

Slutrapport for projektet "Introduktion af vildarts-funktionalitet i kartoffel" maj – december 2007

Projektets mål er at generere kartoffellinier med nye specifikke stivelseskvaliteter ved at benytte sig af vildartsvariation ved cellefusionsteknikken, hvilket er en ikke-GMO teknik.

Normale forædlede kartofler har fire genopsætninger og er altså tetraploider og det er svært at forædle specifikke egenskaber direkte fra disse sorter. Dihaploide *S. tuberosum* linier og diploide vildtype arter med kun to genopsætninger er blevet fremtaget med nye ønskede stivelses egenskaber. For dette formål findes dihaploide og diploide forædlingsmateriale fra det forrige KAF projekt. Disse kan anvendes for at generere tetraploide somatiske hybrider med de ønskede stivelseskvaliteter som kan videreforædles til helt nye kartoffelsorter.

Partnerlinier for cellefusion:

| 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 |
| Kontrol 1 | Kontrol 2 |
| 90-0-16-11 | 88-0-05-08 88-0-07-09 |

I perioden er yderligere linier Kontrol 1 samt Kontrol 2, blevet inkluderet som ekstra kontrol for at cellefusionsmetodikken er optimal.

I den forrige projektperiode (2006) har vi genereret få celleklumpe, mikrokalli, fra cellefusionsprodukter af en del af disse partnere. I det nuværende projekt er målsætningen at der skal genereres større mængde kallus samt skud og planter fra disse kalli. Skud skal omgående leveres i projektets slutfase til LKF for opformering dyrkning.

Procedure og forløb

Der er i perioden blevet foretaget 13 omgange cellefusionseksperimenter hvor et antal par linje per eksperiment er blevet fusioneret. I alt 19 fusioner er blevet foretaget i perioden. Kallus er blevet regenereret for de fleste af disse fusioner. Typisk er der blevet genereret protoplaster fra 4-6 linjer / eksperiment og typisk er der blevet fusioneret 2 par per eksperiment. Det er typisk blevet dannet 20 – 50 % intakte protoplaster. Mange af disse bliver ødelagt under den følgende procedure hvilket har mindsket udbyttet. Proceduren er derfor optimeret

undervejs for at øge udbyttet. Efter fusion registreres cellerne og fusionerede celler identificeres. De genererede fusionsprodukter inkuberes på flydende medium i små E-kolbe, medium er skiftet regulært og kallusdannelse er kontrolleret ved mikroskopi. Der er noget tab ved inficering med svampe eller bakterier. Synlige kalli flyttes over til fast medium (agar plader) og udviklingen følges ved mikroskopi. Denne procedure repeteres i nogle måneder. Hvert fusionseksperiment er beskrevet i mere detalje for neden i bilag 1.

Typiske kalli er blevet fotograferet (se figurer, Bilag 2). Generelt klarer sig kallus der er frit flydende i det flydende medium fint på fast medium. Kallus der sidder fast på kanten på kolben danner derimod ikke velformet kallus og kan ikke bruges videre.

Der er i perioden genereret cirka 20 kalli med fornuftig facon. Disse inkuberes nu på regenereringsmedium. Kalli overlever generelt i flere uger på fast medium men vokser meget langsomt. Dette gælder også de kontrollinjer der er blevet fusioneret. Der er blevet foretaget tests med forskellige media for at søge løse dette problem. I den sidste periode er der blevet flyttet kallus over til skud medium for at få regenereret planter. Vi afventer resultater fra disse forsøg.

Detaljeret log over hvert eksperiment er beskrevet i Bilag 3.

Bilag 1

Partnere i fusions eksperimenter

(log for hele forsøgsperioden med detaljeret information inkluderet alle fusioner er bilagt (bilag 3))

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 30-05-07:

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| 05-IBI-14 | 22-1 | 05-IBZ-18 05-IBM-11 | 22-2 22-3 |
| 90-0-16-11 | 22-5 | 88-0-07-09 | 22-6 |

Følgende partnere er fusioneret:

22-1 + 22-2
22-3 + 22-4
22-5 + 22-6

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 19-06-07:

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 05-IBI-14 | 25-4 | 05-IBZ-18 05-IBZ-03 05-IBX-20 | 25-3 25-2 25-1 |
| 90-0-16-11 | 25-6 | 88-0-07-09 | 25-5 |

Følgende partnere er fusioneret:

25-1 + 25-4
25-2 + 25-4
25-3 + 25-4
25-5 + 25-6

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 17/7-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 05-IBM-11 | 29-1 | 05-IBN-03 05-IBN-04 05-IBN-06 | 29-2 29-3 29-4 |
| 90-0-16-11 | 29-5 | 88-0-07-09 | 29-6 |

Problem med protoplastoprensning, ingen fusion.

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 23/7-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 05-IBI-14 | 30-1 | 05-IBZ-18 05-IBZ-03 05-IBX-20 | 30-2 30-4 30-3 |
| 90-0-16-11 | 30-5 | 88-0-07-09 | 30-6 |

Følgenden partnere er fusioneret:

30-1 + 30-2

30-5 + 30-6

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 13/08-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|---|--|
| 05-IBI-14 | 33-1 | 05-IBX-02 05-IBX-11 05-IBX-20 05-IBZ-03 05-IBZ-18 | undladt 33-3 undladt 33-2 33-4 |
| 90-0-16-11 | 33-5 | 88-0-07-09 | 33-6 |

Ingen fusion

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 27/08-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 05-IBM-19 05-IBM-11 | undladt* 35-1 | 05-IBN-03 05-IBN-04 05-IBN-06 | undladt* 35-2 35-3 |
| 90-0-16-11 | 35-4 | 88-0-07-09 | 35-5 |

Ingen fusion

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 11/09-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|---|--|
| 05-IBI-14 | 37-1 | 05-IBX-02 05-IBX-11 05-IBX-20 05-IBZ-03 05-IBZ-18 | 37-2 undladt undladt undladt undladt |
| 90-0-16-11 | 37-3 | 88-0-07-09 | 37-4 |

Følgende partnere er fusioneret:

37-3 + 37-4

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 25/09-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------------------|-----------------------|-------------------------------------|--|
| 05-IBM-19 05-IBM-11 | 39-1 39-2 | 05-IBN-03 05-IBN-04 05-IBN-06 | 39-3 39-4 Undladt, dårlige planter |
| 90-0-16-11 | 39-6 | 88-0-07-09 | 39-5 |

Følgende partnere er fusioneret:

39-1+3

39-1+4

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 23-10-07:

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|---|--------------------------------------|
| 05-IBI-14 | 43-1 | 05-IBX-02 05-IBX-11 05-IBX-20 05-IBZ-03 05-IBZ-18 | 43-2 43-3 43-4 43-5 43-6 |
| 90-0-16-11 | 43-7 | 88-0-07-09 | 43-8 |

Følgende partnere er fusioneret:

43-1 + 43-2

43-1 + 43-5

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 05-11-07:

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 05-IBM-19 05-IBM-11 90-0-16-11 | 45-1 45-2 45-6 | 05-IBN-03 05-IBN-04 88-0-07-09 | 45-5 45-4 45-7 |

Følgende partnere er fusioneret:

45-1 + 45-3

45-2 + 45-4

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 19/11-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------|-----------------------|---|---|
| 05-IBI-14 | 47-1 | 05-IBX-02 05-IBX-11 05-IBX-20 05-IBZ-03 05-IBZ-18 | 47-2 47-3 ikke planter nok. 47-4 47-5 |
| 90-0-16-11 | 47-6 | 88-0-07-09 | 47-7 |

Følgende partnere er fusioneret:

47-1 + 47-2

47-1 + 47-4

47-6 + 47-7

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 03/12-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|------------------------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 05-IBM-19 05-IBM-11 | 49-2 49-1 | 05-IBN-03 05-IBN-04 05-IBN-06 | 49-3 49-4 49-5 |
| 90-0-16-11 | 45-6 | 88-0-07-09 | 45-7 |

Ingen fusion

Protoplaster lavet fra de følgende partnere 17/12-07

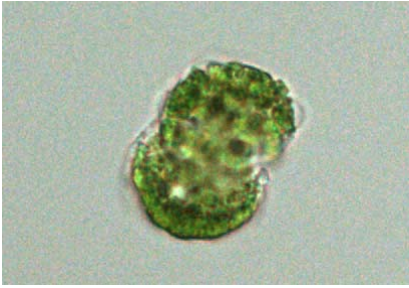
| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|

| | | | |
|------------|------|---|--------------------------------------|
| 05-IBI-14 | 51-1 | 05-IBX-02 05-IBX-11 05-IBX-20 05-IBZ-03 05-IBZ-18 | 51-2 51-3 51-4 51-5 51-6 |
| 90-0-16-11 | 51-7 | 88-0-07-09 | 51-8 |

Følgende partnere er fusioneret:

51-7 + 51-8

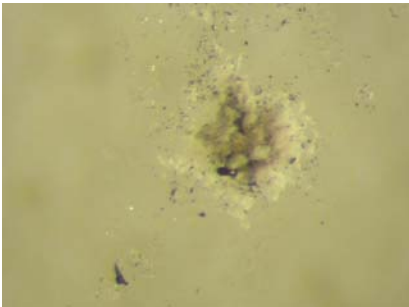
Bilag 2: Figurer



Figur 1. Fusionerede celler



*Figur 2. Protoplastfusion den 30/5-07, billed taget den 19/9-07
Linier 05-IBI-14 + 05-IBZ-18 (fri kallus)*



Figur 3. Protoplastfusion den 30/5-07, billed taget den 19/9-07



*Figur 4. Fusion 25-3+4, linie 05-IBZ-18 + 05-IBI-14.
Kallus m. væske spredt på fast VKM i uge 41.*

Bilag 3: Detaljeret Log for protoplastfusioner og vævskulturer Protoplast fusion af højamylosekloner d. 30/5-07

Planterne er fra den 16/5-07, og har IKKE stået mørkt.

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|--------------------------|-------------------------------------|--------------------------|
| 05-IBI-14 | 22-1 | 05-IBZ-18 05-IBM-11 05-IBN-04 | 22-2 22-3 22-4 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|---------------------------|------------|---------------------------|
| 90-0-16-11 | 22-5 | 88-0-07-09 | 22-6 |

Den 29-05-2007

Plantemateriale fra ovennævnte linier, er høstet, og sat på rystebord.

Den 30-05-07

Protoplast isolering og fusion. Fusions parametre er fulgt

Linier der er fusioneret:

22-1+2
22-3+4
22-5+6

Den 12-06-07

Fusioner er overført til 100 ml erlenmeyer kolber, og tilført 10 ml VKM-medie (med 2,4D, NAA, Zeatin og kul).

Alle er sat i klimakammer i underkælder, på rystebord - kraftig ryst, for iltning.

Den 26-06-07

Udtaget 1 ml af hver fusion, og overført til lille petriskål.

Mikroskopi:

22-3+4: Små celler der ligger sammen - ser godt ud. Begyndende kallusvækst.

22-1+2: Cellerne ligger samlet - kallus vækst.

22-5+6: Der er et slør, som ligger over det hele, og bevæger sig - kontamineret - smidt ud.

Den 03-07-07

Mikroskopi:

22-3+4: Fine kallus, ser dog ud som om der er hyfer fra svamp.
22-1+2: Fine kallus, ser dog ud som om at der er hyfer fra svamp

Medieskift:

22-3+4: Kallus sedimenteret, medie suget fra, og tilsat 35 ml VKM-medie
22-1+2: Kallus sedimenteret, og medie suget fra, tilsat 35 ml VKM-medie.

Den 12-07-07

Mikroskopi:

22-3+4: Ser optimistisk ud
22-1+2: Ser ikke god ud

Den 06-08-07

Visuel bedømmelse:

22-1+2: Der er kallus. Væsken er uklar.
22-3+4: Der er kallus. Væsken er uklar.

Medieskift:

22-1+2: Kallus sedimenteret, og 23 ml suget fra. Tilsat 23 ml VKM-medie.
22-3+4: Kallus sedimenteret, og 18 ml suget fra. Tilsat 18 ml VKM-medie.

Den 22-08-07

Mikroskopi:

22-1+2: Edderkop lignende vækst af celler - kallus.
22-3+4: Også kallus vækst.

Den 29-08-07

Medieskift:

22-1+2: 20 ml suget fra efter bundfældning. Tilsat 20 ml VKM**
22-3+4: 20 ml suget fra efter bundfældning. Tilsat 20 ml VKM**

Den 19-09-07

Der er taget billeder af kallus fra 22-1+2 og 22-3+4.

Den 25-09-07

Medieskift:

22-1+2: Efter sedimentering, er der suget 21 ml fra, og tilsat 21 ml VKM** medie.
22-3+4: Efter sedimentering, er der suget 20 ml fra, og tilsat 20 ml VKM** medie.

Den 10-10-07

Fusions kalli på fast medie: VKM-medie, indhold og koncentration som i flydende VKM, og tilsat 2 g agar/250 ml.

22-1+2 og 22-3+4:

Kallus er skrabet fra kanten af kolben, og overført til fast VKM-medie.

Ligger på mediet, med en størrelse på 1 mm til 3 mm.

Sat i klimakammer, med en tyk serviet over.

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 19/6-07

Planterne har stået i mørke fra fredag til tirsdag.

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| 05-IBI-14 | 25-4 | 05-IBZ-18 05-IBZ-03 05-IBX-20 | 25-3 25-2 25-1 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 25-6 | 88-0-07-09 | 25-5 |

Den 19-06-07

Plantemateriale fra ovennævnte linier, er høstet, tilsat enzymopl., og sat på rystebord.

Den 20-06-07

Protoplast isolering og fusion. Fusionsparametre er fulgt.

Linier der er fusioneret:

25-1+4
25-2+4
25-3+4
25-5+6

Sat på rystebord med stanniol over.

Den 25-06-07

Stanniol er fjernet fra petriskåle med fusioner, og tynd serviet, er lagt over.

Den 03-07-07

Mikroskopi:

25-3+4: Der er ikke så mange celler

25-1+4: Der er ikke så mange celler.

25-5+6: Der er ikke så mange celler.

25-2+4: Der er ikke så mange celler.

Fusioner overføres til 25 ml kolber:

Der er tilsat 1 ml VKM** til alle fusioner.

Kolberne er sat på rystebord i klimakammer.

Den 12-07-07

Mikroskopi:

25-3+4: Flere celler!!

25-1+4: Meget tynd.

25-5+6: Ser god ud.

25-2+4: Tynd.

Den 25-07-07

Tilsat 500 µl VKM** til 25-1+4, pga udtørring.

Den 06-08-07

Der er kallus i 25-2+4, 25-3+4, 25-5+6.

Medieskift:

25-1+4: Tilsat 4 ml VKM-medic.

25-2+4: 0,8 ml suget fra, tilsat 4 ml VKM medic.

25-3+4: Tilsat 4 ml VKM medic.

25-5+6: Tilsat 4 ml VKM medic.

Kolber atter sat i klimakammer, på rystebord.

Den 29-08-07

Medieskift:

25-3+4: 3,5 ml suget fra efter bundfældning. Tilsat 4 ml VKM**.

25-2+4: 3 ml medic suget fra efter bundfældning. Tilsat 4 ml VKM**.

25-5+6: 4 ml medic suget fra eft. bundf. Tilsat 5 ml VKM**.

25-1+4: 2 ml medic suget fra efter bundf. Tilsat 4 ml VKM**.

Kolber atter sat i klimakammer på rystebord.

Den 19-09-07

Der er taget billeder af kallus.

Den 25-09-07

Medieskift:

25-2+4: Suget 3 ml medic fra, tilsat 4 ml VKM**.

25-3+4: Suget 3 ml medic fra, tilsat 4 ml VKM**.

25-1+4: Suget 3,5 ml medic fra, tilsat 4,5 ml VKM**.

25-5+6: Suget 4,5 ml fra, tilsat 5,5 ml VKM**.

Den 10-10-07

Fusions kalli på fast medic: VKM-medic, indhold og koncentration som i flydende VKM-medic, og tilsat 2 g agar/250 ml.

25-2+4 og 25-5+6:

Kallus er skrabet fra kanten af kolben, og ført over på fast VKM-medic. Kallus på 1-2 mm, og derunder.

25-1+4 og 25-3+4:

Kallus er skrabet fra kanten af kolben, og ført over på fast VKM-medic.

Kallus på 1 mm og derunder.

Også suget lidt kallus fra opløsningen, og spredt ud på det faste medic (meget små kallus som er svære at se).

Petriskålene er sat i klimakammer, med stanniol under sig, og tyk serviet over.

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 17/07-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 05-IBM-11 | 29-1 | 05-IBN-03 | 29-2 |
| | | 05-IBN-04 | 29-3 |
| | | 05-IBN-06 | 29-4 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 29-5 | 88-0-07-09 | 29-6 |

Planterne er stressede : de har gule blade, og bladene falder af.
Den eneste plante der er pæn, med grønne blade, er 88-0-07-09.

Et bud på planternes tilstand, er at de har stået i mørke på lab-kontor, og at de har stået for varmt.
Fremover sættes de i klimakammer, med sæk over.

Planterne har stået i mørke i 3 dage, høstet, og tilsat 10 ml enzymopløsning.

Mikroskopi før fusion, d. 18/7-07:

Der er masser af protoplastre i alle petriskålene

Visuel vurdering:

De fleste har en lidt grumset grøn farve.
88-0-07-09 har en klar grøn farve.

Isolering af protoplastre:

Efter 2. centrifugering, er der intet bånd. Det hele er bundfældet. Der er en svag grøn-farvning i top-pen, som er ført videre til 3. centrifugering.
Efter 3. centrifugering, hvor protoplasterne skulle ligge i bunden af røret, er der intet.
Fusionen er standset.

Konklusion:

Der var celler efter dag 1, men de celler der var, er alle sprængt.
Et bud kan være, at planterne var i dårlig stand, pga. af for meget varme.
Fremover skal planterne stå i klimakammer ved mørklægning.

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 23/7-07

Planterne har stået i mørke fra fredag til mandag.

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 05-IBI-14 | 30-1 | 05-IBZ-18 | 30-2 |
| | | 05-IBZ-03 | 30-4 |
| | | 05-IBX-20 | 30-3 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 30-5 | 88-0-07-09 | 30-6 |

Planterne ser friske ud, med grønne blade.

Efter høst og udskæring, er der tilsat 10 ml enzymblanding.
Petriskålene er sat, på rystebord.

Den 24/7-07

Mikroskopi:

Der er mange protoplastre i alle skåle.

Isolering af protoplastre:

Efter 2. centrifugering, er båndene diffuse.
Det diffuse er afpippeteret, og ført videre til 3. centrifugering.

De sedimenterede protoplastre, er genopløst i 250 µl 0,5 M Mannitol.

Følgenden partnere er fusioneret:

30-1 + 30-2

30-5 + 30-6

Fusionsparametre er fulgt.

Efter fusion, er der tilsat 500 µl VKM medie.

30-1+2, 30-5+6 og 30-6 (uden strøm), er sat på rystebord, svag rysten og i mørke.

25-07-2007

Fusionerne er nu 1 dag gammel.

Mikroskopi:

30-1+2: Der er celler der er smeltet sammen, og celler der ligger enkeltvis.

30-5+6: Der er celler der er smeltet sammen, og celler der ligger enkeltvis.

06-08-2007

Mikroskopi:

30-1+2: Kallus dannelse.

30-5+6: Enkelte kallus dannelser.

Til kolber:

Fusionerne er overført til 25 ml kolber, og tilsat 3 ml VKM**.

Kolberne er sat i klimakammer, på rystebord, med omdr. på 130.

20-08-2007

30-1+2 er kontamineret, og kasseret.

22-08-2007

30-5+6 og 30-6, er helt klare. Der er ingen bundfald. Taget lille mgd. Ud til mikroskopi.

Mikroskopi:

Der er ingen kallusdannelse.

29/8, 25/9, 31/10, 5/12-07 og 2/1-08 er der skiftet medie.

16/1-08, LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 13/08-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|--------------------------|
| 05-IBI-14 | 33-1 | 05-IBX-02 | undladt, skal opformeres |
| | | 05-IBX-11 | 33-3 |
| | | 05-IBX-20 | undladt, skal opformeres |
| | | 05-IBZ-03 | 33-2 |
| | | 05-IBZ-18 | 33-4 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 33-5 | 88-0-07-09 | 33-6 |

Planterne er 4 uger gamle.

Har stået i mørke i 3 dage.

33-1: Meget grønne blade, frisk.

33-2: Brunlige og mørke grønne blade.

33-3: Grønne blade.

33-4: Bladene er grønne, gullige og rødlig.

33-5: Lysegrønne blade.

33-6: Grønne blade.

Bladene er høstet, skåret og tilsat 10 ml enzymblanding.

Skålene er sat på rystebord.

14-08-2007

Visuel:

Der ligger kun en lille planterest, i hver skål. Det meste er væk.

Mikroskopi:

33-1: Der er en del organeller, ser ud til at de fleste celler er sprængt.

33-2: Der er en del organeller, ser ud til at de fleste celler er sprængt.

33-3: Der er protoplaster.

33-4: Der er protoplaster.

33-5: Der er protoplaster.

33-6: Der er masser af protoplaster.

Fusion:

Ved første centrifugering, opstod der en pause på 1 time - centrifugen virkede ikke.
Efter at have skilt centrifuge ad, og rensset og smurt den, kører den igen.

Efter 2. centrifugering, er der ingen bånd. Der er udtaget en mgd.af væsken, og grønt fruller på siden af røret i midten, til mikroskopi.

Mikroskopi viser ingen hele celler.
Fusionen er standset

Da der ved mikroskopiering, før filtrering og centrifugering, heller ikke så ud til at være ret mange celler, er der gået noget galt dag 1?

Det kan evt. være enzytblandingen. Kan se ud fra Pers rapporter, at det er vigtigt at bruge Cellulase YC fra Karlan, evt. Pectolysase Y 23 og Macerozym R10 fra Duchefa. Dette er bestilt - og jeg laver en ny enzytblanding.

17/1-08, LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 27/08-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 05-IBM-19 | undladt* | 05-IBN-03 | undladt* |
| 05-IBM-11 | 35-1 | 05-IBN-04 | 35-2 |
| | | 05-IBN-06 | 35-3 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 35-4 | 88-0-07-09 | 35-5 |

Undladt*: Disse planter er undladt, da de skal opformeres.

Planterne er 4 uger gamle.

Planterne har stået i mørke i 3 dage.

Bladene er høstet, og tilsat enzymløsning.

OBS! Der er lavet en ny enzymløsning, med nye enzymer, den 22/8-07.

28-08-2007

Bladene har nu stået på rystebord natten over, med enzymløsning.

Visuel:

35-1: Frisk grøn, en smule planterest tilbage.

35-2: Grøn-brun. En smule planterest tilbage.

35-3: Grøn-brun. En smule planterest tilbage.

35-4: Grøn, lidt planterest tilbage.

35-5: Frisk mørk grøn. Lidt plante rest tilbage.

Mikroskopi:

35-1: Mange protoplastre.

35-2: Protoplastre.

35-3: En del protoplastre

35-4: Celler er sprængte.

35-5: Protoplastre.

Fusion:

Protoplastre er sigtet, vasket og centrifugeret.

Efter 2. centrifugering, er der intet bånd.

Fusionen er standset.

Vi skal checke op på enzymopløsningen og 0,5 M Mannitol.

17/1-08,
LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 11/09-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 05-IBI-14 | 37-1 | 05-IBX-02 | 37-2 |
| | | 05-IBX-11 | undladt |
| | | 05-IBX-20 | undladt |
| | | 05-IBZ-03 | undladt |
| | | 05-IBZ-18 | undladt |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 37-3 | 88-0-07-09 | 37-4 |

Planterne er 4 uger gamle.
De har stået i mørke i 1 dag.

Der er lavet ny enzymopløsning med MES og CPW, og ny 0,5 M Mannitol med CPW.

Fra 37-1 og 37-2 er der høstet blade, skåret i stykker i 0,5 M Mannitol+CPW, Mannitol er suget fra, og herefter er der tilst ny enzymblanding.
Skålene er sat på rystebord - OBS! - skal ryste meget svagt!

Efter 1 1/2 time er der kommet protoplaster. Der er stadig en del planterester tilbage.

Isolering af protoplaster startes - efter 2. centrifugering, er der et bånd midt i røret - og ved mikroskopi ses der protoplastre.

Jeg har valgt at stoppe her, der er ikke nok at gå videre med.

En ny portion sættes over, som skal stå natten over.

37-3 og 37-4.

Bladene er skåret i Mannitolen, Mann. er suget fra, og enzymbl. Tilsat.
Skålen er sat på bordet, dvs. ingen rysten/de har stået stille natten over.

12-09-2007

Skålene har nu stået natten over.

Mikroskopi:

37-3: Over 50 % protoplastre.

37-4: Over 50 % protoplastre.

Efter 1 1/2 time svag rysten:

37-3: Over 50 % protoplastre - som før.

37-4: Over 50 % protoplastre - som før.

Fusion:

Efter 2. centrifugering, er der et bånd i begge rør - 37-3 og 37-4. Båndet sidder ca 1 cm nede i væsken.

Båndet er ført videre til sidste centrifugering, og de sedimenterede protoplastre er genopløst i 250 µl 0,5 M Mannitol.

Følgende partnere er fusioneret:

37-3 + 37-4

Fusionsparametre er fulgt.

Apparater siger "overload" midt i fusionen, trykker AC-on, fusion fortsætter, og til sidst siger app. "fusion completed".

37-3+4 er ført over i petriskål og tilsat 1000 µl VKM.

Fusion er sat på rystebord, svag rysten i mørke.

17-09-2007

Mikroskopi:

Koncentrationen af celler er tynd. Der er hele celler.

Tilsat 3 ml VKM*, og overført til større petriskål.

25-09-2007

Fusion er nu 14 dage gammel.

Mikroskopi:

Der er meget få celler.

Fusion er overført til kolbe, og tilsat 4 ml VKM**.

Sat i klimakammer, på rystebord.

05-12-2007

Medieskift:

Medie suget fra, tilsat 4 ml VKM**

02-01-2008

Medieskift:

Medie suget fra, tilsat 4 ml VKM**

17/1-08, LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 25/09-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|--------------------------------------|
| 05-IBM-19 | 39-1 | 05-IBN-03 | 39-3 |
| 05-IBM-11 | 39-2 | 05-IBN-04 | 39-4 |
| | | 05-IBN-06 | undladt - planterne så ikke godt ud. |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 39-6 | 88-0-07-09 | 39-5 |

Den 21-09-07

Planterne er placeret i mørke.

Den 24-09-07

Plantemateriale fra ovennævnte linier, er høstet, og sat på rystebord - meget svag rysten.

Den 25-09-07

Mikroskopi:

39-1: Der er mange protoplastre, mere end 50 %. Også nogle røde.

39-2: Mange protoplastre, mere end 50 %.

39-3: Protoplastre, ca 50 %.

39-4: Protoplastre. Lidt mere end 50 %.

39-5: Mange protoplastre. Mere end 50 %.

39-6: Protoplastre, lidt mere end 50 %.

Isolering af protoplastre:

39-1 har mørkegrønt bånd på 0,5 cm, øverst i røret.

39-2 svagt mørkere grønt bånd på 0,3 cm, øverst i røret.

39-3: ingen bånd øverst i rør, antydning af svagt bånd længere nede i rør.

39-4: Ingen bånd - der sidder noget "fnuller" op ad kanten, som afpippeteres.

39-5: Antydning af bånd nede i røret, som afpippeteres.

39-6: Meget svag antydning af bånd nede i røret ved 3-4 ml mærket, som afpippeteres.

Fusioneret:

39-1+3

39-1+4

Fusionsparametre er fulgt, og der er tilsat 1 ml VKM, og fusioner er overført til lille petriskål.

Mikroskopi 1 time efter fusion:

39-1+3: Masser af protoplastre, over 50 %.

39-1+4: Masser af protoplastre, over 50 %.

Den 08-10-07

Fusionerne er nu 2 uger.

Mikroskopi:

39-1+4: Der er ca. 50 % hele protoplastre.

39-1+3: Væsken er meget tæt, koncentreret med celler, der er i vækst - kallus

Den 09-10-07

Fusioner er overført til kolber, og sat i underkælder på rystebord.

Den 29-10-07

Mikroskopi:

39-1+4: Koncentration af kallus tynd, enkelte samlinger af kallus.

39-1+3: Væsken er koncentreret af celler i vækst - kallus vækst.

Den 31-10-07

Væske med kallus overført til fast VKM medie.

Der er taget billeder af kallus på fast medie.

05-12-2007

Medieskift:

Der er suget medie fra, og tilsat VKM** til 39-1+3, 39-1+4, 39-5+6.

Fast VKM medie:

39-1+3: Der er overført 2 kalli - ca. 1/2 mm til fast medie. Den ene kallus er gullig, den anden er grå.
(det kan være kul+agar).

02-01-2008

Medieskift:

Der er suget medie fra, og tilsat VKM**, til de 3 fusioner.

17-01-2008, LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 23/10-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 05-IBI-14 | 43-1 | 05-IBX-02 | 43-2 |
| | | 05-IBX-11 | 43-3 |
| | | 05-IBX-20 | 43-4 |
| | | 05-IBZ-03 | 43-5 |
| | | 05-IBZ-18 | 43-6 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 43-7 | 88-0-07-09 | 43-8 |

Planterne har stået i mørke i 3 dage, i dagslys 1 dag, og derefter høstet, og skåret i små stykker.

05-IBX-02 har flere visne blade, 05-IBX-20 har en del visne blade.
De andre planter har friske blade.

24-10-2007

De udskårne blade, har stået med 10 ml enzymblanding, natten over, på rystebord, svag ryste.

Mikroskopi:

43-1: Masser af protoplaster, over 50 % intakte
43-2: Masser af protoplaster, over 50 % intakte
43-3: Masser af protoplaster, over 50 % intakte
43-4: Protoplaster, ca. 50 %. intakte
43-5: Masser af protoplaster, over 50 % intakte
43-6: Masser af protoplaster, over 50 % intakte
43-7: Masser af protoplaster, over 50 % intakte
43-8: Masser af protoplaster, over 50 % intakte

Fusionen:

Efter 2. centrifugering, var der ingen tydelige bånd nogle af rørene.

Der var lidt diffust bånd på nogle, på andre var der intet.

Afpipetteret fra toppen af rørene, og det diffuse grønne, til næste centrifugering.

Efter sidste centrifugering så det sådan ud:

43-1: Tilsat 500 µl 0,5M Mannitol til de sedimenterede protoplaster.

43-2: Tilsat 250 µl 0,5M Mannitol til de sedimenterede protoplaster.

43-3: Kasseret, intet bundfald.
43-4: Kasseret, intet bundfald.
43-5: Tilsat 750 µl 0,5M Mannitol til de sedimenterede protoplastere.
43-6: Kasseret, intet bundfald.
43-7: Kasseret, intet bundfald.
43-8: Tilsat 500 µl 0,5M Mannitol til de sedimenterede protoplastere.

Mikroskopi af 43-1, 43-2, 43-5, 43-8:

Der er ca. 10 % intakte protoplaster af hver linie.

Følgende partnere er fusioneret:

43-1 + 43-2
43-1 + 43+5

Fusionsparametre er fulgt.

Efter fusion, er der tilsat 500 µl VKM.

Mikroskopi efter fusion:

43-1+2: ca. 10 % intakte protoplaster. (umiddelbart ingen sammensmeltede)
43-1+5: ca. 30 % intakte protoplaster. (umiddelbart ingen sammensmeltede)

43-5: (ingen strøm) ca. 30 % intakte protoplaster.

Petriskålene er sat på rystebord, svag rysten, i mørke.

29-10-2007

Fusionen har nu stået 1 uge på rystebord i mørke.

Mikroskopi:

43-1+2: Over 50 % intakte celler. Der er enkelte samlinger af celler, - kallus.
43-1+5: Ca. 30 % intakte celler.

Tilsat 1 ml VKM* til alle skåle.

07-11-2007

Fusionen er nu 2 uger gammel.

Mikroskopi:

43-1+2: Der er en del samlinger af kallus. 4 - 5 kalluser som kan ses med det blotte øje.

43-1+5: Der er mange celler, og en smule kallus.

Til fast VKM-medie:

Dråber med 4-5 kallus (0,5 mm i diameter) er overført til fast VKM- medie.

Til kolber:

43-1+2, er overført til 25 ml kolbe, og tilsat 6 ml VKM**

43-1+5, er overført til 25 ml kolbe, og tilsat 6 ml VKM**

43-5, er overført til 25 ml kolbe, og tilsat 6 ml VKM**

Kolberne er sat i klimakammer, på rystebord, med omdr. på 130.

02-01-2008

Til fast VKM-medie:

43-1+2: Der er overført materiale til 3 skåle: Dråber, kallus skrab fra kant af kolbe, og kallus.

Foretaget medieskift:

Alle 3 kolber er der suget medie fra, og tilsat 4 ml VKM**.

15/1-08,
LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 05/11-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 05-IBM-19 | 45-1 | 05-IBN-03 | 45-5 |
| 05-IBM-11 | 45-2 | 05-IBN-04 | 45-4 |
| | | 05-IBN-06 | 45-3 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 45-6 | 88-0-07-09 | 45-7 |

Planterne er 6 uger gamle.

De har stået i mørke i 3 dage.

45-1: Mange blade er helt lysegule.

45-2: Planten har visne blade, de høstede blade er grønne.

45-3: Planten har mange visne blade.

45-4: Planten har mange visne blade.

45-5: Planten har mange visne blade.

OBS! Planterne er generelt dårlige efter de har stået i 6 uger.

De skal stå i 4 uger fremover, når de skal høstes til fusion.

Bladende er skåret, og tilsat 10 ml enzymblanding. Sat på rystebord, svag rysten.

06-11-2007

Bladende med enzymblanding, har stået natten over.

Mikroskopi:

45-1: Der er protoplaster, ca. under 30 % er intakte.

45-2: Der er protoplaster, ca. 30 - 40 % er intakte.

45-3: Der er protoplaster, ca. under 20 % er intakte.

45-4: Der er protoplaster, ca. 30 - 40 % er intakte.

45-5: Der er protoplaster, ca. 30 % er intakte.

45-6: Der er protoplaster, ca. 40 % er intakte.

45-7: Der er protoplaster, ca. 40 - 50 % er intakte

Fusion:

45-5, 45-6, 45-7 er kasseret, da der ikke var nogen protoplaster der var sedimenteret.

De sedimenterede protoplaster 45-1, 45-2, 45-3 og 45-4, er genopløst i 250 µl 0,5 M Mannitol.

Mikroskopi:

- 45-1: over 50 % intakte protoplaster.
- 45-2: under 30 % intakte protoplaster.
- 45-3: under 30 % intakte protoplaster.
- 45-4: meget, meget tynd. Under 10 % protoplaster.

Følgende partnere er fusioneret:

- 45-1 + 45-3
- 45-2 + 45-4

Fusionsparametre er fulgt.

Til begge fusioner er der tilsat 500 µl VKM, og overført til petriskål.

Mikroskopi:

45-1+3: Opløsningen er tæt af celler, ca. 20 % er intakte protoplaster. Svært at få øje på sammensmeltede celler - der er dog et par stykker.

45-2+4: Meget tynd opløsning. Under 10 % intakte protoplaster. Der er ingen der er sammensmeltede.

Petriskåle er sat på rystebord, svag rysten.

07-11-2007

Fusion er 1 dag gammel. Til begge fusioner er der tilsat 500 µl VKM*.

21-11-2007

Fusionerne har nu stået i 14 dage på rystebord, og gendannet cellemembranen.

Mikroskopi:

- 45-1+3: Der er kallus, og masser af celler.
- 45-2+4: Der er få celler.

Fusionerne er overført til kolber, og tilsat 5 ml VKM**.

Kolberne er sat i klimakammer på rystebord, med 130 omdr.

02-01-2008

Medieskift:

Der er suget medie fra begge fusioner, og tilsat 4 ml VKM** til begge.

10-01-2008

45-2+4 er kontamineret, og kasseres.

15/1-08, LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 19/11-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|------------------------------------|
| 05-IBI-14 | 47-1 | 05-IBX-02 | 47-2 |
| | | 05-IBX-11 | 47-3 |
| | | 05-IBX-20 | undladt, ikke plantemateriale nok. |
| | | 05-IBZ-03 | 47-4 |
| | | 05-IBZ-18 | 47-5 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 47-6 | 88-0-07-09 | 47-7 |

Planterne er 4 uger gamle.

De har stået i mørke i 3 dage.

Alle planter ser fine ud.

Planterne er skåret og tilsat enzytblanding:

47-1: 10 ml enzym

47-2: 5 ml enzym

47-3: 8 ml enzym

47-4: 10 ml enzym

47-5: 10 ml enzym

47-6: 10 ml enzym

47-7: 10 ml enzym

20-11-2007

De udskårne blade med enzytblanding, har stået natten over.

Mikroskopi:

47-1: Masser af protoplastre, over 50 %.

47-2: Protoplastre, ca 30 %.

47-3: Masser af protoplastre, ca 50 %.

47-4: Protoplastre, ca. 30-40 %.

47-5: Masser af protoplastre, over 50 %.

47-6: Protoplastre, ca. 30 %.

47-7: Protoplastre, ca. 40 %.

Fusion:

Efter 3. centrifugering, er der diffuse bånd.
Disse er afpiperet, og ført videre til sidste centrifugering.

Efter sidste centrifugering ser det således ud:

47-2 og 47-3 kasseres, da der næsten ingen protoplastre var sedimenteret, og der kun lige er nok af 47-1, til at dele ud til 2 rør.

47-1: Tilsættes 500 µl 0,5 M Mannitol.

47-4: Tilsættes 500 µl 0,5 M Mannitol.

47-5: Tilsættes 500 µl 0,5 M Mannitol.

47-6: Tilsættes 250 µl 0,5 M Mannitol.

47-7: Tilsættes 250 µl 0,5 M Mannitol.

Følgende partnere er fusioneret:

47-1 + 47-2

47-1 + 47-4

47-6 + 47-7

Fusionsparametre er overholdt.

Efter fusion, er der tilsat 500 µl VKM til 47-1+2 og 47-1+4. Til 47-6+7 er der tilsat 1 ml VKM.

Fusioner i petriskåle, er sat på rystebord, svag rysten, i mørke.

21-11-2007

Fusion er 1 dag gammel.

Mikroskopi:

47-1+2: Der er protoplastre, koncentration er tynd.

47-1+4: Der er protoplastre, koncentration er tynd.

47-6+7: Der er protoplastre.

Tilsat 250 µl VKM* til alle fusioner. Og atter på rystebord.

05-12-2007

Fusionerne har stået 14 dage på rystebord, og gendannet cellemembranen. Er nu klar til at komme i kolber.

47-1+4: Der er kallus. Overført til 25 ml kolbe, og tilsat 6,5 ml VKM**

47-1+2: Der er kallus. Overført til 25 ml kolbe, og tilsat 6 ml VKM**.

47-6+7: Der er kallus. Overført til 25 ml kolbe, og tilsat 6 ml VKM**.

Kolberne er sat i klimakammer, ved omdr. på 130.

02-01-2007

47-6+7 er kontamineret og kasseret.

Medieskift:

Der er suget medie fra begge fusioner, og tilsat 4 ml VKM** til begge.

15/1-08, LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 03/12-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|-----------|-----------------------|
| 05-IBM-19 | 49-2 | 05-IBN-03 | 49-3 |
| 05-IBM-11 | 49-1 | 05-IBN-04 | 49-4 |
| | | 05-IBN-06 | 49-5 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 45-6 | 88-0-07-09 | 45-7 |

Planterne er 4 uger gamle.

De har stået i mørke i 3 dage.

49-1: Planten har grønne blade

49-2: Planten har grønne, gule og rødlige blade.

49-3: Plante har meget få, små blade.

49-4: Meget lidt plantemateriale. Nogle blade er visne.

49-5: Plante har grønne, lysegrønne, gullige og røde blade.

49-6: Plante har grønne blade.

49-7: Plante har grønne blade.

Bladene er skåret og tilsat enzymblanding.

04-12-2007

Petriskålene med blade og enzymblanding, har nu stået natten over.

Mikroskopi:

49-1: Ca 30 - 40 % protoplaster.

49-2: Ca. 30 % protoplaster.

49-3: ca. 30 - 40 % protoplaster.

49-4: Ca. 30 % protoplaster.

49-5: Ca. 30 % protoplaster.

49-6: Ca. 30 - 40 % protoplaster.

49-7: Over 50 % protoplaster.

Fusion

Efter 3. centrifugering, er der nogle meget svage bånd, og grønt fnuller langs siden af rørene. Dette er afpippet, og ført videre til sidste centrifugering.

Der er taget en prøve ud af de sedimenterede protoplastre, og kigget på dem i mikroskopet.

Der var ingen hele protoplastre, de var alle sprængte.

Fusionen er standset.

16/1-08, LH

Protoplast fusion af højamylosekloner d. 17/12-07

| Partner 1 | Partner 1 nyt navn | Partner 2 | Partner 2 nyt navn |
|-----------|-----------------------|---|--------------------------------------|
| 05-IBI-14 | 51-1 | 05-IBX-02 05-IBX-11 05-IBX-20 05-IBZ-03 05-IBZ-18 | 51-2 51-3 51-4 51-5 51-6 |

| Kontrol P1 | Kontrol P1 nyt navn | Kontrol P2 | Kontrol P2 nyt navn |
|------------|------------------------|------------|------------------------|
| 90-0-16-11 | 51-7 | 88-0-07-09 | 51-8 |

Planterne er 4 uger gamle.
De har ikke stået i mørke.

- 51-1: Plante har grønne blade. Tilsat 10 ml enzymblanding.
- 51-2: Skravlet plante, ikke så meget materiale. Tilsat 5 ml enzymblanding.
- 51-3: Små planter, ikke så meget materiale. Tilsat 7 ml enzymbl.
- 51-4: Grønne blade. Tilsat 10 ml enzymblanding.
- 51-5: Plante har grønne, gule og røde blade. Tilsat 8 ml enzymbl.
- 51-6: Plante har mange grønne blade, få røde og gule. Tilsat 10 ml enzymbl.
- 51-7: Plante har grønne blade. Tilsat 10 ml enzymbl.
- 51-8: Plante har grønne blade. Tilsat 10 ml enzymbl.

18-12-2007

Skålene med de afskårne blade ofg enzymopl. Har stået stille natten over.

Visuelt:

Der er en del planterest tilbage i skålene.

Mikroskopi:

- 51-1: Over 50 % protoplastre.
- 51-2: Koncentrationen er meget tynd, under 50 % protoplastre.
- 51-3: Ca. 50 % protoplastre.
- 51-4: Over 50 % protoplastre.
- 51-5: Koncentrationen er tynd, under 50 % protoplastre.
- 51-6: Over 50 % protoplastre.
- 51-7: Ca. 50 % protoplastre.
- 51-8: Ca. 50 % protoplastre.

Fusionen:

Da en stor del af protoplasterne ved de tidligere fusioner, er gået i stykker under protoplastisoleringen

, - herunder håndteringen og centrifugeringen - prøver vi denne gang med en ny fusionsprocedure.

I denne procedure er håndteringen forenklet, dvs. færre afpippetinger og færre centrifugeringer (se ny procedure vejledning, fra den -dato-).

Efter 1. centrifugering, er der tydeligt bånd på ca. 3 mm, på 51-4
51-7 og 51-8, har også et bånd på ca 1 mm i toppen.

Efter 2. centrifugering, er der ikke nok sedimenterede protoplastre af 51-1, til at arbejde videre med.
Da 51-1 skal fusioneres med 51-2, 51-3, 51-4, 51-5 og 51-6, er disse nødt til at kasseres.
51-7 og 51-8 er genopløst i 250 µl 0,5 M Mannitol.

Følgende partnere er fusioneret:

51-7 + 51-8

Fusionsparametre er fulgt.

Efter fusion af 51-7+8, er der tilsat 1 ml VKM.

Mikroskopi:

51-7+8: Flere protoplastre er smeltet sammen.

Sat på rystebord, svag rysten, i mørke.

19-12-2007

51-7+8: Tilsat 500 µl VKM*

02-01-2008

Mikroskopi:

51-7+8: Tynd koncentration af celler. - umiddelbart ingen kallus.

Fast VKM:

Der er overført 2 dråber til fast VKM medie af 51-7+8

Til kolbe:

51-7+8 er overført til 25 ml kolbe, og tilsat 4 ml VKM**. Kolben er sat i klimakammer, på rystebord, med omdr. på 130.

16-01-2008