الكلية	العلوم
القسم	التقنيات الاحيائية
المادة باللغة الانجليزية	Plant tissue culture technique
المادة باللغة العربية	تقنية زراعة الانسجة النباتية
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	أنمار كامل مبارك
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Introduction to plant tissue culture (P.T.C) science
عنوان المحاضرة باللغة العربية	مقدمة في علم زراعة الأنسجة النباتية
رقم المحاضرة	الاولى
المصادر والمراجع	George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008).** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer https://uodiyala.edu.iq/uploads/PDF%20ELIBRARY%20UODIYALA/EL34/Plant%20Propagation%20by%20Tissue%20Culture%203rd%20Edition.pdf
	Pierik, R. L. M. (1997).** *In Vitro Culture of Higher Plants*. Springer
	Reed, B. M. (2008).** *Plant Tissue Culture: Techniques *and Experiments
	https://biot202.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf

1987 1408
UNIVERSITY OF ANBAR

مختبر زراعة الانسجة احتياجاته وملحقاته

المحاضرة الأولى

زراعة انسجة عملي

مكونات مختبر زراعة الانسجة:

- عند التفكير باستخدام تقنية زراعة الانسجة وسيلة للاكثار الخضري للنبات او مختبراً بحثياً متخصصاً لا بد من توفر مواصفات خاصة ومرافق محددة متوفرة جميعها في موقع جغرافي واحد:

١- ان يكون موقعه بعيداً عن مصادر التلوث كالمصانع وأماكن حرق النفايات

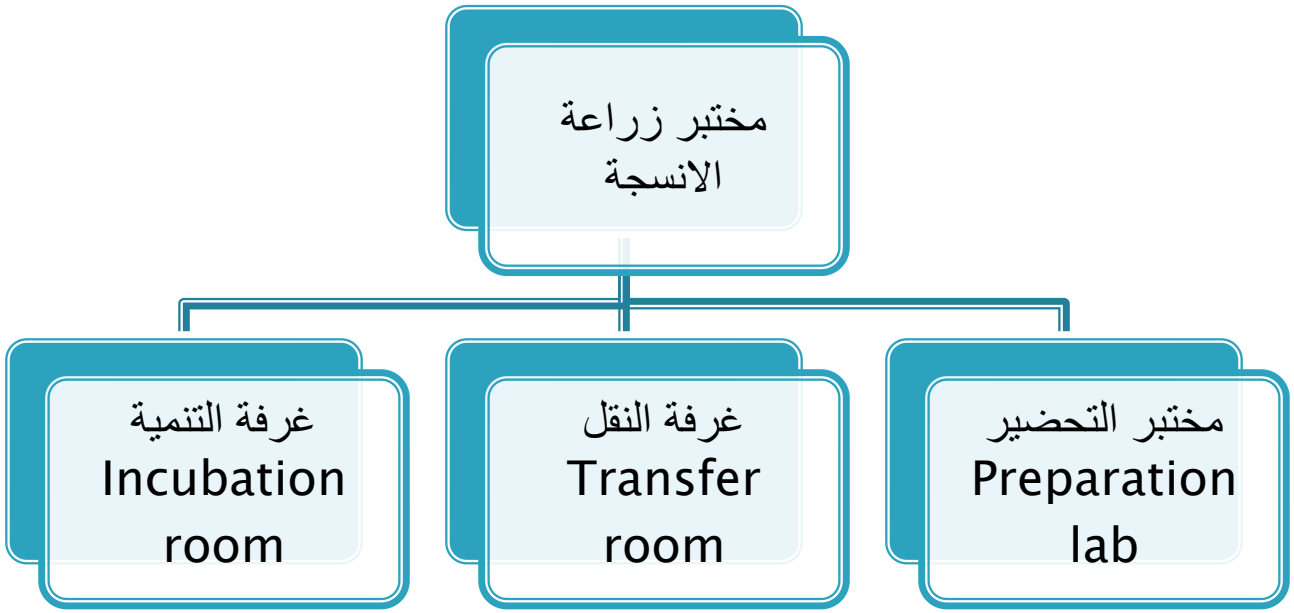
٢- ان يكون مكيفاً تكييفاً مركزياً

٣- ان يكون اثاثه من النوع الذي يسهل تنظيفه

٤- ان تلحق به مخازن كثيرة بغية خزن الزجاجيات والاجهزة وغيرها

مكونات مختبر زراعة الانسجة:

- يتكون مختبر زراعة الانسجة من ثلاث مكونات رئيسية:



مختبر التحضير Preparation lab

- فيه تحضر الاوساط الغذائية اللازمة والنباتات للزراعة واجراء التعقيم الاولي. وتكون بصورة عامة اوسع من بقية الاماكن وتسمح بسهولة حركة العاملين وتنقلهم في المختبر.
- اهم المستلزمات التي يجب توفرها في هذا القسم:

١- رفوف ومخازن لخزن الزجاجيات والادوات والاجهزة المحدودة الاستخدام

٢- مصادر للماء واجهزة تقطير الماء (water distillers) واخرى لازالة الايونات من الماء (water deionizers) وتجهيز البخار بضغط عالي

٣- مغاسل عديدة ومصادر للغاز واخرى لخلخلة الضغط (vacuum source)

٤- نقاط كهرباء متعددة

٥- تكييف مركزي

٦- مناضد مختبرية (benches)

مختبر التحضير Preparation lab

- اهم الاجهزة الواجب توفرها في هذه المختبرات:

١- ثلاجة ومجمدة (٤°م، -٢٠°م) لحفظ المواد الكيمياوية بدرجات حرارة مختلفة

٢- موازين حساسة

٣- جهاز قياس الاس الهايدروجيني pH meter

٤- حمام مائي water bath

٥- اجهزة تقطير وتنقية ماء

٦- خلاط لمزج الاوساط مزود بمصدر حراره hot plate stirrer

٧- المعقام (المؤصدة) autoclave

٨- يفضل ايضا تزويد المختبرات بغسالة أواني آلية

مختبر التحضير Preparation lab

- المستلزمات الواجب توفرها لتحضير الاوساط الغذائية:

١- الدوارق الاعتيادية والحجمية flasks

٢- البيكرات beakers

٣- انابيب الزراعة culture tubes

٤- الماصات pipettes

٥- الاسطوانات المدرجة graduated cylinders

٦- فرش التنظيف

غرفة النقل Transfer room

- ويعد من المرافق المهمة وفيه يتم استئصال الجزء النباتي explant وزراعته في الوسط الغذائي تحت ظروف معقمة وعليه فيجب مراعاة النقاط التالية:

١- السيطرة على ظروف التكييف بصورة محكمة مع ضرورة وجود ترشيح للهواء
٢- وجود نظام تهوية جيد لتصريف روائح الكحول والابخرة السامة
٣- مغسلة او حوض لسكب السوائل المستخدمة في تعقيم الاجزاء النباتية
٤- مصدر لخلخلة الضغط vacuum لاستخدامه في منظومة التعقيم
٥- مصادر للغاز والطاقة الكهربائية
٦- مناضد لوضع الاجهزة المستخدمة في غرفة النقل

Transfer room غرفة النقل

- اهم الاجهزة الواجب توفرها في هذا النوع من المختبرات:

١- اجهزة الطرد المركزي Centrifuges
٢- مجهر تشريحي dissecting microscope
٣- منضدة التعقيم Laminar-air flow cabinet

غرفة التنمية Incubation room

- وتستخدم لتنمية الزروعات بعد زراعتها في الوسط الغذائي.
- ولكي يمكننا حفظ الزروعات ودفع نموها وتطورها لابد من توفر جملة من المستلزمات التي يمكن اجمالها بالاتي:

١- تكييف الهواء والسيطرة على حركة الهواء مع ضرورة وجود المرشحات

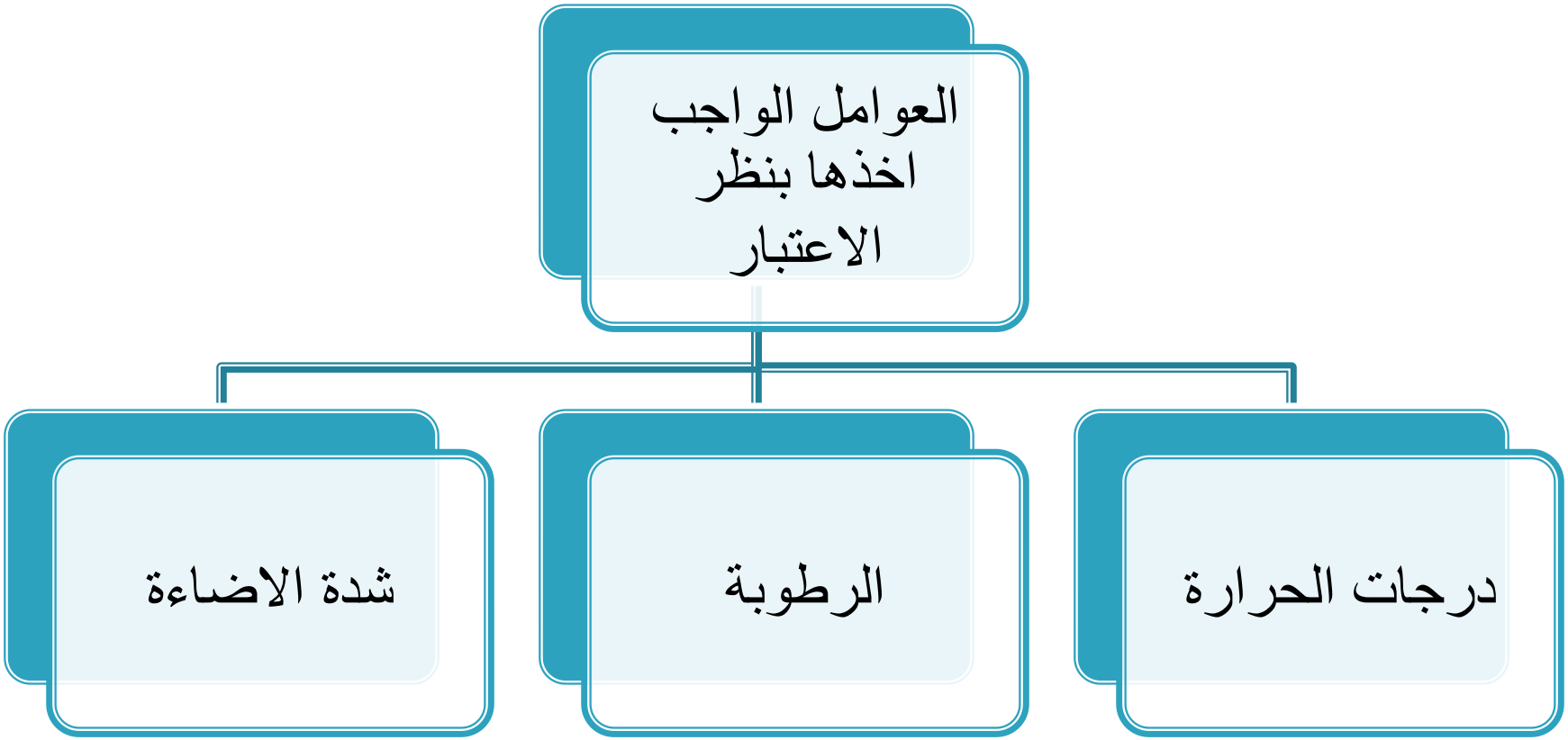
٢- جهاز لتنظيم درجات الحرارة thermostat

٣- رفوف لوضع الزروعات عليها والتي تختلف من حيث شدة الاضاءة

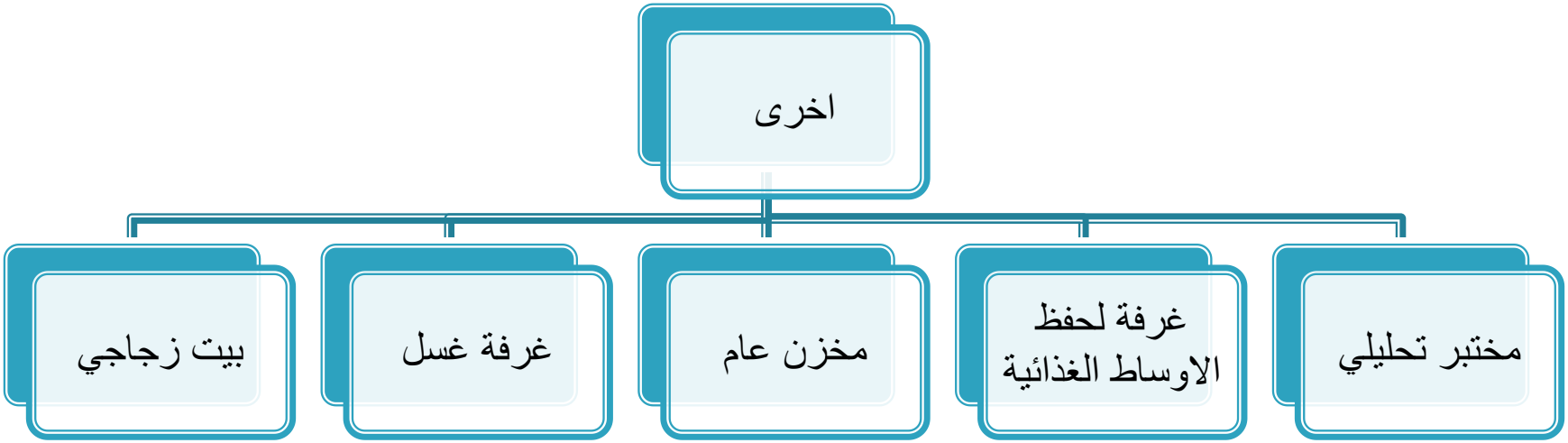
٤- اجهزة الرج shakers

٥- مقياس لتسجيل درجات الحرارة thermograph

غرفة التنمية Incubation room



فضائات مختبرية اضافية



التعقيم
Sterilization

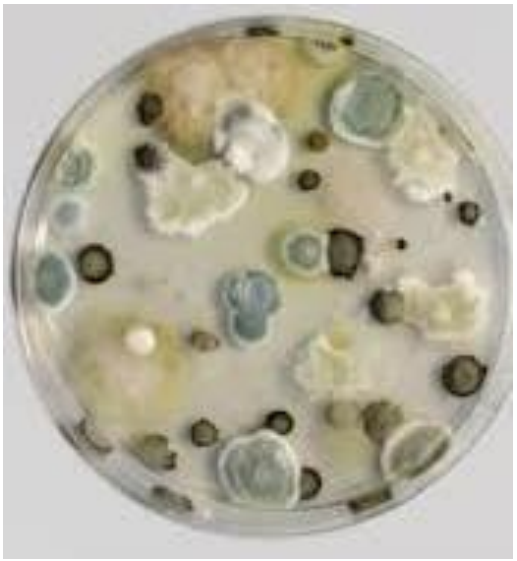
مقدمة

- يتطلب العمل في زراعة الانسجة درجات عالية من التعقيم في جميع خطوات العمل إذ إن الخلايا النباتية والاحياء المجهرية لها نفس متطلبات النمو.
- وفي وحدات الانتاج التجاري لزراعة الانسجة فان تلوث دفعة من الزروعات ربما يسبب خسارة مادية كبيرة وحتى خسارة سلالة نباتية كاملة وعليه تفرض اجراءات وقائية صارمة لدخول الاشخاص والمواد الحية في مثل هكذا مختبرات.

نظافة المختبر Lab Cleanliness

- تعتبر مشكلة التلوث pollution من اهم المشاكل التي يجب أخذها بعين الاعتبار في مختبرات زراعة الانسجة لأنها البيئة المثالية لنمو كافة انواع البكتريا والفطريات حيث يعيق التلوث نمو الخلايا النباتية بعدة طرق منها:

١. تحرير بعض الانزيمات والسموم التي تثبط نمو الخلايا
٢. الامتصاص الانتقائي لعناصر غذائية معينة من وسط الزراعة
٣. اصابة وتلوث بعض الانسجة النباتية



نظافة المختبر Lab Cleanliness

- الاحتياطات الواجب مراعاتها في مختبر زراعة الانسجة:

١. تقليل تيار الهواء في منطقة العمل لتجنب حركة سبورات الاحياء الدقيقة ويمنع استخدام المراوح في غرفة النقل الحاوية على Laminar

٢. خزن الاوساط المحضرة والمحاليل المغذية والادوات في خزانة خاصة

٣. استخدام منطقة معزولة للتنظيف والغسل وتحضير الاوساط

نظافة الأدوات والأوساط

- تجرى جميع خطوات الزراعة النسيجية تحت ظروف التعقيم لذا فان جميع المواد المستعملة في العمل تكون خالية من الأحياء الدقيقة ومعقمة. وبصورة عامة تستخدم ثلاث طرق للتعقيم في المختبر:

١. التعقيم الحراري الجاف Dry heat sterilization
٢. التعقيم الحراري الرطب Wet heat sterilization
٣. التعقيم بالترشيح Filter sterilization

التعقيم الحراري الجاف

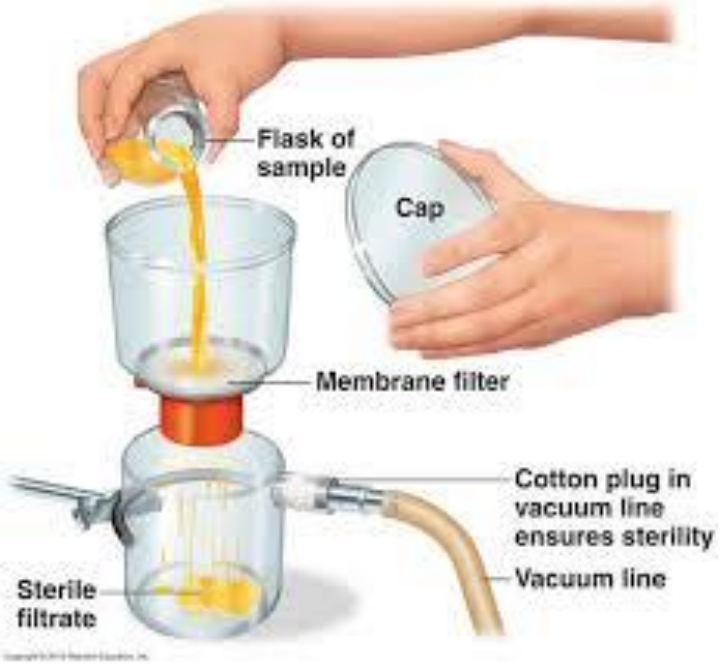
- توضع الزجاجيات والادوات المعدنية وبقية المواد التي لا تحترق بالحرارة العالية في حاويات او تُلف بورق الالمنيوم وتوضع في الفرن الجاف وتعقم لمدة لا تقل عن ثلاث ساعات وعلى درجة حرارة ١٤٠-١٦٠ درجة مئوية.

التعقيم الحراري الرطب

- من اكثر الطرق شيوعاً في تعقيم الأوساط هي استخدام جهاز التعقيم الحراري الرطب Autoclave على درجة حرارة 121 مئوي وضغط 1.04 كغم/سم٢ لمدة 15-20دقيقة وتختلف هذه البيانات باختلاف أحجام الوسط. حيث يجب وضع القناني الحاوية على الوسط بصورة عمودية ولا يملئ اكثر من ٥٠% منها.

التعقيم بالترشيح

- يستعمل في حالة تعذر استخدام التعقيم الحراري للمحلول حيث تعمل مسامية المرشح التي تكون عادة بين 0.22 الى 0.45 مايكرومتر على حجز الاحياء الدقيقة. تناسب هذه الطريقة بشكل عام المركبات غير الثابتة بالحرارة او الكيمياويات الحساسة للحرارة مثل منظمات النمو النباتية (Zeatin, IAA, IBA, GA3) والانزيمات والمضادات الحيوية وغيرها.



تعقيم الادوات

- تعقم ادوات المختبر من مشارط وملاقط وغيرها عادة بالكحول متبوعة بتعريضها الى لهب. وتتوفر في وقتنا الحاضر خرز للتعقيم Bead sterilization والتي تعمل على اساس التسخين الجاف.

تعقيم الجزء النباتي

- تعقم الاجزاء النباتية باحد المحاليل التالية:

١. هايبوكلورات الصوديوم ١-٤% (القاصر التجاري)
٢. المحلول المشبع لهيبوكلورات الكالسيوم ٧%
٣. محلول البروم المائي ١%
٤. الكحول الاثيلي ٧٠%
٥. كلوريد الزئبق ٠,١ – ٠,٢%
٦. محلول بيروكسيد الهايدروجين ١٠%
٧. محلول نترات الفضة ١%