aufgrund der schlechten Vermehrungsrate nicht zur Verfügung gestellt werden. Am 07.11. erhielten wir je 5 Explantate BE 248 und BE 332, BE 274 war nicht verfügbar. Wegen der kleinen Stückzahl können erste Versuche mit diesen beiden Sorten erst 2017 durchgeführt werden, um sie auf die Eignung der Cryokonservierung zu testen. Wenige Exemplare von BE433 konnten in Kalenderwoche 20 geliefert werden, nach 2 Vermehrungszyklen *in vitro* konnte die Sorte 2x in die Testreihe aufgenommen werden.

2.3 optimiertes Arbeitsprotokoll

Siehe Anhang I

2.4 Konzept Qualitätsmanagement

Mit einer Wahrscheinlichkeit von 94% beträgt die Anwachsrate nach der Cryokonservierung mindestens 40%. Diese 40% werden in diversen Publikationen als ausreichend betrachtet, da sich die Vermehrungsrate der einzelnen Explantate zudem mindestens vervierfacht (Kartha et. al, 1980 und eigene Beobachtungen).

In einem Langzeitversuch über 28 Jahre mit Erdbeermeristemem zeigt Caswell (2009) auf, dass durchschnittlich 59.3% der Sorte „Redcoat“ die Lagerung in Flüssigstickstoff (LN) überlebt haben. Nach dem Auftauen und der Überführung auf Erds substrat entwickelten sich die Pflanzen phänotypisch normal, waren wüchsig und bildeten Ausläufer. Caswell (2009) zeigt auch, dass die Anwachsrate von der ersten bis zur achten Wochen in LN abnimmt, dann jedoch stabil ist. Eigene Ergebnisse sind nach dem ersten Projektjahr 2016 von der Sorte BE11 vorhanden. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Sorten unterschiedlich reagieren.

Weiterführende Versuche mit anderen Sorten sollten in Zukunft durchgeführt werden, dies ist jedoch nicht Bestandteil der Projektes 05-NAP-P67.

Graphische Darstellung des QM-Konzepts:

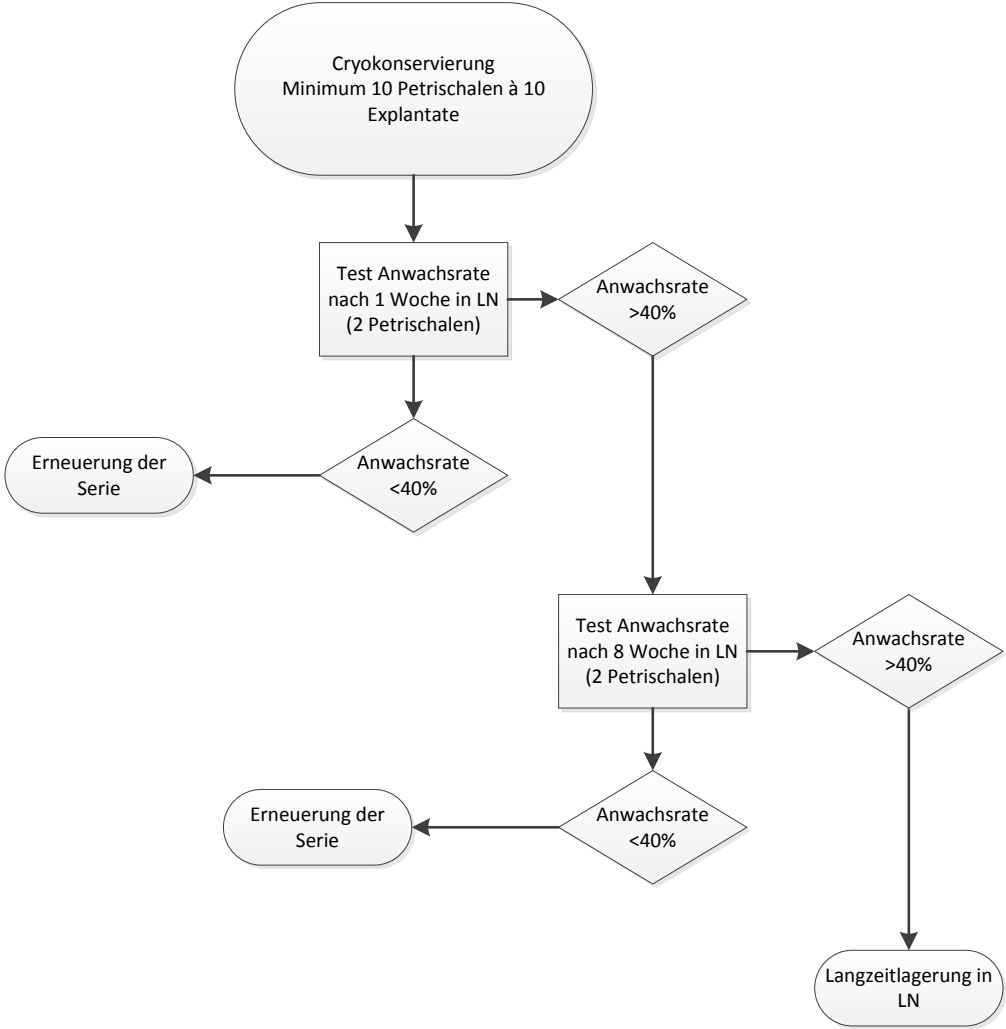


Abb. 1: Konzept zur Qualitätssicherung

2.5 Exemplarische Durchführung

Exemplarisch wurde die Qualitätssicherung mit der Sorte BE 11 durchgeführt, in definierten Abständen aufgetaut und bonitiert.

Tab. 3: Anwachsrate der Sorte BE11 nach 7, 56 und 100 Tagen in LN

Dauer (d) in LN	Anwachsrate in % (n=20, 2 Petrischalen)
7	60
56	50
100	60

Nach Engelmann (2004) kommt es während der Lagerung in Flüssigstickstoff zu keinen phänotypischen, biochemischen, chromosomalen oder molekularen Veränderungen. Kann diese Aussage mit weiteren Experimenten verifiziert werden, ist die Cryokonservierung eine sichere und effiziente Methode zur langfristigen Erhaltung.

Literatur:

- K.K Kartha., L. Leung et al (1980): Cryopreservation of strawberry meristems and mass propagation of plantlets. Journal of the American Society for Horticultural Science 105(4): 481-484.
- K.L. Caswell (2009): Recovery of plants from pea and strawberry meristems cryopreserved for 28 years, 2009, CryoLetters 30.
- F. Engelmann (2004): Plant Cryopreservation: Progress and Prospects, In vitro cellular & Developmental Biology – Plant, Volume 40, Issue 5, pp 427-433

Wädenswil, 26. Januar 2017

ZÜRCHER HOCHSCHULE FÜR ANGEWANDTE WISSENSCHAFTEN (ZHAW)
Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen (IUNR)
Forschungsbereich BIOLOGISCHE LANDWIRTSCHAFT

Julia Angstl

ANHANG I

Optimiertes Arbeitsprotokoll: Cryokonservierung von Erdbeeren

1 Einleitung

In diesem Arbeitsprotokoll werden die Protokolle von T. Niino et al. (2003): Cryopreservation of *in vitro*-grown apical shoot tips of strawberry by Vitrification und S. Yamamoto et al. (2012): Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of strawberry by the Vitrification method using aluminum cryo-plates auf die Anwendbarkeit und die Anwachsrate verglichen.

Beide Protokolle basieren auf dem Verfahren der Vitrifikation. Die Vitrifikation ist das Festwerden der Zellflüssigkeit durch Erhöhung der Viskosität während sie abgekühlt wird, wobei die Kristallisation ausbleibt und somit ein amorphes Material entsteht. Dies wird durch extrem schnelles Abkühlen in Flüssigstickstoff und im Zusammenspiel mit Zusätzen (Cryoprotektiva), die die Kristallisation verhindern erreicht.

2 Material und Methoden

2.1 Nährmedien

Alle Nährmedien basieren auf Murashige und Skoog Pflanzennährmedium zur Kultivierung von pflanzlichen Gewebekulturen.

MS-Erdbeer-Medium

4,4g/l MS in deionisiertem Wasser lösen,

+ 2,5% Sucrose (25g/l)

→ mit deionisiertem Wasser auf 1l auffüllen

→ pH messen, 5,8

+ 8,0g/l Agar lösen

→ Autoklavieren

+ 0,2mg/l BA (Benzyl Aminopurin), steril pipettieren

Medien in Becher (L*B*H = 10cm*8cm*6cm) ausgiessen, ca. 1cm Füllhöhe, 16 Becher/l

→ Beschriftung: Medium, Herstellungskalenderwoche



Abb.2: Ausgangsmaterial für die Cryokonservierung auf MS-Erdbeer-Medium, Sorte BE21.

MS-Preculture-Medium

- 4.4g/l MS in deionisiertem Wasser lösen,
- + 0,3M Sucrose (102,69g/l)
- + 2M Glycerol (184,2g/l)
- mit deionisiertem Wasser auf 1l auffüllen
- pH messen, 5,8
- + 8,0g/l Agar
- Autoklavieren

Medien in Petrischalen (ø 9cm) ausgießen, ca. 7mm Füllhöhe, ca. 40Schalen/l

- Beschriftung: Medium, Herstellungskalenderwoche

MS-Recovery-Medium

- 4,4g/l MS in deionisiertem Wasser lösen,
- + 2,5% Sucrose (25g/l)
- mit deionisiertem Wasser auf 1l auffüllen
- + 1g/l PVP (Polyvinyl pyrrolidone)
- pH messen 5,8
- + 8,0g/l Agar lösen
- Autoklavieren
- + 0,2mg/l BA, steril pipettieren

Medien in Petrischalen ausgießen, ca. 7mm Füllhöhe, ca. 40Schalen/l

- Beschriftung: Medium, Herstellungskalenderwoche

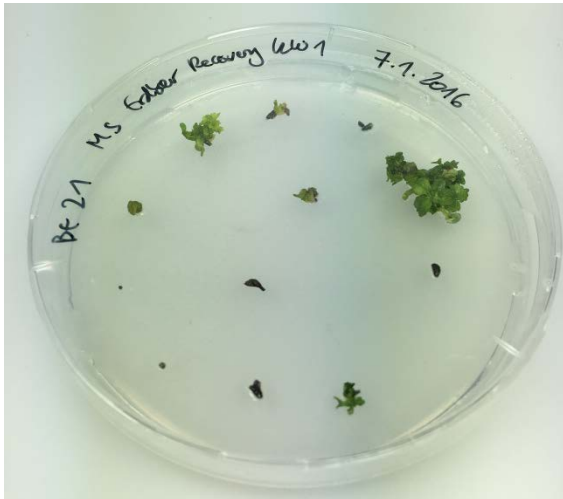


Abb. 3: Cryokonservierte Explantate von BE21 auf MS-Recovery-Medium.

2.2 Cryo-Lösungen

Die Cryo-Lösungen können vorbereitet und nach dem Autoklavieren im Kühlschrank gelagert werden. Von der Grundlösung wurden 2l, von allen anderen Lösungen 500ml hergestellt, von Natrium-Alginat und Calcium-Lösung 250ml.

Grundlösung

4,4g/l MS in deion. Wasser lösen
 + 0,4M Sucrose (136,92g/l)
 → gut lösen im Magnetrührer

Osmotic loading solution (für 500ml)

Grundlösung
 + 2M Glycerol (92,1g/500ml)
 → gut lösen im Magnetrührer

PVS2 (für 500ml)

Grundlösung
 + 30% w/v Glycerol = 150g/500ml
 + 15% w/v Ethylen Glycol = 75g/500ml
 + 15% w/v DMSO = 75g/500ml
 → gut lösen im Magnetrührer

Rinsing solution (für 500ml)

Grundlösung
 + 0,6M Sucrose (102,69g/500ml)
 → gut lösen im Magnetrührer

Sodium-Alginat (250ml, nur für Aluminium-Cryo-Plates)

2% w/v Sodium-Alginat = 5g/250ml

→ in Ethanol lösen, mit deionisiertem Wasser auffüllen und bis zu 24h im Magnetrührer rühren.

+ 4,4g/l MS calciumfrei (Spezialmischung von Duchefa)

→ gut lösen im Magnetrührer

Calcium-Lösung (250ml, nur für Aluminium-Cryo-Plates)

0,1M Calcium Chlorid = 2,77g/250ml

+ 1,18g/250ml MS Basal Medium

→ gut lösen im Magnetrührer

2.3 Pflanzmaterial

Das für die Experimente verwendete *in vitro* Pflanzmaterial wurde von Agroscope Changins zur Verfügung gestellt. An der ZHAW wurden die Sorten alle 6-8 Wochen auf neues MS-Erdbeer-Medium passagiert und unter Normalbedingungen bei +21°C und 16h Photoperiode weiterkultiviert.



Abb. 4: BE 11, 7 Wochen nach der letzten Passage.

2.4 Cold-hardening und Vorkultur

Zwei Wochen nach dem letzten Passagieren werden die *in vitro* Pflanzen bei +4°C und 8h Photoperiode in der Klimakammer für 20-30 Tage abgehärtet.

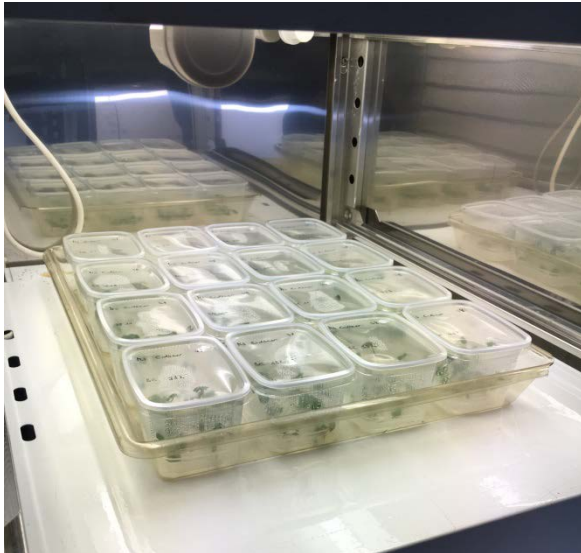


Abb. 5: Klimakammer zum Abhärten der *in vitro* Pflanzen

Aus den abgehärteten Sprossen wird das Meristem steril in einer *laminar flow*-Bench mit Hilfe einer Stereolupe (6,4-fache Vergrößerung) seziiert. Das Meristem besteht aus 1-2 Blattprimordia (erste erkennbare Entwicklungsphase von Blättern) und der Basalplatte (Bereich der Pflanze, in dem die Differenzierung zwischen Wurzel, Blatt und Stängel stattfindet) und hat eine Größe von 1,5-2,0mm.



Abb. 6: Erdbeer-Meristem mit 2 Blattprimordia und Basalplatte.

Je Petrischale werden zehn Meristeme auf MS-Preculture-Medium gesetzt und für 24h bei +4°C und 8h Photoperiode vorkultiviert.

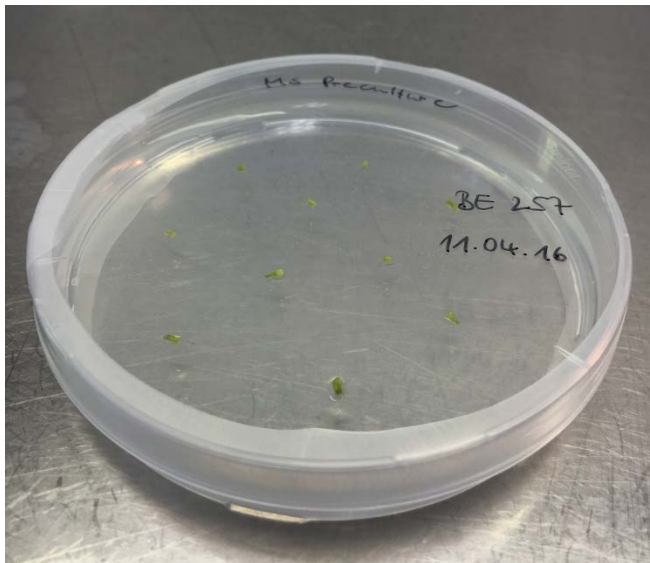


Abb.7: BE11-Meristeme auf MS-Preculture-Medium.

2.5 Vorbereitung Aluminium-Cryo-Plates

Die Alu-Plättchen (Spezialanfertigung von medic AG, 8180 Bülach) haben eine Grösse von:

Länge: 36mm

Breite: 7mm

Tiefe: 0,8mm

Vertiefungen oval: 2.5mm*1.5mm



Abb.8: Aluminium-Cryo-Plate von medic AG.

In jede Vertiefung des Alu-Plättchens werden 2,0-2,5µl calciumfreies Natrium-Alginat pipettiert.

Mit Hilfe einer Pinzette wird ein Meristem pro Vertiefung gegeben und leicht angedrückt.



Abb. 9: Aluminium-Cryo-Plates mit Erdbeermeristemen.

Anschliessend wird der Bereich mit den Vertiefungen und den Meristemen mit der Calcium-Lösung überdeckt (ca. 0,3ml total). Um eine komplette Polymerisation zu erhalten, muss die Lösung 15min bei Raumtemperatur einwirken.



Abb. 10: Aluminium-Cryo-Plates überdeckt mit Calcium-Lösung für die Polymerisation


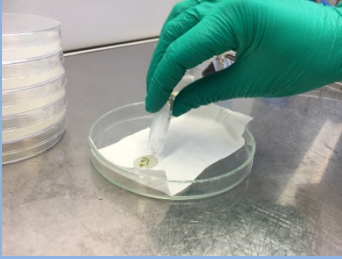
Nach der Einwirkdauer wird die Calcium-Lösung vorsichtig abpipettiert. Durch das Alginate-Gel haften die einzelnen Meristeme an den Aluminium-Plättchen.

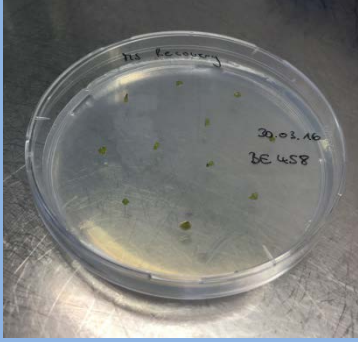
2.6 Vitrifikation nach T. Niino vs. Aluminium Cryo-plates nach S. Yamamoto

Tab. 1: Gegenüberstellung der Protokolle von T. Niino und S. Yamamoto.

Prozess	Vitrifikation nach T. Niino	Aluminium Cryo-plates nach S. Yamamoto
Osmotic loading solution (OLS)	<ol style="list-style-type: none"> (1) 2ml sterile Cryotubes mit 1ml OLS füllen (2) 10 Meristeme pro Cryotube mit einer Pinzette transferieren (3) Einwirkzeit: 20min, bei Raumtemperatur (4) OLS abpipettieren 	<ol style="list-style-type: none"> (1) Ein Pipettier-Reservoir mit 20ml OLS füllen und die Cryo-Plates eintauchen bis alle Meristeme bedeckt sind (2) Einwirkzeit 30min, bei Raumtemperatur (3) Cryo-Plates mit Pinzette herausnehmen
PVS2	<ol style="list-style-type: none"> (1) Cryotube mit 1ml PVS2 füllen (2) Einwirkzeit: 50min, bei Raumtemperatur (Zeit exakt einhalten!) (3) Während diesen 50min PVS2 1x durch frisches PVS2 ersetzen (4) PVS2 abpipettieren und durch 0,5ml frisches PVS2 ersetzen 	<ol style="list-style-type: none"> (1) Ein Pipettier-Reservoir mit 20ml PVS2 füllen und Cryo-Plates darin platzieren (2) Einwirkzeit: 50min, bei Raumtemperatur
Flüssigstickstoff (LN)	<ol style="list-style-type: none"> (1) Cryotubes verschliessen, mit Bleistift beschriften (2) direkt in LN tauchen 	<ol style="list-style-type: none"> (1) Cryo-Plates in 2ml sterile Cryotubes geben, beschriften (2) Cryotubes offen in Cryo-Cane stellen (3) Direkt in LN tauchen



<p>Auftauen</p>	<p>(1) Nach einer definierten Zeit in LN, Cryotubes herausnehmen, Achtung: Brille/Schutzmaske und Handschuhe tragen!</p> <p>(2) Im Wasserbad bei +35°C für 1min auftauen</p>  <p>(3) Achtung: Explosionsgefahr der Cryotubes beim Eintauchen, Schutzmaske und Handschuhe tragen!</p>	<p>(1) Cryo-Plates mit einer Pinzette aus den Cryotubes herausnehmen</p>
<p>Rinsing Solution</p>	<p>(1) PVS2 abpipettieren und mit 1ml Rinsing Solution ersetzen</p> <p>(2) 1x mit frischer Rinsing Solution wiederholen</p> <p>(3) Einwirkzeit gesamt: 20min</p>	<p>(1) Cryo-Plates in Pipettier-Reservoir mit 20ml Rinsing Solution tauchen</p> <p>(2) Einwirkzeit: 15min, bei Raumtemperatur</p>
<p>MS-Recovery-Medium</p>	<p>(1) Cryotube auf sterilem Filterpapier ausgießen</p>  <p>(2) Meristeme leicht antrocknen lassen</p> <p>(3) Meristeme auf MS-Recovery Medium transferieren. (10Stk/Petrischale)</p> <p>(4) 5-7d bei +4°C und 8h Photoperiode</p> <p>(5) Weiterkultur unter Normalbedingungen bei +21°C und 16h Photoperiode</p>	<p>(1) haftende Meristeme mit einer Pinzette von den Aluminium-Plättchen lösen und auf sterilem Filterpapier antrocknen.</p> <p>(2) Weitere Schritte analog Vitrifikation nach T. Niino</p>

		
Bonitur der Anwachsrate	5-8 Wochen nach dem Auftauen	5-8 Wochen nach dem Auftauen

2.7 Laboreinrichtungen und Verbrauchsmaterial

- sterile Bench mit Sterilisierer
- Klimakammer für Abhärtung und Vorkultur bei +4°C, incl. Beleuchtung
- Kühlschrank zur Lagerung der Lösungen
- Autoklaviergerät
- Cryotank incl. Racks und Boxen
- Waage (2 Kommastellen)
- pH-Messgerät
- Magnetrührer incl. Magnete
- Stereolupe
- Pipette 100-1000µl mit Pipettenspitzen
- 2ml Cryotubes verschliessbar
- Aluminium-Cryo-Plates
- Petrischalen (∅ 9cm)
- Becher mit Deckel (L*B*H = 10cm*8cm*6cm)
- Schottflaschen
- Messbecher/Zylinder
- Skalpell
- Pinzette
- Glaspetrischale
- Steriles Filterpapier
- Stoppuhren
- Weiteres Verbrauchsmaterial (Produkte für die Herstellung der Nährmedien und Lösungen, 70%iges Ethanol, Falcon Tubes, Tücher, Ersatzklingen usw.)

3 Ergebnisse

Tab. 2: Resultate der Anwachsrate in %, Versuchsgrösse n=10, 05-NAP-P67 Projektjahr 2016

Sorte	Vitrifikation T. Niino			Cryo-Plates S. Yamamoto			
	1	2	3	4	5	6	Ø
533	60	70	70	60	50	50	60
332	60	80	80	60	70	60	68.33
21	50	80	70	50	70	60	63.33
458	50	60	60	40	60	50	53.33
11	70	40	60	50	60	80	60
257	50	40	60	20	50	60	46.66
239	40	50	60	50	40	60	50
433	-	-	70	-	-	50	60
248	Testreihe 2017						
274	Testreihe 2017						

Die Anwachsrate wird nach 7-9 Wochen bonitiert. Zeigt sich ein grüner Austrieb, kann das Explantat als lebend bewertet werden.

BE 433 wurde in KW20 geliefert und musste aufgrund der geringen Menge an Explantaten vor den ersten Versuchsreihen 2x passagiert werden. BE 248 und BE 274 konnten 2016 nicht zur Verfügung gestellt werden.

4 Diskussion

Beide Methoden erfordern Laborerfahrung, sind jedoch unter Anleitung oder mithilfe des Protokolls erlernbar. Wichtig bei der *in vitro* Kultur und Cryokonservierung ist das sterile Arbeiten in der Laminar Flow Bench mit sterilen und/oder autoklavierten Werkzeugen und Materialien. Das Sezieren der 1,5-2,0mm grossen Meristeme unter der Stereolupe stellt die grösste Herausforderung dar und benötigt Erfahrung sowie Einarbeitungszeit. Wichtig ist das exakte Einhalten der Zeitangaben für die Einwirkdauer der Cryoprotektiva. Ein Einsatz von Stoppuhren ist empfehlenswert. Sämtliche Arbeitsschritte können durch eine Person ausgeführt werden.

Medien und Cryoprotektiva sind bei beiden Methoden identisch. Die Vitrifikation mit den Aluminium-Cryo-Plättchen benötigt im Vergleich zur Vitrifikation nach T. Niino einen Zwischenarbeitsschritt um die Meristeme mit Alginat-Gel auf den Plättchen anzuhafte. Arbeitet man mit grösseren Batches einer Sorte (>5 Plättchen/Sorte), ist diese Methode in den darauf folgenden Arbeitsschritten sehr effizient. Bei kleineren Versuchsreihen ist der Verbrauch an Cryoprotektiva um die Pipettier-Reservoirs mit 20ml zu füllen grösser als bei der Methode nach T. Niino. Da sich einzelne Meristeme von den Plättchen lösen können, muss für jede Sorte ein separates Pipettier-Reservoir verwendet werden, damit es zu keinen Verwechslungen kommt. Die Plättchen können mehrmals verwendet und autoklaviert werden.

Die Vitrifikation nach T. Niino wurde dreimal nach Protokoll durchgeführt. Es waren keine Anpassungen notwendig.

Bei der Methode nach S. Yamamoto mit den Aluminium-Plättchen mussten aufgrund abweichender Laboreinrichtungen an der ZHAW Anpassungen vorgenommen werden:

1. Da in den Versuchsreihen jeweils mit 2 Aluminium-Plättchen pro Sorte gearbeitet wurde, sind die Pipettier-Reservoirs durch 2ml Cryo-Tubes ersetzt worden. Dadurch kann der Verbrauch an Cryoprotektiva reduziert und eine Verwechslung der Sorten verhindert werden.
2. Der LN-Tank an der ZHAW ist nicht wie im Protokoll beschrieben für Cryo-Canes eingerichtet (s. Abb. 11), sondern für 10x10cm grosse Cryoboxen aus Karton (s. Abb. 12). Zudem ist im publiziertem Protokoll nicht ersichtlich, wie die Tubes in den Cryo-Canes offen ohne Verschluss direkt in LN getaucht werden können. Dies führte zu weiteren Anpassungen der Abläufe:

Nach 50min in PVS2 wurden die Cryo-Plättchen in den 2ml Tubes belassen und erneut mit 1ml PVS2 Lösung aufgefüllt, verschlossen und in LN getaucht. Bei einer Versuchsreihe ohne zugegebenes PVS2 explodierten diese beim Auftauen!



Abb. 11: Cryo-Canes der Firma Sigma Aldrich, www.sigmaaldrich.com



Abb. 12: verwendete Cryobox aus Karton der Firma Labtec, www.labtec-services.ch

Achtung: bei allen Arbeiten mit dem Cryotank und beim Auftauen der Tubes Schutz-ausrüstung tragen.



Abb.13: Nötige Schutz-ausrüstung bei den Arbeiten mit LN-Tank.

5 Fazit

Bei der Anwachsrate gibt es nach der Durchführung der Versuche im Projektjahr 2016 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Methoden nach T. Niino und S. Yamamoto.

Entscheidend für die Wahl der Methode ist die Batchgrösse. Bei mehr als 5 Plättchen pro Sorte ist das Verfahren mit den Aluminium-Plättchen effizienter, bei kleineren Versuchsgrössen eignet sich die Vitrifikation nach T. Niino.

Da es sich bei den Aluminium-Plättchen um eine Spezialanfertigung handelt sind die Kosten mit ca. 28CHF/Stück nicht zu vernachlässigen.

Zu den Unterschieden zwischen den beiden Gruppen „guter Wuchs *in vitro*“ und „problematisch *in vitro*“ kann noch keine abschliessende Aussage gemacht werden, da die Sorten BE 248 und BE 274 erst 2017 behandelt werden können.