الباب الأول

إنشاء معمل زراعة الأنسجة النباتية

التخطيط لإنشاء معمل زراعة الأنسجة

عند التخطيط لإنشاء معمل زراعة الأنسجة يستلزم أن يؤخذ فى الاعتبار العناصر الآتية:

١- المساحة المخصصة للمعمل.

٢- تحديد الهدف من إنشاء المعمل إن كان للبحث العلمىأو للإنتاج التجارى.

٣- تحديد مجالات الإنتاج إن كانت شاملة لأنواع كثيرة من النباتات أو متخصصة فى بعض النباتات دون غيرها.

٤- تحديد تتابع المعامل والحجرات طبقا لتخصصاتها وارتباطها فى تسلسل خطوات حركة العمل المتوقعة.

٥- تحديد متطلبات المعمل من الأجهزة ومستلزمات التشغيل.

٦- طريقة توزيع وتثبيت مواقع الأجهزة ومستلزمات التشغيل داخل الحجرات والمعامل المخصصة لها.

٧- تحديد متطلبات المعمل من المتخصصين والمشرفين والعمالة وغيرها.

مكونات معمل زراعة الأنسجة

(أ) مكونات إنشائية

١- حجرة التحكم فى التيار الكهربائى.

٢- حجرة الغسيل والنظافة. وحدة تحضير البيئات الغذائية. وحدة الزراعة المعملية (معمل الحقن) وحدة النمو. وحدة الكشف عن الأمراض.

٣- مجموعة حجرات خاصة بأجهزة التعقيم والحضانات والموازين والثلاجات والديب فريزر والفحص المجهرى (ميكروسكوب)، وجهاز قياس الأس الهيدروجينى pH-meter.

٤- مخزن للأدوات بعد غسلها وتعقيمها وحمايتها من إعادة التلوث. ومخزن لمستلزمات التشغيل مثل الأوانى الزجاجية والكيماويات والبيئات المختلفة. ومخزن للكحولات والمذيبات والبيئات سابقة التجهيز.

٥- حجرات خاصة للإداريين والمتخصصين والفنيين المساعدين.

(ب) ملحقات معمل زراعة الأنسجة

(أ) أرض زراعية لزراعة الشتلات فى أصص أو أكياس بلاستيك للوصول بها إلى الحجم المناسب للتسويق.

(ب) صوبة مزودة بأجهزة تحكم فى الإضاءة والحرارة والرطوبة والرى والتهوية، ومحمية من الحشرات والآفات. ومرفق بها مخازن للأدوات والأوانى الزراعية والأسمدة والمبيدات. وللصوبة أهمية كبيرة فى:

١- أقلمة النباتات بعد خروجها من معمل زراعة الأنسجة.

٢- إكثار وتربية نباتات الأم، وهى نباتات تعتبر مصدرا آمنا يفصل منها الأجزاء المطلوبة للزراعة المعملية.

مواصفات وحدات معمل زراعة الأنسجة

١- حجرة التحكم فى التيار الكهربائى

هى حجرة تحتوى على اثنين من المولدات الكهربائية، أحدهما أساسى والثانى احتياطى، لضمان توفير تيار كهربائى مستمر بالقدر الكافى للإضاءة وتشغيل الأجهزة، مع توفير أجهزة إنذار عن الأعطال المفاجئة .

٢- حجرة الغسيل Washing room

هى حجرة خاصة لاستقبال العينات النباتية القادمة من الصوبة أو الحقل. ويتم فيها تهذيب العينات النباتية للوصول بها إلى الحجم المناسب للعينة، ثم غسلها وتنظيفها للتخلص من الأتربة وجميع العوالق. وتتجمع فيها الأدوات المعملية والأوانى الزراعية المستعملة للتخلص من بقايا النباتات والآجار وتنظيفها. ويجب أن تقع هذه الحجرة فى مقدمة معمل زراعة الأنسجة ومنعزلة عنه لشدة تلوثها. ويجب أن يتوفر فيها:

١- مصدر للمياه الباردة والساخنة وأحواض معدنية أو مطلية لا تتأثر بالمنظفات والكيماويات.

٢- غسالة أطباق لغسل الأوانى والأدوات الأخرى، ومجموعة من الأرفف الثابتة والمتحركة للتجفيف.

٣- فرن لتجفيف وتعقيم الزجاجات وأدوات التشريح المعدنية بالحرارة الجافة.

٤- جهاز للتعقيم البخارى تحت ضغط (أوتوكلاف).

٥- أجهزة ثنائية التقطير مزودة بأجهزة لإزالة الأيونات ومتصلة بمصدر للمياه الباردة والساخنة.

٦- بعض الدواليب لحفظ الكيماويات اللازمة لغسيل أوانى الزراعة والأدوات المختلفة.

٣- وحدة تحضير البيئات الغذائية

Media preparation unit

هذا المعمل لإعداد وتحضير البيئات وتعقيمها وتخزينها مؤقتا لحين تفريغها فى أوانى الزراعة المعملية مثل الأطباق البترى والدوارق المخروطية والبرطمانات. ويثبت

فى وسط المعمل منضدة عمل ترص عليها أوانى الزراعة المعملية وجهاز توزيع البيئة الغذائية. ويستلزم لهذا المعمل وجود:

١- جهـاز ثنائىالتقطير مزود بجهاز مزيل للأيونات وأوتوكلاف للتعقيم ومصدر للمياه الباردة والسـاخنة. ودواليب لتخزين الأوانى الزجاجية والكيماويات اللازمة لتكوين البيئة الغذائية والأدوات المعملية.

٢- بنشـات جانبية يثبت عليها بعض الأجهزة مثل ميزان كهربائى حساسـية ٠,١ جرام للأوزان الكبيرة نسـبيا. وميزان آخر حساس (ملليجرام) للأوزان الدقيقة. وجهاز قياس تركيز أيون الهيدروجين pH-meter . ومقلب مغناطيسى بمسطح ساخن وفرن ميكروويف لإسالة البيئة.

٤- وحدة الزراعة المعملية (حجرة الحقن)

Inoculation room

هى حجرة خاصة للزراعة المعملية. ويجب أن تكون معزولة عن مكونات المعمل. وتتميز بمسـتوى عال من النظافة والتعقيم، وتحتـوى على كابينة الحقن Laminar air-flow cabinet. ويجب أن يتوفر فيها الآتى:

١- أن تكون أرضيتها وجدرانها وما تحتويه من المناضد والأرفف قابلة للغسـيل والتعقيم بالماء والمعقمات.

٢- أن تكون مزودة بجهاز تكييف يعمل ذاتيا إذا ارتفعت الحرارة عن المدى المطلوب.

٣- يثبت بالحجرة لمبات أشعة فوق بنفسجية (UV) للتعقيم، ويثبت واحدة منها فى سقف الحجرة .

الاحتياطات الواجبة فى حجرة الحقن

١- تعتـبر أحذية وملابس الزائرين مصدرا هامـا للتلوث، لذلك يجب تغطيتها بغطاء معقم من البلاسـتيك أو غمس نعلها فى محلول معقم قبل دخول المعمل ولبس بلاطٍ على أن تعقم أرضية الحجرة يوميا.

٢- على العاملين بالمعمل غسل الأيدى والأجزاء المكشوفة من الأذرع بانتظام بالصابون ثم تعقيمها بكحول ٩٦٪. و يستخدم العاملون بالمعمل أحذية وبلاطى- معقمة مقرها الدائم داخل حجرة الحقن.

٣- عدم استخدام الكابينة للتخزين أو إدخال مواد ملوثة للمعمل، وعدم إدخال مستخدم الكابينة رأسه داخلها.

٤- تغيير الأدوات المعملية المستعملة بانتظام ووضعها بعد استعمالها مباشرة فى كحول ٩٦٪. واستبعاد الأوانى المحتوية على بيئات ملوثة بسرعة. وتجمع المخلفات فى أكياس بلاستيك، ويتخلص منها فورا وبانتظام.

٥- حجرة النمو (وحدة الزراعة)

Growth room (Culture unit)

هى حجرة تنقل إليها الأجزاء النباتية بعد زراعتها فى بيئة غذائية منشطة للنمو وتكوين الأعضاء. وتحتوى هذه الوحدة على منضدة لفحص وتتبع نمو المزروعات. وقد يستلزم توفير أكثر من حجرة نمو خصوصا إذا تعددت اهتمامات المعمل وامتدت إلى أنواع نباتية أخرى مختلفة فى احتياجاتها الحرارية والضوئية. وحينئذ قد تقسم حجرة النمو إلى وحدات صغيرة بواسطة عوازل محكمة مع وضع مسمى خاص لكل منها مثل:

١- **حجرة الاستبداء** Initiation room: وهى وحدة تنقل إليها الأجزاء النباتية عقب زراعتها مباشرة. وتحضن فى ظلام تام أو ضوء ضعيف ودرجة حرارة مناسبة حتى يكتمل تكوين الكالس.

٢- **حجرة النمو** Growth room: وينقل إليها الكالس بعد تكوينه ويحضن عند درجة حرارة وطول فترة ضوئية وشدة إضاءة مناسبة لتكشف الأعضاء النباتية ونموها.

مستلزمات الإضاءة فى حجرة النمو

١- تستخدم لمبات فلورسنت كمصدر ضوئى تتناسب شدته وفقا لكثافة واحتياج المزروعات. ويتم التحكم فى شـــدة الإضاءة فى بعض الأماكن داخل حجرة التنمية بإضعافها أو حجبها بالكامل وفقا لاحتياج النباتات .

٢- تثبت لمبات الفلورســنت أفقيا تحت الأرفف (فوق النباتات) أو عموديا على جوانــب الأرفف لانتظــام توزيع الإضاءة بين النباتات وتجنــب ارتفاع الحرارة فى الأماكن القريبة من اللمبات.

٣- الترنسات الخاصة بلمبات الفلورسنت تعتبر مصدرا لانبعاث الحرارة، لذلك يفضل تثبيتها خارج حجرة النمو.

٤- توفــير جهاز توقيت لضبط توالى عدد ســاعات الإضاءة والظلام طبقا لحاجة النباتات.

٥- توفــير جهاز لقياس شــدة الإضاءة Lux- meter. وجهــاز إنذار عن الأعطال المفاجئة فى التيار الكهربائى.

تثبيت الحرارة فى حجرة النمو

١- يثبت جهاز تكييف مركزى للتحكم الكامل فى درجات الحرارة داخل جميع وحدات معمل زراعة الأنسجة، وضبطها عند ١٧- ٢٧°م. لذلك يفضل تركيب جهاز تكييــف احتياطى داخــل كل وحدة من وحدات المعمل للتشــغيل إذا حدث عطل مفاجئ لجهاز التكييف المركزى.

٢- توفير جهاز إنذار للتنبيه عن الأعطال أو الخلل المفاجئ فى جهاز التكييف المركزى.

٣- ضرورة التأكد من التهوية الجيدة بين الأرفف الحاملة للأوانى المزروعة حتى لا ترتفع الحرارة بينها. ويفضل اســتخدام أرفف معدنية مفتحة مع المحافظة على زيادة حركة الهواء داخل الحجرة وبين الأرفف.

٤- تثبيت جهاز أمان بكل حجرة يقوم بفصل الإضاءة إذا كانت هى السبب فى ارتفاع الحرارة.

٦- وحدة الكشف عن الأمراض

هى وحدة خاصة للكشف عن الأمراض الفيروسية والبكتيرية والإصابات الحشرية والنيماتودا التى تصيب النباتات. ويجب أن تكون هذه الوحدة معزولة عن الحجرات السابقة. ويثبت فيها بنشات يوضع عليها أجهزة الكشف عن الفيروسات مثل جهاز ELISA أو جهاز IC-PCR و بينوكلر وميكروسكوب. كما يجب أن يتوفر فيها الأطباق البترى والأدوات المعملية والكيماويات اللازمة للاختبارات الميكروبيية.

احتياجات معمل زراعة الأنسجة النباتية

١- أجهزة ومعدات

- كابينة تيار هواء مستمر (كابينة للحقن) Laminar air-flow cabinet
- حضانات عادية Incubators وحضانات هزازة Shaking incubators
- حضانة بمسطح دائرى الاهتزاز Platform - shaker incubator
- أجهزة تعقيم بالضغط البخارى Autoclaves
- أفران تجفيف Ovens مختلفة الأحجام للتجفيف والتعقيم.
- فرن ميكروويف Microwave لتسخين وإسالة البيئة الغذائية والآجار والعينات المجمدة.
- جهاز تبريد عميق (-٢٠°) Deep freezer .
- ثلاجات عادية لتخزين البيئات الغذائية والمواد الكيميائية مثل الهرمونات والفيتامينات.
- جهاز ثنائى التقطير مزود بجهاز مزيل للأيونات Deionizer Bi-distiller

- جهاز طرد مركزى بطىء السرعة Low speed Centrifuge
- جهاز قياس الأس الهيدروجينى pH-meter
- حمامات مائية مختلفة الأحجام.
- غسالة أطباق ذاتية التشغيل Dishwasher وغسالة ماصات مقاومة للأحماض Pipette washer.
- مقلب مغناطيسى عادى Magnetic stirrer ومقلب مغناطيسى بمسطح ساخن.
- موازين عادية ذات حساسية ٠,٠١ جرام و ذات حساسية ٠,٠١ ملليجرام.
- موزع للعينات ذاتى التشغيل Automatic dispenser
- خلاط للعينات الكبيرة Blender
- ميكروسكوب استريو Stereo- microscope
- جهاز توقيت Timer لضبط وقت التعقيم.

مستلزمات تشغيل

- مواد كيميائية داخلة فى تكوين البيئة الغذائية من أملاح معدنية ومنظمات النمو وآجار ومنظمات للنمو.
- بيئات غذائية مختلفة جاهزة التركيب.
- مواد معقمة مثل هيبوكلوريت الصوديوم وهيبوكلوريت الكالسيوم وكحول إيثانول ٩٦٪.
- خطوط لإمداد الغاز والماء والهواء المضغوط وخطوط لتفريغ الهواء ومصدر للبخار Steamer وخطوط كهرباء فى جميع المعامل وكابينة الحقن.
- نظام مرشح دقيق Millipore filter system
- حاويات معدنية للأطباق البترى والماصات تستخدم أثناء تعقيمها فى جهاز الضغط البخارى.

– أدوات زجاجيـة وبلاسـتيكية عياريـة وغـير عيارية مثل المخابـير ودوارق مخروطية ودوارق سـتيـوارد Steward flask وكئوس وماصات وسـحاحات وأنابيب اختبار مختلفة الأحجام ويفضل أحيانا أنابيب بغطاء قلاووظ Screw-top، وأطباق بـترى Petri dishes وزجاجات لبن وبرطمانات مربـى وزجاجات حفظ ومجففات Desiccator وخزان للماء المقطر والماء الخالى من الأيونات.

مستلزمات الغسيل والنظافة

– حوض غسيل مضاد للأحماض وتروللى لنقل المعدات .

– أدوات نظافـة مثل الفوط والقرش. ومـواد تنظيف الأدوات الملوثة مثل حمض الكبريتيك والكروميك ومطهرات.

– حوامـل معلقـة لتجفيـف الأدوات المعملية مثـل الـدوارق والبرطمانات بعد غسلها.

– سـدادات قطن وورق ألومنيوم وأفلام بلاسـتيك وأغطيـة أنابيب معدنية لغلق الأنابيب.

– ورق ألومنيـوم Aluminum foil وورق ترشـيح Filter papers وفيتا فيلم Vita film أو ما يماثله للف وتغطية الصناديق والحوامل وغيرها.

تستخدم فى المعامل التجارية لزراعة الأنسجة أدوات ومستلزمات خاصة بالتكاثر مصنوعة من البلاسـتيك لانخفاض سعرها وسـهولة تداولها. ويؤخذ فى الاعتبار أن أنابيب الاختبار حجمها أكبر ومسـطح البيئـة داخلها أصغر ولكن التهوية داخلها منخفضـة وهذا يقلل مـن تعرض البيئة للجفـاف والتلوث. بينمـا الأطباق البترى لها حجم أصغر نسـبيا ومسـطح أكبر وتهوية أفضل مما يعرض البيئة بها لسـرعة الجفاف والتلوث. لذلك يفضل إحكام غلق الأطباق البترى بشرائط من البارا فيلم أو ما يماثلهـا. والدوارق الكبيرة أفضل للنمو من الـدوارق الصغيرة، حيث تزداد فيها كمية البيئة الغذائية المسـتخدمة فى وحدة المسـاحة مما يؤدى إلى انخفاض تجمع غازات ثانى أكسيد الكربون والإيثلين حول الأجزاء النباتية المزروعة.