

پیشگفتار:

بسمه تعالی

کاربرد ریزازدیادی در افزایش کمیت و کیفیت محصولات کشاورزی، از مهمترین حوزه‌های بیوتکنولوژی نوین به ویژه برای کشورهای در حال توسعه و پرجمعیت می‌باشد که نتیجه اولیه آن تولید سریع مواد گیاهی کیفی با فرم یکنواخت و عاری از بیماری می‌باشد و فرصت‌های جدیدی را برای تولیدکنندگان نهال و باغداران و سیاستگذاران باغبانی به وجود آورده است. در طی سه دهه گذشته تکثیر گیاهان از طریق کشت بافت به عنوان یکی از فن‌آوری‌های کشاورزی مطرح شده و اکنون تولید گیاهان کشت بافتی بیش از ۵۰٪ کل تولید جهانی را دربرگرفته است.

نهال درختان میوه به عنوان اصلی‌ترین نهاده در روند احداث باغات نوین و زیربنای تولید و توسعه انواع محصولات تجاری محسوب می‌شود که با توجه به روند رو به رشد سطح زیرکشت محصولات باغی و سیاست وزارتخانه درخصوص جایگزینی باغات قدیمی و درجه ۳، با ارقام تجاری، تولید نهال سالم و استاندارد از اولویت خاصی برخوردار است. متأسفانه عدم دسترسی به منابع کافی و سالم و اصیل و همچنین محدودیت روش‌های معمول تکثیر موجب بروز مشکلات فیتوپاتولوژی و انتشار پاتوژن‌ها در سطح باغات کشور گردیده است، که ضرورتاً کشت بافت گیاهی و ریزازدیادی به عنوان یکی از ابزارهای معمول

در سالم سازی مواد گیاهی و سرعت نرخ تکثیر مواد گیاهی توجه و اولویت ویژه‌ای را می‌طلبد.

با توجه به اهمیت موضوع و به منظور استفاده بهینه از فن‌آوری کشت بافت و تدوین نرم‌افزاری تولید نهال سالم و گواهی شده و چگونگی حمایت، توسعه و گسترش سخت‌افزاری این فن‌آوری به دستور معاون محترم وزیر در امور تولیدات گیاهی، ستاد کشت بافت گیاهی با شرکت نمایندگان موسسات تحقیقاتی مربوطه تشکیل گردید.

سیاست‌گذاری و برنامه‌ریزی در راستای بومی کردن تکنولوژی تولید گونه‌های استراتژیک مورد نیاز کشور، تشویق و حمایت از حضور بخش خصوصی در عرصه تولید و افزایش درآمد ناخالص ملی، نظارت بر فرآیند اجرایی شدن پروتکل‌های تولیدی - اختصاصی، ملی و بین‌المللی از اهم اهداف ستاد مذکور می‌باشد.

اعضای ستاد با برگزاری جلسات ماهانه، کاربردی نمودن این فن‌آوری را در تولید نهال سالم و اصیل که بتواند ضمن رفع نیاز داخل با محصولات مشابه کشورهای دیگر قابل رقابت باشد و همچنین ترغیب بخش خصوصی به سرمایه‌گذاری در این زمینه را ضروری می‌داند. لذا در اولین اقدام دستورالعمل احداث سایت تجاری تولید نهال کشت بافتی را که دارای حداقل استانداردهای لازم باشد تدوین نموده است.

استاندارد آزمایشگاه کشت بافت گیاهی

۱- هدف و دامنه کاربرد :

این استاندارد حداقل نیازهای یک آزمایشگاه کشت بافت گیاهی که شامل موارد عمومی، ساختمانی و کاربردی می‌باشد را تعیین می‌کند. هدف از تدوین این استاندارد ارائه راهنمای ساخت و تجهیز آزمایشگاه‌های کشت بافت گیاهی می‌باشد.

۲- مراجع الزامی :

مدارک الزامی زیر حاوی مقرراتی است که در متن این استاندارد به آنها رجوع شده‌است. بدین ترتیب این مقررات، جزئی از آیین کار محسوب می‌شوند.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این آیین کار الزامی است :

- شماره‌های ملی مربوط به سازه ساختمان
- شماره‌های ملی مربوط به لوله‌کشی ساختمان
- شماره‌های ملی مربوط به ساختمان‌سازی
- شماره ملی مربوط به سیم‌کشی و تجهیزات الکتریکی
- استانداردهای ملی مربوط به پسماندهای مایع کشاورزی
- استانداردهای ملی مربوط به پسماندهای جامد کشاورزی - کمپوست شده
- استانداردهای ملی ایران شماره ۲۴۲۲ سال ۱۳۷۲ راهنمای عمومی برای طرح‌های اطاق‌های آزمایشگاهی

- استانداردهای ملی ایران شماره ۵۷۶۸ سال ۱۳۸۰ استاندارد تولید خیار و گوجه‌فرنگی 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 ۲۰۰۴

۳- اصطلاحات و تعاریف :

در این استاندارد اصطلاحات و یا واژه‌ها با تعاریف زیر به کار می‌روند.

۳-۱- کشت بافت

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

۳-۲- محیط کشت

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

۳-۳- استریلیزاسیون

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

۳-۴- ضد عفونی

به حالتی اطلاق می‌گردد که در آن مواد گیاهی، محیط کشت و تعدادی از وسایل مورد استفاده در عملیات کشت، عاری از میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده می‌گردد.

۳-۵- انکوباسیون

در این مرحله کشت‌ها در یک شرایط مطلوب به منظور رشد بافت گیاهی تحت کنترل در می‌آیند.

۳-۶- لامینارفلو یا اتاقک تمیز

جریان هوای تصفیه شده و به صورت لایه‌ای که با ایجاد فشار مثبت استریل، قابل امتزاج با هوای بیرون نمی‌باشد.

۴- موقعیت محل :

- ۴-۱- منطقه و زمین مورد استفاده با نقشه‌های اجرایی مطابقت داشته باشد .
- ۴-۲- محل ساختمان‌ها طوری واقع گردد که جمعیت آفات حداقل بوده و هوا دارای کمترین آلودگی بوده و از منابع آلودگی نظیر راه‌های شنی یا پارکینگ روباز، انبار آفت‌کش‌ها یا گرد و غبار و کودهای شیمیایی حاصل از مزارع به دور باشد .
- ۴-۳- محوطه مجاور ساختمان، جاده دسترسی به محل، پیاده‌روها و پارکینگ، فوراً با بتن یا آسفالت و مواد مشابه این‌ها پوشش داده شود.
- ۴-۴- محل مورد نظر باید به جاده، تجهیزات آب و خطوط برق دسترسی داشته باشد.
- ۴-۵- متقاضی مجوزهای لازم درخصوص 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، ۲۰۰۰ مترمربع می‌باشد که شامل ۲۰۰ مترمربع ساختمان آزمایشگاه و ۱۵۰۰ مترمربع گلخانه است.

۶- مواد مورد نیاز در ساختمان :

۱-۶-۱- بام

۱-۶-۱- سازه سقف می‌تواند از الوار، تیرچه بتنی یا آهن با رنگ، ضدزنگ و یا نظیر آن‌ها باشد.

۶-۱-۲ مواد پوششی بام می‌تواند ورق گالوانیزه، ورق آهنی مقاوم در برابر خوردگی، سفال، آسفالت و نظیر آن‌ها باشد.

۶-۱-۳ هواکش‌های سقف، قبلاً تدارک دیده شده و بصورت صحیح نصب گردد.
۶-۲-۲- سقف

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

۶-۲-۲ سقف طوری طراحی و ساخته شود که از ریزش مواد آلاینده و گرد و 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، رنگ‌آمیزی شود.
۶-۲-۳- دیوار

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

۶-۳-۲ دیوار اتاق رشد باید با رنگ اپوکسی و ضد قارچ رنگ‌آمیزی شود.

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

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

۶-۴- پنجره‌ها

۶-۴-۱ تمامی پنجره‌ها بطور صحیح نصب و به یک صفحه تور مشبک سایز ۱۶ مجهز شوند.

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

۶-۵- درب‌ها

- ۱-۵-۶- به منظور تسهیل در جابجایی و حرکت وسایل و تجهیزات بزرگ نظیر هود، کابینت‌ها و قفسه‌ها، درهای ورودی اصلی حداقل ۱/۵ متر پهنا و در ورودی کارکنان، انبار و اتاق‌های مواد شیمیایی حداقل ۸۰ سانتی‌متر پهنا داشته باشد.
- ۲-۵-۶- درها و چارچوب آن‌ها در برابر زنگ‌زدگی و رطوبت مقاوم باشند.
- ۶-۶-۷- کف
- ۱-۶-۶- کف از جنس بتون و مستحکم بوده تا از ترک‌خوردگی جلوگیری نموده و نهایتاً کاملاً صاف و یا کاشی‌کاری شده 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 ۴-۲٪ به طرف کانال زهکشی داشته باشد.
- ۴-۶-۶- کف قادر به تحمل فشاری معادل 170 kg/m^2 باشد.
- ۷-۶- کلیه مواردی که درخصوص طراحی سازه و ساختمان‌سازی در این استاندارد تدارک دیده نشده است با استاندارد ملی ساختمان‌سازی 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 آماده‌سازی محیط کشت
- ۲- اتاق استریلیزاسیون یا محلی برای استریلیزاسیون
- ۳- اتاق شستشو یا محلی برای شستشوی ظروف

- ۴- انبار یا محلی برای نگهداری تمام وسایل، شامل ظروف شیشه‌ای، مواد شیمیایی، مواد اولیه و سایر
- ۵- اتاق تاریک
- ۶- اتاق یا محلی برای ترازوها، یخچال و فریزر در صورت نیاز
- ب- بخش‌های ایزوله آزمایشگاه شامل سه مورد :
- ۷- اتاق انتقال (Culture Room)
- ۸- اتاق رشد
- ۹- فیتوترون‌ها یا محیط کنترل شده سازگاری
- ج- ستاد و فضای اداری
- ۱۰- اتاق مدیر یا تکنسین‌ها
- ۱۱- سرویس‌های بهداشتی
- ۱۲- راهروها و سایر
- د- گلخانه‌ها و انبارهای مربوط به آن، ساخت و تجهیز گلخانه مطابق استاندارد ملی شماره ۵۷۶۸ کشور
- ۲-۷- در طراحی یک آزمایشگاه کشت بافت ردیف‌های ۶-۱ در یک قسمت مجزا و ردیف‌های ۷، ۸ و ۹ نیز در یک قسمت و محیط ایزوله دیگر پیش‌بینی گردند.
- ۳-۷- متوسط مساحت مورد نیاز تا ردیف ششم (مجموعه تهیه محیط کشت) ۳۵ درصد، اتاق انتقال ۲۳ درصد، ۴۲ درصد باقیمانده جهت اتاق‌های رشد و فیتوترون‌ها در نظر گرفته می‌شود.
- ۴-۷- در موارد تولید تجاری، ظرفیت تولید بر اساس ظرفیت ایجاد شده واحدهای اتاق رشد، فیتوترون و گلخانه تعیین می‌گردد، حجم فیتوترون‌ها و گلخانه‌ها باید بیشتر از میزان خروجی اتاق‌های 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 کف اتاق رشد و فیتوترون معادل ۳۰ درصد و فضای راهروها معادل ۶۰ درصد مساحت اتاق خواهد بود. با منظور نمودن چهار ردیف قفسه در هر ردیف، فضای مفید جهت تولید، چهار برابر خواهد شد.

۸- ملزومات اساسی :

۸-۱ آزمایشگاه

۸-۱-۱ محل شستشوی ظروف شیشه‌ای و انبار

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

۸-۱-۱-۲ محل ظروف شیشه‌ای حداقل به دو سینک تجهیز شود. قسمت بالای فضای کاری کاشی‌کاری یا کاملاً صاف باشد. سینک می‌تواند از جنس استینلس استیل، سرامیک، آجر نسوز، پلیمری مقاوم به اسید و قلیا و یا از نظایر آن انتخاب شده باشد.

۸-۱-۱-۳ فضای کاری کافی و مناسب در هر دو طرف سینک فراهم گردد، این فضا جهت غوطه‌ور سازی لوله‌ها و ظروف شیشه‌ای و آبکشی سینی‌ها استفاده می‌شود.

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

۸-۱-۱-۵ کابینت‌ها و قفسه‌ها جهت نگهداری مواد شیمیایی از جنس ضدخورندگی فراهم گردند.

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

۸-۱-۲-۱ این قسمت به میزهای کار آزمایشگاهی مجهز شود، این میزها اگر از دوطرف قابل دسترس باشند میتوانند بیشتر از ۱/۲ متر پهنا داشته باشند و اگر یکطرفه باشند پهنای آنها نباید از ۶۰ سانتیمتر تجاوز نماید و ارتفاع می‌تواند ۸۰-۹۰ سانتیمتر 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.

۸-۱-۲-۲ منبع تأمین آب و انبار ظروف شیشه‌ای تدارک دیده شود.

۸-۲-۱ اتاق انتقال

۸-۲-۱-۱ اتاق انتقال جهت جداسازی نمونه‌ها، کشت اولیه و انتقال آن‌ها فراهم گردد.
۸-۲-۱-۲ هودهای لامینارفلو به منظور انجام تمامی کارهای آسپتیک یا ضد عفونی شده لازم و ضروری است.

۸-۲-۱-۳ اتاق انتقال تا سرحد امکان تمیز بوده و یک اتاق جدا با حداقل اختلافات جریان هوا باشد.

۸-۲-۱-۴ برای جلوگیری از آلودگی، تعداد درب‌ها و پنجره‌ها حداقل باشد.

۸-۲-۱-۵ جعبه‌های کمک‌های اولیه و کیسول‌های اطفاء حریق در اتاق انتقال ضروری است.

۸-۲-۱-۶ نصب سیستم مادون قرمز UV برای ضد عفونی ضروری است.

۸-۳-۱ اتاق رشد

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

- ۸-۳-۲ سقف بطور صحیح با عایق مناسب عایق کاری شود.
- ۸-۳-۳ به منظور تولید گیاهان حساس به فتوپریود، نور مصنوعی فراهم گردد. برای کارکنان، ۲۰۰ لوکس تامین شود.
- ۸-۳-۴ تامین قفسه یا سینی ضروری است. قفسه‌ها می‌توانند ثابت و یا متحرک از جنس چوب با 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 قفسه‌ها با سینی‌ها هم اندازه باشند.
- ۸-۳-۵ در صورتیکه دسترسی برای قفسه‌ها از یک طرف باشد عرض قفسه‌ها ۴۰۵ میلیمتر و اگر از دو طرف قابل دسترسی باشند عرض آنها ۱ متر در نظر گرفته می‌شود. این فاصله مابین طبقات قفسه‌ها ۴۵۵ میلیمتر باشد.
- ۸-۳-۶ راهروها و معابر حداقل ۱ متر باشند.
- ۸-۳-۷ ارتفاع قفسه‌ها نباید بیش از ۲ متر باشد.
- ۸-۳-۸ دما، نور و رطوبت نسبی قابل کنترل در طراحی اتاق کشت در نظر گرفته شود.

۹-۴- تجهیزات و تاسیسات

۹-۴-۱ سیستم روشنایی

- ۹-۴-۱-۱ همواره نور مصنوعی جهت استفاده در طی شب و زمان‌های تاریکی و ابری در طول روز وجود داشته باشد.
- ۹-۴-۱-۲ جدول شماره ۱ شدت نور توصیه شده برای یک آزمایشگاه کشت بافت و جدول شماره ۲ ملزومات روشنایی را نشان می‌دهد.
- ۹-۴-۱-۳ دارای سیستم برق ۲۲۰ ولت بوده و تاسیسات کشت بافتی به موتور برق اضطراری مناسب تجهیز شوند.

جدول شماره ۱- شدت نور مورد نیاز برای آزمایشگاه کشت بافت

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

جدول شماره ۲- ملزومات روشنایی

شدت نور Lux	تعداد لامپ مورد نیاز در هر متر مربع							
	لامپ رشته ای						لامپ فلورسنت	
	۲۵W	۴۰W	۶۰W	۱۰۰W	۱۵۰W	۲۰۰W	۲۰W	۴۰W
۵۰۰	۳/۹۳۵	۱/۹۸۹	۱/۰۵۲	۰/۵۲۰	۰/۳۱۴	۰/۲۳۶	۰/۶۸۲	۰/۲۶۶
۴۰۰	۳/۱۴۸	۱/۵۹۱	۰/۸۴۲	۰/۴۱۶	۰/۲۵۱	۰/۱۸۱	۰/۵۴۶	۰/۲۱۳
۳۰۰	۲/۳۶۱	۱/۱۹۳	۰/۶۳۱	۰/۳۱۲	۰/۱۸۹	۰/۱۳۶	۰/۴۰۹	۰/۱۶۰
۲۰۰	۱/۵۷۴	۰/۷۹۶	۰/۴۲۱	۰/۲۰۸	۰/۱۲۶	۰/۰۹۰	۰/۲۷۳	۰/۱۰۷
۱۵۰	۱/۱۸۰	۰/۵۹۷	۰/۳۱۶	۰/۱۵۶	۰/۰۹۴	۰/۰۶۸	۰/۲۰۵	۰/۰۸۰
۱۰۰	۰/۷۸۷	۰/۳۹۸	۰/۲۱۰	۰/۱۰۴	۰/۰۶۳	۰/۰۴۵	۰/۱۳۶	۰/۰۵۳
۵۰	۰/۳۹۳	۰/۱۹۹	۰/۱۰۵	۰/۰۵۲	۰/۰۳۱	۰/۰۲۳	۰/۰۶۸	۰/۰۲۷
۱۰	۰/۰۷۹	۰/۰۴۰	۰/۰۲۱	۰/۰۱۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۱۴	۰/۰۰۵

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

۹-۴-۲ سیستم تهویه ، دما و رطوبت

۹-۴-۲-۱-۱ پیش‌بینی‌های لازم جهت یکسان سازی جریان هوا در داخل اتاق‌های رشد به‌منظور یکنواخت نگهداشتن دما در تمامی محیط اتاق الزامی است.

۹-۴-۲-۲-۲ به‌منظور جلوگیری از وجود دماهای متفاوت در اتاق رشد و تجاوز از دمای مطلوب محیط، ترموستات مناسب نصب گردد.

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

۹-۴-۲-۴-۴ سیستم گرمایشی و سرمایشی قادر به تامین دمای ۲۲ درجه سانتیگراد در طی فصل باشد.

۹-۴-۳ تهیه آب و زهکشی

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

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

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

۹-۴-۳-۴-۴ حداقل قطر لوله‌های تامین آب در آزمایشگاه ۲ سانتیمتر باشد.

۹-۴-۳-۴-۴ سیستم لوله کشی و زهکشی مطابق استاندارد مربوطه و ملی کشور انجام گیرد. این سیستم تمامی فاضلاب‌ها را جمع کرده و به شبکه عمل‌آوری 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.

۹-۴-۵ سیستم اطفاء حریق

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

۱۰- دفع زباله

براساس اصول و قوانین بهداشتی رایج در کشور انجام می‌پذیرد.

۱۱- محاسبه ظرفیت تولید در آزمایشگاه‌های تولید تجاری

۱۱-۱- در موارد تولید تجاری ظرفیت تولید براساس سه جایگاه اتاق رشد، فیتوترون و گلخانه مشخص می‌گردد. خروجی اتاق‌های رشد متناسب با ورودی فیتوترون‌ها بوده و متناسب آن حجم فیتوترون‌ها بطور متوسط دو برابر بیشتر از اتاق‌های رشد خواهد بود.

۱۱-۲- طبق محاسبات بعمل آمده در هر دوره چهار هفته‌ای در هر مترمربع از اتاق رشد بطور متوسط ۴۰۰-۳۵۰ (Explant) درون فلاسک در هر دوره پرآوری تولید و این امر در هر مترمربع فیتوترون‌ها 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 پیش‌بینی 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 مترمربع، شامل:

وان شستشوی 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 شیشه‌ای و غیره قبل و پس از استریل کردن *

وسایل تنظیف (برس ، اسکاچ و غیره)

اتوکلاو

۲ - آزمایشگاه آماده سازی محیط کشت، به مساحت حداقل ۴۰ مترمربع، که فضای

اصلی آزمایشگاه بوده و دارای میز کار و قفسه‌بندی برای قرار دادن مواد پرمصرف

روزانه است. شامل:

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

انواع مختلف ظروف شیشه‌ای

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 *

فیلترهای حساس در حد میلی لیتر

PH متر

EC متر

انواع مواد شیمیایی لازم

ساعت برای تنظیم زمان در مراحل مختلف کاری مانند استریل کردن

جا لوله‌ای برای قرار دادن لوله‌های آزمایش در داخل اتوکلاو *

ظروف فلزی جهت قرار دادن پتری دیش در داخل اتوکلاو *

دستگاه تهیه آب مقطر *

وسایلی برای بستن درب لوله‌های آزمایش (چوب پنبه ، ورق نازک آلومینیومی و غیره)

مکان نگهداری مواد شیمیایی

تانک یا مخزن ذخیره آب مقطر

وسایل برچسب‌زنی محیط های کشت، مانند برچسب و مارکر

ب: بخش‌های ایزوله آزمایشگاه

۳- اتاق کشت، به مساحت حداقل ۲۰ متر مربع

- دستگاه‌های سرمایشی و گرمایشی مورد نیاز

- لامپ‌های U.V برای استریل اتاق

- کابینت‌های لامینار Air Flow

- دستگاه استریلیزاتور *
 - وسایل کار مورد نیاز (اسکالپل، پنس، پتری، فیلترها و ...)
 - محلی برای تعویض لباس کارکنان قبل از ورود به اتاق کشت
 - بینوکولر *
 - قفسه برای نگهداری محیط‌های 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 نمونه‌ها پس از اتاق کشت به این مکان منتقل می‌شوند، شامل :
 - قفسه‌بندی مناسب به نحوی است که نور رسانی مطلوب به نمونه‌ها صورت گیرد
 - دستگاه‌های کنترل اتوماتیک دما، نور و رطوبت
 - شیکر *
 - ۵- اتاق سازگاری، به مساحت حداقل ۵۰ متر مربع
 - مکان انتقال نمونه‌ها از شیشه به گلدان و شستشو
 - کنترل مناسب رطوبت (مه ساز)، دما و نور
 - قفسه‌بندی مناسب
 - ظروف و بستر کشت مناسب جهت انتقال نمونه‌ها
 - ج: گلخانه، به مساحت حداقل ۵۰۰ مترمربع**
 - کنترل رطوبت، دما و نور
 - دارای سازه مناسب
 - قفسه قرارگیری قارچ کش‌ها، آفت کش‌ها و کودها
 - قفسه‌بندی مناسب جهت قرارگیری مرتب گلدان‌ها*
 - سیستم آبیاری مناسب *
- * مواردی که وجود آنها جهت بهبود انجام کار پیشنهاد می‌شود، ولی الزامی نمی‌باشد.

ضمیمه ۲

نمودار فراگیر چرخه کار تولید نهال آزمایشگاهی

اتاق آماده سازی ریز نمونه‌ها ، حذف برگها ، شاخه‌های آلوده



یخچال محل نگهداری ریز نمونه‌ها



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 ریزازدیادی :

- ۱- تهیه ریزنمونه
- ۲- انتقال ریزنمونه
- ۳- سترون سازی
- ۴- استقرار
- ۵- پرآوری
- ۶- رشد طولی
- ۷- ریشه زایی
- ۸- سازگاری در اتاق رشد
- ۹- سازگاری در شرایط طبیعی (In vivo hardening)

کشت بافت و کالوس :

توده سلولی متشکل از مریستم‌های تمایز نیافته که توسط محققین با استفاده از فنون مختلف برای دادن گرایش تکوینی (Evaluation) به سوی تولید یک اندام خاص (Organogenesis) قابل بهره‌برداری است.

در حقیقت کالوس از نظر اندام‌زایی قابل هدایت به سوی یک جهت خاص است :

- ۱- تولید اندام‌های هوایی یا ساقه چه (In vitro shoots)
- ۲- تولید اندام‌های زمینی یا ریشه چه (In vitro roots)

ضمیمه ۴

عوامل مؤثر در ایجاد انحراف ژنتیکی نهال‌های 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 سلول‌های ناخواسته با دسته‌جات کروموزومی افزایش یافته (Polyploidy) و یا پلوئیدی ناقص (Aneuploidy) می‌شود. پس کالوس و اندام‌های منشأ گرفته از آن را باید حذف کرد تا بزرگترین امتیاز روش ریزازدیادی یعنی حفظ ثبات ژنتیکی رقم یا کلون برای گیاهان همگروه شده زیر سؤال نرود و نهال به صورت (True-to-type) تولید شود.

۲- کنترل تعداد واکشت ها از زمان استقرار اولین ریزنمونه ها (Explants) در محیط کشت :

از دیدگاه تئوریک ۱۲ واکشت (Sub culture) را در مرحله پرآوری حد مناسب قلمداد می‌کنند. اما صنایع زیست فناوری و تولید کنندگان نهال درون شیشه اذعان می‌کنند که تجربه عملی آنها طی سال ها نشان داده است که تا ۲۰ واکشت مخاطره آمیز نیست.

۳- استفاده از تنظیم کنندگان رشد قوی مانند تو فور دی (D_{۲،۴}) یا دی‌کلرو فنوکسی‌استیک در مرحله سترون‌سازی برای مبارزه با آلودگی‌های قارچی و باکتریایی و یا در مرحله ریشه زایی برای تسریع در فرایند القای ریشه‌های نابجا.

۴- استفاده از غلظت‌های غیر متعارف و اغراق آمیز تنظیم کنندگان رشد در محیط کشت .

پروسه تولید و تایید نهال کشت بافت



شرایط اخذ مجوز تولید نهال کشت بافت :

با توجه به وضعیت نامناسب باغهای 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 تولیدی‌های کشت بافت توسط ستاد کشت بافت گیاهی بشرح ذیل مصوب گردید:

- ۱) ارائه طرح توجیهی فنی - اقتصادی از گونه‌های اولویت دار (خرما، گردو، پایه های رویشی هسته دارها و دانه دارها و)
- ۲) ارائه پروتکل و دانش فنی مستقل یا تحت لیسانس مراکز و موسسات معتبر علمی
- ۳) ارائه رزومه (C.V) افراد متخصص جهت حصول اطمینان از توانمندی متقاضی
- ۴) ارائه اعلام نیاز سازمان جهاد کشاورزی استان مربوطه
- ۵) ارائه جدول زمانبندی (time table) محصول مربوطه
- ۶) داشتن حداقل استاندارد تاسیسات و تجهیزات