

# زراعة الأنسجة النباتية

## Plant Tissue Culture

### المحاضرة الثاني

#### مكونات مختبر زراعة الأنسجة النباتية

#### Plant Tissue Culture Laboratory

تجرى زراعة الأنسجة النباتية تحت ظروف معقمة في معامل أو مختبرات خاصة تسمى (معامل أو مختبرات زراعة الأنسجة) ويجب أن تتوفر فيها شروط معينة وأن تجهز تجهيزاً خاصاً ويجب أن يكون المعمل خالي من جميع الكائنات الدقيقة الملوثة وأن يكون بعيداً عن الأماكن والطرق المتربة والتي يمكن أن تلوث المزارع والبيئات. إن إنشاء معمل لزراعة الأنسجة يعتمد في الأساس على نوعية وهدف الأبحاث والدراسات التي سوف تجرى داخل المعمل وكذلك الميزانية المعدة لإنشاء هذا العمل. بغض النظر عن نوع التقنية التي سوف تستخدم داخل المعمل إن كان الهدف منها على سبيل المثال إكثار النباتات أو إنتاج المركبات الثانوية أو إجراء تجارب التحسين الوراثي ونقل الجينات الهامة إلى النبات فلا بد من توافر الركائز الأساسية للمعمل والتي تشمل على ما يأتي:

- 1-1 - مكان للغسيل والتخزين. حر
- 2-2 - مكان لإعداد البيئة وتعقيمها وتخزينها.
- 3-3 - غرفة لإجراء عمليات التعقيم والزراعة.
- 4-4 - غرفة للنمو مزودة بنظام للتحكم في الحرارة والضوء والرطوبة.
- 5-5 - غرفة لإجراء عملية الملاحظة على النتائج.

ونستعرض هذه المكونات كالتالي:

#### 1- غرفة الغسيل ومخزن للأدوات Washing and Storage Room

يجب أن تشمل غرفة الغسيل مكان متسع به أحواض ذات صرف جيد مصنعة من الرصاص لمقاومة الأحماض والقلويات التي تستخدم داخل المعمل ومزودة بمصدر للمياه الساخنة والباردة فضلاً على وجود مناوئ عمل يوضع عليها جهاز التقطير المزدوج Double distilled water. غسالة أطباق، أحواض بلاستيكية وإستانلس لإجراء عملية النقع والشطف بها، مجفف هوائي وفرش للغسيل، يجب أن تكون الغرفة مزودة بجهاز شفط للأتربة لحماية الأدوات المغسولة من التلوث مرة أخرى. وسوف نقدم هنا أحد الرسومات الهندسية لمعمل زراعة الأنسجة

#### 2- غرفة إعداد البيئات الغذائية Media Preparation Room

إن مكان إعداد البيئة الغذائية يجب أن يكون به الاستعدادات والفراغات اللازمة لتخزين الكيماويات و أدوات وأوعية الزراعة وكل الأدوات اللازمة لإعداد البيئة الغذائية مثل جهاز تسخين بمقلب مغناطيسي - ميزان حساس - دوارق - كاسات - ماصات - جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH حمام مائي - موقد بنزل مزودة بالغاز، فرن ميكروويف - جهاز تعقيم أوتوكليف وهناك أجهزة ضرورية مثل الثلجات وجهاز رج شيكر - جهاز شفط أو تفريغ وذلك لتفريغ البيئة من الهواء - جهاز تجميد.

### 3- غرفة الزراعة Culture Room

استخدام غرفة كبيرة معقمة بواسطة اشعة الـ UV بحيث يدخلها هواء منقى من الأتربة بواسطة مجموعة من الفلاتر مثل فلتر HEPA حيث تصل كفاءته من 99.97 إلى 99.99% وهذه تقوم بعدم السماح للأتربة والكائنات الدقيقة بالنفوذ منه وهو يستخدم في معظم معامل زراعة الأنسجة وهو ما يطلق عليه (الهود) Laminar airflow وهو عبارة عن جهاز يدفع الهواء في أحد الفلاتر التي تحجز الأتربة العالقة الكبيرة الحجم ثم بعد ذلك يمر الهواء إلى فلتر دقيق HEPA (ميكرون)  $0.3 \mu$  والهواء إما يدفع رأسياً أو أفقياً في منطقة العمل (الهواء القادم من منطقة الفلاتر يكون خالياً من الأتربة والبكتريا والفطريات) وسرعته حوالي  $27 \pm 3$  م/ دقيقة وهذه السرعة قادرة على إزاحة أى مصدر للتلوث الخارجى من أوراق أو شعر أو أتربة عن منطقة العمل داخل الكابينة.

### 4- غرفة التحضين Incubation Room

تؤثر العوامل البيئية كثيراً على عملية نمو المزارع وكذلك تكشفها ولذلك فإن جميع أنواع مزارع الأنسجة تحفظ في مكان يمكن التحكم بداخله في درجة الحرارة والضوء والرطوبة ودورة الهواء. إن مزارع البروتوبلاست أو المتوك والمزارع السائلة أكثر حاجة لظروف التحكم عن مزارع الكالوسات ولذلك يجب أن يوضع برنامج لدرجات الحرارة والإضاءة على مدار 24 ساعة.

### 5- غرفة الملاحظة وجمع المعلومات

#### Observation or Data Collection Area

تجرى متابعة النوبات داخل الدوارق إما في غرفة النمو داخل الحضانات على فترات متقاربة متساوية حيث إنه يجب أن تكون المتابعة في نفس ظروف النمو ولذلك تفحص المزارع إما في غرفة النمو أو في الكابينة الهوائية المعقمة أو أى منطقة معقمة صالحة لتجديد ونقل المزارع بالنسبة للفحص الميكروسكوبى يمكن أن تأخذ المزارع إلى حيث يوجد الميكروسكوب. النباتات الناتجة من الكالوسات أو من مزارع الأنسجة تنتقل بعد ذلك إلى أصص صغيرة تحتوى على تربة صناعية مثل البيت موس والفيرموكوليت مكونة من عدة عناصر وتوضع في غرفة

النمو ثم تنقل إلى الصوبة الزجاجية بعد ذلك مع دوام الفحص الدورى لها وتسجيل الملاحظات عن درجة الحرارة و الضوء والرطوبة.

### الأجهزة والأدوات التي يجب توافرها فى معمل زراعة الأنسجة

قائمة بأهم الأدوات والأجهزة التي يجب أن تتوفر في معمل أو مختبر زراعة الأنسجة:

- 1 - دوارق Flasks مخروطية بأحجام مختلفة
- 2 - دوارق معيارية بأحجام مختلفة
- 3 - مخابير مدرجة بأحجام مختلفة
- 4 - ماصات مدرجة بأحجام 1 و 2 و 5 و 10 مل.
- 5 - ماصات باستير.
- 6 - أوعية الزراعة\_ وتشمل انابيب الزراعة والزجاجيات وإطباق بتر دش
- 7 - جرادل بلاستيك لنقع الزجاجيات قبل غسلها.
- 8 - ترمومتر Digital Thermometer لقياس درجات الحرارة داخل الحضانة أو غرفة الزراعة وذلك لضبط درجة الحرارة.
- 9 - فرن Oven لتجفيف الأوعية والزجاجيات وتعقيمها وعادة يتم التعقيم على درجة حرارة 180°م لمدة 3 ساعات ولذلك يجب أن يعمل الفرن حتى 210°م على الأقل.
- 10 - سلال سلكية توضع بها أوعية البيئات الصغيرة (أنابيب إختبار ) في أثناء تعقيمها في الأوتوكلاف والزجاجيات الصغيرة أثناء تجفيفها في الفرن.
- 11 - موازين Balances (موازين حساسة) 14 - سخان Hot plate مع قلاب مغناطيسى Magnetic stirrer لإذابة المركبات الكيميائية وإذابة الآجار.
- 12 - قنينات بلاستيك بأحجام مختلفة لتخزين المحاليل سائلة أو مجمدة.
- 13 - ثلاجة Refregerator لتخزين المركبات الكيماوية والمحاليل القياسية التي تحضر منها البيئات .
- 14 - ديب فريزر Deep Freezer لتخزين المحاليل القياسية لفترات أطول والهرمونات وبعض الإنزيمات ولبن جوز الهند.
- 15 - جهاز pH meter لقياس وضبط ال pH
- 16 - أوتوكلاف Autoclave أو قدور طهي وهي أجهزة تعقيم با لبخار تحت ضغط تستخدم لتعقيم البيئات والماء المقطر ويكون التعقيم على درجة حرارة 121°م تحت ضغط جوى 1.2 to 1.5 . كجم /سم<sup>2</sup> أو 15 رطل/ البوصة المربعة ولمدة ثلاث ساعة (20 دقيقة).
- 17 - رشاشات صغيرة لرش الكحول المخفف 70% داخل الهود أو حجرة العزل.

- 18 ملاقط Forceps كبيرة
- 20 مشارط Scalpels حادة لتقطيع الأنسجة النباتية
- 21 مجهر ثنائي العينين Binocular .
- 22 مكيفات هواء Air Condition.
- 23 هزاز Shaker لهز وتحريك (بحركة منتظمة) المزارع السائلة.
- 24 جهاز طرد مركزي Centerfuge صغير لترسيب الخلايا بغرض تحديد حجم النمو الخلوى.
- 25 كابينة زراعة الأنسجة النباتية (اللامينار أو الهود) Laminar airflow hood .
- 26 حضانة Incubator.
- 27 حوامل الأنابيب Raks.
- 28 حمام مائي Water bath.
- 29 قفازات Gloves.
- 30 غطاء الرأس والفم والحداء.