

زراعة الأنسجة النباتية

Plant Tissue Culture

المحاضرة الثامنة

بعض الملاحظات الرئيسية عند الغسيل وإستعمال الزجاجات داخل معمل زراعة الأنسجة

- 1- الأدوات التى تستخدم أكثر من مرة داخل معمل زراعة الأنسجة يجب أن تفرغ من البيئات الغذائية بعد الانتهاء من العمل مباشرة وتقع فى الماء ولا يسمح أن تجف البيئات أو الأجار داخل الأوعية.
- 2- يجب أن تعزل الأدوات المستخدمة فى الكيماويات مثل المطهرات والمذيبات العضوية بعيداً عن الزجاجات المستخدمة فى الزراعة.
- 3- كل الأوعية التى حدث بها تلوث أو لاصقت أى من الملوثات يجب أن تعقم قبل الاستخدام مرة أخرى.
- 4- يجب إزالة أى ملصقات على الزجاجات أو أى بيانات بالحبر على أوانى الزراعة قبل الغسيل عن طريق إستخدام الأسيتون أو الكحول.
- 5- الأجار أو البيئة الموجودة داخل الأوعية بعد الزراعة يجب أن تجمع ويتخلص منها بسرعة من المعمل إن كان هناك ملوثات يجب أن يعقم هذا الأجار داخل الأوتوكلاف قبل التخلص منه.
- 6- الأغشية البلاستيكية يجب أن تتقع فى ماء مقطر ويحذر نقعها فى محاليل الصابون أو المطهرات الكيماوية.
- 7- الأوعية الزجاجية المستخدمة فى الزراعة يجب أن تعامل بمحلول حامضى لإزالة أى نوع من البروتينات على الجدر.
- 8- الأوعية الزجاجية المصنعة من السليكون يجب أن توضع منفصلة عن الأوعية الأخرى بالمعمل وغالباً ما تكون معلمة .

ما يجب مراعاته عند غسيل الأوعية الزجاجية:

- 1- يجب أن تتقع الأوعية الزجاجية فى أحد المطهرات ذات تركيز 5% لمدة ساعة على الأقل.
- 2- فى الغسيل الأوتوماتيكي لا توضع أى مطهرات وتبرمج الغسالات على أساس الشطف بالمياه العادية 5 مرات ثم بالماء المقطر مرة واحدة ويمكن أن تعامل الأدوات بالمحاليل المطهرة قبل وضعها فى الغسالة.
- 3- الأوعية الزجاجية الكبيرة الحجم التى لا يمكن إدخالها فى الغسالة يمكن أن تغسل خارجها عن طريق شطفها بماء الصنبور من 5 إلى 6 مرات ثم بماء مقطر مرة واحدة.
- 4- إذا لم تتوفر إمكانيات الغسيل الميكانيكى فإن أى طريقة باستخدام ماكينة ذات فرش مختلفة الأحجام تؤدى الغرض.

ما يجب مراعاته عند الغسيل بالأحماض:

- 1- يجب أن يرتدى الشخص الذى يقوم بالغسيل قناع للوجه وكذلك قفاز..
- 2- يجب أن يتم الغسيل بالأحماض ونقع الأدوات الزجاجية فى مكان مزود بألة شطف للأبخرة.
- 3- يحذر إضافة الماء إلى الحامض وعند التخفيف يضاف الحامض إلى الماء.
- 4- يجب التخلص من بواقي الغسيل بالأحماض عند تحول المحلول إلى اللون الأسود.

الصفات العامة للحضانات أو غرف النمو:

- 1- درجات الحرارة بها تتراوح من 2-40 ° م.
- 2- التحكم فى درجة الحرارة يجب أن يكون بمقدار ± 0.5 °م.
- 3- يجب أن تكون ذات أمان بالنسبة للدرجة القصوى والدنيا من الحرارة
- 4- يجب أن يكون بها مسجل دائم لدرجات الحرارة.
- 5- أن تكون ذات قدرة على البرمجة لمدة 24 ساعة بالنسبة للضوء والحرارة.
- 6- تتحمل أن يوضع بها إضاءة لأكثر من 10.000 لوكس.
- 7- نسبة الرطوبة بها تتراوح من 20 – 98%.
- 8- نسبة الرطوبة يكون التحكم فيها بمقدار ± 3 %.
- 9- أن يكون بها موزع للهواء بانتظام.
- 10- أن يكون السعة الحجمية بمعدل 0.7 م³ لكل 0.5 م² مساحة.

الأجهزة والأدوات التى يجب توافرها فى معمل زراعة الأنسجة

أولاً- قائمة بأهم الأدوات والأجهزة التى يجب أن تتوفر فى معمل أو مختبر زراعة الأنسجة:

- 1 - دوارق Flasks مخروطية بأحجام 100 و 125 و 250 مل و 1 و 5 لترات.
- 2 - دوارق معيارية بأحجام 500 مل و 1 و 2 و 3 لترات.
- 3 - مخابير مدرجة بأحجام 25 و 50 و 100 و 500 مل ولتر واحد.
- 4 - ماصات مدرجة بأحجام 1 و 2 و 5 و 10 مل.
- 5 - ماصات باستير.
- 6 - أوعية الزراعة

أ - أنابيب إختبار Test tubes تصنع من زجاج البيركس تتحمل عمليات التعقيم ولها أغطية شفافة تصنع من مادة Polypropylene لتتحمل درجات الحرارة العالية مع الضغط أثناء عملية التعقيم. وهذه الأنابيب تستخدم فى الزراعة فى المراحل الأولى مثل زراعة المرستيمات فيزرع كل مرستيم فى أنبوبة أو ينقل إليها نبات النخيل بعد تكشفه من الكالوس.

ب - زجاجيات (برطمانات) بأحجام مختلفة منها الصغير والمتوسط والكبير لها أغطية بلاستيكية شفافة تتحمل عملية التعقيم وهذه تستخدم فى المرحلة الثانية (مرحلة الإكثار).

ج - ماجينئات بأغطية بلاستيك شفافة تتحمل عملية التعقيم تستخدم فى مرحلة الإكثار.

د - أطباق بترى وهى تصنع من الزجاج وهذه تعقم أو من البلاستيك وتباع معقمة وهذه لا تستعمل إلا مرة واحدة وهذه توضع بها نباتات البطاطس لحين تقسيمها أو لتفصيص نباتات الموز أثناء عملية الزراعة فى كابينة زراعة الأنسجة (الهود).

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) فى أثناء تعقيمها فى الأوتوكلاف والزجاجيات الصغيرة أثناء تجفيفها فى الفرن.

- 11 - جهاز لنزع الأيونات من الماء Water Deionizer. و جهاز تقطير المياه و يفضل ماهو زجاجى و منه نحصل على مياة مقطرة خالية من الأملاح والرواسب.
- 12 - أوعية بلاستيكية بحجمى 10 و 20 لتر لتخزين الماء المقطر الناتج من جهاز التقطير.
- 13 - موازين Balances (موازين حساسة) أحدهما لوزن الكميات الصغيرة جدا حوالي 3 أو 4 أرقام عشرية من الجرام لوزن الهرمونات والثانى رقمان عشريان لوزن الكميات الكبيرة نسبيا مثل السكر والأجار وأملاح البيئية المستخدمة.
- 14 - سخان Hot plate مع قلاب مغناطيسى Magnetic stirrer لإذابة المركبات الكيميائية وإذابة الأجار.
- 15 - مضخة تفريغ لتسهيل عملية التعقيم بالترشيح.
- 16 - قنينات بلاستيك بأحجام مختلفة لتخزين المحاليل سائلة أو مجمدة.
- 17 - ثلاجة Refregerator لتخزين المركبات الكيماوية والمحاليل القياسية التي تحضر منها البيئات .
- 18 - ديب فريزر Deep Freezer لتخزين المحاليل القياسية لفترات أطول والهرمونات وبعض الإنزيمات ولبن جوز الهند.
- 19 - جهاز توليد بخار Steamer لإذابة الأجار والبيئات.
- 20 - جهاز pH meter لقياس وضبط ال pH للبيئات والمحاليل ويقرأ اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين في محلول البيئة وقبل إضافة الأجار ويقرأ من مدى صفر إلى 14 pH . وهو للبيئة السائلة 5.2 to 5.5 وللبيئة الصلبة 5.6 to 5.8.
- 21 - أوتوكلاف Autoclave أو قدور طهي وهي أجهزة تعقيم بالبخار تحت ضغط تستخدم لتعقيم البيئات والماء المقطر ويكون التعقيم على درجة حرارة 121°م تحت ضغط جوى 1.2 to 1.5 كجم /سم² أو 15 رطل/البوصة المربعة ولمدة ثلاث ساعة (20 دقيقة). الظروف السابقة (من حرارة وضغط) فدرجة الحرارة مع الضغط تعقم البيئة وبدون غليانها ثم بعد إنتهاء فترة التعقيم يلى ذلك فتح صنبور الضغط برفق وبيبئى حتى ينزل الضغط ولا يفتح فجأة فيتسبب في غليان البيئة وتطاير الأغذية وعند التأكد من نزول الضغط إلى الصفر وتركه فترة 5 - 10 دقائق بعدها يبدأ في فتح غطاء الأوتوكلاف وإستخراج البيئة ووضعها لتبرد لحين إستعمالها. ويجب أن يكون هناك جوانتى من الجلد أو من القماش السميك وذلك لرفع البرطمانات من الأوتوكلاف حيث تكون تلك الأوانى ساخنة ومن الأوتوكلاف ماهو رأسى ومنه ما هو أفقى.
- 22 - أغشية مرشحات تعقيم ومواسكها لتعقيم المحاليل بالترشيح (مرشحات بكتيرية).
- 23 - حقن بلاستيكية معقمة لغرض الإستعمال مع المحاليل المعقمة بالترشيح.
- 24 - عربات صغيرة (تروللى) مزودة بصوان مناسبة لنقل البيئات والأدوات من حجرة البيئة إلى حجرة الزراعة ونقل الأوعية التي زرعت ومن حجرة الزراعة إلى حجرة التحضين.
- 25 - لمبة (شعلة) كحول أو مصباح بنزن لتعقيم الأدوات وذلك بغمس الأدوات في الكحول ثم تعريضها للهب لتشتعل ويجب أن يكون العمل في مجال الشعلة لأنها تعقم المجال الذى حولها.
- 26 - رشاشات صغيرة لرش الكحول المخفف 70% داخل الهود أو حجرة العزل وكذلك تعقيم القائم بالعمل. وكذلك تعقم بها البرطمانات من الخارج قبل الإستخدام وأيضا تستخدم لرى النباتات الصغيرة بالماء (رذاذ) أثناء عملية الأقلمة.
- 27 - ملاقط Forceps كبيرة من الصلب الذى لا يصدأ ذات أطراف غير حادة لزراعة الأجزاء الكبيرة في الأوعية الكبيرة.
- 28 - ملاقط Forceps من الصلب ذات أطراف حادة لنزع بشرة الأوراق.
- 29 - ملاقط Forceps صغيرة لزراعة الأجزاء الصغيرة في الأوعية الصغيرة.
- 30 - إبر Needels دقيقة للتشريح.
- 31 - مشارط Scalpels حادة لتقطيع الأنسجة النباتية ومنها رقم 10 - 11 - 12 - 13.

- 32 - مجهر ثنائي العينين Binocular لرؤية الأجزاء مجهرية الحجم وكذلك يستخدم في فصل المرستيمات.
- 33 - مكيفات هواء Air Condition للمحافظة على درجة الحرارة المطلوبة بقدر الإمكان في حجرة الزراعة وحجرة التحضين لأن هذا يساعد على نمو النباتات نموا جيدا داخل الأوعية في حجرة التحضين.
- 34 - هزاز Shaker لهز وتحريك (بحركة منتظمة) المزارع السائلة وكذلك مزارع الكالس فيسبب التهوية وتخلل الهواء بين جميع الأنسجة المنزرعة وكذلك يجعل البيئة السائلة تلامس كل أجزاء النسيج المنزرع.
- 35 - جهاز طرد مركزي Centerfuge صغير لترسيب الخلايا بغرض تحديد حجم النمو الخلوي.
- 36 - شرائح ميكروسكوبية (هيموسيتوميتر) لعد الخلايا و البروتوبلاست في وحدة المساحة.
- 37 - مجهر لفحص الخلايا والأنسجة (ميكروسكوب ضوئي) Lightmicroscope .
- 38 - كابينة زراعة الأنسجة النباتية (اللامينار أو الهود) Laminar airflow hood وهو متعدد الأنواع فمنه لعمل فرد واحد فقط فيكون طوله حوالي المتر وآخر لعمل فردين ويكون طوله حوالي 160 سم ومنة الصغير جدا وهذا يعمل لتخليص الهواء الداخل إلي حيز الكابينة من الأتربة والكائنات الدقيقة عن طريق إمراره على فلاتر (مرشحات) ميكروبية وعليها يتوقف كفاءة الهود. فاذا حدث تلوث بسبب الهود بعد تعقيمة تماما وخبرة القائم على العمل فتكون كفاءة منخفضة بسبب أن هذه الفلاتر تكون كفاءتها منخفضة وهذا لمرور وقت طويل عليها دون أن تتغير ولهذا يجب أن تتغير من وقت إلى آخر حتى تظل كفاءتها عالية وقد يزود لمبة أشعة فوق البنفسجية Ultra violet lamp لتعقيم الهود والجو المحيط (تؤين الجو المحيط بالهود) وبه لمبات فلورسنت وذلك لإضاءة الهود وقد يكون به مصدر لدخول الغاز الطبيعي (البوتاجاز) وذلك بتوصيله بأنبوبة غاز وقد يستخدم سيرتاية أو أي مصدر آخر لتعقيم أدوات العمل من مشارط وملاقط وخلافة.
- 39 - جهاز لصب البيئة بالكميات المطلوبة بكميات متساوية.
- 40 - الكيماويات الجاهزة (الكتس) مثل الخاصة بإختبار ELISA test لإختبار الفيروس.
- 41 - جهاز Reader لقراءة الكتس و الميكروبلت Microplate.
- 42 - المجفف وهو إناء زجاجي متين ذو غطاء زجاجي متين يحتوى على كلوريد الكالسيوم لإمتصاص الرطوبة بحيث يجعل داخل الإناء جاف وتوضع به الهرمونات والفيتامينات والمواد الهامة التي يخشى من تميؤها ويوضع داخل الديب فريزر.
- 43 - حضانة Incubator مزودة بضابط لدرجة الحرارة وتعمل من 4 - 40°م ومزودة بوحدة إضاءة مع Timer لضبط فترات الإضاءة والإظلام وتتراوح شدة الإضاءة بها من 1000 إلى 10000 لوكس.
- 44 - حوامل الأنابيب Raks وهي تصنع من الخشب أو الألمنيوم أو البلاستيك وهي ذات ثقب مختلفة تبعا لسمك الأنابيب وعادة تحمل من 12 أو 24 أو 36 أنبوبة.
- 45 - حمام مائي Water bath عبارة عن إناء من الصلب الذى لا يصدأ ويوضع به الماء ويتم التسخين بواسطة الكهرباء ويستخدم لتسخين وغلbian المواد التي لا يبراد تعرضها للهب النار مباشرة.
- 46 - قفازات Gloves أحيانا تستعمل القفازات لمنع التلوث عن طريق اليدين أو لحماية بشرة اليدين من الكيماويات المستعملة في التطهير مثل الكحول الذى قد يسبب جفافها وكذلك من بعض المطهرات وتصنع هذه القفازات من البلاستيك الطرى المقاوم للكيماويات.
- 47 - غطاء الرأس Over head حتى لا تسقط شعيرات من رأس القائم بالعمل.
- 48 - غطاء الفم Mask وذلك حتى لاتتأثر الأوعية المحتوية على البيئة المعقمة بعملية الشهيق والزفير أثناء عملية الزراعة وخاصة في حالة الإصابة بالإنفلوانزا.
- 49 - غطاء الحذاء Over shoes وهو من البلاستيك لارتدائه على الحذاء حتى لاتتأثر أرضية المعمل بما تحمله الأحذية من ملوثات ويجب أن يكون هناك حذاء مخصص للمعمل.
- 50 - مقياس لشدة الإضاءة Lux meter وهو جهاز يقيس شدة الإضاءة وبهذا يمكن ضبط الإضاءة المطلوبة وهذا يستعمل في غرف النمو والحضانات.
- 51 - الكيماويات Chemicals. وهي الكيماويات التي تستخدم وتساعد في تحضير البيئة وفى التعقيم.

52 - ستارة هوائية وهذه تركيب على باب غرفة الزراعة لمنع دخول الهواء من الخارج إلى الداخل عند فتح باب الغرفة.

53 - ورق ترشيح Filter papers وذلك لترشيح المحاليل التي تحتوى على رواسب.

توزيع الأجهزة على الغرف المختلفة للمعمل

أ- غرفة إعداد البيئات Media preparation

- 1- مصدر للماء والغاز والكهرباء.
- 2- جهاز شفط وتفريغ للغازات.
- 3- سخان مائى أو مصدر حرارى للتسخين.
- 4- سخان كهربائى من ذوات المقلب المغناطيسى.
- 5- زجاجيات أو أوعية جديدة غير قابلة للصدأ لإعداد البيئة وإذابتها.
- 6- جهاز تعقيم (أوتوكلاف) أو معقم بخار مضغوط.
- 7- جهاز لقياس الأس الأيدروجينى pH.
- 8- ميزان حساس (مليجرام).
- 9- أدوات زجاجية (مخبر مدرج - دوارق - كاسات - ماصات) مختلفة الأحجام وأنابيب اختبار- أطباق بترى
- 10- أنابيب للزراعة أو زجاجات للزراعة ذات فوهات مناسبة وأغطية مناسبة من القطن أو المطاط أو ورق الألومنيوم، البلاستيك.
- 11- أدوات للنقل والتشريح والتقطيع مثل مقصات - مشارط - ملاقط - إبر تشريح وخلافه.
- 12- فرن هوائى ذو درجة حرارة عالية لإذابة الآجار وقد يستخدم ميكرو ويف.
- 13- جهاز لنزع الأيونات من الماء وكذلك جهاز تقطيرماء مزدوج.
- 14- جهاز ترشيح وكذلك أغشية للترشيح والتعقيم عن طريق الترشيح .
- 15- الكيماويات اللازمة للبيئات الغذائية سواء على صورة جافة أو مخاليط جاهزة بما فيها منظمات النمو.
- 16- منظفات ومطهرات.
- 17- وعاء لغسل الماصات (مقاوم للأحماض).
- 18- أرفف للتجفيف وتصفية المياه من الأدوات.
- 19- أماكن لتخزين الأدوات الزجاجية، الكيماويات، الماء المعقم وأشياء أخرى.

ب- أدوات لابد من توافرها أثناء عملية الزراعة والتجديد

- 1- كابينة زراعة الأنسجة وهذه تكون معقمة.
- 2- مصدر للهب مثل موقد بنزن.
- 3- ميكروسكوب.
- 4- كحول 95% للتطهير والتعقيم.
- 5- أطباق زجاجية معقمة لاستخدامها عند القطع للأجزاء المعقمة.
- 6- محاليل مطهرة للأجزاء النباتية مثل محلول الهيدروكلوريد.

ج- أدوات رئيسية لابد من توافرها فى المعمل General equipment

- 1- ثلاجة عادية وكذلك جهاز تجميد.
- 2- غسالة أطباق أوتوماتيكية.
- 3- جهاز موزع للأبخرة المائية والرطوبة.
- 4- أساسيات معملية مثل – ترولى – أطباق بلاستيكية – وصوانى معدنية.
- 5- حوض مجهز لاستعماله فى الغسيل بالأحماض والقلويات.
- 6- ميكروسكوب بسيط أو مركب.
- 7- أقلام للكتابة على الزجاج وأدوات ورقية لتسجيل النباتات عليها وبارافيلم لإحكام قفل الزجاجيات وخاصة عند نقلها من مكان إلى آخر أو فى حالة عرضها فى معرض.

د- أجهزة بغرفة النمو: Growth room

- 1- تتمتع بدرجة حرارة يمكن التحكم فيها ما بين 17 – 27° م.
- 2- مصدر كهربائى آخر بديل وذلك للإضاءة والحرارة.
- 3- أرفف لوضع الدوايق والزجاجيات المنزرع بداخلها الأنسجة.
- 4- لمبات فلورسنت للإضاءة.
- 5- منظم للوقت للتحكم فى ساعات الإضاءة.
- 6- جهاز رج.
- 7- منضدة لإجراء عملية الملاحظة وفحص المزارع.
- 8- أرفف لوضع المزارع السائلة عليها.

بالإضافة إلى ذلك مكان لإجراء عملية النقل والأقلمة للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة ويمكن التحكم فيه بالحرارة والإضاءة والرطوبة على صورة صوب زجاجية أو غرف صغيرة.