

**Slutrapport for projektet ”Introduktion af vildarts-funktionalitet i kartoffel”
maj – december 2006**

22. februar, 2007

Kort beskrivelse af projektets plan

I projektet er målet at generere kartoffellinier med nye specifikke stivelseskvaliteter ved at benytte sig af vildartsvariation ved cellefusionsteknikken, hvilket er en ikke-GMO teknik. Projektet er en fortsættelse af det KAF finansierede projekt som initieredes i 2005 med udgangspunkt i at forbedre to vigtige kvalitetsparametre i stivelsen, stivelsens fosforyleringsgrad og amylopektinindhold ved kombineret krydsnings og cellefusions strategier. Projektet finansieres i denne omgang af KAF og af KMC med medfinansiering fra LIFE-KU samt LKF. Dihaploide *S. tuberosum* linier og diploide vildtype arter med de nye ønskede egenskaber fra LKFs forædlingsmateriale (se tabel). Disse linier er delt ind i to partnergrupper baseret på genotype. Disse linier er fusioneret parvis i forskellige kombinationer med hensigt at producere tetraploide linier med ønskede egenskaber.

Partner 1	Partner 2
05-IBI-14	05-IBX-02 05-IBX-11 05-IBX-20 05-IBZ-03 05-IBZ-18
05-IBM-11 05-IBM-19	05-IBN-03 05-IBN-04 05-IBN-06

Tabel 1. Plantelinier brugt for celle fusion.

Planlagt tidsforløb for projektet

1. Måned 1-2: Screening af cellefusion af alle linier.
2. Måned 3: Cellefusion af selekterede linier
3. Måned 4-5: Første celledeling af somatiske hybrider
4. Måned 6: Skud isoleret fra kallusvæv, screening og selektion af hybrider
5. Måned 7-8: Opformering af udvalgte plantelinier

Kort beskrivelse af opnåede resultater

Det er lykket i projektperioden at optimere fusionsteknikken og opnå at producere kallusvæv med fornuftig morfologi (se billede bilag 3). Det første kritiske punkt efter fusionen er blevet overkommet. I de 8 forskellige fusionseksperimenter, der er blevet foretaget, er det lykket at optimere betingelser for de første trin til at producere høj frekvens af morfologisk sunde kalli. Specielt er der blevet fokuseret på at modulere lysforhold, luftning af medierne samt fjernelse af potentielle toxiner der dannes i medierne. De fleste af disse problemer ser nu ud til at være løst.

Problemerne med at få kalli at vokse i tilstrækkelig hastighed har medført at vi er kommet noget bag ud i planen. Gode kalli er blevet produceret men disse skal have tid at vokse sådan at regenerering af skud kan ske. Derfor er målene 4 og 5 i vores plan ikke opnået. Disse mål forventes at kunne opnås indenfor et par måneders tid hvis der kan blive støtte til dette. Indtil videre afprøves udvalgte tiltag for at optimere kallusvækst med støtte fra Plantebiokemis Laboratorium.

Detaljeret beskrivelse af opnåede resultater

Generering af protoplaser og fusionering

Der er i projektperioden foretaget 8 separate fusionseksperimenter (se bilag 1). I projektets start blev der fokuseret på at løse nogle specifikke problemer med at effektivisere fusionsprotokollet. Den første forandring i proceduren var at skifte fusionsapparat til BIOJET CF 50 og at optimere fusionsparametrene for dette apparatur. Instrumentet er til låns fra LKF. Dette apparatur har gjort det væsentlig lettere at styre fusionsparametrene, teste forskellige parametre og sikre ensartede forsøgsbetingelser.

Der er også blevet optimeret på metoden til protoplastisolering, bl.a. ved ny enzym-sammensætning, hvilket har medført en væsentlig forøgelse i mængden af protoplaster. De kartoffellinier der er blevet brugt er delt ind i 2 grupper med hver to grupper af partnere (se tabel 1). Partner 1 giver generelt rigtig godt udbytte af protoplaster, imens partner 2 nogen gange ikke har givet optimalt udbytte. I få tilfælde har der ikke blevet genereret protoplaster i tilstrækkelig mængde for videre fusionering. I de fleste tilfælde er der imidlertid blevet produceret protoplaster i tilstrækkelig mængde til at gennemføre en protoplastfusioner.

Generering af kallus fra protoplast fusions produkter

Efterfølgende vækst på flydende medium fungerer godt og kalli i størrelser op til en til et par mm er blevet produceret. Kalli har god størrelse og facon (se bilag 2). At generere levende kallus opfattes generelt som det største problem og det er derfor godt at vi i projektet har lykkedes overkomme dette trin.

Problemer har imidlertid opstået ved flyt af kalli over til fast medium for regenerering af skud hvor de genererede kalli ikke har overlevet. Der har derfor i projektets senere del satset på at finde en løsning på dette problem og der fokuseres nu på at få kalli til en størrelse der kan bruges til at regenerere skud. I en første omgang er vi prøvet at regulere lysforholdet i vækstkamrene. Dette har desværre ikke tilstrækkeligt forbedret situationen. De strategier der skal bruges omfatter at flytte kallus over til større kolbe og øge tilførsel af luft i mediet ved at øge omrøring og have større volumen. Resultater fra disse forsøg er beskrevet for neden.

Plantemateriale

Generelt ser planterne bedre ud end i de forrige perioder - planterne er muligvis blevet tilvænnet vores dyrkningsbetingelser og/eller vores dyrkningsfaciliteter er blevet mere

stabile. Det betyder at vi nu kan isolere planter efter 3 uger (i nogen tilfælde 4 uger) med tilfredsstillende antal protoplaste, hvor vi tidligere har måtte vente længere på at få tilstrækkeligt med plantemateriale. Det er kendt at hvis plantematerialet er for gammelt, kan det give problemer med regenerering.

Ny forbedret dyrkningsmetode

Vi har i de tidligere forsøg set at delingerne - og kalli igangsættes - men stopper derefter. Nogle kalli degenererer (se billede bilag 2). Det kan der være flere grunde til, bl.a. at de ikke får nok ilt - især når de står længere tid i flydende kultur og at de udvikler skadelige stoffer der hæmmer udviklingen. Vi har i denne periode prøvet at binde disse stoffer via aktive kul immobiliseret i agarose kugler i det flydende medium. For at øge ilt tilførselen i mediet, har vi siden sidst skiftet til at bruge 25- og 100 mL Erlenmyer-kolber i stedet for petriskåle. Da det ikke fungerede optimalt med at dække kolberne med stanniol - bl.a. p.g.a. infektion, blev der indkøbt autoklaverbare "Steristopfen" propper. Disse gav dog for stor fordampning, men en kombination af propper, stanniol og film viste sig at være en god løsning. For at yderligere øge ilttilførselen, har vi udover de nye kolber (og propper), sørget for hurtigere at få fusioner samt kontroller på omrystnings-/vippebord - det hjælper med at "trække" ilten ned i mediet.

Igangværende forsøg og forsøg planlagte i den nære fremtid

Da det ikke er lykkedes at overføre kalli til fast medie, formentlig på grund af for små kalli, er det nødvendigt at yderligere stimulere væksten så vi får større kallus (3-4 mm). Udover de ovenstående beskrevne tiltag, er længere tid i medie og mere medie nødvendig. Der kan også moduleres på hormonsammensætningen undervejs i regenereringen og tilsættes detergent til det flydende medie i starten - sidstnævnte kan være med til at påvirke membranen gennem interaktion med lipider og proteiner og/eller øger cellens optag af næringsstoffer, vækst regulatorer og ilt. Alt dette testes i øjeblikket.

Hvis ikke de nye tiltag løser vores problemer, vil skift af mediet undervejs (i stedet for blot at tilsætte mere) prøves. Dette er mere kompliceret og skal gøres forsigtig da kalli er fragile. Til sidst kunne forsigtig centrifugering og/eller filtrering, semi-flydende medium andre detergenter, f.eks. Pluronic F-68, og alternativt kemisk fusion overvejes for at yderligere optimere kallus udvikling.

Bilag 1.

Log for fusionseksperimenter i projektperioden

Alle medier og andre opløsninger er de samme som er blevet brugt og rapporteret i den forrige projektperiode i 2005.

Protoplast fusion af højamylosekloner d.11/7-06

D.7/7-06:

Planter fra d.6/6 placeret mørkt.

D.10/7-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBM-11	05-IBN-04 #1
05-IBM-19	05-IBN-04 #2
Partner 2 planterne så lettere stresset ud. Partner 1 planter så fine ud. Isolering påbegyndt. Der blev brugt 3 boxe af hver (2*3 af 05-IBN-04).	

D.11/7-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

Der blev set mange flere protoplastre ind tidligere - ny cellulase blev brugt til isolering, så der har muligvis været problemer med den gamle.

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~1mL (Partner 2) og ~2mL (Partner 1) 0,5M Mannitol, og talt v.h.a tællekammer (ca. antal):

Linie:	PP / 0,0000125 mL	PP / mL
05-IBN-04 #1	50	4,0E+06
05-IBN-04 #2	45	3,6E+06
05-IBM-11	45	3,6E+06
05-IBM-19	40	3,2E+06
Alle linier blev fortyndet yderligere 2x til henholdsvis 2 og 4mL.		

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Fusion nr.:	Partner 1:	Partner 2:

1	05-IBM-11	05-IBN-04 #1
2	05-IBM-11	05-IBN-04 #2
3	05-IBM-19	05-IBN-04 #1
4	05-IBM-19	05-IBN-04 #2
5	05-IBM-11	05-IBN-04 #1
6	05-IBM-11	05-IBN-04 #2
7	05-IBM-19	05-IBN-04 #1
8	05-IBM-19	05-IBN-04 #2
9	05-IBM-19	05-IBN-04 #1
10	05-IBM-19	05-IBN-04 #2
11	05-IBM-11	05-IBN-04 #2

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en lille petriskål og tilsættes 500µL VKM. (Elektroderne skylles med VKM).

Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500µL + 500µL VKM). Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.12/7-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 1mL VKM.

D.14/7-06:

Der er tilsat yderligere 2mL VKM og er blevet placeret ved svag omrystning og svagt lys.

D.17/7-06:

Fusionsprodukter + kontroller inspiceret; begyndende delinger/mikrocalli. Flyttet til større petriskåle og tilsat 2mL VKM.

D.24/7-06:

Der er tilsat yderligere 1mL VKM og er placeret på lab.bord uden omrystning.

D.27/7-06:

2 mL på fast medie (MS6899 + 2mg/L Zeatin og 0,1mg/L NAA) - til resten er tilsat 2 mL VKM: 1, 2, 3, 4, 7, IBN-04#1, IBM-11 og IBM-19

Inficeret og derfor smidt ud: 5, 6 og 8

De resterende: 9, 10, 11 og IBN-04#2

Protoplast fusion af højamylosekloner d.13/7-06

D.10/7-06:

Planter fra d.13/6 placeret mørkt.

D.12/7-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBI-14	05-IBZ-03 05-IBZ-18

Partner 2 planterne så lettere stresset ud. Partner 1 planter så fine ud.
Isolering påbegyndt.
Der blev brugt 3 boxe af hver. 05-IBI-14 så ud til at give meget plantemateriale, så her blev tilsat dobbelt mængde enzym (10mL).

D.13/7-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

Igen så vi mange protoplastre (samme mængder som d.11/7).

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~2mL (Partner 2) og ~4mL (Partner 1) 0,5M Mannitol.

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Fusion nr.:	Partner 1:	Partner 2:
1	05-IBI-14	05-IBZ-03
2	05-IBI-14	05-IBZ-18
3	05-IBI-14	05-IBZ-03
4	05-IBI-14	05-IBZ-18
5	05-IBI-14	05-IBZ-03
6	05-IBI-14	05-IBZ-18
7	05-IBI-	05-

	14	IBZ-03
8	05-IBI-14	05-IBZ-18
9	05-IBI-14	05-IBZ-03
10	05-IBI-14	05-IBZ-18
11	05-IBI-14	05-IBZ-03
12	05-IBI-14	05-IBZ-18

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en lille petriskål og tilsættes 500µL VKM. (Elektroderne skylles med VKM).

Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500µL + 500µL VKM). Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.14/7-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 1mL VKM.

D.17/7-06:

Der er tilsat yderligere 2mL VKM og er blevet placeret ved svag omrystning og svagt lys.

D.19/7-06:

Fusionsprodukter + kontroller inspiceret; masser af mikrocalli. Flyttet til større petriskåle og tilsat 2mL VKM.

D.24/7-06:

Der er tilsat yderligere 1mL VKM og er placeret på lab.bord uden omrystning.

D.27/7-06:

2 mL på fast medie (MS6899 + 2mg/L Zeatin og 0,1mg/L NAA)

- til resten er tilsat 2 mL VKM: 1, 2, 3, 4, 6, 7, IBI-14, IBZ-03 og IBZ-18

Inficeret og derfor smidt ud: 5

De resterende: 8, 9, 10, 11 og 12

Protoplast fusion af højamylosekloner d.18/7-06

D.14/7-06:

Planter fra d.6/6 placeret mørkt.

D.17/7-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBM-11	05-IBN-06
Partner 2 planterne så lettere stresset ud. Partner 1 planter så fine ud. Isolering påbegyndt. Der blev brugt 3 boxe af hver.	

D.18/7-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~2mL (Partner 2) og ~3mL (Partner 1) 0,5M Mannitol.

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Der er lavet 6 fusioner mellem de to linier.

Fusion nr.5 og 6 har fået 30 min. hvile efter fusion før VKM tilsættes (i stedet for 10 min.).

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en lille petriskål og tilsættes 500µL VKM. (Elektroderne skylles med VKM).

Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500µL + 500µL VKM).

Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.19/7-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 1mL VKM.

D.21/7-06:

Inspiceret: ikke meget at se.

Der er tilsat yderligere 2mL VKM og er blevet placeret ved svag omrystning og svagt lys.

D.24/7-06:

Flyttet til større petriskåle og tilsat 3mL VKM.

Der er tilsat yderligere 1mL VKM og er placeret på lab.bord uden omrystning.

D.27/7-06:

2 mL på fast medie (MS6899 + 2mg/L Zeatin og 0,1mg/L NAA)

- til resten er tilsat 2 mL VKM: 2, 3, 5, IBM-11 og IBN-06

Inficeret og derfor smidt ud: -

De resterende: 1, 4 og 6

Protoplast fusion af højamylosekloner d.22/8-06

D.18/8-06:

Planter fra d.19/7 placeret mørkt.

D.21/8-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBM-19	05-IBN-06
Isolering påbegyndt. Der blev brugt 3 boxe af hver.	

D.22/8-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~2mL (Partner 1) og ~3mL (Partner 2) 0,5M Mannitol.

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Der er lavet 7 fusioner mellem de to linier.

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en lille petriskål og tilsættes 1mL VKM. (Elektroderne skylles med VKM).
Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500µL + 1000µL VKM).
Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.24/8-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 2mL VKM.

D.28/8-06:

Der er tilsat yderligere 2mL VKM.

D.30/8-06:

Der er tilsat yderligere 2mL VKM.
Placeret med lys (3,4,7 og ibm-19) / svagt lys.

D.1/9-06:

De plader der var placeret ved svagt lys stilles i normalt lys.

Protoplast fusion af højamylosekloner d.25/8-06

D.14/8-06:

Planter fra d.25/7 placeret mørkt.

D.21/8-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBI-14	05-IBZ-18
	05-IBX-20

Isolering påbegyndt.
Der blev brugt 2 boxe af 05-IBI-14 og 3 boxe af hver partner 2.

D.25/8-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~3,5mL (IBI-14), ~1,5mL (IBZ-18) og ~1mL (IBX-20) 0,5M Mannitol.

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Fusion 1-3 med IBX-20.

Fusion 4-8 med IBZ-18

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en lille petriskål og tilsættes 1mL VKM. (Elektroderne skylles med VKM).
Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500µL + 1000µL VKM).
Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.28/8-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 2mL VKM.

D.30/8-06:

Der er tilsat yderligere 2mL VKM.

D.1/9-06:

Der er tilsat yderligere 2mL VKM.
Placeret med lys / svagt lys (2,3,5,8 og kontrol ibx-20).
Fusion nr. 7 var inficeret.

D.4/9-06:

De plader der var placeret ved svagt lys stilles i normalt lys.

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 4/10-06

D.28/9-06:

Planter fra d.11/9 placeret mørkt.

D.3/10-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBI-14	05-IBZ-18
	05-IBZ-03

Isolering påbegyndt.
Der blev brugt 3 boxe af hver.

D.4/10-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~3,5mL (IBI-14), ~2mL (IBZ-18) og ~1mL (IBZ-03) 0,5M Mannitol.

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Fusion 1 og 2 med IBZ-03.

Fusion 3-7 med IBZ-18.

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en lille kolbe (autoklaveret dækket med staniol) .

og tilsættes 500µL VKM (Elektroderne skylles med VKM).

Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500µL + 500µL VKM).

Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.9/10-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 3mL VKM.

Placeret på rystebord ved svagt lys.

D.11/10-06:

Der er tilsat yderligere 2mL VKM.
Placeret på vippebord ved normalt lys.
Fusion nr.3 inficeret og derfor kasseret.

D.13/10-06:

Der er tilsat yderligere 1 mL VKM.

D.20/10-06:

Fusioner inspiceret: Flere er inficeret og væksten ellers gået i stå. Kalli stadig for små.

Protoplast fusion af højamylosekloner d.9/11-06

D.6/11-06:

Planter fra d.19/10 placeret mørkt.

D.8/11-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBM-19	05-IBN-04
	05-IBN-06

Isolering påbegyndt.

Der blev brugt 3 boxe af hver.

D.9/11-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~5mL (IBM-19), ~3mL (IBN-04) og ~2mL (IBN-06)

0,5M Mannitol.

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Fusion 1 til 6 med IBN-06.

Fusion 7 til 16 med IBN-04.

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en 25mL kolbe (steriliseret med Steristopfen-prop) .

og tilsættes 500 μ L VKM (Elektroderne skylles med VKM).
Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500 μ L + 500 μ L VKM).
Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.10/11-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 1mL
VKM.

D.14/11-06:

Der er tilsat 1mL VKM + kul-substrat (10 μ L/mL VKM i total volumen
(3mL)).

Placeret på rystebord ved svagt lys.

D.16/11-06:

Der er tilsat yderligere 1 mL VKM.

D.17/11-06:

Der er tilsat yderligere 0,5 mL VKM.

Placeret på vippebord ved normalt lys.

D.20/11-06:

Der er tilsat yderligere 2,5 mL VKM.

D.28/11-06:

Udvalgte fusioner og kontroller inspicereres.

Protoplast fusion af højamylosekloner d.16/11-06

D.10/11-06:

Planter fra d.19/10 placeret mørkt.

D.15/11-06:

Følgende linier er udvalgt til protoplast isolering og fusion:

Partner 1	Partner 2
05-IBM-11	05-IBN-03

Isolering påbegyndt.

Der blev brugt 3 boxe af hver.

D.16/11-06:

Isolering af protoplastre fortsat.

De isolerede protoplastre blev resuspenderet i ~3mL (IBM-11) og ~1mL (IBN-03)
0,5M Mannitol.

Fusion:

Følgende parametre er brugt til fusionerne:

AC-field		Pulse		Multipulse		Pre - AC - Post	
V	kHZ	V	µs	Nr.	s (delay)	s	s
9,8	1000	189	50	1	-	60	30

Fusionsvolumen: Der er brugt 250µL af begge partnere.

Der var materiale til 2 fusioner samt en kontrol af IBN-03 og 3 kontroller med IBM-11

Ca. 10 min efter fusion, overføres fusionsprodukt til en 25mL kolbe (steriliseret med Steristopfen-prop) .
og tilsættes 500µL VKM (Elektroderne skylles med VKM).
Placeres mørkt.

Der blev ydermere lavet kontroller af alle linier uden fusion (500µL + 500µL VKM).
Kontroller blev ligeledes placeret mørkt.

D.17/11-06:

Alle fusionsprodukter + kontroller blev tilsat yderligere 1mL VKM.

D.20/11-06:

Der er tilsat 1mL VKM + kul-substrat (10µL/mL VKM i total volumen (3mL)).
Placeret på rystebord ved svagt lys.

D.22/11-06:

Der er tilsat yderligere 2 mL VKM.

D.24/11-06:

Der er tilsat yderligere 2 mL VKM.
Placeret på vippebord ved normalt lys.

D.28/11-06:

Udvalgte fusioner og kontroller inspiceres.

Bilag 2: Eksempel på kalli produceret i projektperioden. 1. Kallus cirka 2 mm stor med godkendt morfologi. 2. Degenereret kallus.



IBM-11 + IBN-03 Fusion nr.1 d.16/11-06