

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η ικανότητα δημιουργίας ολόκληρων φυτών από καλλιεργούμενα φυτά με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας είναι μια ικανοποιητική μέθοδος πολλαπλασιασμού που έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετά φυτά. Για τα φυτά της οικογένειας Proteaceae έχουν καταγραφεί ελάχιστες αναφορές για τον πολλαπλασιασμό τους *in vitro*. Ο απώτερος σκοπός αυτής της εργασίας είναι να διασταυρωθούν και να μελετηθούν αν τα φυτά *Leucospermum* “sunrise” μπορούν να ριζοβολήσουν εύκολα και επιτυχώς σε συνθήκες *in vitro*.

2.2.1 Υλικά και εργαστηριακές συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων

Η παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθεί στην ιστοκαλλιέργεια απαιτεί διάφορα υλικά και συσκευές. Στους Πίνακες 2.1. και 2.2. συνοψίζονται τα πλήρη στοιχεία του υλικού, καθώς και η προέλευση αυτών, όπως επίσης και οι τύποι και προέλευση όλων των εργαστηριακών συσκευών. Περισσότερα στοιχεία ή λεπτομέρειες που τυχόν απαιτούνται για το καθένα από αυτά, είναι διαθέσιμα στον αντίστοιχο κωδικό της κάθε εταιρίας.

Πίνακας 2.1. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος και κατά την εργασία στην τράπεζα

Όνομα	Εταιρία	Κωδικός	Συνθήκες αποθήκευσης
MS Murashige and Skoog basal medium	SIGMA	#M5519	Θερμοκρασία 4°C
Sucrose, Grade I	SIGMA	#S5390-1KG	Θερμοκρασία δωματίου
Sucrose, Grade II	SIGMA	#55391-1KG	Θερμοκρασία δωματίου
Phytigel, plant cell culture tested, powder	SIGMA	#P8169-250G	Θερμοκρασία δωματίου
Ethanol 99% denatured	J.T. Baker	#3408	Θερμοκρασία δωματίου

Πίνακας 2.2. Συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή και κατά την εργασία στην τράπεζα

Όνομα	Εταιρία	Κωδικός
Ζυγαριά ακριβείας	Precisa 62A	#14879
Ζυγαριά αναλογική	Kern Kb	#031679
Drying oven	Trade Raypa	#DOD-150
Steam sterilizer	Trade Raypa	#AE-75 DRY
Θερμική Εστία / Μαγνητικός αναδευτήρας	Snijders Scientific	#34532
Επιτραπέζιος αποστειρωτής ξηρού τύπου (Steri-250)	Swiss	#250
Τράπεζα νηματικής ροής	ESCO	

2.2.2. Διαδικασία παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος

Ξεκινώντας την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος πρέπει να γίνει υπολογισμός της ποσότητας του κάθε υλικού που θα χρησιμοποιηθεί. Για 1000ml θρεπτικού διαλύματος πρέπει να χρησιμοποιηθούν οι εξής χημικές ουσίες

- MS (4,4gr/l) 4,4gr
- Sucrose II (2%) 20gr
- Agar(0,8%) 8gr

Στα πειράματα που θα πραγματοποιηθούν σε 50% MS, για 1000ml θρεπτικού διαλύματος και τα υλικά θα είναι στις εξής τιμές.

- MS (4,4gr/l) 2,2gr
- Sucrose II (2%) 20gr
- Agar(0,8%) 8gr

Στα πειράματα που θα πραγματοποιηθούν σε 50% MS, για 600ml θρεπτικού διαλύματος και τα υλικά θα είναι στις εξής τιμές.

- MS (4,4gr/l) 1,32gr
- Sucrose II (2%) 12gr
- Agar (0,8%) 4,8gr

Στα πειράματα που θα πραγματοποιηθούν σε 50% MS, για 600ml θρεπτικού διαλύματος και IBA 1ppm τα υλικά θα είναι στις εξής τιμές.

- MS (4,4gr/l) 0,66gr
- Sucrose II (2%) 6gr
- IBA stock (10mg/100ml) 3ml
- Agar (0,8%) 2,4gr

Στα πειράματα που θα πραγματοποιηθούν σε 50% MS, για 600ml θρεπτικού διαλύματος και IBA 3ppm τα υλικά θα είναι στις εξής τιμές.

- MS (4,4gr/l) 0,66gr
- Sucrose II (2%) 6gr
- IBA stock (10mg/100ml) 9ml
- Agar (0,8%) 2,4gr

Σε κωνική φιάλη των 1000ml μεταφέρονται 700ml απιονισμένου νερού και τοποθετείται ένας μαγνητικός αναδευτήρας. Στη συνέχεια τοποθετείται πάνω σε ένα θερμικό/μαγνητικό αναδευτήρα και τίθεται σε λειτουργία η ανάδευση. Ζυγίζονται 20gr Sucrose II και προσθέτονται στην κωνική φιάλη. Η Sucrose II είναι το πρώτο υλικό γιατί διαλύεται πιο δύσκολα από τα υπόλοιπα. Έπειτα ζυγίζονται 4,4 ή 2,2gr (για τα 50% MS) από το θρεπτικό MS στη ζυγαριά και μεταφέρονται στην κωνική φιάλη. Στην συνέχεια κλείνει ο αναδευτήρας και συμπληρώνεται με απιονισμένο νερό ως τα 1000ml. Τίθεται ξανά σε λειτουργία ο αναδευτήρας. Γίνεται η μέτρηση και μετά η ρύθμιση του pH που πρέπει να είναι pH 5,8. Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις KOH για αύξηση του pH και HCl για μείωσή του. Έπειτα ζυγίζονται 8gr από την πηκτική ουσία Agar, προσθέτονται στην κωνική φιάλη και ακολουθεί θέρμανση για περίπου 30 λεπτά μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.

Στη συνέχεια μεταφέρονται περίπου 25-30ml σε βαζάκια (διαστάσεων 6cm διάμετρο x 9,5cm ύψος). Πάνω στο κάθε βαζάκι σημειώνεται η ημερομηνία παρασκευής και το όνομα του υποστρώματος. Τέλος τυλίγονται με χαρτί που γράφεται επάνω η ημερομηνία παρασκευής και η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος. Έπειτα μπαίνουν στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Η αποστείρωση γίνεται στους 121°C για 20 λεπτά της ώρας.

Μόλις τελειώσει η διαδικασία της αποστείρωσης μεταφέρονται τα βαζάκια από τον κλίβανο και τοποθετούνται στον πάγκο του εργαστηρίου μέχρι να κρυσώσουν και να πήξει το θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια τοποθετούνται στο ψυγείο μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2.3. Προετοιμασία εκφύτων και απολύμανση

Για την εγκατάσταση μοσχευμάτων από φυτά του *Leucospermum* “sunrise” έγινε η συλλογή από τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα και κόπηκαν οι κορυφές του φυτού. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε βαζάκι όπου ξεπλύθηκαν με νερό για να απομακρυνθούν τα χώματα. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε το διάλυμα χλωρίνης 20% και προστίθεται 2 σταγόνες Tween-20. Το Tween-20 είναι ένα είδος σαπουνιού που βοηθάει να προσκολλήσουν τα ενεργά συστατικά της χλωρίνης πάνω στα έκφυτα. Τα μοσχεύματα αφού ξεπλύθηκαν τοποθετήθηκαν στο διάλυμα χλωρίνης για να πραγματοποιηθεί η απολύμανση. Η διαδικασία της απολύμανσης με χλωρίνη διαρκεί 10 λεπτά και γίνεται με ανακίνηση. Μετά την απολύμανση πρέπει να ξεπλυθεί η χλωρίνη από τα μοσχεύματα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε στην τράπεζα εργασίας. Προστέθηκε νερό στο σκεύος που βρίσκονταν τα μοσχεύματα και ακολούθησε ανακίνηση για 1 λεπτό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε 3-4 φορές μέχρι να ξεπλυθούν τελείως τα μοσχεύματα και να μην δημιουργούνται φυσαλίδες εξαιτίας του σαπουνιού. Μόλις ξεπλύθηκαν ήταν έτοιμα να τοποθετηθούν σε βαζάκια με θρεπτικό υπόστρωμα (Εικόνα 2.1). Σε κάθε βαζάκι τοποθετήθηκαν 4 έκφυτα. Στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης.

2.2.4. Προετοιμασία τράπεζας νηματικής ροής και διαδικασία ιστοκαλλιέργειας

Τέθηκε σε λειτουργία η τράπεζα νηματικής ροής και ο επιτραπέζιος αποστειρωτής ξηρού τύπου όπου είναι έτοιμα για χρήση σε περίπου 15 λεπτά. Πρώτα έγινε η παρασκευή της αιθανόλης 70% γιατί η αποστείρωση είναι πολύ βασική μέσα στην τράπεζα. Χρησιμοποιήθηκαν 70% αιθανόλη και 30% απιονισμένο νερό. Υπήρχαν αποστειρωμένα χαρτιά, πλάκες και εργαλεία (λαβίδες και νυστέρια) για την έναρξη της διαδικασίας τα οποία ήταν τυλιγμένα σε

αλουμινόχαρτο και είχαν αποστειρωθεί στον κλίβανο ξηρού τύπου. Με ένα άσπρο χαρτί (τύπου κουζίνας) και διάλυμα αιθανόλης 70% σκουπίστηκαν όλα τα εσωτερικά τοιχώματα της τράπεζας νηματικής ροής. Μεταφέρθηκαν τα βαζάκια με το υπόστρωμα. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν τα εργαλεία στον επιτραπέζιο αποστειρωτή και αφέθηκαν μέχρι να αποστειρωθούν. Ξετυλίχτηκε η πλάκα από το αλουμινόχαρτο και τοποθετήθηκε στη μέση της τράπεζας. Τα αποστειρωμένα χαρτιά αφέθηκαν μέσα στην τράπεζα.

Οι ψεκασμοί και σκούπισμα του χώρου της νηματικής ροής με αιθανόλη είναι συνεχείς. Τοποθετήθηκε πάνω στην πλάκα ένα αποστειρωμένο χαρτί όπου στη συνέχεια μεταφέρθηκαν τα μικρόφυτα προς εγκατάσταση στα θρεπτικά υποστρώματα. Κόπηκε η βάση του βλαστού και μεταφέρθηκαν στο βαζάκι με το νέο θρεπτικό υπόστρωμα. Σε κάθε βαζάκι τοποθετήθηκαν 4 φυτά. Στο βαζάκι σημειώνεται ο κωδικός του φυτού, η ημερομηνία και το όνομα του υπεύθυνου που εργάστηκε με το πείραμα. Μετά από κάθε χρήση τα εργαλεία αποστειρώνονταν. Στη συνέχεια τα καινούρια βαζάκια μεταφέρθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης στους 22°C.