

Toepassingsmogelijkheid *in vitro* callusfusie- methode voor bepaling compatibiliteit tussen ent- en onderstamrassen bij pruim

Frank Maas & Jos Kanne

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Fruit

september 2007

Rapportnummer
2007-27

© 2007 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

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

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

PPO Rapportnummer 2007-27; € 15,-



Projectnummer PPO: 32 610592 00

Projectnummer PT: 12343

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Sector Fruit

Adres : Lingewal 1, 6668 LA Randwijk

: Postbus 200, 6670 AE Zetten

Tel. : 0317 - 47 3702

Fax : 0317 - 47 3717

E-mail : info.ppofruit@wur.nl

Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING.....	5
1 INLEIDING EN DOELSTELLING	7
2 WERKWIJZE.....	9
2.1 Werkbezoek laboratorium Errea	9
2.2 Keuze pruimenrassen voor testen callusfusiemethode	9
2.3 Opkweek callusweefsel <i>in vitro</i>	10
2.4 Callusfusie <i>in vitro</i>	11
2.5 Anatomisch onderzoek vergroeiing callusweefsels.....	12
3 RESULTATEN & DISCUSSIE	17
3.1 <i>In vitro</i> teelt pruimenrassen en –onderstammen	17
4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN	19
5 LITERATUUR.....	21
BIJLAGE 1	23
BIJLAGE 2.....	25
BIJLAGE 3.....	27

Samenvatting

Onderzocht is of een in Spanje voor abrikoos ontwikkelde snelle toetsmethode uitgaande van weefselweekplanten ook bruikbaar is om vroegtijdig de verenigbaarheid tussen ent- en onderstamrassen bij pruim vast te stellen. Met deze zogenaamde callusfusiemethode wordt callusweefsel van de beoogde entpartners opgekweekt vanuit weefselweekplanten en met elkaar in contact gebracht. De groei van cellen en een aantal biochemische reacties van cellen in de contactzone laten binnen enkele weken zien of entras en onderstam verenigbaar of onverenigbaar zijn. Een dergelijke methode om vroegtijdig de onverenigbaarheid tussen entras en onderstam vast te kunnen stellen kan de kosten van de veldproeven sterk verminderen omdat hiermee het planten van onverenigbare ras-onderstamcombinaties kan worden voorkomen.

De callusfusiemethode blijkt echter zulke hoge eisen te stellen aan weefselweekervaring van onderzoeksassistenten en laboratoriumapparatuur dat de methode alleen efficiënt kan worden uitgevoerd door laboratoria waar mensen fulltime met deze methode bezig zijn. Ondanks de aanwijzingen vanuit het Spaanse laboratorium waar de callusfusiemethode is ontwikkeld en adviezen van andere weefselweekdeskundigen is het niet gelukt om binnen de projectduur van een jaar de pruimenrassen en onderstammen in weefselweek te krijgen en cultures van callusweefsel te kweken om de bruikbaarheid van deze methode voor pruim te testen. Om deze methode, of een alternatieve methode met micro-enten, toepasbaar te maken voor de Nederlandse vruchtboomkwekerij is intensieve samenwerking met een weefselweeklaboratorium noodzakelijk. Het laten uitvoeren van deze verenigbaarheidstesten door het laboratorium in Spanje dat de methode heeft ontwikkeld en waar alle kennis en apparatuur aanwezig is, biedt nog meer kans op succes.

1 Inleiding en doelstelling

Pruimenbomen bestaan net als appel-, peren- en kersenbomen uit een vruchtproducerend ras geënt op een onderstam. Onderstammen worden in de fruitteelt toegepast om de groeikracht van het entras te verminderen en de vruchtbaarheid en de vruchtkwaliteit te bevorderen.

Een goede verenigbaarheid tussen onderstam- en entras is een voorwaarde waaraan voldaan moet worden bij de selectie van een onderstam. Echter, symptomen van onverenigbaarheid kunnen zich bij veldproeven soms pas na een aantal jaren manifesteren. Vooral bij steenfruit kan zich het verschijnsel voordoen van uitgestelde onverenigbaarheid, d.w.z. na een aantal jaren van aanvankelijk goede groei en productie kan de boom minder goed gaan produceren en zelfs afsterven omdat onderstam en ent elkaar niet langer verdragen. Vanwege het risico op uitgestelde onverenigbaarheid dienen onderstamproeven met steenfruit gedurende ten minste 8 tot 10 jaar te worden voortgezet. Een laboratoriumtoets waarbij vroegtijdig is vast te stellen of onderstam- en entras verenigbaar zijn, zou het proces van onderstamselectie kunnen versnellen. Daarnaast zou een dergelijke toets een aanzienlijke besparing kunnen opleveren doordat in het laboratorium als onverenigbaar aangemerkte combinaties niet langer in veldproeven te hoeven worden opgenomen.

Voor abrikoos is een dergelijke test ontwikkeld en beschreven (Errea *et al.* 2001). Callusweefsel gekweekt van *in vitro* plantjes van ent- en onderstam ras wordt op een speciale voedingsbodem tegen elkaar geplaatst. Na ongeveer 3 weken kan bij abrikoos aan de hand van een aantal histologische kleurtechnieken en microscopische waarnemingen worden vastgesteld of beide weefsels wel of niet verenigbaar met elkaar zijn. Deze verenigbaarheid/onverenigbaarheid in het laboratorium komt bij abrikoos overeen met de reactie van entras en onderstam bij geënte bomen.

Het doel van dit onderzoek was te onderzoeken of de door Errea *et al.* (2001) beschreven callusfusie-methode voor het bepalen van verenigbaarheid tussen ent- en onderstam ook toepasbaar is bij pruim.

2 Werkwijze

2.1 Werkbezoek laboratorium Errea

Van 21 tot 24 februari 2006 werd een werkbezoek gebracht aan het laboratorium van dr. Pilar Errea, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón, Gobierno de Aragón in Zaragoza in Spanje. Tijdens dit bezoek werd uitleg gegeven over de ontstaansgeschiedenis van de callusfusiemethode, de kweek van plantjes *in vitro*, het kweken van callusweefsel vanuit *in vitro* plantjes, het samenbrengen van callus van ent- en onderstamrassen, en alle histologische en anatomische technieken die gebruikt worden voor het bepalen van de verenigbaarheid of onverenigbaarheid tussen ent- en onderstam.

Sinds de publicatie van het artikel over de toepassing van de callusfusiemethode voor bepaling van verenigbaarheid tussen ent- en onderstamras bij abrikoos (Errea *et al.* 2001) zijn er een aantal wijzigingen in het medium voor het *in vitro* opkweken van plantjes en callusweefsel aangebracht. Tijdens het werkbezoek werden de aangepaste protocollen van de in Spanje gebruikte media voor inductie en opkweek van callusweefsel toegelicht. Deze vernieuwde protocollen vormden de basis van de *in vitro* kweek van pruimen bij PPO in Randwijk.

Naast faciliteiten voor weefselkweek beschikt het laboratorium in Zaragoza ook over een zeer goed uitgerust laboratorium voor histologisch en anatomisch onderzoek aan planten. Gespecialiseerde analisten zorgen hier voor het inbedden van plantmateriaal in kunsthars of paraffine, maken coupes voor microscopisch onderzoek met speciale microtomen (apparatuur voor het snijden van dunne coupes). Voor het microscopisch onderzoek heeft het laboratorium de beschikking over moderne lichtmicroscopen met filtertechnieken en een op de computer aangesloten camerasysteem voor analyse van de microscopische beelden. Door middel van specifieke kleur- en belichtingstechnieken kan onder de microscoop de celopbouw en het samengroeien van calluscellen van verschillende ent-onderstamcombinaties worden bestudeerd.

2.2 Keuze pruimenrassen voor testen callusfusiemethode

In overleg met oud-onderzoeker Bob Wertheim (Proefstation Fruitteelt Wilheminadorp) is een overzicht opgesteld van pruimenrassen en onderstammen waarvan op grond van langjarige teeltverving bekend is dat ze goed of niet verenigbaar zijn en een aantal combinaties waarvan de verenigbaarheid onbekend of twijfelachtig is (Tabel 1). De rassen uit deze tabel vormden het uitgangsmateriaal om de bruikbaarheid van de callusfusiemethode voor pruimen te toetsen.

Tabel 1. Combinaties van ent- en onderstamrassen bij pruim met bekende goede verenigbaarheid (+), onverenigbaarheid (-) en onbekende verenigbaarheid (?)

	Victoria	RC d'Althan	St. Julien A	Myrobalan B	VVA-1	Ferlenain
Victoria	+					
RC d'Althan		+				
St. Julien A	+	+	+			
Myrobalan B	+	-	?	+		
VVA-1	+	?	?	?	+	
Ferlenain	+	?	?	?	?	+

Planten van onderstammen en rassen werden opgekweekt in een klimaatkamer onder kunstlicht (Philips SONT PIA 400W) bij een temperatuur van 16 °C en een daglengte van 11 uur. Als uitgangsmateriaal voor de *in vitro* teelt werden in eerste instantie stukjes stengel met een oog genomen.

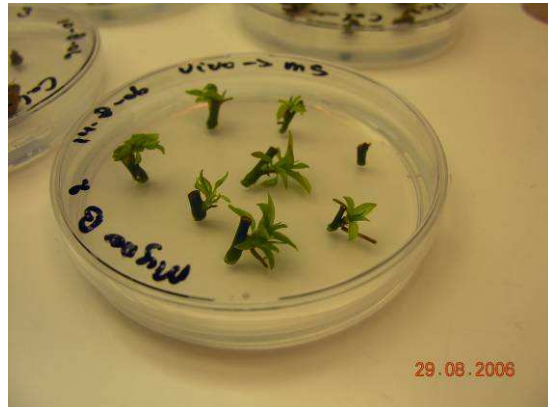
Na oppervlaktesterilisatie met 70% ethanol gevolgd door driemaal spoelen met steriel (demi/MQ) water werden de stengelstukjes op een speciale voedingsbodem geplaatst (figuren 1-4). In bijlage 1 staat de samenstelling van het gebruikte medium beschreven. Eenmaal in weefselweek groeiende plantjes werden in weefselweek gehouden door, afhankelijk van de groeisnelheid van de plantjes, om de paar weken stukjes plantmateriaal over te zetten op een verse voedingsbodem (bijlage 2).

2.3 Opkweek callusweefsel *in vitro*

Callusweefsel werd gekweekt vanuit in weefselweek geteelde plantjes. Hiertoe werd van de te onderzoeken rassen eerst de hierboven beschreven *in vitro* teelt van het plantmateriaal opgezet. Stukjes stengel (internodia) van de weefselweekplantjes werden gebruikt voor de opkweek van callusweefsel op een speciaal callus-inducerend medium (bijlage 3). Voor de callusfusie zijn van beide fusiepartners klompjes callusweefsel nodig met een diameter van ca. 5 tot 10 mm.



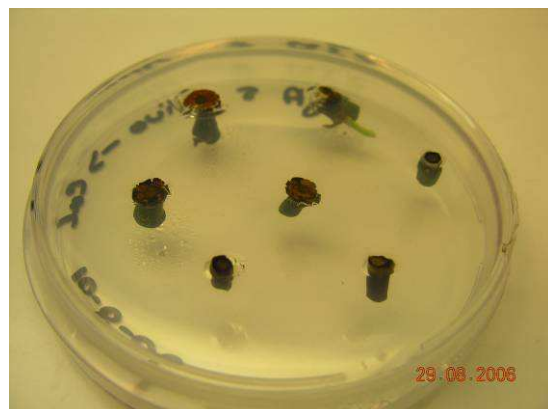
Figuur 1. Plantmateriaal VVA-1 in weefselweek



Figuur 2. Plantmateriaal Myrobalan B in weefselweek



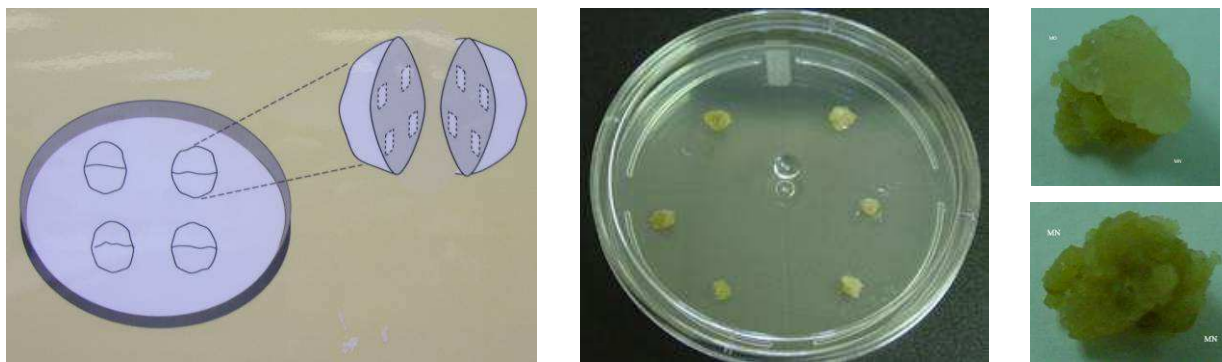
Figuur 3. Plantmateriaal St Julien A na 19 dagen op callus-inducerend medium. Beginnende callusvorming zichtbaar aan basale deel stengel.



Figuur 4. Callusvorming aan basale stengeldeel St Julien A na 19 dagen groei op callus-inducerend medium. Petrischaal van figuur 3 bekeken vanaf onderzijde.

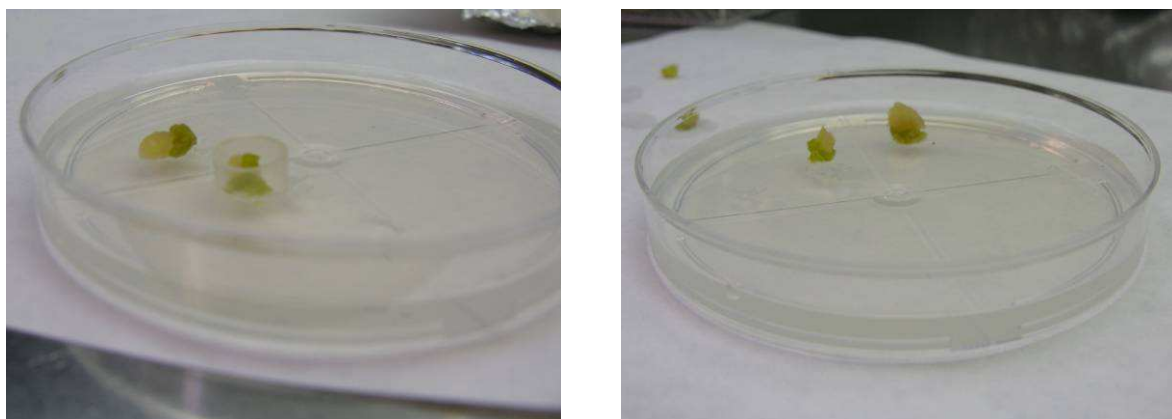
2.4 Callusfusie *in vitro*

Het wel of niet goed met elkaar vergroeien van callusweefsel van ent- en onderstamras bij rassen die respectievelijk bekend staan als verenigbaar en onverenigbaar vormde de kern van dit project. Stukjes callusweefsel van ongeveer 5 mm doorsnede werden doormidden gesneden. Van de verschillende toetsrassen werden stukjes callusweefsel met de snijvlakken tegen elkaar op vers medium in een petrischaal geplaatst. In de oorspronkelijk door Errea *et al.* (2001) beschreven methode werd hierbij het raakvlak tussen beide callusfusiepartners loodrecht op het agarmedium geplaatst zodat beide stukjes callus contact maakten met deze voedingsbodem (figuur 5). Tijdens het werkbezoek in februari 2006 werd verteld dat deze methode, waarbij de callusfusiepartners door een teflonringetje tegen elkaar aan werden gedrukt (figuur 6), niet langer werd gebruikt, maar dat men tegenwoordig de callusfusiepartners op elkaar legt zodat deze door de zwaartekracht bijeenblijven. Deze verandering van oriëntatie heeft geen invloed op de vergroeiing tussen beide callusfusiepartners (persoonlijke mededeling dr. Pilar Errea).



Figuur 5. Callusfusie tussen callusweefsels. Schematische weergave combinatie callusweefsels (links) en foto van callusfusiecombinaties in petrischaal (midden) van onverenigbare combinatie abrikozenras Monique en onderstam Mariana 2624 (rechtsboven) en verenigbare combinatie van Mariana op Mariana (rechtsonder).

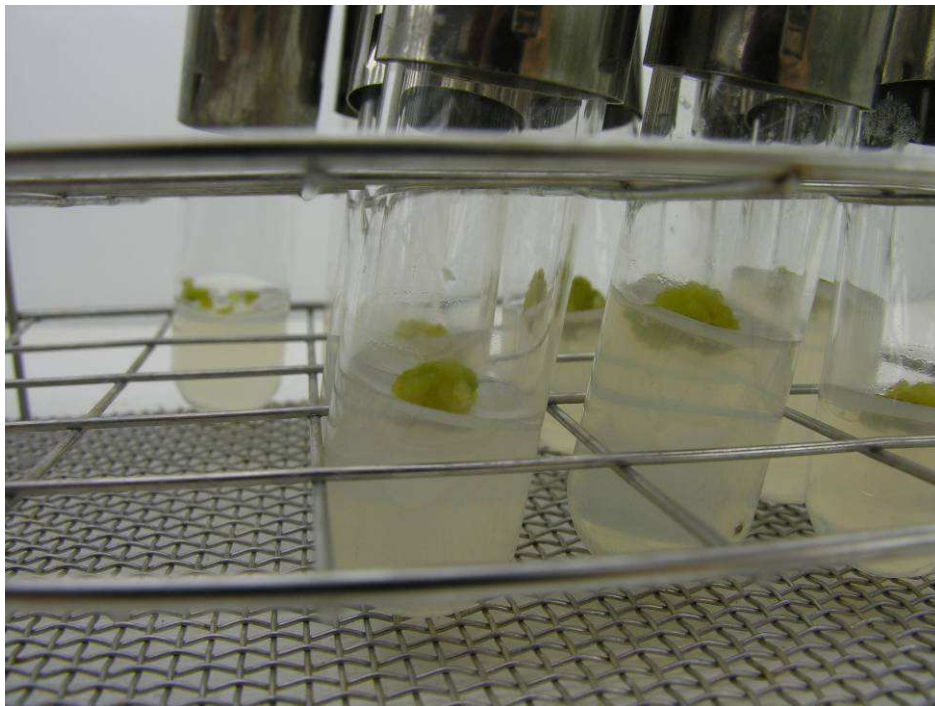
Figuur en foto's: dr. Pilar Errea, Zaragoza, Spanje.



Figuur 6. Callusfusiepartners met fusiecontactvlak verticaal en bijeengehouden door Teflon ringetje (links) en met fusiecontactvlak horizontaal en bijeengehouden door de zwaartekracht (rechts). Foto genomen tijdens werkbezoek in Zaragoza van daar gekweekt callus van abrikozen.

2.5 Anatomisch onderzoek vergroeiing callusweefsels

Microscopie is een van de belangrijkste technieken om vast te kunnen stellen of 2 typen callusweefsels verenigbaar zijn. Uit de rangschikking van de nieuw gevormde cellen op het grensvlak van beide callusweefsels, de opbouw van de celwanden en de aanwezigheid van lipiden en fenolen in de cellen in het grensvlak kan worden afgeleid of beide weefsels verenigbaar zijn. Dit type histologisch onderzoek vereist expertise op het gebied van het fixeren van callusweefsels, het snijden van dunne plakjes weefsel (coupes) en het uitvoeren van specifieke kleuringen van microscopische preparaten om celwandopbouw en de gehalten aan lipiden en fenolen te kunnen bestuderen. Ook is voor het anatomisch onderzoek gespecialiseerde apparatuur noodzakelijk. De figuren 7 en 8 geven een overzicht van de in Zaragoza gebruikte faciliteiten en apparatuur bij het callusfusieonderzoek. Bij abrikoos vertonen de cellen, in het geval van fusie tussen callus van verenigbare ent- en onderstamrassen, op het grensvlak van beide typen callus na 3 weken contact een veel regelmatigere rangschikking dan bij niet verenigbare combinaties. Bij onverenigbare combinaties is gedurende deze 3 weken een duidelijke verandering van de celwandopbouw waarneembaar aan de hand van een verminderde kleurreactie van de celwand. Ook treedt een sterke toename op in de hoeveelheid lipiden en fenolverbindingen in de cellen (Figuur 9).



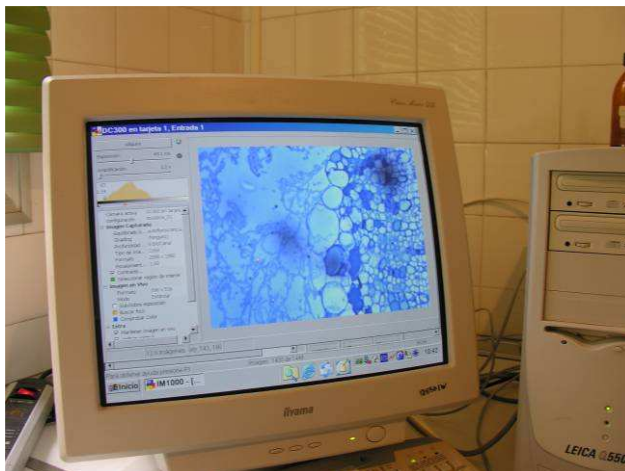
Figuur 7. Weefselweek plantjes en callusweefsel van abrikozen in een klimaatkamer van het 'Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón in Zaragoza, Spanje.

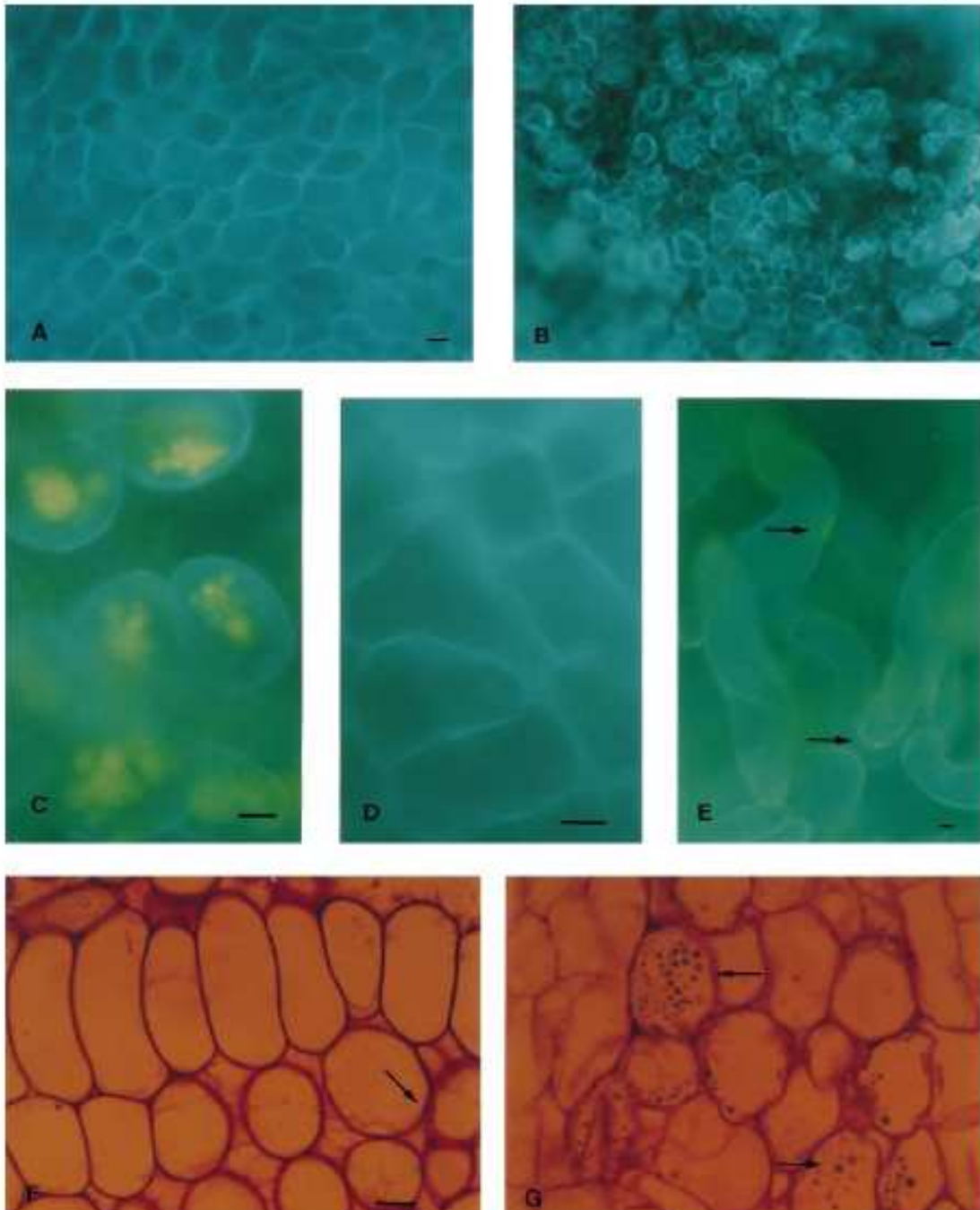


Figuur 8. Van boven naar beneden:
Het snijden van dunne plakjes (coupes) van
in paraffine ingebed callusfusieweefsel.

Microscopen voor anatomisch onderzoek
microscopische preparaten (coupes).

Weergave op computerscherm van onder
de microscoop vergrootte cellen van het
callusweefsel.



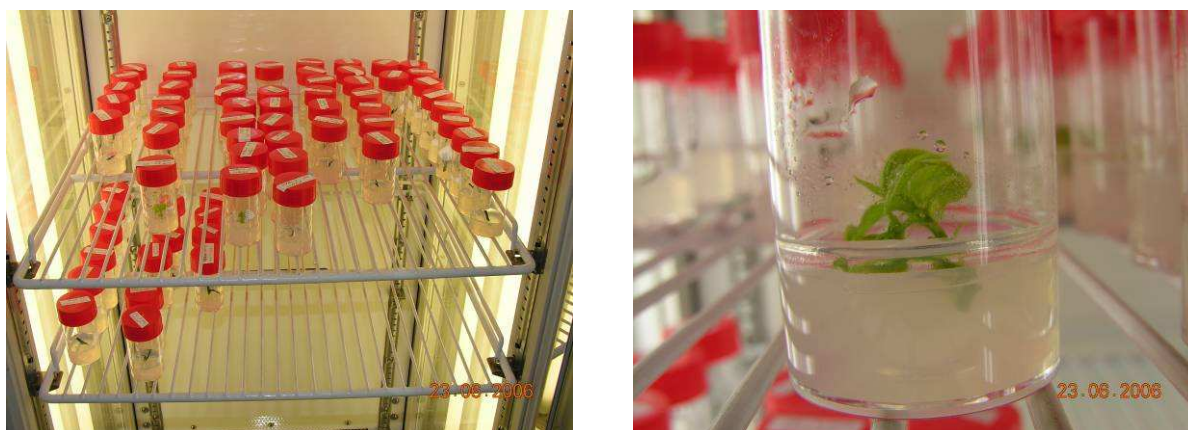


Figuur 9. Histologische en histochemische reacties van calluscombinaties. Rangschikking cellen op grensvlak verenigbare (A) en onverenigbare (B) combinatie 2 weken na aanvang callusfusie. Kleuring met calcofluor. Lipiden in cellen grensvlak van overenigbare (C), verenigbare (D) en niet vergroeide calluscombinatie (E). Kleuring met calcofluor en auramin O. Kleuring met toluidine blauw op fenolverbindingen in een verenigbare (F) en onverenigbare (G) calluscombinaties. Fenolen zijn alleen zichtbaar in vacuoles van cellen in onverenigbare combinatie. zwarte streepje = 10 μ m
 Bron: Errea et al. 2001. *Physiologia Plantarum* 112: 135-141.

3 Resultaten & discussie

3.1 *In vitro* teelt pruimenrassen en –onderstammen

De eerste poging de te toetsen rassen en onderstammen in weefselweek te krijgen mislukte volkomen. De op 29 maart op agar geplaatste ogen of stengelstukjes van Myrobalan waren op 3 april allemaal beschimmeld. De gebruikte methode van oppervlaktersterilisatie met ethanol en chloor was kennelijk niet voldoende om de op het hout of tussen de knopschubben aanwezige schimmels of schimmelsporen te doden. Het op agar geplaatste weefsel van VVA-1 vertoonde echter op dezelfde datum geen sporen van schimmelgroei. Het uitgangsmateriaal van VVA-1 was echter afkomstig van veel jonger, nog niet verhout materiaal dat wellicht minder schimmelsporen bij zich droeg.



Figuur 7. '*In vitro*' teelt van pruimenrassen in klimaatkast. Foto rechts toont detailopname van VVA-1 plantje na 3 maanden '*in vitro*' teelt gestart uit stengelstukje met oog.

Omdat het gedurende de looptijd van het project niet is gelukt van alle rassen uit tabel 1 goed groeiend en voldoende callusweefsel te verkrijgen, kon van de meeste beoogde ent- onderstamras combinaties de *in vitro* compatibiliteit niet worden onderzocht via de callusfusiemethode. Het enige ras dat zich gemakkelijk in weefselweek liet brengen en waarvan ook vrij gemakkelijk callusweefsel gekweekt kon worden was VVA-1 (figuur 7). Echter, het gevormde callus had, in tegenstelling tot het in Zaragoza getoonde callusweefsel van abrikozen, een zeer losse en brokkelige structuur. Hierdoor viel het snel uit elkaar en was het lastig om stukjes callusweefsel te snijden en op elkaar te plaatsen op de wijze zoals weergegeven in figuren 5 en 6. Callus VVA-1 geplaatst op callus VVA-1 werd als eerste callusfusiecombinatie getest. Door niet opgehelderde oorzaak lukte het echter niet om de twee VVA-1 fusiepartners met elkaar te laten vergroeien. Binnen enkele weken trad er een bruinverkleuring van het weefsel op en ging het callus dood. Mogelijk is het callus niet groeikrachtig genoeg geweest om door te groeien en met elkaar te vergroeien. Op advies van SBW International in Roelofarendsveen (Michiel van Bennekom, persoonlijke mededelingen) werd de dosering van het auxine 2,4 D in het medium verlaagd van 3 naar 1,5 mg/l om een betere groei en structuur van het callusweefsel te krijgen. Ook op dit nieuwe medium lukte het om callusweefsel van VVA-1 goed te laten groeien, maar binnen de looptijd van het project is het niet meer gelukt om vast te stellen of dit callus vitaal genoeg was om snel met elkaar te vergroeien. Andere suggesties van SBW voor aanpassingen van het medium om een betere groei van het callus te krijgen waren het auxine 2,4 D te vervangen door het minder agressieve thidiazuron (TDZ). Om het ideale medium voor pruim te vinden werd geadviseerd callus te kweken op media met en zonder het cytokinine benzyladenine (BA) en met oplopende concentraties 2,4 D.

Voor het minder compact laten groeien van de plantjes in weefselweek was het advies om geen hogere doseringen BA te gebruiken dan 0,2 mg/l en om de concentraties van de macronutriënten in het medium eventueel ook nog te halveren. Een betere strekking van de plantjes in weefselweek zou ook nog verkregen kunnen worden door verhoging van de concentratie gibberelline GA3 naar 5 mg/l. Echter, de resterende tijd in het project was te kort om al deze voorgestelde veranderingen in de samenstelling van de weefselweekmedia te kunnen onderzoeken.

4 Conclusies en aanbevelingen

De door Errea *et al.* (2001) in de literatuur beschreven methode voor het testen van verenigbaarheid tussen ent- en onderstamrassen via het wel of niet vergroeien van callusweefsel van beide entpartners kan veel tijdswinst opleveren bij het vinden van goed met elkaar verenigbare combinaties. Deze zogenaamde callusfusiemethode kan ook het aantal kostbare en tijdrovende veldproeven van fruitrassen op verschillende onderstammen beperken.

Echter, het kopiëren van deze methode en het toepassen op pruimenrassen blijkt zeer tijdrovend en specialistisch werk te zijn. Ondanks de op basis van diverse externe adviezen aangebrachte veranderingen in de protocollen voor weefselkweek, is het gedurende de looptijd van het project niet gelukt om op een reproduceerbare manier voldoende en geschikt callusweefsel van pruim te kweken. Hierdoor kon de callusfusiemethode niet op zijn geschiktheid voor toetsen van de verenigbaarheid tussen ent- en onderstamrassen worden gebruikt. Het enige ras dat redelijk goed in weefselkweek groeide en waarvan ook voldoende callusweefsel werd verkregen was VVA-1. Toch lukte het niet om twee stukjes callusweefsel van VA-1, als positieve controle van de methode, succesvol met elkaar te laten vergroeien.

Niet alleen is veel ervaring met weefselkweek van planten vereist, maar het in weefselkweek brengen en in stand houden van de te onderzoeken rassen kost veel meer tijd dan de publicatie van Errea *et al.* (2001) deed vermoeden. Navraag bij dr. Errea leverde op dat voor het ontwikkelen van deze methode bij abrikoos, het in stand houden van het weefselkweekmateriaal en het microscopisch onderzoek van het callusweefsel in het laboratorium in Zaragoza twee laboratoriumassistenten 3 dagen per week nodig zijn. Achteraf kan worden geconcludeerd dat de doelstelling van het project om binnen een jaar een bruikbare callusfusiemethode te ontwikkelen voor pruimen en de eerste combinaties te testen veel te ambitieus is geweest. Ook de begrote inzet van assistenten voor het project en de mindere ervaring op het gebied van weefselkweek en microscopische technieken is niet realistisch geweest in vergelijking tot de personele en materiële inzet in het laboratorium in Spanje.

Het microscopisch onderzoek om de verenigbaarheid tussen de callusweefsels te onderzoeken kon door het ontbreken van geschikt callusweefsel niet worden uitgevoerd. Het werkbezoek aan het laboratorium in Spanje heeft tevens laten zien dat ook voor de microscopische technieken geavanceerde apparatuur en meer expertise met histologische technieken nodig is dan beschikbaar is bij PPO. Binnen andere onderdelen van Wageningen Universiteit en Research Centrum is deze apparatuur wel aanwezig, maar ontbreekt de ervaring met weefselkweek van fruitgewassen.

De callusfusiemethode leent zich niet voor incidenteel gebruik. Perspectief voor de inzet van deze methode in het gebruikswaardeonderzoek van nieuwe ras-onderstamcombinaties vereist samenwerking met een laboratorium waar continu planten in weefselkweek worden vermeerderd en microscopisch onderzoek plaatsvindt, omdat het opstarten van de methode voor slechts enkele ras-onderstamcombinaties per jaar te bewerkelijk en te kostbaar is.

Bij een eventueel vervolg van dit project verdient het daarom aanbeveling dit in samenwerking met een weefselkweeklaboratorium en histologisch laboratorium uit te voeren of het onderzoek op het laboratorium in Spanje te laten uitvoeren. Ook zou kunnen worden onderzocht of alternatieve toetsmethoden ontwikkeld kunnen worden op basis de door Espen *et al.* (2005) beschreven methode van micro-enten.

5 Literatuur

- Errea P., Garay L. and Marin J.A. (2001). Early detection of graft incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) using *in vitro* techniques. *Physiologia Plantarum* 112: 135-141.
- Espen L., Cocucci M. and Sacchi G.A. (2005). Differentiation and functional connection of vascular elements in compatible and incompatible pear/quince internode micrografts. *Physiologia Plantarum* 25: 14-19-1425.

Bijlage 1

Protocol medium voor vermeerdering plantmateriaal in weefselkweek

Samenstelling per liter medium:

Murashige en Skoog (MS) basal salt mix (macro en micro zouten)	4,3 g
MS vitaminen (1000x stock)	1,0 ml
Thiamine (stock 1mg/ml)	0,3 ml
<u>Hormonen</u>	
BAP (voor autoclaveren)	1,0 mg
IBA (voor autoclaveren)	0,04 mg
Suiker	30 g
Agar	7 g
pH	5,5

Bijlage 2

Protocol medium voor in stand houden plantmateriaal in weefselkweek

Samenstelling per liter medium:

Murashge en Skoog (MS) basal salt mix (macro en micro zouten)	4,3 g
MS vitaminen (1000x stock)	1 ml
Thiamine (stock 1mg/ml)	0,3 ml
<u>Hormonen</u>	
BAP (voor autoclaveren)	0,7 mg
GA 3 (filter steriel)	0,1 mg
IBA (voor autoclaveren)	0,1 mg
Suiker	30 g
Agar	7 g
pH	5,5

Bijlage 3

Protocol medium voor opkweek callusweefsel

Samenstelling per liter medium:

Murashge en Skoog (MS) basal salt mix (macro en micro zouten)	4,3 g
MS vitaminen (1000x stock)	1,0 ml
Thiamine (stock 1mg/ml)	0,9 ml
Hormonen	
BAP (voor autoclaveren)	1,0 mg
2.4 D (voor autoclaveren)	3,0 mg
Suiker	30 g
Agar	7 g
pH	5,7