

# استاندارد ملی کشت بافت گیاهی

۱- هدف و دامنه کاربرد:

این استاندارد حداقل نیازهای یک آزمایشگاه کشت بافت گیاهی که شامل موارد عمومی، ساختمانی و کاربردی می باشد را تعیین می کند.

هدف از تدوین این استاندارد ارائه راهنمای ساخت و تجهیز آزمایشگاه های کشت بافت گیاهی می باشد.

۲- مراجع الزامی:

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها رجوع شده است. بدین ترتیب این مقررات، جزئی از آیین کار محسوب می شوند. استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این آیین کار الزامی است:

- شماره های ملی مربوط به سازه ساختمان

- شماره ملی مربوط به ساختمان سازی

- شماره ملی مربوط به سیم کشی و تجهیزات الکتریکی

- استانداردهای ملی مربوط به پسماندهای مایع کشاورزی

- استانداردهای ملی مربوط به پسماندهای جامد کشاورزی - کمپوست شده

- استانداردهای ملی ایران شماره ۳۴۲۲ سال ۱۳۷۲ راهنمای عمومی برای طرح های اطاق های آزمایشگاهی

- استانداردهای ملی ایران شماره ۵۷۶۸ سال ۱۳۸۰ استاندارد تولید خیار و گوجه فرنگی گلخانه - آیین کار

### **Low cost options for tissue culture technology in developing countries**

Proceedings of a Technical Meeting organized by the joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and held in Vienna, 26-30 August 2002 February 2004

۳: اصطلاحات و تعاریف:

در این استاندارد اصطلاحات و یا واژه ها با تعاریف زیر به کار می روند.

#### ۱-۳-۳- کشت بافت

عبارت است از رشد پروتوپلاست، یاخته، اندام، جنین، مریستم نوک ساقه و تک جوانه، پرچم یا میکروسپور، کالوس، قلمه، تخمک و گلپهای جداشده، بذر و ریشه در یک محیط آزمایشگاهی

#### ۲-۳- محیط کشت

به هر نوع ماده مغذی آماده شده برای کشت و رشد بافت گیاهی اطلاق می گردد.

#### ۳-۳- استریلیزاسیون

مراحل مختلفی که یک ماده (محیط کشت و غیره) یا یک جسم جامد (فلاسک ها و سایر) را بطور کامل عاری از هر نوع میکروارگانیسم زنده می سازد.

#### ۴-۳- ضد عفونی

به حالتی اطلاق می گردد که در آن مواد گیاهی، محیط کشت و تعدادی از وسائل مورد استفاده در عملیات کشت، عاری از میکروارگانیسم های آلوده کننده می گردد.

#### ۵-۳- انکوباسیون

در این مرحله کشت ها در یک شرایط مطلوب نوری، دمایی و رطوبتی به منظور رشد بافت گیاهی تحت کنترل در می آیند.

#### ۶-۳- لامینار فلویا اتا فک تمیز

جریان هوای استریل شده را به صورت لایه ای که با ایجاد فشار مثبت قابل امتزاج با هوای غیر استریل بیرون نمی باشد فراهم می آورد.

#### ۴- موقعیت محل:

۱-۴- منطقه و زمین مورد استفاده با نقشه های اجرایی مطابقت داشته باشد.

۴-۲- محل ساختمان ها طوری واقع گردد که جمعیت آفات حداقل بوده و هوای محل دارای کمترین آلودگی بوده و از منابع آلودگی نظیر راه های شنی یا پارکینگ روباز، انبار آفت کش ها یا گردوغبار و کودهای شیمیایی حاصل از مزارع به دور باشد.

۴-۳- محوطه مجاور ساختمان، جاده دسترسی به محل، پیاده روها و پارکینگ، با بتن یا آسفالت و مواد مشابه این ها پوشش داده شده باشد.

۴-۴- محل مورد نظر باید به جاده، تجهیزات آب و خطوط برق دسترسی داشته باشد.

۴-۵- متقاضی مجوزهای لازم در خصوص محل و شروع ساخت را از مسئولان محلی دریافت کند.

۵- مساحت:

حداقل مساحت مورد نیاز برای احداث یک واحد کشت بافتی با ظرفیت ۲۰۰ / ۰۰۰ نهال، در سال ۲۰۰۰ متر مربع می باشد که شامل ۲۰۰ متر مربع ساختمان آزمایشگاه و ۱۵۰۰ متر مربع گلخانه است.

۶- مواد مورد نیاز در ساختمان:

۶-۱- بام

۶-۱-۱- سازه سقف می تواند از تیرچه بتنی یا آهن بازنگ، ضدزنگ و یا نظیر آن ها باشد.

۶-۱-۲- مواد پوششی بام می تواند ورق گالوانیزه، ورق آهنی مقاوم در برابر خوردگی، سفال، آسفالت و نظیر آن ها باشد.

۶-۱-۳- هواکش های سقف، قبلاً " تدارک دیده شده و به صورت صحیح نصب گردد.

۶-۲- سقف

۶-۲-۱- ارتفاع زیر سقف از کف حداقل ۲/۴ متر باشد.

۶-۲-۲- سقف طوری طراحی و ساخته شود که از ریزش مواد آلاینده و گرد خاک جمع شده از میان سطوح و قسمتهای بالایی سقف بر روی تجهیزات و محصولات روباز ممانعت نماید.

۶-۲-۳- سقف با رنگ پلاستیکی (لاتکس) یا امولسیون سفید، رنگ آمیزی شود.

### ۳-۶- دیوار

۳-۶-۱- سطوح داخلی دیوار باید با گچ یا سیمان پوشش داده شود و نهایتاً " صاف و بطور صحیح با رنگ پلاستیکی یا امولسیون سفید، رنگ آمیزی شده و یا با سایر سطوح نظیر کاشی، سرامیک و نظایر آن پوشش داده شود.

۳-۶-۲- دیوار اتاق رشد در صورتی که از سرامیک و یا عایق حرارتی نباشد باید با رنگ اپوکسی و ضد قارچ رنگ آمیزی شود.

۳-۶-۳- قسمت فوقانی دیوارها باید شیب ۴۵ درجه داشته باشند.

۴-۶-۳- تقاطع بین دیوارها و کف با یک شعاع ۵۰-۶۰ میلی متر قوس داده شود.

### ۴-۶- پنجره ها

۱-۶-۴- تمامی پنجره ها بطور صحیح نصب و به یک صفحه تور مشبک جهت جلوگیری از ورود حشرات مجهز شوند.

۲-۶-۴- لبه پنجره حداقل ۱ متر از خط تمام شده کف فاصله داشته باشد.

### ۵-۶- درب ها

۱-۶-۵- به منظور تسهیل در جابجایی و حرکت وسایل و تجهیزات بزرگ نظیر هود، کابینت و قفسه ها، درهای اصلی حداقل ۱/۵ متر پهنا و در ورودی کارکنان، انبارواتاق های مواد شیمیایی حداقل ۸۰ سانتی متر پهنا داشته باشد.

۲-۶-۵- درب ها و چهارچوب آن ها در برابر زنگ زدگی و رطوبت مقاوم باشند.

### ۶-۶- کف

۱-۶-۶- کف از جنس موزائیک و سنگ و یا سرامیک مستحکم بوده تا از ترک خوردگی جلوگیری نموده و نهایتاً " کاملاً صاف و قابل ضد عفونی باشد.

۲-۶-۶- کف نباید حالت سرخوردگی داشته باشد. کف سیمانی با رنگ اپوکسی یا یورتان لعاب داده شود.

۳-۶-۶- کف شیب ۲-۴٪ به طرف کانال زهکشی داشته باشد.

۴-۶-۶- کف قادر به تحمل فشاری معادل  $170 \text{ Kg/ m}^2$  باشد.

۷-۶- کلیه مواردی که در خصوص طراحی سازه و ساختمان سازی در این استاندارد تدارک دیده نشده است با استاندارد ملی ساختمان سازی کشور تطابق داشته باشد.

۷- نمای کلی و ساختار:

۱-۷- در ساختار یک آزمایشگاه کشت بافت، وجود موارد ذیل ضروری بوده و لازم است در طراحی نقشه مورد توجه قرار گیرد.

الف- مجموعه تهیه محیط کشت شامل ۶ مورد:

۱- محل آماده سازی محیط کشت

۲- اتاق استریلیزاسیون یا محلی برای استریلیزاسیون

۳- اتاق شستشو یا محلی برای شستشوی ظروف

۴- انبار یا محلی برای نگهداری وسائل شامل ظروف شیشه ای موادشیمیایی، مواد اولیه و سایر

۵- اتاق تاریک

۶- اتاق یا محلی برای ترازوها، یخچال و فریزردر صورت نیاز

ب- بخش های ایزوله آزمایشگاه شامل سه مورد:

۷- اتاق کشت (Culture Room)

۸- اتاق رشد (Growth chamber)

۹- فیتوترون ها یا محیط کنترل شده برای سازگاری

ج- فضای اداری

۱۰- اتاق مدیر و تکسین ها

۱۱- سرویس های بهداشتی

۱۲- راهروها و سایر

د- گلخانه ها و انبارهای مربوط به آن، ساخت و تجهیز گلخانه مطابق استاندارد ملی شماره ۵۷۶۸ کشور

۷-۲- در طراحی یک آزمایشگاه کشت بافت ردیف های ۶- ۱در یک قسمت مجزا و ردیف های ۷، ۸، ۹ نیز در یک قسمت و محیط ایزوله دیگر پیش بینی گردند.

۷-۳- متوسط مساحت مورد نیاز تا ردیف ششم (مجموعه تهیه محیط کشت) ۳۵ درصد، اتاق انتقال ۲۳ درصد و ۴۲ درصد باقیمانده جهت اتاق های رشد و فیتوترون ها در نظر گرفته می شود.

۷-۴- در موارد تولید تجاری، ظرفیت تولید براساس ظرفیت ایجاد شده واحدهای اتاق رشد، فیتوترون و گلخانه تعیین می گردد، حجم فیتوترون ها و گلخانه ها باید بیش تر از میزان خروجی اتاق های رشد باشد.

۷-۵- در طراحی یک آزمایشگاه کشت بافت برای به حداقل رساندن آلودگی، نحوه نظافت را در ابتدا باید مشخص نمود.

۷-۶- فضای مورد استفاده جهت قفسه بندی در قسمت اتاق رشد و فیتوترون

معادل ۴۰ درصد و فضای راهروها معادل ۶۰ درصد مساحت اتاق خواهد بود. با منظور نمودن حداقل چهار ردیف قفسه در هر ردیف، مفید جهت تولید، چهار برابر خواهد شد.

۸- ملزومات اساسی:

۸-۱- آزمایشگاه

۸-۱-۱- محل شستشوی ظروف شیشه ای و انبار

۸-۱-۱-۱- محل شستشوی ظروف شیشه ای نزدیک محل استریلیزاسیون و محل آماده سازی محیط کشت باشد.

۸-۱-۱-۲- محل ظروف شیشه ای حداقل به دوسینک تجهیز شود. فضای کاری کاشی کاری یا کاملاً صاف باشد. سینک می تواند از جنس استینلس استیل، سرامیک، آجر نسوز، پلیمری مقاوم به اسید و یا قلیا و یا نظایر آن انتخاب شده باشد.

۸-۱-۱-۳- فضای کاری کافی و مناسب در هر دو طرف سینک فراهم گردد، این فضا جهت غوطه ور سازی لوله ها و ظروف شیشه ای و آبکشی سینی ها استفاده می شود.

۴-۱-۱-۸- انباری باید در فضای مناسب احداث شده و به کابینت مجهز گردد.

۵-۱-۱-۸- کابینت ها و قفسه ها جهت نگهداری مواد شیمیایی بایستی از جنس ضد خوردگی و دارای فن تهویه بخارهای سمی انتخاب گردد.

۶-۱-۱-۸- در محل ورودی آزمایشگاه یک دستگاه دوش اضطراری برای موارد پاشش اسید یا باز نصب شود.

۲-۱-۱-۸- محل استریلیزاسیون و آماده سازی محیط کشت

۱-۲-۱-۸- این قسمت به میزهای کار آزمایشگاهی مجهز شود، این میزها اگر از دوطرف قابل دسترس باشند می توانند بیش تر از ۱/۲ متر پهنا داشته باشند و اگر یکطرفه باشند پهنای آنها نباید از ۶۰ سانتیمتر تجاوز نماید و ارتفاع می تواند ۹۰-۸۰ سانتی متر باشد. روکش میزها از مواد ضد اسید(گرانیت و نظیر آن) پوشش داده شود و به آسانی تمیز شود و در مقابل مواد پاک کننده و ضد عفونی کننده مقاوم باشد.

۲-۲-۱-۸- منبع تامین آب و انبار ظروف شیشه ای تدارک دیده شود.

۲-۸- اتاق کشت

۱-۲-۸- اتاق انتقال جهت جداسازی نمونه ها، شت اولیه و انتقال آن ها فراهم گردد.

۲-۲-۸- هودهای لامینارفلو به منظور انجام تمامی کارهای آسپتیک یا ضد عفونی شده لازم و ضروری است.

۳-۲-۸- اتاق کشت تا سرحد امکان تمیز بوده و یک اتاق جدا با حداقل اختلافات جریان هوا باشد.

۴-۲-۸- برای جلوگیری از آلودگی، تعداد درب ها و پنجره ها حداقل باشد.

۵-۲-۸- جعبه های کمک های اولیه و سیستم هشداردهنده گاز و بخارالکل، کپسول های اطفاء حریق در اتاق کشت ضروری است.

۶-۲-۸- نصب سیستم مادون قرمز UV برای ضد عفونی ضروری است.

۳-۸- اتاق رشد



۱-۳-۸- اتاق رشد از محیط بیرون کاملاً ایزوله بوده و به گونه ای طراحی گردد که از نظر ترافیک تردد، کنترل آلودگی اتاق های مجاور، تاسیسات سرمایشی و گرمایشی، منابع آب و فاضلاب و منابع ایمنی و اطفاء حریق تمام موارد لحاظ شود.

۲-۳-۸- سقف بطور صحیح با عایق مناسب عایق کاری شود.

۳-۳-۸- به منظور تولید گیاهان حساس به فتوپریود، نور مصنوعی با شدت ۴۰۰۰ تا ۵۰۰۰ لوکس فراهم گردد.

۴-۳-۸- تامین قفسه یا سینی ضروری است. می توانند ثابت و یا متحرک از جنس چوب یا رنگ سفید، فلزی مشبک یا شیشه آبداده باشند. به منظور سهولت در امور تمیز کردن اتاق رشد و تعمیر و نگهداری تاسیسات و راحتی حرکت در آن قفسه ها با سینی ها هم اندازه باشند.

۵-۳-۸- در صورتی که دسترسی برای قفسه ها از یک طرف امکان پذیر باشد، عرض قفسه ها ۴۰ سانتی متر و اگر از دو طرف قابل دسترسی باشند عرض آنها ۱ متر در نظر گرفته می شود. همچنین فاصله ما بین طبقات قفسه ها ۴۵۵ سانتی متر تنظیم گردد.

۶-۳-۸- راهروها و معابر حداقل ۱ متر باشند.

۷-۳-۸- ارتفاع قفسه ها ترجیحاً نباید بیش از ۲ متر باشد.

۸-۳-۸- دما و شدت نور قابل تنظیم در نظر گرفته شود.

۴-۹- تجهیزات و تاسیسات

۱-۴-۹- سیستم روشنایی

۱-۴-۹-۱- همواره نور مصنوعی جهت استفاده در طی شب و زمان های تاریکی و ابری در طول روز وجود داشته باشد.

۲-۴-۹-۱- جدول شماره ۱ شدت نور توصیه شده برای یک آزمایشگاه کشت بافت و جدول شماره ۲ ملزومات روشنایی را نشان می دهد.

۳-۴-۹-۱- دارای سیستم برق ۲۲۰ ولت بوده و تاسیسات کشت بافتی به موتور برق اضطراری مناسب تجهیز شوند.

جدول شماره ۱- شدت نور موردنیاز برای آزمایشگاه کشت بافت

شدت Lux(Lumen/2m)	منطقه
۱۰۰	بیرون آزمایشگاه
۲۰۰	حالت عمومی
۵۰۰	میزهای کار
۱۰۰-۵۰۰۰	اتاق رشد

جدول شماره ۲- ملزومات روشنایی

تعداد لامپ مورد نیاز در هر متر مربع

شدت نور Lux	لامپ رشته ای						لامپ فلورسنت	
	۲۵W	۴۰W	۶۰W	W ۱۰۰	۱۵۰W	W ۲۰۰	۲۰W	۴۰W
۵۰۰	۳/۹۳۵	/۹۸۹ ۱	/۰۵۲ ۱	۰/۵۲۰	۰/۲۱۴	/۲۳۶ ۰	/۶۸۲ ۰	/۲۶۶ ۰
۴۰۰	۳/۱۴۸	/۵۹۱ ۱	/۸۴۲ ۰	۰/۴۱۶	۰/۲۵۱	/۱۸۱ ۰	/۵۴۶ ۰	/۲۱۳ ۰
۳۰۰	۳/۳۶۱	/۱۹۳ ۱	/۶۳۱ ۰	۰/۳۱۲	۰/۱۸۹	/۱۳۶ ۰	/۴۰۹ ۰	/۱۶۰ ۰
۲۰۰	۱/۵۷۴	/۷۹۶ ۰	/۴۲۱ ۰	۰/۲۰۸	۰/۱۳۶	/۰۹۰ ۰	/۲۷۳ ۰	/۱۰۷ ۰
۱۵۰	۱/۱۸۰	/۵۹۷ ۰	/۲۱۶ ۰	۰/۱۵۶	۰/۰۹۴	/۰۶۸ ۰	/۲۰۵ ۰	/۰۸۰ ۰
۱۰۰	۰/۷۸۷	/۲۹۸ ۰	/۲۱۰ ۰	۰/۱۰۴	۰/۰۶۳	/۰۴۵ ۰	/۱۳۶ ۰	/۰۵۳ ۰
۵۰	۰/۲۹۳	/۱۹۹ ۰	/۱۰۵ ۰	۰/۰۵۲	۰/۰۲۱	/۰۲۳ ۰	/۰۶۸ ۰	/۰۲۷ ۰
۱۰	۰/۰۷۹	/۰۴۰ ۰	/۰۲۱ ۰	۰/۰۱۰	۰/۰۰۶	/۰۰۵ ۰	/۰۱۴ ۰	/۰۰۵ ۰

۹-۴-۱-۴- طراحی و نصب کلیه تجهیزات برقی با استاندارد ملی مطابقت داشته باشد.

۹-۴-۲- سیستم تهویه، دما و رطوبت

۹-۴-۲-۱- پیش بینی های لازم جهت یکسان سازی جریان هوا در داخل اتاق های رشد به منظور یکنواخت نگهداشتن دما در تمامی محیط اتاق الزامی است.

۹-۴-۲-۲- به منظور جلوگیری از وجود دماهای متفاوت در اتاق رشد و تجاوز از دمای مطلوب محیط، ترموستات مناسب همراه با سیستم حفاظتی تکمیلی افزایش دما نصب گردد.

۹-۴-۲-۳- رطوبت ساز یا دستگاه تخلیه رطوبت جهت کنترل رطوبت نسبی داخل تجهیزات رشد، تدارک دیده شود.

۹-۴-۲-۴- سیستم گرمایشی و سرمایشی اتاق رشد قادر به تامین دمای ۲۰-۲۵ درجه سانتی گراد در طی فصل باشد. حداکثر خطای قابل قبول دستگاههای کنترل کننده ۲ درجه سانتی گراد است.

۹-۴-۳- تهیه آب و زهکشی

۹-۴-۳-۱- وجود آب سرد و گرم بانضمام دستگاه تقطیر آب یا بخش دیونیزه کننده آب الزامی است.

۹-۴-۳-۲- لوله های متصل به سینک از جنس PVC مقاوم به اسید و باز باشند.

۹-۴-۳-۳- کانال زهکشی روباز با یک شبکه آهنی متحرک هم اندازه آن جهت تمیز کردن کانال الزامی است .

۹-۴-۳-۴- حداقل قطر لوله های تامین آب در آزمایشگاه ۲ سانتی متر باشد.

۹-۴-۳-۴- سیستم لوله کشی و زهکشی مطابق استاندارد مربوطه و ملی کشور انجام گیرد. این سیستم تمامی فاضلاب ها را جمع کرده و به شبکه عمل آوری فاضلاب یا سپتیک مناسب دفع نماید.

۹-۴-۴- تجهیزات شستشوی دست

با توجه به نوع کار کارکنان امکانات مناسب مطابق اصول بهداشتی جهت شستشوی راحت و مناسب دست و خشک کردن آنها در دسترس باشد.

۵-۴-۹- سیستم اطفاء حریق

ساختار سیستم اطفاء حریق مطابق استانداردهای ملی کشور در زمینه صنعت ساختمان سازی باشد.

۱۰- دفع زباله

بر اساس اصول و قوانین بهداشتی رایج در کشور انجام می پذیرد.

۱۱- محاسبه ظرفیت تولید در آزمایشگاه های تولید تجاری

۱-۱۱- در موارد تولید تجاری ظرفیت تولید براساس سه جایگاه اتاق کشت، فیتوترون یا اتاق رشد و گلخانه ها مشخص می گردد. خروجی اتاق های کشت متناسب با ورودی فیتوترون ها بوده و متناسب آن حجم فیتوترون ها بطور متوسط دو برابر بیش تر از اتاق های رشد خواهد بود.

۲-۱۱- طبق محاسبات بعمل آمده، در هر دوره چهار هفته ای در هر متر مربع از اتاق رشد بسته به گونه گیاهی و مرحله رشد یا ریشه زایی بطور متوسط ۳۵۰-۴۰۰ (Explant) درون فلاسک در هر دوره پرآوری تولید و این امر در هر متر مربع فیتوترون معادل ۲۰۰-۱۵۰ اصله درون لیوان پلاستیکی خواهد بود.

## ضمیمه ۱

### تجهیزات و وسایل لازم برای راه اندازی یک آزمایشگاه تخصصی کشت بافت

تجهیزات و وسایل لازم با مشخصات زیر برای راه اندازی یک آزمایشگاه کشت بافت کارآمد لازم است. در کلیه فضاهای کاری پیش بینی شده زیر، آب، برق، گاز، تلفن و سیستم اعلام خطر و حریق برای مواقع اضطراری ضروری است.

الف: مجموعه تهیه محیط کشت

۱- اتاق اتوکلاو و شستشو به مساحت حداقل ۱۵ متر مربع، شامل:

وان شستشو ضد اسید

ماشین ظرفشویی\*

مکان نگهداری ظروف آلوده

مکان نگهداری ظروف آلوده اتوکلاو شده\*

مکان نگهداری ظروف کثیف\*

مکان نگهداری ظروف شسته شده

آون جهت خشک کردن ظروف شیشه ای و غیره قبل و پس از استریل کردن\*

وسایل نظیف (برس، اسکاچ و غیره)

اتوکلاو

۲- آزمایشگاه آماده سازی محیط کشت، به مساحت حداقل ۴۰ متر مربع که فضای اصلی آزمایشگاه بوده و دارای میز کار و قفسه بندی برای قرار دادن مواد پرمصرف روزانه است شامل:

میز کار آزمایشگاه مجهز به شیر گاز، آب و پریز برق

انواع مختلف ظروف شیشه ای

گرمکن یا همزن مغناطیسی

ترازوی نیمه حساس، برای توزین در حد گرم

ترازوی حساس، برای توزین در حد میلی گرم

قاشقک و کاغذ توزین برای استفاده هنگام وزن کردن

مایکروویو برای گرم کردن و ذوب کردن سریع محیط کشت و آگار \*

فیلتر های مخصوص استریل کردن مواد حساس به اتوکلاو (۰/۲ میکرومتر)

PH متر

EC متر

مواد شیمیایی لازم برای تهیه محیط رشد

ساعت برای تنظیم زمان در مراحل مختلف کاری مانند استریل کردن

جا لوله ای برای قرار دادن لوله های آزمایش در داخل اتوکلاو\*

ظروف فلزی جهت قرار دادن پتری دیش در داخل اتوکلاو\*

دستگاه تهیه آب مقطر یا آب دیونیزه با خروجی مطلوب برای تهیه محیط کشت

موادی برای بستن لوله های آزمایش (چوب پنبه، ورق نازک آلومینیومی و غیره)

مکان نگهداری مواد شیمیایی

تانک یا مخزن ذخیره آب مقطر

وسایل برچسب زنی محیط های کشت، مانند برچسب و مارکر

آون برای ضد عفونی کردن پنس، اسکالپل، پتری های شیشه ای،... پمپ خلاء و دسیکاتور ویژه

برای استریل نمونه ها تحت خلاء

ب: بخش های ایزوله آزمایشگاه

۳- اتاق کشت به مساحت حداقل ۲۰ متر مربع

- دستگاه های سرمایشی و گرمایشی مورد نیاز

- لامپ های U.V برای استریل اتاق

- کابینت های لامینار Air Flow

- دستگاه استریلیزاتور\*

- وسایل کار مورد نیاز (اسکالپل، پنس، پتری، فیلتر ها و...)

- محلی برای تعویض لباس کارکنان قبل از ورود به اتاق کشت

- بینوکولر\*

- قفسه برای نگهداری محیط های کشت ساخته شده، آب استریل و غیره

۴- اتاق رشد، به مساحت حداقل ۲۰ متر مربع، فضایی با آمد و شد محدود و عاری از آلودگی، که نمونه ها پس از اتاق کشت به این مکان منتقل می شوند، شامل:

- قفسه بندی مناسب به نحوی است که نور رسانی مطلوب به نمونه ها صورت گیرد و دما دارای یکنواختی نسبی باشد.

- دستگاههای کنترل اتوماتیک دما، شدت و فتوپریود

- شیکر\*

۵- اتاق سازگاری، به مساحت حداقل ۵۰ متر مربع

- مکان انتقال نمونه ها از شیشه به گلدان و شستشو

- کنترل مناسب رطوبت (مه ساز)، دما و نور

- قفسه بندی مناسب

- ظروف و بستر کشت مناسب جهت انتقال نمونه ها

ج: گلخانه به مساحت حداقل ۱۵۰۰ متر مربع

- کنترل رطوبت، دما و نور

- دارای سازه مناسب



- قفسه قرار گیری قارچ کشها، آفت کش ها، کودها

- قفسه بندی مناسب جهت قرار گیری مرتب گلدان ها\*

- سیستم آبیاری مناسب \*

در مجاور گلخانه، اتاقی برای انتقال مواد گیاهی ریشه دار به گلدان در نظر گرفته شده باشد.

\*مواردی که با وجود آنها جهت بهبود انجام کار پیشنهاد می شود، ولی الزامی نمی باشد.

## ضمیمه ۲

### نمودار فراگیر چرخه کار تولید نهال آزمایشگاهی

اتاق آماده سازی ریز نمونه ها، حذف برگ ها و شاخه های آلوده



یخچال محل نگهداری ریز نمونه ها



آزمایشگاه: سترون سازی، کشت تا ریشه زایی



اتاق انتقال: از آگار به پیت ماس



اتاق رشد (سازگاری اولیه)



گلخانه (تونل سازگاری نیمه کنترل شده)



تونل سازگاری با کنترل سبک (Hardening)

### ضمیمه ۳

#### مراحل ریز ازدیادی:

- ۱- تهیه ریز نمونه
- ۲- انتقال ریز نمونه
- ۳- سترون سازی (Sterilization)
- ۴- استقرار (Establishment)
- ۵- پرآوری (Proliferation)
- ۶- رشد طولی (Elongation)
- ۷- ریشه زایی (Rooting)
- ۸- سازگاری در راتاق کنترل شده (Acclimatization)
- ۹- سازگاری در شرایط طبیعی (*In vivo hardening*)

#### کشت بافت و کالوس:

توده سلولی متشکل از مریستم های تمایز نیافته که توسط محققین با استفاده از فنون مختلف برای گرایش تکوینی (Evaluation) به سوی تولید یک اندام خاص (Organogenesis) قابل بهره برداری است. در حقیقت کالوس از نظر اندام زایی قابل هدایت به سوی یک جهت خاص است.

۱- تولید اندام های هوایی یا ساقه چه (*In vitro shoots*)

۲- تولید اندام های زمینی یا ریشه چه (*In vitro roots*)

عوامل موثر در ایجاد انحراف ژنتیکی نهال های درون شیشه (*In vitro*)

۱- کالوس و خطر انحراف ژنتیکی:

- کالوس به عنوان یک توده سلولی تمایز نیافته احتمال وقوع انحراف ژنتیکی را در بیوماس تولید شده به شدت افزایش می دهد.

- کالوس باعث افزایش سطح پلوئیدی و تولید سلول های ناخواسته با دسته جات کروموزومی افزایش یافته (Polyploidy) و یا پلوئیدی ناقص (Aneuploidy) می شود. پس کالوس و اندام های منشا گرفته از آن را باید حذف کرد تا بزرگترین امتیاز روش ریز ازدیادی یعنی حفظ ثبات ژنتیکی یا کلون برای گیاهان همگروه شده زیر سوال نرود و نهال به صورت (True-to-type) تولید شود.

۲- کنترل تعداد واکشت ها از زمان استقرار اولین ریز نمونه ها (Explants)

در محیط کشت:

از دیدگاه تتوریک ۱۲ واکشت (Sub culture) را در مرحله پرآوری حد مناسب قلمداد می کنند. اما صنایع فناوری و تولید کنندگان نهال درون شیشه اذعان می کنند که تجربه عملی آنها طی سال ها نشان داده است که تا ۲۰ واکشت مخاطره آمیز نیست. این تعداد بسته به نوع ریز نمونه و شرایط متغیر است .

۳- استفاده از تنظیم کنندگان رشد قوی مانند توفوردی (2,4,D) یا دی کلروفنوکسی استیک در مرحله سترون سازی برای مبارزه با آلودگی های قارچی و باکتریایی و یا در مرحله ریشه زایی برای تسریع در فرایند القای ریشه های نابجا.

۴- استفاده از غلظت های غیر متعارف و اغراق آمیز تنظیم کنندگان رشد در محیط کشت، خصوصا "گروه سیتوکینین ها.

## ضمیمه ۴

### پروسه تولید و تایید نهال کشت بافت

انتخاب درخت مادری مناسب جهت تکثیر کشت بافت (Mother plant) با مشارکت تولید کننده نهال + موسسه تحقیقات محصول خاص + موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال + مدیریت باغبانی + موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور



تایید سلامت رشد، کمیت و کیفیت میوه از طریق مشخصات فنوتیپی پایه مادری توسط مشارکت کنندگان فوق الذکر



سالم سازی و انجام پروسه تولید نهال در محل تاسیسات تولید کنندگان نهال کشت بافتی



تایید سلامت نهال های تولید شده قبل از توزیع و ارائه گواهی سلامت



تایید اصالت نهال های تولید شده قبل از توزیع و ارائه گواهی اصالت



بازدید از نهال های تولید شده و اقدام جهت نصب شناسه های نهال موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال



تحويل نهال دارای شناسه توسط دفتر برنامه ریزی و بهبود ارقام نهال



توزیع نهال آماده کاشت بین استان های متقاضی

## ضمیمه ۵

شرایط اخذ مجوز تولید نهال کشت بافت:

با توجه به وضعیت نامناسب باغ های درختان میوه و ضرورت تامین نهال سالم و استاندارد از ارقام جدید و تجاری و تقویت حضور بخش خصوصی در تامین نهال، شرایط اعطاء مجوز احداث تاسیسات و تجهیزات تولیدی های کشت بافت توسط ستاد کشت بافت گیاهی بشرح ذیل مصوب گردید:

(۱) ارائه طرح توجیهی فنی - اقتصادی از گونه های اولویت دار خرما، گردو، پایه های رویشی هسته دارها ودانه دارها  
(...و)

(۲) ارائه پروتکل و دانش فنی مستقل یا تحت لیسانس مراکز و موسسات معتبر علمی داخلی یا خارجی ارائه رزومه  
(C.V) افراد متخصص جهت حصول اطمینان از توانمندی متقاضی

(۳) ارائه اعلام نیاز سازمان جهاد کشاورزی استان مربوطه

(۴) ارائه جدول زمانبندی (time table) تولید محصول مربوطه

(۵) داشتن حداقل استاندارد تاسیسات و تجهیزات