საქართველოს ს.დურმიშიძის სახელობის
მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

ხ ა თ უ ნ ა გ ა მ ყ რ ე ლ ი ძ ე

სტევიას (**STEVIA REBAUDIANA**)
მორფოგენეზის თავისებურებანი **in vitro** სისტემაში

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის
სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად წარმოდგენილი

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

სპეციალობა – ბიოტექნოლოგია

მეცნიერ-ხელმძღვანელები:
ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი: ზეინაბ ღოღობერიძე
ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი: ნანა ზარნაძე

2006 წელი

შემოკლებული სიტყვების სია

1. ბაპ – 6 – ბენზილამინოპურინი
2. ზე – ზეატინი
3. კნ _ კინეტინი
4. 2,1 იპ – 2,1 – იზოპენტენილადენინი
5. 2,4 დ._ 2,4 დიქლორფენოქსიძმარმჟავა
6. ნძმ _ αნაფტილძმარმჟავა
7. იემ – β – ინდოლილ ერბომჟავა
8. იძმ _ β – ინდოლილ ძმარმჟავა
9. მკმ – მიკრომოლი
10. MშM მურასიგე- სკუგის საკვები არე
11. B_5 – გამბორგის საკვები არე
12. კლუქსი – კილოლუქსი

შ ი ნ ა ა რ ს ი

შესავალი 63

თავი I ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1. მცენარეთა მიკროკლონალური გამრავლების თავისებურებანი ---------- 8

1.1.1. მცენარეთა მიკროკლონალური გამრავლების ეტაპები ---------- 10

1.1.2. იღლიური მერისტემების განვითარების ინდუქცია ---------- 11

1.1.3. კალუსის პროლიფერაცია და მცენარეთა რეგენერაციის ინდუქცია -- 15

1.1.4. გვერდითი ყლორტების წარმოქმნა ექსპლანტის ქსოვილებიდან ------- 19

1.1.5. იღლიური დატოტიანების ინდუქცია ---------- 21

1.2. მიკროგამრავლების პროცესზე მოქმედი ფაქტორები ---------- 22

1.2.1. გენოტიპი და მშობელი მცენარეების მდგომარეობა ---------- 22

1.2.2. ექსპლანტის მდგომარეობა ---------- 23

1.2.3. ექსპლანტის სტერილურ კულტურაში შეყვანის თავისებურებანი----- 25

1.2.4. კულტივირების პირობები---------- 28

1.2.5. ჰორმონალური ბუნების ზრდის რეგულატორები---------- 32
ექსპერიმენტული ნაწილი
თავი II კვლევის მასალა და მეთოდიკა ---------- 36
2.1 კვლევის ობიექტის დახასიათება ---------- 36
2.2 სტერილიზაციის ხერხები ---------- 39
2.3 ექსპლანტების ტიპები ---------- 40
2.4 საკვები არეების შემადგენლობა და მომზადება ---------- 41
2.5 კულტივირების პირობები ---------- 43
2.6 მცენარე-რეგენერანტების აკლიმატიზაცია ---------- 44
2.7 დაკვირვება და აღწერა ---------- 44
თავი III სტევიის ექსპლანტების ინ ვიტრო კულტურაში შეყვანა და მიკროკლონალური გამრავლება ---------- 46
3.1 პირველადი მასალის ზედაპირული სტერილიზაცია ---------- 46
3.2 პირველად ექსპლანტთა სპეციფიკურობისა და ხნოვანების
გავლენა სტევიის კვირტების პროლიფერაციაზე ---------- 49
3.3 სტევიის კვირტების პროლიფერაცია საკუთრივ მიკროგამრავლების
ეტაპზე: ---------- 53
ა) საკვები არის კომპონენტების გავლენა ---------- 53
ბ) ზრდის რეგულატორების მოქმედების შესწავლა კვირტების მასიურ ინდუქციასა
და პროლიფერაციაზე ---------- 58
გ) კულტივირების პირობების გავლენა ---------- 69
**თავი IV სტევიის მიკროყლორტების დაფესვიანების თავისებურებათა
შესწავლა** ---------- 74
4.1 აუქსინების გავლენა მიკროგამრავლებისა და დაფესვიანების პროცესზე---- 74
4.2 მცენარე-რეგენერანტების აკლიმატიზაციის პროცესის ოპტიმიზაცია--- 80
თავი V მორფოგენეზი სტევიის კულტურაში ---------- 84

5.1 ზრდის რეგულატორების გავლენა კალუსების ინდუქციასა და პროლიფერაციაზე ---------- 84
5.2 კალუსების ორგანოგენული პოტენციალის შესწავლა ზრდის რეგულატორების გავლენით ---------- 89
5.3 კულტივირების ფიზიკური პირობების გავლენა მორფოგენეზზე -------- 100
5.4 რეგენერანტების მორფოლოგიური თავისებურებანი---------- 103
დასკვნები ---------- 106
გამოყენებული ლიტერატურის სია ---------- 108

შესავალი

უმაღლეს მცენარეთა ბიოლოგიის შესწავლაში პროგრესი განისაზღვრება არა მარტო ანალიზური ტექნიკის სრულყოფით, არამედ ახალ სისტემათა მოდელირებით, რაც საშუალებას იძლევა შევაფასოთ მცენარის უჯრედის პოტენცია მისთვის უჩვეულო სიტუაციაში და ამასთანავე გვიხსნის არატრივიალურ გზებს მიღებული შედეგების და ცოდნის პრაქტიკაში დანერგვისათვის.

ერთ-ერთ ასეთ არატრივიალურ მეთოდს წარმოადგენს მცენარის უჯრედისა და ქსოვილის კულტურა. უჯრედული ტექნოლოგიები დაფუძნებული ინ ვიტრო უჯრედთა, ქსოვილთა და ორგანოთა კულტივირებაზე, აჩქარებს ტრადიციულ სელექციურ პროცესს, მნიშვნელოვნად აუმჯობესებს მიღებული მასალის ხარისხს აკონტროლებს სხვადასხვა მორფოგენეტიკური პროცესების მოდელირებასა და რეალიზაციას, აპირობადებს იშვიათი, გენეტიკურად ძვირფასი ფორმების გამრავლების პროცესს და სტანდარტიზაციას, იძლევა კვლავწარმოებად შედეგებს.

უჯრედული ტექნოლოგია საშუალებას იძლევა მოკლე დროში მივიღოთ დიდი რაოდენობით მცენარეთა ერთგვაროვანი სარგავი მასალა. გამრავლების კოეფიციენტი აღწევს 10^5-10^7 მცენარეს წელიწადში, რაც რამდენიმე ათასჯერ მეტია, ვიდრე ვეგეტაციური გამრავლების ტრადიციული მეთოდების გამოყენებისას. კლონური მიკროგამრავლება მნიშვნელოვნად ამცირებს ახალი ჯიშებისა და ფორმების

იუვენილურ პერიოდს და ზრდის მათ პროდუქტიულობას, მნიშვნელოვანია ისიც, რომ ამ დროს მიმდინარეობს მცენარეთა გათავისუფლება პათოგენური მიკროორგენიზმებისა და უმეტეს შემთხვევაში ვირუსებისაგან, გაჯანსაღებული, სარგავი მასალა ფაქტიურად აუმჯობესებს მიღებული მასალის წარმოებაში დანერგვის წესებს.

უჯრედული ტექნოლოგიის უპირატესობაა ისიც, რომ მცენარეთა ზრდა-განვითარება მიმდინარეობს მთელი წლის განმავლობაში, ცვლის და ამცირებს სადედე ნაკვეთებს დაკალმებით გამრავლების დროს, საშუალებას იძლევა გავამრავლოთ ის მცენარეები, რომლებიც ვეგეტატურად ძნელად ან აბსოლუტურად არ მრავლდებიან.

მიუხედავად იმისა, რომ ინ ვიტრო მორფოგენეზის შესწავლას მიძღვნილია უამრავი ექსპერიმენტული შრომა კლონური გამრავლების ტექნოლოგიის შემუშავება უმეტესი სასოფლო-სამეურნეო მნიშვნელობის მცენარეებისათვის რთულია, ამის მიზეზები კი შემდეგია:

1) ერთი და იგივე მეთოდიკა ყველა მცენარეზე არ მეორდება, საჭიროა მისი მოდიფიცირება; 2) მეთოდის შრომატევადობა და სირთულე; 3) საკვები არის კომპონენტების და ფიტოჰორმონების სიძვირე.

მიუხედავად ამისა, უჯრედული ტექნოლოგიის უპირატესობა მაინც ძალიან დიდია და აქტუალური განსაკუთრებით ისეთი მცენარის მორფოგენეზის შესწავლისათვის, როგორიცაა სტევია.

<u>კვლევის მიზანი და ამოცანები:</u> კვლევის მიზანს შეადგენდა სტევიის მორფოგენეზის თავისებურებათა შესწავლა ინ ვიტრო სისტემაში. ამ ამოცანათა რეალიზაციისათვის საჭირო იყო შემდეგ პრობლემათა გადაჭრა:

_ ვეგეტირებადი ყლორტების ზედაპირული სტერილიზაციისათვის ოპტიმალური პირობების შემუშავება;

_ მიკროყლორტების გამრავლებისა და განვითარების პირობების შერჩევა;

_ ტროფიკული ფაქტორების, ზრდის რეგულატორებისა და ფიზიკური პირობების გავლენის შესწავლა მორფოგენეზის სხვადასხვა ეტაპზე;

_ მიკროყლორტების დაფესვიანების პირობების შესწავლა;

_ აკლიმატიზაციის პროცესისა და შემდგომი პერიოდის პირობების შერჩევა.

<u>მეცნიერული სიახლე:</u> მიღებულია ახალი მონაცემები სტევიის მორფოგენეზის შესახებ ინ ვიტრო სისტემაში. შემუშავებულია ინ ვიტრო კულტურაში შეყვანის მეთოდიკა, შესწავლილია მიკროკლონური გამრავლებისა და მასიური ადვენტური კვირტწარმოქმნის ოპტიმალური პირობები. შემუშავებულია დაფესვიანებისა და მიკროგამრავლების პროცესის მორიგეობითი ცვლა და პარალელური თანაწყობა გამრავლების შემდეგი ეტაპებისათვის. შესწავლილია კალუსოგენეზი სტევიის კულტურაში და მისგან ორგანოგენეზის ინდუქცია. ნაჩვენებია ზემოთ აღნიშნულ პრობლემათა დამოკიდებულება საკვები არის კომპონენტებსა და ფიტოჰორმონებთან. აგრეთვე ყველა ამ პროცესში ექსპლანტის ფიზიოლოგიური მდგომარეობისა და გენოტიპის მნიშვნელობა. მიღებულია აკლიმატიზებული მცენარე-რეგენერანტები, რომლებიც თავისუფლად იზრდებიან გრუნტში.

<u>თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა.</u> მიღებულ შედეგებს აქვს ძალიან დიდი თეორიული მნიშვნელობა მორფოგენეტიკური თავისებურებებისა და პოტენციალის რეალიზაციის შესწავლის საქმეში. ამ პროცესთან მცენარის გენოტიპზე, საკვები არის ფაქტორებზე, ფიტოჰორმონებზე და კულტივირების პირობებზე დამოკიდებულების ირგვლივ ცოდნის და გამოცდილების გაფართოება. მიღებულია მცენარე-რეგენერანტები, რომლებიც ჩაშვებულია წარმოებაში და შექმნილია სტევიის პლანტაცია ჩსკჩმსსგ-ის ჩაქვის ფილიალის სანერგეში.

შემუშავდა ინდივიდუალური მეთოდები: კლონური მიკროგამრავლებისა, დაფესვიანების, კალუსოგენეზისა და მისგან მცენარეთა რეგენერაციისა, აგრეთვე, აკლიმატიზაციის პირობები, რაც უზრუნველყოფს სანერგე მცენარეების მასიურ მიღებას.

<u>პუბლიკაციები.</u> კვლევის ძირითადი შედეგები გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო ნაშრომში

<u>შრომის აპრობაცია</u> შრომის ცალკეული თავები მოხსენებული იქნა ჩაის, სუბტროპიკულ კულტურათა და ჩაის მრეწველობის სამეცნიერო-საწარმოო გაერთიანების ჩაქვის ფილიალის სამეცნიერო კონფერენციებზე (1998-1999), ამავე გაერთიანების ასპირანტთა და ახალგაზრდა მეცნიერ-მუშაკთა კონფერენციებზე

(1999-2000), საქართველოს მცენარათა ბიოქიმიის ინსტიტუტის 2005 წ. ლაბორატორიის სხდომაზე.

<u>დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა</u>: დისერტაცია შედგება: შესავლის, ლიტერატურის მიმოხილვის, მასალა და მეთოდიკის, ექსპერიმენტული ნაწილის და შედეგებისაგან. ნაშრომი გადმოცემულია 115 გვერდზე, ილუსტრირებულია 35 ფოტოსურათით და 18 ცხრილით. ლიტერატურა მოიცავს 112 ბიბლიოგრაფიულ დასახელებას.

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1. მცენარეთა მიკროკლონალური გამრავლების თავისებურებანი

ქსოვილური კულტურის გამოკვლევებში ბოლო ხანებში გამოიყო ორი მიმართულება: პირველი დაკავშირებულია კულტივირებული მცენარეული უჯრედის ბიოლოგიურ გამოკვლევასთან, მეტაბოლიზმის, ზრდის, დიფერენცირების, მისთვის დამახასიათებელი გენეტიკური და ეპიგენეტიკური თავისებურებების შესწავლასთან, მეორე უფრო გამოყენებითია, რომელიც მიზნად ისახავს მემცენარეობაში სასოფლო-სამეურნეო გენეტიკასა და სელექციაში წარმოქმნილი რთული პრაქტიკული ამოცანების გადასაწყვეტად მცენარეთა კულტურის მეთოდების ფართო გამოყენებას. ერთ-ერთი ასეთი ეფექტური და ეკონომიურად გამოსადეგი ხერხია ინ ვიტრო კულტურაში მცენარეთა მიკროკლონებით გამრავლება (Висоцкый, 1986).

ტერმინი კლონალური მიკროგამრავლება ეწოდება ქსოვილის და უჯრედის კულტურაში მასობრივ უსქესო გამრავლებას, რომლის დროსაც წარმოქმნილი მცენარეთა კლონები, ფორმები გენეტიკურად იდენტურია საწყისი ეგზემპლარების. მიკროგამრავლებას საფუძვლად უდევს ექსპერიმენტალური ზემოქმედების ქვეშ მცენარემ გამოამჟღავნოს ტოტიპოტენტურობა და დასაბამი მისცეს ახალ ორგანიზმს (Бутенко, 1975, Sanal Kumaz,, 2004).

სოფლის მეურნეობის პრაქტიკაში გამოყენებული ტრადიციული მეთოდებიდან კლონალური მიკროგამრავლება რიგი უპირატესობებით გამოირჩევა:

1. მოკლე ვადაში შეგვიძლია მივიღოთ დიდი რაოდენობით მცენარეთა სარგავი მასალა. გამრავლების კოეფიციენტი მიკროკლონარული გამრავლების დროს საკმაოდ მაღალია ჩვეულებრივთან შედარებით.

2. მცენარეთა ზრდა-განვითარება მიმდინარეობს მთელი წლის განმავლობაში, რაც მნიშვნელოვანია იმ ფორმებისათვის, რომელთა განვითარების ციკლში არის შესვენების პერიოდები.
3. ინ ვიტრო გამრავლება ძალიან ეკონომიურია. ათასობით მცენარე შეიძლება განვითარდეს ლაბორატორიაში პატარა ფართობებზე, კლიმატურ კამერებში და ამით შემცირდეს სათბურებში სარგავი მასალის განლაგების ფართობები.
4. გამრავლებასთან ერთად ხდება მცენარეების გამოჯანსაღება. ინ ვიტრო კულტურაში მცენარეები თავისუფლდებიან პათოგენი მიკროორგანიზმებისა და ვირუსებისაგან, ამიტომ ნაკლებია რისკი მცენარის თავიდან დასნებოვნების. სარგავი მასალის გამოჯანსაღება ამაღლებს პროდუქციის ხარისხს. დიდი მნიშვნელობა აქვს სარგავი მასალის ერთგვაროვნებას, რომლის რეგულირება თავისუფლად შეიძლება ინ ვიტრო კულტურაში (Legullion 2003).
5. ქსოვილური კულტურის მეთოდით შესაძლებელია იმ მცენარეთა გამრავლება, რომლებიც საერთოდ არ მრავლდებიან ვეგეტატიურად, მაგალითად პალმები (Sountavius K. Heber M 1970).

მიუხედავად იმისა, რომ არსებობს ბევრი ნაშრომი ამ მეთოდის შესახებ, კლონალური მიკროგამრავლების ტექნოლოგია მთლიანად არ არის დამუშავებული უმრავლესობა სასოფლო-სამეურნეო კულტურებისთვის (Бутенко. 1983). მიზეზი მდგომარეობს იმაში, რომ 1) მეთოდების უმრავლესობა რთული და შრომატევადია, ძნელად განსახორციელებელი. 2) საკვები არის შემადგენელი კომპონენტების დეფიციტი და სიძვირე, და ბოლოს 3) ინ ვიტრო კულტურაში მცენარეთა მორფოგენეტიკური პოტენციალი ბოლომდე არაა შესწავლილი და ამიტომ მისი მართვაც საკმაოდ რთულია (Бутенкою 1975).

დღესდღეობით არ არსებობს კლონალური მიკროგამრავლების მეთოდების ერთიანი კლასიფიკაცია. მურასიგე გვთავაზობს (Murashige T. 1977) სხვადასხვა მორფოგენეტიკურ რეაქციებზე დაფუძნებულ კლასიფიკაციას. ავტორი აღწერს 6 მეთოდს:

1). საუღლე მერისტემების აქტივაცია; 2). უშუალოდ ექსპლანტის ქსოვილში ადვენტური ყლორტების წარმოქმნა; 3). კალუსში ადვენტური კვირტების წარმოქმნა; 4). ექსპლანტის

უჯრედებში სომატური ემბრიოგენეზის ინდუქცია; 5). კალუსში ემბრიოდების წარმოქმნა; 6). Iნ ვიტრო კულტურაში წარმოქმნილი სომატური ჩანასახების ქსოვილებში დამატებითი ემბრიოდების ფორმირება.

მოცემულ კლასიფიკაციასთან ერთად არსებობს სხვა გზაც. კლონალური მიკროგამრავლების პროცესი შეიძლება გავყოთ 2 ტიპად: 1. მცენარეში არსებული მერისტემების (ღეროს აპექსი, ღეროს გვერდითი და მძინარე კვირტები) აქტივაცია; 2. De novo ემბრიოდების ან კვირტების წარმოქმნის ინდუქცია, რომელიც იყოფა 3 მეთოდად: ა) ორგანიზებული სტრუქტურების წარმოქმნა უშუალოდ ექსპლანტის სპეციალიზირებული ქსოვილებიდან (ფოთლის, რეპროდუქციული ორგანოების ქსოვილებიდან, ეპიდერმისიდან, სუბეპიდერმალური ქსოვილებიდან, ფოთლის მეზოფილიდან და სხვა) (Rardan 2004, Зарнадзе 1995); ბ) ექსპლანტის უჯრედებიდან წარმოქმნილი პირველადი კალუსიდან; გ)გადასარგავი კალუსური ქსოვილებიდან ან სუსპენზიური კალუსური უჯრედებიდან (Батягина 1978, Рэиху 2004, Зарнадзе 1993, მანჯგალაძე 2002).

სხვა კლასიფიკაციებიდან ეს კლასიფიკაცია იმით გამოირჩევა, რომ საფუძვლად უდევს პრინციპული განსხვავება მშობელ ფორმებსა და მერისტემიდან წარმოქმნილი გენეტიკურად იდენტურ მცენარეებს, სპეციალიზირებულ და კალუსური უჯრედებიდან წარმოქმნილ მცენარეებს შორის, რომელთათვისაც დამახასიათებელია გენომური მუტაცია (Sanal Kumaz 2004).

1.1.1. მიკროკლონალური გამრავლების ეტაპები

კლონალური გამრავლების პროცესი შედგება სამი ეტაპისაგან. პირველი_ მცენარეთა საწყისი ქსოვილიდან ექსპლანტის გამოყოფა. ამ ეტაპზე საჭიროა ინფექციისაგან თავისუფალი კულტურის მიღება, საკვებ არეზე ექსპლანტის გადარჩენა_შეგუება და სწრაფად ზრდა. მეორე _ საკუთრივ მოკროგამრავლება ანუ მიკროკლონების ზრდა რაოდენობრივად. მესამე _ დაფესვიანება. მასთან ერთად ტარდება მცენარეთა გაკაჟება, გარემოს არახელსაყრელი პირობების მიმართ გამძლეობის ამაღლება. ამისათვის ზრდიან განათების ინტენსივობას და ამაღლებენ ნესტიანობას. ზოგიერთ შემთხვევაში მიზანშეწონილია დაფესვიანებულ მცენარეთა

მოთავსება დეპონირებაზე დაბალი ტემპერატურის პირობებში, რაც საშულებას იძლევა საჭიროების შემთხვევაში მცენარეთა განვითარების შეფერხების და ხანგრძლივად მათი შენახვის.

დობერგის და მეინის აზრით (Dobergh 1981) სასოფლო-სამეურნეო მცენარეების მასობრივი მიკროგამრავლებისათვის მიზანშეწონილია მესამე ეტაპის სამად გაყოფა. ა) გამრავლებული კვირტების ზრდა ყლორტების წარმოქმნამდე. ბ) in vitro ყლორტების დაფესვიანება. in vitro მცენარეთა დაფესვიანების რთულად დასაძლევ პრობლემად შეიძლება ჩაითვალოს მცენარეთა სუსტი ზრდა განპირობებული ფესვთა სისტემის არანორმალური განვითარებით, ფესვებზე ბუსუსების უქონლობით ან ფესვების სიკვდილით, გადარგვისას ფესვების დაზიანებით, რაც იწვევს ჭრილობებიდან ინფექციის შეჭრას. ავტორები თვლიან, რომ მცენარეთა დაფესვიანება საკმაოდ ძნელი და ძვირი ოპერაციაა მიკროგამრავლებაში.

დობერგმა და მეინმა შემოგვთავაზეს ინ ვიტრო გამრავლებული მერიკლონების დაფესვიანების რამოდენიმე ხერხი, რომელიც ყლორტებით დაფესვიანების ტრადიციულ მეთოდს ჰგავს.

პირველი ხერხი მდგომარეობს იმაში რომ ყლორტებს, რომლებიც წარმოიქმნებიან ა) სტადიაში აკულტივირებენ აუქსინის შემცველ ხსნარიან ჭურჭელში, შემდეგ ყლორტები გადააქვთ უშუალოდ ნიადაგში. დაფესვიანება შეადგენს 100%. Eეს ტექნოლოგია აპრობირებულია ბეგონიის (Begonia tuberhybrida-ს) 20 ჯიშზე. მეორე ხერხი მდგომარეობს იმაში, რომ ყლორტებს ა) სტადიის გავლის შემდეგ ათავსებენ სუბსტრატზე, რომელშიც შეწოვილია აუქსინის ხსნარი. ამ ხერხით დაფესვიანებულია Gordiline termihales, Dracena congesta, Dracena pareyl, Ficus 107 სახეობა Dracena devemensis, Spatifillum (Dobergh 1981) და ბოლოს მესამე ხერხი _ ყველაზე ადვილი, რომელიც მდგომარეობს იმაში რომ გამრავლებული ყლორტები გადააქვთ ნიადაგში. დაფესვიანების ეს ხერხი გამოიყენება უშუალოდ იმ შემთხვევაში, როცა ფესვები წარმოიქმნებიან უშუალოდ ქსოვილის კულტურაში გამრავლების ეტაპზე, ცნობილია, რომ თუ კი სინჯარებში დაფესვიანებული მცენარეები ფრთხილად იქნებიან ნიადაგში გადატანილი, ადვილად შეეგუებიან აკლიმატიზაციას სათბურის და ველის პირობებში.

1.1.2. იღლიური მერისტემების განვითარების ინდუქცია

საუღლე მერისტემების პროლიფერაციის ინდუქცია, იღლიური კვირტების ზრდის აქტივაცია და გვერდითი ყლორტების დაკალმება ერთ-ერთია ვეგეტატიური გამრავლების ტრადიციულ მეთოდებს შორის. ბუჩქებისა და ნახევრადბუჩქებისათვის, რომლთათვისაც აპიკალური დომინირება სუსტადაა გამოხატული, გამრავლებისათვის ბუჩქის გაყოფა ჩვეულებრივია. იმ შემთხვევაში როცა მცენარე ივითარებს მთავარ ღეროს იღლიური ყლორტების ზრდის ინდუქციისათვის აუცილებელია აპიკალური დომინირების მოხსნა, რაც შეიძლება მიღწეულ იქნას ღეროს აპექსის მოხსნით ან მცენარის ჰორმონალური დამუშავებით. აპიკალური დომინირება წარმოადგენს მემკვიდრულ ნიშანს და დაკავშირებულია მცენარის სხვადასხვა ორგანოების ჰორმონალურ ბალანსთან, ფიტოჰორმონების ტრანსპორტთან და კვირტების ტროფიკული ფაქტორებით მომარაგებასთან (Кефели 1978) ვიკსონისა და ტიმანის თეორიის მიხედვით კენწრული მერისტემის ქსოვილებში სინთეზირებული აუქსინის ტრანსპორტირება ხდება მთავარ ღეროში ბაზიპეტალურად. ზედმეტი დოზით მისი დაგროვება ახდენს იღლიური კვირტების ზრდის ინგიბირებას, ავტორები ვარაუდობენ, რომ ამ პროცესით ხდება მათში ციტოკინინების სინთეზის ბლოკირება (Wickson, Thimanin 1958, 1960).

ამ თეორიით ყველა ექპერიმენტული მონაცემების ახნა შეუძლებელი იყო. სნოუს აზრით (Snow 1940) ყველაზე ხშირად ზრდის შეჩერება ხდება კენწეროდან მეტად დაშორებულ იღლიურ კვირტებში. მიუხედავად იმისა, რომ აუქსინების მოძრაობა ხდება ზემოდან ქვემოთ, ისინი ზოგჯერ იწვევენ ინჰიბიტორის სინთეზს, რომელიც მოძრაობს აპოლარულად აპიკალური ზონიდან ქვემოთ ღეროს გასწვრივ, აღწევს იღლიურ კვირტებში, უფრო ხშირად მის წვეროში და აჩერებს მათ ზრდას. იღლიური კვირტების ზრდა პირდაპირაა დამოკიდებული ფესვებზე. ფესვების მასტიმულირებელი მოქმედების შეცვლა შესაძლებელია იღლიური კვირტების ეგზოგენური ციტოკინინებით დამუშავებით. ვულისა და უორინგის ექპერიმენტებში (Wooley, Wareing 1972) ნიშანდებული ნახშირბადშემცველი ეგზოგენური 6-ბენზილპურინი (ბაპ.) გროვდება იღლიური კვირტების ზრდის წერტილებში.

ეგზოგენური β–ინდოლილ 3 ძმარმჟავა (იმძ) ეწინააღმდეგება იღლიურ კვირტებში ციტოკინინების დაგროვებას, რაც იწვევს ზრდის შეჩერებას, ან ნაწილობრივ შეფერხებას.

მეცნიერთა აზრით (Burg, Burg,1866, Phillips,1975, Сытник и др. 1981) აპიკალური დომინირების პროცესში ფიტოჰორმონებთან ერთად მონაწილეობას იღებენ ზრდის ინჰიბიტორები. ღეროს აპექსში სინთეზირებული აუქსინის მაღალი შემცველობის გამო ხდება ზრდის ინჰიბიტორის წარმოქმნის ინდუცირება (მაგ. ეთილენი). სუბაპიკალურ ზონაში ინჰიბიტორი მოძრაობს აპოლარულად და აფერხებს კვირტების ზრდას ზემოდან ქვემოთ, ღეროს გასწვრივ, ან კიდევ ასრულებს ტრიგერის ფუნქციას აბცისის მჟავას სინთეზისას.

აპექსიდან მოშორებით აუქსინების სინთეზი წყდება, რაც აფერხებს საუღლე კვირტებში ინჰიბიტორების მიწვდომას. პარალელურად ფესვებში სინთეზირებული ციტოკინინები მოძრაობენ ზემოთ ღეროში აუქსინების მოძრაობის საწინააღმდეგოდ. მცენარის დეკაპიტაცია იწვევს ციტოკინინების შემცირებას აპიკალურ ნაწილში. იღლიური კვირტების ზრდის დაწყების წინ ციტოკინინების დაგროვების მოვლენას ხსნიან იღლიურ კვირტებში სინთეზირებული აუქსინების მიმზიდველობით სხვა კვირტების მიერ, ან თვითონ ციტოკინინების სინთეზით იღლიურ კვირტებში, როგორც თვლიან ტიმანი და ვიკსონი (Wichson, Thiman 1960). დღემდე უცნობია აპიკალური დომინირების პროცესში აუქსინების და ციტოკინინების მოქმედების მექანიზმი, ბუნება და ინჰიბიტორების კორელაციური მოქმედება.

საკვები ნივთიერებების მოქმედებას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება აპიკალური დომინირებისას, რადგანაც დომინირების ხარისხი (Gregory, Veall 1957, Thengane etal 2003) პირდაპირპროპორციულია მცენარეების საკვები ნივთიერებებით მომარაგებასთან, კერძოდ, აზოტით და ნახშირბადით. აუქსინები გავლენას ახდენენ კვირტების ნივთიერებებით მომარაგებაზე, მაგრამ აფერხებს ამ ნივთიერებების გატარებას იღლიურ კვირტებში დეკაპიტინირებულ ზოგიერთ მცენარებში ეგზოგენური აუქსინით დამუშავება არ აღადგენს აპიკალურ დომინირებას. ამასთან მცენარეების საკვები ნივთიერებებით მომარაგების შემცირება იწვევს ერთი ღეროს განვითარებას (Gahan, Wang et al 2003, Choi 2003, Kadota 2003).

მას შემდეგ, რაც დამტკიცებულია ციტოკინინების ფიზიოლოგიური მოქმედება და მათი არსენალი გამდიდრდა ხელოვნური და ბუნებრივი ზრდის რეგულატორებით, გაიზარდა მათი გამოყენება მცენარეთა მიკროგამრავლებაში იღლიური კვირტების აქტივაციის მიზნით. იღლიური კვირტების აქტივაციით მიკროკლონარული გამრავლება დაფუძნებულია ან აპიკალური დომინირების მოხსნაზე, ან მთავარი ღეროს ზრდის ინდუცირებაზე და ერთ იღლიური კვირტებით მიკროდაკალმებაზე, ან დიდი რაოდენობით ადვენტური კვირტების განსავითარებლად საკვებ არეში ციტოკინინების დიდი რაოდენობით შეტანაზე. ყველა შემთხვევაში განვითარებულ ყლორტებს აცალკევებენ შემდგომი კულტივირებისათვის და გადააქვთ იმ საკვებ არეზე, რომელიც იწვევს იღლიური მერისტემების განვითარებას. მიკროგამრავლებისთვის დიდი მნიშვნელობა ენიჭება საკვებ არეში შეტანილი ფიტოჰორმონების კონცენტრაციებს. მურასიგეს ნაშრომები (Murashige 1977) ითვლება მცენარეთა მიკროგამრავლების საძირკველად, და ეხება იღლიური კვირტების განვითარებისათვის შესაბამისი საკვები არეებისა და კულტივირების პირობების შერჩევას. ბოლო დროის მონაცემებით ფიტოჰორმონების მაღალი კონცენტრაციები არაა მიღებული მეცნიერთა მიერ მცენარეების მორფოფიზიოლოგიური თავისებურებათა და ხანგრძლივად ქსოვილის კულტურაში მცენარეთა ინ ვიტრო გამრავლებისთვის. ლუნდერგანის და ჯანიკის მონაცემებით (Lundergan, Janik 1980) მონაცემებით ბაპ კონცენტრაციით 20-25 მკმ ერთი მხრივ იწვევს იღლიური კვირტების განვითარებას, ხოლო მეორე მხრივ, დაბალი, მახინჯი ღეროების განვითარებას ცუდი ფესვებით. ხოლო საკვებში შეტანილი ბაპ 4,43 მკმ კონცენტრაციით იწვევს კვირტებიდან ნორმალური ყლორტების განვითარებას. მაგრამ დიდი რაოდენობით გამრავლების ციკლის გამოყენება ყოველთვის სასიკეთო არაა ზოგიერთ კენკროვნებში, როგორც ეს აღმოაჩინა პოპოვმა და ვისოცკიმ (Попов, 1976 Попов, Высоцкий 1978) მაყვალის ინ ვიტრო გამრავლების რამდენიმე ციკლის შემდეგ საკვებზე წარმოიქმნებოდა პასიური კვირტები, რომლებიც ვეღარ წარმოქმნიან გვერდით კვირტებსა და ფესვებს. ოპტიმალურად უნდა ჩაითვალოს გამრავლების 2-3 ციკლის მონაცვლეობა დაფესვიანებასთან. ვარდის ყლორტების განვითარება 4,62 მკმ ბაპ შემცველ საკვებ არეზე იწვევს ანომალური ყლორტების განვითარებას. ფიტოჰორმონების დიდი დოზებით შეტანა აპირობადებს ექსპლანტების სიკვდილს

(Greval et all 1977. Bilkey et all 1978. Beauchesec 1980). 46,2_92,4 მკმ იწვევს იღლიური კვირტების პროლიფერაციას გერბერაში, დიდი ხნით ამ არეზე კულტივირებისას ხდება იღლიური მერისტემების აქტივაციის შემცირება. ყლორტები ღებულობდნენ არანორმალურ მორფოლოგიას, არ ფესვიანდებოდნენ აუქსინიან არეში და ცუდად იტანდნენ გადარგვას ნიადაგის სტერილურ პირობებში, ზოგ შემთხვევაში კი იღუპებოდნენ. ყლორტების კულტივირების პროცესში ხდება ფიტოჰორმონების თანდათანობითი დაგროვება კულტივირებულ ქსოვილებში ფიზიოლოგიურ დონეზე მაღლა, რაც იწვევს მათ ტოქსიკურობას.

ციტოკინინების მოქმედების შეფასებიდან გამომდინარეობს, რომ ციტოკინინების მაღალი დოზებით გამოყენება გამრავლების მაღალი კოეფიციენტის მისაღებად, იწვევს კლონალური მიკროგამრავლების ისეთ არასასურველ ეფექტს, როგორიცაა მცენარეთა მორფოლოგიის შეცვლა, იღლიური მერისტემების პროლიფერაციის დახშობა, ღეროების დაფესვიანების შემცირება (Ozellana at al 1993, Zhang 1996, Зарнадзе 1995).

ამიტომ უნდა იქნას გამოყენებული ციტოკინინები იმ მინიმალური კონცენტრაციით, რომელიც დააჩქარებს მიკროგამრავლებას. ციტოკინინების მაღალი და დაბალი დოზების მონაცვლეობით თავს დავაღწევთ მათ ტოქსიურობას.

1.1.3. კალუსის პროლიფერაცია და მცენარეთა რეგენერაციის ინდუქცია

ამ მეთოდს საფუძვლად უდევს საკვებ არეზე მოთავსებული მცენარეთა უჯრედების "დედიფერენცირების" უნარი. ტერმინ "დედიფერენცირებაში" იგულისხმება უჯრედული სპეციალიზაციის დაკარგვა და მცენარის ინერტული უჯრედების დაყოფის უნარიანობის გააქტიურება ან მერისტემული უჯრედების დაყოფის ტიპის შეცვლა და არაორგანიზებულ უჯრედებად ანუ კალუსურ ქსოვილად შემდგომი გარდაქმნა (Бутенко 1974).

კალუსური უჯრედები აქტიურად იყოფიან, მრავლდებიან და გარკვეულ პირობებში შეუძლიათ გადასვლა განსაკუთრებულ ქცევაზე, რასაც თან ახლავს ღეროს ორგანიზებული ზრდა და ყლორტების ფორმირება, ე.ი მთავარი ფაქტორი, რაც

განაპირობებს კალუსის პროლიფერაციიდან ორგანოგენეზში გადასვლას ეს გახლავთ საკვებ არეში ჰორმონალური ფაქტორების არსებობა და მათი შეხამება. ეგზოგენური ჰორმონების: ციტოკინინისა და აუქსინის შედარებით მაღალი კონცენტრაციისას წარმოიქმნება ყლორტები, პირუკუ მდგომარეობისას კი ხდება ფესვის პროლიფერაცია, საშუალოს დროს კი კალუსის. ეს შეფარდება პირველად დადგენილი იქნა სკუგისა და მილერის მიერ თამბაქოს გულგულის (Skoog, Miller 1957) კონტროლირებად მორფოგენეზზე და წარმოადგენს საფუძველს კალუსური უჯრედებიდან მცენარეთა მიკროგამრავლებისა.

ლილიის საყვავილე კვირტების ნაწილებზე კალუსის პოლიფერაცია ხდება 4,52 მკმ 2,4-დ და 4,43 მკმ კნ შემცველ არეზე, ყლორტების განვითარება კი საკვები არიდან აუქსინის ამოღებით. (Bocchetta 2003).

სედუმ ტელლეპჰიუმ–ს ფოთლის ექსპლანტებზე აკვირდებოდნენ კალუსის განვითარებას 5,37 მკმ ნძმ. და 0,08 მკმ ბაპ შემცველ არეზე. საკვებ არეზე, სადაც ბაპ: ნძმ=100:1 ხდება ღეროების წარმოქმნის ინდუცირება.

კალუსის პროლიფერაცია გერბერის ღეროს ფუძეზე მიმდინარეობდა 4,62 მკმ კნ და 5,37 მკმ ნძმ შემცველ საკვებ არეზე (Bრანდო, შალემა ღ. 1977). კალუსში ფესვების ფორმირების ინდუცირება ხდება საკვებში 5,37 მკმ ნძმ და 0,9 მკმ 2,4-დ შეტანით, ხოლო ყლორტების ფორმირება ხდება ციტოკინინების შეტანით და აუქსინების ამოღებით, ციტრუსის საყვავილე კვირტების კულტივირებისას ყლორტების ფუძეში წარმოიქმნება მცირე რაოდენობის კალუსი. კალუსის გადატანით არეზე ციტოკინინის აუქსინთან მაღალი შეფარდებით კი მრავალრიცხოვანი კვირტები (Kobayashi 2003).

ქსოვილის კულტურაში ორგანოების ფორმირება ყოველთვის არ ექვემდებარება სკუგისა და მილერის მიერ შემუშავებულ კანონზომიერებას. ჩლიცჰოირუმ ინ ტუბუს ფესვის სეგმენტებზე კალუსის ინიციაცია და ზრდა, აგრეთვე კალუსში ყლორტების დიფერენციაცია ხდება სრულიად უბრალო საკვებ არეზე, რომლის შემადგენლობაშიც შედის მინერალური მარილები და საქაროზა (Raman K. et all 1980). კინეტინი კალუსის პროლიფერაციის ინჰიბირებას იწვევს, ხოლო ნძმ 0,57 მკმ კონცენტრაციით სტიმულაციას. ნძმ უფრო მაღალი დოზით ყლორტების ინჰიბირებას ახდენს, მაგრამ იწვევენ ფესვების ინდუცირებას (pzehn 2003).

ლუცერნის კალუსის (Medikago sativa) წინასწარი კულტივირება აუქსინის მაღალ ფონზე სტიმულს აძლევს ყლორტების დიფერენციაციას უჰორმონო არეზე და პირიქით ციტოკინინებით მდიდარ არეზე კალუსის კულტივირებას მივყავართ ფესვების ფორმირებისაკენ უჰორმონო არეზე, თუმცა სკუგისა და მილერის კონცეფცია მრავალრიცხოვან ცდებშია დამტკიცებული, მას არ შეუძლია ახსნას ზოგიერთი ფაქტები, რომელთაც ადგილი აქვს ორგანოგენეზის ინდუქციისას კალუსური უჯრედების კულტურაში, ამიტომ ყოველთვის არაა მისაღები. მაგრამ უნდა აღინიშნოს, რომ კალუსის უჯრედების მორფოგენურობა ფიტოჰორმონების იმ ბალანსზეა დამოკიდებული, რომელიც კალუსურ უჯრედებში იქმნება და დამოკიდებულია 1) ზრდის ენდოგენური რეგულატორების დონეზე 2) ზრდის ეგზოგენური რეგულატორებით ქსოვილის უზრუნველყოფაზე და ბოლოს 3) კულტივირებული უჯრედების ფაქტორებისადმი რეაქციის უნარზე (Quraishi 2004).

ნორმალურ კალუსურ უჯრედებს არა აქვთ უნარი მათი გამრავლებისათვის ოპტიმალური რაოდენობის ფიტოჰორმონების სინთეზირების და ამიტომ საჭიროებენ ეგზოგენური ზრდის რეგულატორებს. ზოგიერთ შემთხვევაში კალუსური უჯრედები, რომლებიც გამოჰყავთ ხანგრძლივად გადასარგავ კულტურაში, ხდებიან შეჩვეულები და ჰორმონდამოკიდებულები. მიურის და მილერის ნაშრომებში (Miura, Millern 1968) ლობიოს ციტოკინინდამოუკიდებელი კლონი გაჩნდა კულტივირების 6 წლის მერე, რაც განპირობებული იყო ენდოგენური ციტოკინინების სინთეზით. ანალოგიური რეზულტატებია მოცემული ციტოკინინის ან აუქსინის მიმართ ავტოტროფული ალოეს (Lიაო, ჩჰენ 2004) დიოსკურიას (Borges 2004) და სხვა კულტურების შტამების შესწავლისას. ჰორმონოდამოუკიდებელი კალუსური კლონების წარმოქმნის მიზეზია უჯრედული პოპულაციების მუტაცია და მუტანტური უჯრედების სელექცია, აგრეთვე ფიტოჰორმონების ბიოსინთეზის სისტემებთან დაკავშირებული გენების დეპრესია (Perrot-Rechenman 2004).

კულტივირებული უჯრედების ციტოგენეტიკური ცვალებადობის მიზეზები სხვადასხვაა, ფროლოვას აზრით (Фролова 1950) შეიძლება გამოიყოს რიგი ფაქტორები: 1) მცენარიდან ექსპლანტის გამოყოფისას კორელაციური კავშირის დარღვევა. 2) საკვები არის კომპონენტების მოქმედება. 3) საკვებ არეში დაგროვებული მეტაბოლიზმის

პროდუქტების გავლენა. 4) კულტივირებადი მასალის ჰეტეროგენურობა და გარკვეული ტიპის უჯრედების სელექცია.

თორის კონცეფციით (Torrei 1979) კინეტინი ჰეტეროგენური ექსპლანტის პოლიპლოიდურ უჯრედებში იწვევს დაყოფის ინდუცირებას. პოლიპლოიდური უჯრედები აქტიურად მრავლდებიან, პროლიფერირებენ, რის შედეგსაც წარმოადგენს პოპულაციაში მათი მზარდი დომინირება. ეს მსვლელობა გათვალისწინებული იყო კუნახის და ალპატოვას ნაშრომებში (1975) ციტოკინინების მსგავსი ეგზოგენური ზრდის რეგულირების ხანგრძლივად გამოყენება ჰაპლოპაპუსის (Haplopappus graulis) ქსოვილის კულტურაში იწვევს პლოიდურობის მომატებას და მიკროპლოიდური უჯრედების წარმოქმნას. აღსანიშნავია, რომ ჰაპლოპაპუსის ხანგრძლივად პასირებული შტამების პოლიპლოიდიზაცია უჰორმონო არეზე მათი გამოზრდისას საგრძნობლად ნელდება და წყდება კულტივირების პირველ წელს. კულტივირებული უჯრედების ციტოგენეტიკური ცვალებადობა დაკავშირებულია საკვებ არეში აუქსინების არსებობაზე, კერძოდ 2,4-დ, რომელიც იწვევს in vitro მცენარეული უჯრედების დიპლოიდური ბირთვების ენდორედუპლიკაციას ან ენდომიტოზის ინდუცირებას.

ჰეტეროგენური კალუსური უჯრედებიდან მცენარის რეგენერაცია რიგ შემთხვევაში იწვევს შეცვლილი მორფოლოგიით მცენარეების მიღებას: ჯუჯების, ფოთლების არასწორი დაძარღვით, ფოთლების განლაგების დარღვევით, სიმახინჯეებით და დაბალი სიცოცხლისუნარიანობით (Skirvin 1978).

კალუსიდან რეგენერირებული ხორბლის მცენარეები განსხვავდებან ერთმანეთისაგან ზომით, ყვავილის და ფოთლის მორფოლოგიით. მცენარეების ცვალებადობა დამოკიდებულია კალუსის ხნოვანებაზე და წარმოშობაზე (Zale et al 2004). ღეროსეული კალუსიდან ვითარდება ნორმალური მცენარე, ხოლო ფესვის კალუსიდან კი გარეგანი პათოლოგიებით. სკირვინისა და სხვათა აზრით (Skirvin, Sanick 1976) ეს პათოლოგიები დაკავშირებულია ქრომოსომულ აბერაციებსა და გენურ მუტაციებთან.

ციტოგენეტიკურ ცვალებადობისთვის ძირითადი მნიშვნელობის მინიჭება ანომალური მცენარეების განვითარებაში არ იქნებოდა სწორი, არაა გამორიცხული მოდიფიკაციური ცვალებადობების როლი, კულტივირების პირობების შეცვლა იწვევს ზრდის პროცესის დარღვევების გამოსწორებას.

მორფოლოგიური გადახრები, როგორიცაა სიდაბლე, მოგრძო ფოთლები ჭარხლის კალუსური კულტურიდან მიღებულ მცენარეებში, დაკვირტვით ქრებოდნენ. ამის მიზეზი კი მხოლოდ კულტივირების პირობების არაადექვატურობა იყო. ამიტომ ყოველთვის, როცა კალუსიდან ხდება ანომალური მცენარის განვითარება, უნდა გადაწყდეს საკითხი ეხება თუ არა ეს გადახრები მცენარის გენეტიკურ ბუნებას და წარმოადგენს თუ არა ეს მორფოზებს (Dozica, Nedelea 1996).

კალუსური ზრდის პერიოდის შემცირებით 3-4 პასაჟამდე, კალუსის ძველი ნეკროტული უბნების მოცილებით ფიტოჰორმონების დაბალი კონცენტრაციების გამოყენებით შესაძლებელია ერთგვაროვანი თაობოს მიღება (Sushcelamna 1996).

in vitro -ს მცენარეების ქსოვილებისა და უჯრედების კულტივირება ზოგჯერ იწვევს მცენარის მორფოგენეტიკური პოტენციალის დარღვევას. კალუსურ უჯრედებს ხანგრძლივად კულტივირებისას უქვეითდებათ ყლორტების ან ფესვების რეგენერაციის ან ემბრიოდების დიფერენცირების უნარი (Smith, Street 1974 . Thomas Street 1970).

ამ მოვლენის ასახსნელად ლიტერატურაში მოტანილია მიზეზები, რომელთაგან კონკურენტულია ორი: პირველის თანახმად (გენეტიკური კონცეფცია) მორფოგენეტიკური პოტენციალის დაკარგვა განპირობებულია კულტივირებულ უჯრედებში ციტოგენეტიკური ცვალებადობით პოლიპლოიდიზაცია, ანეუპლოდია, ქრომოსომული აბერაციები, გენური მუტაციები. ინ ვიტრო კულტურაში სელექციურად უპირატეს გენეტიკურად შეცვლილ უჯრედებს თანდათანობით ცვლიან ნორმალური მორფოგენეზუნარიანი უჯრედები (Thomas Steet 1970. Smith. Steet 1974).

მეორე აღიარებს კულტივირებული უჯრედების მორფოგენეზუნარიანობას, რომლის რეალიზაცია არ ხდება იმ უკუქცევადი ფიზიოლოგიური და ეპიგენეტიკური ცვალებადობის გამო, რომლებიც მიმდინარეობს უჯრედებში. საკრისტანმა და მელეხერსმა (Sakristan Melchers 1969) შეძლეს მცენარეების რეგენერირება თამბაქოს ძველი ანეუპლოიდური კალუსიდან. ხანგრძლივად კულტივირებული სტაფილოს კალუსის ემბრიოგენული პოტენციალის აღდგენა შეიძლება საკვებში კინეტინის შეტანით (Wochok Wetherell)

ამ მოვლენის კონკრეტულ მიზეზად შეიძლება განიხილოს მცენარეების ჯიშური კუთვნილება. ასე მაგალითად უმრავლესი მარცვლოვნების კალუსი პირველი თვეების

განმავლობაში ინარჩუნებს მორფოგენეზუნარიანობას, თამბაქოს კალუსი ინარჩუნებს ოთხი წლის განმავლობაში ორგანოების ფორმირების უნარს (Бутенко 1967).

მიუხედავად იმისა, რომ კალუსისათვის დამახასიათებელია ციტოგენეტიკური ცვალებადობა, შესაბამისად ხანგრძლივ კულტურაში ანორმალური მცენარეების განვითარება და კულტივირების პროცესში მორფოგენეზის უნარიანობის დაქვეითება, კალუსის პროლიფერაცია და მისგან კვირტების რეგენერაცია ან ემბრიოიდების დიფერენციაცია, ეკონომიურად სასარგებლოა და რიგი მცენარეებისათვის ერთადერთ შესაძლო ხერხს წარმოადგენს ინ ვიტრო კულტურაში გამრავლება. ეს მეთოდი მხოლოდ იმ მცენარეებისათვის უნდა იქნეს გამოყენებული, რომლებისთვისაც დამახასიათებელია კალუსური ქსოვილების გენეტიკური სტაბილურობა ან როცა მცენარე-რეგენერანტების ვარიაბელობა არ აღემატება ბუნებრივ ცვალებადობას.

1.1.4. გვერდითი ყლორტების წარმოქმნა ექსპლანტის ქსოვილებიდან

მიკროგამრავლების ეს მეთოდი დაფუძნებელია იზოლირებული ნაწილების მიერ უკმარი ორგანოების აღდგენის უნარზე და ამით მთელი მცენარის რეგენერაციის უნარზე. ამ დროს მიმდინარეობს მთლიანი მცენარის ორგანოებს შორის კორელაციის დარღვევა და ამავდროულად ხდება ამ კორელაციის კომპენსაციაც, რომლის დროსაც აღდგება ორგანიზმში დარღვეული წონასწორობა (СИННОТ 1963.) ეს არის უმაღლეს მცენარეებში რეგენერაციის ყველაზე გავრცელებული ხერხი, რომელიც საფუძვლად უდევს ვეგეტატიური გამრავლების მეთოდებს: ტრადიციულ და აგრეთვე უჯრედის და ქსოვილის კულტურაში გამრავლებას. ექსპლანტის სახით შეიძლება გამოვიყენოთ თითქმის ნებისმიერი ორგანოები და ქსოვილები, თუ შეიძლება მათგან სტერილური კულტურის მიღება (ალასანია 1998, Зарнадзе 1991, 1995) .

ადვენტური ყლორტების განვითარება შეიძლება მოხდეს მერისტემული ქსოვილების ხარჯზე. ცნობილია, რომ მცენარეებში ღეროს და ფესვის აპიკალურ და იღლიურ მერისტემებთან ერთად არის ინტერკალარული და შეზღუდული ზრდის ორგანოები (Chrysothemis 1995, ზარნაძე 2002).

მცენარეულ ორგანიზმებში მკაცრად განსაზღვრული ფუნქციების მქონე მერისტემული ქსვილები in vitro ყლორტებში რეორგანიზებენ და აღადგენენ პირველად

ფუნქციას. ამის მაგალითია Tolmia menziesu, რომელიც განუწყვეტლივ წარმოქმნის მცენარეებს ყუნწისა და ფოთლის შეერთების ადგილზე. კალანხოეს ხორცოვანი ფოთლის კიდეებზე არის მერისტემული უჯრედები, რომლებისაგანაც წარმოიქმნება კვირტები.

ცდებით დადასტურდა, რომ ადვენტური ყლორტები მარტო მერისტემულ ქსოვილში არ ვითარდებიან. ფრანგი მეცნიერის ტრან ტან ვანის მიერ (Tran Thans Van 1974) ჩატარებულია საინტერესო ექსპერიმენტი ექსპლანტის კულტივირების ირგვლივ, რომელიც შედგებოდა ეპიდერმისისა და სუბეპიდერმისისაგან. ექსპლანტი იზოლირებული იყო ფოთლის ცენტრალური ძარღვიდან. მოგვიანებით იმავე ავტორმა განახორციელა Torenia fournievi ღეროს ქსოვილის ცალკეული უჯრედული შრეების კულტივირება: კერძოდ, ეპიდერმისის და სუბეპიდერმისის ქსოვილების, ეპიდერმისის _ მიმდებარე ქსოვილებით, ღეროს ეპიდერმისის გარეშე იზოლირებული ქსოვილის, შემდეგ სუბეპიდერმალურ ქსოვილთან ერთად უშუალოდ აგარის თხელი ფენაზე, აღმოჩნდა, რომ ეპიდერმისში ფესვების და კვირტების ინდუცირება ხდება თანამდებარე ქსოვილთან ერთად კულტივირების შემთხვევაში. იზოლირებულ ეპიდერმისს არ გააჩნია ორგანოგენეზის უნარი.

მაშ ასე, მიკროგამრავლების ეს მეთოდი დაფუძნებულია ორ ერთმანეთისაგან განსხვავებულ მოვლენაზე. 1. კვირტების წარმოქმნა არსებული მერისტემიდან 2. სპეციალიზირებული უჯრედების რედიფერენციაცია, მერისტემული კერების და ღეროს კვირტების წარმოქმნა. უკანასკნელ შემთხვევაში ადვენტური კვირტები ჩვეულებრივ წარმოიქმნება ეპიდერმისიდან ან სუბეპიდერმისიდან. განსხვავება ამ ორ მეთოდს შორის ისაა, რომ მცენარეების მერისტემული წარმოშობა დედა მცენარეების იდენტურობის გარანტიაა. მაგ., ძაღნორა რეგენერირებს მცენარეებს ფოთლის სეგმენტებიდან, ყუნწებიდან, მურასიგესა და სკუგის არეზე, შევსებული 2 მგ/ლ ნ.ძ.მ. და 1 მგ/ლ ბაპ (Nagak 1995) კლონალური მიკროგამრავლების ამ მეთოდის თვალნათელი მაგალითია წითელი მოცვი, რომელიც ყლორტებს ივითარებს ფოთლის სეგმენტებზე კალუსოგენეზის სტადიის გარეშე (Cugopobur 1996).

ვაზი საყვავილე კვირტების ფუძეში ივითარებს ადვენტურ ყლორტებს, ეს პროცესი შეიძლება გამოწვეული იყოს უკვე არსებული მძინარე კვირტების გამოღვიძებით ან დე

ნოვო მათი ფორმირებით, რაც მცენარეული უჯრედების ტოტიპოტენტურობითაა გამოწვეული. აღსანიშნავია, რომ მისი ყველა ორგანო შეიძლება იქნეს გამოყენებული ექსპლანტად, თუ ის ინფექციისაგან არის თავისუფალი (მანჯგალაძე 2003).

ექსპლანტში ინიციალების გაზრდა შესაძლებელია ადვენტური ყლორტების იზოლირებით და სხვა ახალ საკვებ არეზე გადატანით, რომელშიც ხდება იღლიური კვირტების ინდუცირება, ამით შესაძლებელია გამრავლების ორი მეთოდის შეხამება ადვენტური ყლორტების და ორგანოების ინდუქცია იღლიური კვირტების შემდგომი პროლიფერაციით (მანჯგალაძე 1999, 2003, ალასანია 2001).

საკვები არის შერჩევა ხორციელდება ცდისა და შეცდომის საფუძველზე, ვიზუალური დაკვირვების შედეგად. თუმცა უნდა ავღნიშნოთ, რომ არ არსებობს იდეალური ფორმულა საკვებ არეში ფიტოჰორმონების ტიპისა და კონცენტრაციის შესახებ.

1.1.5. იღლიური დატოტიანების ინდუქცია

იღლიური დატოტიანება ჩვეულებრივი გამრავლების საფუძველია. ძირითადი აპიკალური ყლორტის ზრდა იწვევს იღლიური კვირტების ინჰიბირებას (აპიკალური დომინირება), როგორც საქსმა და ტიმანმა აჩვენა ციტოკინინებს შეუძლიათ აპიკალური დომინირების მოხსნა და ორლებნიან მცენარეებში გამოიწვიონ ნაადრევი დატოტიანება. ეს ლატერალური ყლორტები შეიძლება იქნეს მოშორებული და მათი კულტივირება მოხდეს ახალ, იგივე შედგენილობის საკვებ არეზე, სადაც მოხდება კვირტის შემდგომი ზრდა და დატოტიანება. მაგრამ გამრავლების ციკლის მრავალჯერ გამეორება ყოველთვის არაა ხელსაყრელი, ზოგიერთ კენკროვანებში, (Shimada K.. Asahina E. 1975) გამრავლების რამოდენიმე ციკლის მერე წარმოიქმნება პასიური კვირტები, რომელსაც არ შესწევთ უნარი გვერდითი კვირტებისა და ფესვების წარმოქმნისა. (Bonnier , Steponkus 1972).

ამ მეთოდით მრავლდება მრავალი დეკორატიული კულტურა (Ackez 1995, Nayak 1995), ხილი (Branka et al 1994, Корнова 1995, Orellana 1993), კარტოფილი (Давидова 1995, Le 1996) მრავალი სხვა მცენარე, რომლებშიც ექსპლანტად გამოიყენება ყლორტის წვერო.

1.2. კლონალური მიკროგამრავლების პროცესზე მოქმედი ფაქტორები

მორფოგენეზი, რომელიც საფუძვლად უდევს მიკროგამრავლებას, მცენარეული ორგანიზმის ცხოველმყოფელობის ერთ-ერთი რთული პროცესია. თვით მიკროგამრავლების საფუძველი კი რიგი ფაქტორებია, რომლებიც განსაზღვრავენ მის წარმატებას: 1. გენოტიპი და მშობელი ორგანიზმების მდგომარეობა. 2. ექსპლანტის მდგომარეობა. 3. ექსპლანტის სტერილურ კულტურაში შეყვანის თავისებურებანი. 4. კულტივირების პირობები.

1.2.1. გენოტიპი და მშობელი მცენარეების მდგომარეობა

ყველა ფაქტორებიდან, რომლებიც კულტივირებული ქსოვილებისა და ორგანოების მორფოგენეზურ პოტენციას განსაზღვრავენ, უპირატესობა გენეტიკურს ენიჭება. ამას ადასტურებს მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტული მონაცემები ქსოვილის კულტურაში ინდუცირებული მორფოგენეზის შესახებ: მაგ. ორლებნიანი ბალახოვანი მცენარეები უფრო მეტად არიან რეგენერაციის უნარიანნი, ვიდრე ერთლებნიანები და ხე-მცენარეები. ზოგიერთ მცენარეს აქვს უსქესო გამრავლების პროცესის პირდაპირი კორელაცია in vitro და in vivo. მრავალი სახეობა: ამარილისი, გიაცინტი, ნერინე, ნარცისი ლილია და სხვა ქსოვილის კულტურაში მრავლდებიან ადვენტური ბოლქვებით, რაც შეესაბამება შვილეული ბოლქვებით მათ ვეგეტატიურ გამრავლებას, სხვა მაგალითია ციტრუსებში, რომლებშიც პოლიემბრიონული სახეობებია, in vitro კულტივირებისას ნუცელუსის ქსოვილიდან წარმოიქმნება ნუცელარული ემბრიოდები. in vitro პრაქტიკაში ფართოდ გამოიყენება მიკროდაკალმება იმ მცენარეებისათვის, რომლებშიც სუსტადაა გამოხატული აპიკალური დომინირება (გერბერა, მარწყვი, ვაშლი, ატამი) ქსოვილის კულტურაში ამ მცენარეების გამრავლებისას საკვებ არეში ციტოკინინების შეტანა სტიმულს აძლევს არსებული იღლიური მერისტემებიდან გვერდითი ყლორტების განვითარებას. ამ პროცესმა მიიღო სახელი «მიკროდაკალმება» ანუ «დაკალმება სინჯარაში» (Катаева, Бутенко 1981).

დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მიკროგამრავლების პროცესში გენეტიკურ (ჯიშობრივ) თავისებურებებს. მაგ.: თუთას სხვადასხვა ჯიშებში აღინიშნა შესამჩნევი სხვაობა იზოლირებული აპიკალური ყლორტის დაფესვიანების, კალუსის წარმოქმნისა და წარმოქმნილი ღეროს ზრდისუნარიანობას შორის. ე.ი. ექსპლანტის ქცევა

უმეტესწილად დამოკიდებული აღმოჩნდა მშობელი მცენარეების გენეტიკურ თავისებურებებზე, ვიდრე საკვებ არეში ფიტოჰორმონების შეფარდებასა და კონცენტრაციაზე.

ზოგიერთი მეცნიერის აზრით ქსოვილის კულტურაში რეგენერაციის ინდუქცია ექსპლანტიდან დამოკიდებულია წელიწადის გარკვეულ პერიოდზეც, რაც განპირობებულია დედამცენარის მდგომარეობით ქსოვილების და ორგანოების იზოლირების პერიოდში (Susheelalamma 1996).

დიდი მნიშვნელობა აქვს აგრეთვე მშობელი მცენარეების ასაკს. რაც უფრო ნაკლებია მცენარეების აბსოლუტური ასაკი, მით უფრო ინტენსიურად ხდება ყლორტების ზრდა (Zhang 1966). Eეს დამოკიდებულება ხე-მცენარეებში უფრო მკვეთრად გამოიხატება. ექსპერიმენტებმა დაადასტურა, რომ ქსოვილის კულტურაში გამრავლებისას ექსპლანტის სახით უმჯობესია გამოყენებული იქნეს ახალგაზრდა ამონაყართა ქსოვილები და ორგანოები (Сидорович 1996, Шарова 1995).

1.2.2. ექსპლანტის მდგომარეობა

კულტივირებული ქსოვილების მორფოგენეტიკური პოტენციალი დამოკიდებულია იმაზე, თუ რომელი ორგანოდანაა იგი იზოლირებული. Dდამტკიცებულია, რომ ერთი და იგივე მცენარის სხვადასხვა ორგანოებისათვის სხვადასხვა მორფოგენეტიკური პოტენციალია დამახასიათებელი (Шарова 1995).B ბოლქვიანებში მაღალი რეგენერაციის უნარით ბოლქვის წყვილი ქერქლი გამოირჩევა, ვიდრე სხვა ორგანოები. Arabidopsis thaliana მაღალი, დაბალი და ნულოვანი რეგენერაციის უნარიანი კალუსური ხაზების მიღებისას აღმოჩენილი იქნა, რომ რეპროდუქციული ორგანოებიდან წარმოქმნილი კალუსი მაღალი მორფოგენეტიკური პოტენციალით ხასიათდება, ვიდრე ვეგეტატური წარმოშობის ქსოვილები (Negrutiu 1987) მიღებულია Actinidia delicioza და A.chinensis ორი კალუსური ხაზი, რომლებიც განსხვავდებიან მორფოგენეტიკური პოტენციალით ერთმანეთისაგან. ერთი ხაზის კალუსიდან ფორმირდებოდა მეტწილად ყლორტები, ხოლო მეორე კალუსური ხაზიდან კი კვირტებთან ერთად ფესვებიც. ეს სხვაობა შენარჩუნებული იყო მრავალი სუბკულტივირების განმავლობაში (Зарнадзе 1994).

საწყისი ორგანოების ეპიგენეტიკური მახასიათებლები შენარჩუნებულია არა მარტო კულტივირების პროცესში, არამედ დიფერენცირებისა და მორფოგენეზის პროცესშიც. სხვადასხვა გზით in vitro წარმოქმნილი ფრეზიის ყლორტებისა აპიკალური დომინირების მოხსნის და დატოტიანების ექსპერიმენტებში ნაჩვენები იყო, რომ გენერაციული ორგანოებიდან წარმოქმნილ ყლორტებს, კერძოდ, საყვავილე კვირტებიდან, მომწიფებული ყვავილებიდან, მტვრიანების კალუსებიდან წარმოქმნილ ადვენტურ ყლორტებს აქვთ უნარი წარმოქმნან დამატებითი ყლორტები შემდეგი სუბკულტივირების პროცესში. მ.შ. ფრეზიის იზოლირებული ყლორტების მორფო-გენუნარიანობა მნიშვნელოვნად დამოკიდებულია იმაზე, თუ რომელი ორგანოებიდანაა იზოლირებული ექსპლანტი.

დიდი მნიშვნელობა აქვს ექსპლანტის ფიზიოლოგიურ ასაკსაც, რაც უფრო ახალგაზრდაა ორგანო, რაც უფრო პატარაა მისი ფიზიოლოგიური ასაკი, მით უფრო სწრაფად მიმდინარეობს ექსპლანტის განვითარება ან პირიქით. მაღალ მორფო-გენეტიკურ პოტენციალს ფლობს ზეთის პალმის არა მარტო ახალგაზრდა ფოთლები, არამედ მათი ყუნწებიც. (Egunyomi 1980). Echeveria elegans-is. ახალგაზრდა ფოთლის ექსპლანტებზე წარმოიქნმნება უმეტესად ფესვები, ასაკოვანზე _ უმეტესად ყლორტები, შუალედურებზე ფესვებიც და ყლორტებიც (Raju, Mann 1990). ექსპლანტის ზომაც მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს მიკროგამრავლების წარმატებას, რაც უფრო პატარაა ექსპლანტი, მოთ უფრო ნაკლებია მისი რეგანერაციის უნარი და პირიქით. დიდი ზომის ექსპლანტები, რომლებიც შედგებიან პარენქიმული, გამტარი ქსოვილისაგან და კამბიუმისაგან, შეუძლიათ ფიტოჰორმონებისაგან დამოუკიდებლად საკვებ არეში წარმოქნან კვირტები. მეორეს მხრივ მსხვილ ექსპლანტებში იზრდება უჯრედებში ვირუსებისა და სხვა პათოგენების შეჭრის შესაძლებლობა, რაც ხელს უშლის ქსოვილის კულტურაში წარმოქმნილი ამონაყრების გაჯანსაღებას. ექსპლანტის ოპტიმალური სიდიდე დამოკიდებულია მცენარე დონორის სახეობრივ თავისებურებებზე და იმ ორგანოს თვისებებზე, საიდანაც ექსპლანტია აღებული (Давидова 1995, Зарнадзе 1991).

კონკრეტული სასოფლო-სამეურნეო კულტურის მიკროგამრავლების ტექნოლოგიის დამუშავებისას საჭიროა მცენარის მორფოგენეტიკური პოტენციალის ყოველმხრივი შესწავლა, რაც ერთმნიშვნელოვნად განსაზღვრავს გამრავლების

ოპტიმალური მეთოდის შერჩევას და პირობების შემუშავებას. ტერმინი მორფოგენეტიკური პოტენციალი გულისხმობს მოცემული მცენარის იზოლირებული ქსოვილების და ორგანოების in vitro კულტივირების შესაძლო ხერხების მრავალფეროვნებას გენეტიკური და ეპიგენეტიკური თავისებურებების ფონზე.

გამოყოფილი იქნა მიკროგამრავლების რამდენიმე ოპტიმალური ხერხი. პირველი _ საყვავილე კვირტებიდან ადვენტური ყლორტების წარმოქმნა, შემდგომ მათგან იღლიური მერისტემების პროლიფერაციის ინდუქციით. ადვენტური ყლორტების განვითარების ინდუცირება ყლორტის ფუძიდან და განვითარებადი კალუსური ქსოვილიდან. მეორე _ექსპალნტზე არსებული ყველა მერისტემების განვითარება, მესამე _ადვენტური ყლორტების წარმოქმნა ექსპლანტის ქსოვილიდან და მასზე განვითარებული კალუსიდან.

ზემოთ აღნიშნული მეთოდებიდან მცენარეთა მიკროგამრავლებისათვის ყველაზე პერპექტიულია იმ ადვენტური ყლორტების ინდუქცია, რომლებიც საყვავილე კვირტებიდანაა განვითარებული, რადგანაც რიგ უპირატესობებს ფლობს: უზრუნველყოფს ერთი მცენარიდან საშუალოდ რამოდენიმე ათასი ყლორტის განვითარებას წელიწადში, საყვავილე ყლორტების განვითარება იმითაცაა კარგი, რომ ექსპლანტის იზოლირებისას მშობელი მცენარე არ ზიანდება. Eეს მეთოდი ხასიათდება ყლორტების რეგენერაციის ინდუქციის სტაბილურობით, მაგრამ მოკლე ყვავილობის პერიოდი ზღუდავს მის გამოყენებას. მეორეს მხრივ არსებული მეთოდები შესაძლებელობას იძლევა სწრაფად და წელიწადის ნებისმიერ დროს მივიღოთ სასურველი მცენარეები. გარდა ამისა, რადგანაც მცენარეები ხშირად სნებოვნდება ვირუსებით, მიზანშეწონილია მიკროგამრავლების მეთოდების შეხამება მერისტემების კულტურასთან და თერმოთერაპიასთან. ამიტომ მიკროგამრავლების სამივე მეთოდის გამოყენება შეიძლება იყოს სასარგებლო მცენარეთა ახალი ჯიშების სწრაფი გამრავლებისთვის (Borges et.al. 2004, Malabadi. 2004).

1.2.3. ექსპლანტის სტერილურ კულტურაში შეყვანის თავისებურებანი

ექსპლანტის იზოლირებით და საკვებ არეზე გადატანით იწყება მიკროგამრავლების პროცესი. აუცილებელ პირობას წარმოადგენს საწყისი მცენარეული მასალის იზოლირება. მცენარის ქსოვილის გაფრთხილების მიზნით სტერილიზაციისას

გამოყენებული უნდა იქნას ნაკლებად ტოქსიური ნივთიერებები. სასტერილიზაციო ხსნარები იყოფა რამოდენიმე ჯგუფად: ქლორამინი, ქლორიანი კირი, კალციუმის ჰიპოქლორიდი და ნატრიუმის ჰიპოქლორიდი.

ქლორამინი ხშირად გამოიყენება მცენარის ნაზი და ადვილად დასაზიანებელი მცენარეული ქსოვილის სტერილიზაციისათვის. ეს პრეპარატი ჰიპოქლორიდებთან ერთად ფლობს ნაკლებად გამოხატულ ტოქსიკურობას. მცენარეთა ქსოვილური სეგმენტების და ახლგაზრდა კვირტების სტერილიზაციისათვის იყენებენ უმეტესად 5-10% ქლორამინი ნ. კვირტების სტერილიზაციის ხანგრძლივობა 10-20 წთ (მანჯგალაძე 1999 წ., ალასანია 1998). მეორე ჯგუფში შედის ვერცხლისწყლის შემცველი ხსნარები, რომლებიც მეტად გამოხატული დეზინფიცირებით გამოირჩევა და ამიტომ გამოიყენება იმ შემთხვევაში, როცა ქლორიანი ხსნარები არაეფექტურნი არიან. სულემა ($HgCl_2$) და დიოციდი (ეთანოლმერკური ქლორიდი და ბორის მჟავა ცეტილპირეთილბრომიდთან ერთად როგორც დეტერგენტი) გამოიყენება კონცენტრაციით 0,1_0,2%. ზოგიერთ შემთხვევაში სტერილიზაცია ტარდება წყალბადის ზეჟანგით (10_12%) და იოდის ხსნარით. სტერილიზაციის ეფექტურობის ამაღლების მიზნით სტერილიზაცია ტარდება 70% სპირტით. ექსპლანტს ჩადებენ 1-3 წმ 70% სპირტში, ხოლო შემდეგ გადააქვთ მასტერილებელ ხსარში. ეს ხერხი მნიშვნელოვნად ამაღლებს არაინფიცირებული ექსპლანტების რაოდენობას (Зарнадзе 1991).

იმ შემთხვევაში თუ სტერილური ექსპლანტის მიღება გაძნელებულია მკვლევარები საჭიროდ მიიჩნევენ საკვებ არეში ანტიბიოტიკების შეტანას (Бутенко1964). სასტერილიზაციოდ ანტიბიოტიკების ფუნგიციდურ და ბაქტერიოციდულ მოქმედებას წინ ეღობება მცენარის ზრდის ინგიბირება. ისინი არჩევითი აქტიურობით ხასიათ-დებიან, ამიტომ მათი არჩევა მოქმედების საჭირო სპექტრით გაძნელებულია.

ექსპლანტის იზოლირებასა და მის სტერილიზაციაზე ირგვლივ საუბრისას, გვერდს ვერ ავუვლით მშობელი მცენარეების სპეციალურ მომზადებას, რაც მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს სტერილიზაციის წარმატებას.

ბუტენკოს თანახმად (Бутенко1964) რულბეკიის როზეტული მცენარის სტერილური კულტურის მიღებისათვის მიზანშეწონილია რამოდენიმე დღით ღერო გადატანილი იქნეს დაგრძელებისათვის დღის განათების პირობებში. ეს იწვევს მიწის

ზევით ღეროზე ფოთლების როზეტად შეკვრას, ასეთ შემთხვევაში მასტერილებელი სითხე ავლენს დადებით ეფექტს ზედაპირული სტერილიზაციისათვის.

როზეტულ მცენარეთა მიკროგამრავლების ტექნოლოგიის დამუშავებისას ძირითად და რთულად დასაძლევი პრობლემაა ღეროს წვეროს სტერილური კულტურის მიღება. ფესვის შეკუმშვადი მოქმედების გამო დამოკლებული ღერო აპექსთან ერთად ხვდება მიწაში. ამასთან ღეროს წვერო დაფარულია ბუსუსებით, რაც აფერხებს სტერილიზაციას არსებული ხერხებით. მიუხედავად იმისა, რომ სტერილიზაციის პირობები ექსპერიმენტების დროს მკაცრად არის დაცული, კულტივირების სამი_ხუთი კვირის შემდეგ მაინც აღინიშნა ასეთი კვირტების ინფიცირება. მასტერილებელი ხსნარების კონცენტრაციის ამაღლება (10%-ზე მაღალი ქლორამინი) ან სხვა ძლიერი სტერილიზატორების გამოყენება (სულემა, დიოციდი, წყალბადის ზეჟანგი) იწვევდნენ ექსპლანტის სიკვდილს. მხოლოდ მშობელი მცენარეების დარგვის ხერხის შეცვლით მიღებული იქნა სასურველი შედეგი. კერძოდ, დედა მცენარე ისე უნდა ყოფილიყო დარგული, რომ მისი ზრდის წერტილი მიწის ზემოთ ყოფილიყო წამოწეული. სკალპელით აჭრიდნენ იღლიურ ყლორტს, რომელიც მიწას მოცილებული იყო 2_2,5 სმ, აცლიდნენ ფოთლებს, ხოლო კვირტს, რომელიც ზომით 1_5 სმ-ია და იგი შედგებოდა ღეროს წვერისაგან, ფოთლის ყუნწისაგან და ღეროს აპიკალური ნაწილისაგან, ექსპალნტს წმენდნენ 70%-იანი სპირტით, ამის შემდეგ ახორციელებდნენ ზედაპირულ სტერილიზაციას.

დობერგისა და მეინის აზრით (Dobergh, Maene 1981) მცენარეების წინასწარი მომზადება რამოდენიმე თვის მანძილზე იძლევა ჯანმრთელი და კარგად განვითარებული ექსპლანტების მაღალ პროცენტს. ამიტომ რეკომენდირებულია სპეციალური ნულოვანი ეტაპის გამოყოფა მიკროგამრავლებისას, რომლის მიზანია ჯანმრთელი ექსპლანტების მიღება.

მშობელი მცენარეების წინასწარი მომზადება ექსპლანტების იზოლირებისათვის მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს მიკროგამრავლების წარმატებას. მცენარეული ქსოვილის სტერილიზაციისათვის ხმარობენ ძლიერ მოქმედ ტოქსიკურ აგენტებს. შეიძლება იქნეს გათვალისწინებული რამოდენიმე პრაქტიკული რეკომენდაცია. პირველი_სანამ დაწყებულა ახალი მცენარის მიკროგამრავლებაზე მუშაობა, საჭიროა ვიზუალურად შეფასდეს

მისი ქსოვილების ინფიცირების ხარისხი. მეორე_ქსოვილის ექსპლანტირებისათვის მცენარე უნდა მომზადდეს ზემოთ აღნიშნული ან სხვა ხერხით. მესამე_ექსპერიმენტულად შეირჩეს სტერილიზაციის ოპტიმალური ხერხი. ამისათვის ცდიან რამდენიმე სტერილიზატორს განსხვავებული მოქმედებით და განსხვავებული დროის განმავლობაში. ოპტიმალურად ჩაითვლება ის ხერხი, რომლის დროსაც აღინიშნება მცენარეული ქსოვილების ნაკლები დაზიანება არაინფიცირებული ექსპლანტების მაღალი გამოსავლით (ალასანია 1998, მანჯგალაძე 1999).

როცა ჩნდება ინფექცია, ექსპლანტების დარგვიდან რამოდენიმე ხნის მერე მიზანშეწონილია ხელმეორე სტერილიზაცია. უმეტესად ეს არ ტარდება, რათა არ დაზიანდეს აქტიურად მზარდი ქსოვილები, მაგრამ ამის საშიშროება არც ისე დიდია. ამასთან, ასეთი ხელმეორე სტერილიზაცია იძლევა საშუალებას შენარჩუნდეს ქსოვილის კულტურაში მიღებული და გამრავლებული მცენარეები (Катаева, Бутенко 1983).

მეორადი სტერილიზაციისას სტერილური პინცეტით ამოაქვთ დასნებოვნებული ექსპლანტი, სტერილური ლანცეტით აცლიან იმ ადგილს, რომლითაც ის ეხება არეს და შეიმჩნევა ინფექცია, რამდენიმე წუთით ათავსებენ სტერილიზატორის ხსნარში, ავლებენ სტერილურ წყალში რამოდენიმეჯერ და რგავენ ახალ საკვებ არეზე. მსგავსი ოპერაციის შესრულებისას რამოდენიმეჯერ უნდა გამოიცვალოს სტერილური ინსტრუმენტები ისე, რომ არ უნდა იქნეს დაშვებული ექსპლანტების თავიდან დასნებოვნება (Катаева, Бутенко 1983).

1.2.4 კულტივირების პირობები

კლონალური მიკროგამრავლების ეფექტურობას მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს საკვები არის სწორი შერჩევა. ქიმიური შემადგენლობა და ფიზიკური თვისებები უნდა პასუხობდეს იმ ამოცანებს, რომელსაც ასრულებს საკვები არე მიკროგამრავლების ყველა ეტაპზე. პირველ ეტაპზე ხშირად შეყავთ საკვებ არეში ანტიოქსიდანტები, რომლებიც აფერხებენ ჰიდროლიზური ფერმენტების აქტივაციას და გადარგული ექსპლანტების დაღუპვას. როგოც მეიერი გვთავაზობს (Meier 1975) ექსპლანტების იზოლირების ყველა ოპერაცია შეიძლება ჩატარდეს ფილტრის ქაღალდზე, რომელიც ასკორბინის მჟავითაა გაჟღენთილი. მონაკო, თანაავტორებთან ერთად (Monaco 1977) ყავის ხის ექსპლანტების

მომზადების და აგრეთვე მათი გადარგვის პროცესში გვთავაზობს ანტიოქსიდანტების შემცველ ხსანრში ქსოვილების მოთავსების რეკომენდაციებს. ცისტეინის, გლუტატიონის, მერკაპტოეთანოლის, ასკორბინის მჟავის ფენოლური ნაერთების მოცილებისათვის დარგვის წინ მიზანშეწონილია ექსპლანტების მოთავსება რამდენიმე საათით დისტილირებულ წყალში (Cresswell 1975). მრავალი მეცნიერის ექსპერიმენტალური მონაცემებით (Monaco et al 1977. David et al 1978. Fridborg 1978) აქტივირებული ნახშირის დამატება დადებით ზეგავლენას ახდენს ყლორტების ზრდასა და ემბრიოდების წარმოქმნაზე. მათი აზრით აქტივირებული ნახშირბადის ზედაპირზე ხდება ექსპლანტის მიერ გამოყოფილი ტოქსიკური ნივთიერებების ადსორბცია, როგორიცაა ფენილმმარნჟავა, ბენზოინის მჟავა, პელარგონიუმის მჟავა, კაპრილმჟავა. აქტივირებული ნახშირბადი ადსორბირებს საკვები არიდან ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთებს, რაც მნიშვენელოვნად ამცირებს მათ გამოსავალ კონცენტრაციას. Aამიტომ აქტივირებულ ნახშირბადთან ერთად საჭიროა ფიტოჰორმონების 1-2-ჯერ გადიდებული რაოდენობების შეტანა საკვებ არეში. (Reynold, Muraschige 1979).

ბუაჩიძე თვლის, რომ (Beauchesne G. 1980) გამრავლების პირველ ეტაპზე მნიშვნელობა ენიჭება საკვებში ისეთი ნივთიერებების ჩართვას, როგორიცაა კაზეინის ჰიდროლიზატი, ამინომჟავები, საფუარის ექსტრაქტი. ბიოლოგიურად აქტიური დანამატებით საკვები არეების გამდიდრება მიკროორგანიზმების სპორების განვითარების პრივოცირებას იწვევს. ეს შესაძლებელს ხდის გამოირიცხოს ყველა ექსპლანტი, რომელიც შეიცავს მალულ ინფექციას.

მიკროგამრავლების პირველი ეტაპის მნიშვნელობა განპირობებულია იმით, რომ ქსოვილის ან ორგანოს პირველადი კულტურის მიღებაზე დამოკიდებულია გამრავლების შემდეგი პროცესი. გამრავლების პირველ ეტაპზე საკვებში შედის როგორც წესი, მინერალური მარილების, ნახშირწყლების, ვიტამინების, ციტოკინინების და აუქსინების მაღალი კონცენტრაციები. ზოგჯერ საკვებში ჩართულია გიბერელინის მჟავაც.

ზოგიერთ შემთხვევაში საკვები არის შემადგენლობა მეორე ეტაპზე, ანუ საკუთრივ მიკროგამრავლების ეტაპზე უცვლელია. სხვა შემთხვევაში მას ამდიდრებენ ნივთიერებებით (უმეტესად ფიტოჰორმონებით), რომელთაც ინ ვიტრო

მორფოგენეტიკური რეაქციების სტიმულირების ან ინდუცირების უნარი აქვთ. მესამე ეტაპზე საჭიროა არე, რომელიც უზრუნველყოფს ღეროს ზრდას და მცენარის დაფესვიანებას, როგორც წესი საკვები არე უფრო უბრალო შემადგენლობისაა, ფიტოჰორმონების გარეშე ან შეიცავს აუქსინების მცირე რაოდენობას.

ავტორების აზრით მიზანშეწონილია ამ სტადიაზე მინიმალური არეების გამოყენება, რომლებიც შეიცავენ მინიმალური რაოდენობით მინერალურ მარილებს და საქაროზას, აგრეთვე ფიტოჰორმონების, ვიტამინების და აგარის გარეშე (Button 1977, Conger 1978, Jones) უეჭველია მინიმალური არეების გამოყენება უზრუნველყოფს მცენარეების გამოწრთობას გარემოს არახელსაყრელი პირობების მიმართ და უზრუნველყოფს ნიადაგში გადარგვისას მის ნორმალურ ზრდას. უეჭველია აგრეთვე ისიც, რომ ასე გამოწრთობილი მცენარეები ძლიერი მიწისზედა ნაწილებით შეეგუებიან მკაცრ პირობებს.

მცენარეთა კლონალური მიკროგამრავლებისას ყველაზე მეტად გამოიყენება შემდეგი არეები: მურასიგესა და სკუგის, ლინსმეიერისა და სკუგის, ჰელერის, ნიჩის, კნუდსონის. უპირატესობა მურასიგესა და სკუგის არეს ენიჭება (Muraschige, Skoog. 1962) ამ არეს თავისებურება არაორგანული აზოტის მაღალი კონცენტრაციით განისაზღვრება. არეს შემადგენლობაში შედის ორი აზოტშემცველი მარილი KNO_3 და NH_4NO_3. ამონიუმის და ნიტრატული აზოტის შეხამება ოპტიმალურია, როგორც არაორგანიზებული ზრდისთვის, ისე ორგანიზების პროცესისათვის.

აზოტი საკვები არის შეუცვლელი ელემენტია. მცენარის მორფოგენეტიკური პოტენციალის რეალიზაცია მეტწილად განისაზღვრება აზოტის ფორმითა და კონცეტრაციით. სინგიმ (შინგ 1978) გამოიკვლია დიოსკორეის კალუსური ქსოვილის მორფოგენეზის ხასიათი აზოტის სხვადასხვა წყაროებზე დამოკიდებულებით: აზოტმჟავა ამონიუმი, გოგირდმჟავა ამონიუმი, აზოტმჟავა კალციუმი, შარდოვანა, კაზეინის ჰიდროლიზატი. ყლორტების დაფესვიანების დიფერენცირება აღინიშნებოდა მხოლოდ NH_4NO_3 –ის შემთხვევაში. იაზავას თანახმად (Yაზაწა 1979) დიოსკორეის ყლორტების იღლიური კვირტების კულტივირებისას საკვებ არეზე, რომელიც შეიცავს მხოლოდ იონ NO_3^- ან თანაფარდობას NO_3^- : NH_4^+ = 4:1 ფორმირდება საჰაერო ბოლქვები. თუ ნიტრატის და ამონიუმის შეფარდება 1:1 ან 1:2, დიოსკორეის იღლიური

კვირტებიდან ვითარდება ყლორტები. კნუდსონის არეზე იღლიური კვირტები წარმოქმნიან საჰაერო ბოლქვებს, ხოლო მურასიგესა და სკუგის არე 12-ჯერ უფრო მდიდარია აზოტით, ვიდრე კნუდსონის.

ზოგიერთი მკვლევარი იყენებს ბიოლოგიურად აქტიურ არაჰორმონალური ბუნების დანამატებით მდიდარ არეს. ზოგი კიდევ მათ გვერდს უვლის. ვიტამინებიდან ყველაზე მეტად გამოიყენება თიამინი და ინოზიტი, რომელთაც მნიშვნელოვანი როლი ენიჭებათ ბრინჯის, ფორთოხლის, ლიმონის და სხვა კულტურების კალუსის პროლიფერაციისათვის (Muraschige 1969. Watanabe et al 1971. Kaul et al 1975).

ზოგიერთ შემთხვევაში მცენარეული ექსტრაქტები აუმჯობესებენ ექსპლანტის ზრდას, კალუსის პროლიფერაციას და ორგანოების დიფერენცირებას. მაგრამ ქიმიური შემადგენლობის უზუსტობა და ამის გამო სტერილური ეფექტის უგულებელყოფა აიძულებს ექსპერიმენტატორს მათ ხშირ გამოყენებაზე უარის თქმას კლონალური მიკროგამრავლებისას.

მიკროგამრავლების პროცესში ბიოლოგიურად აქტიურ დანამატებზე ექსპერიმენტალური ფაქტების სხვადასხვაობა ზოგიერთ შემთხვევაში შეიძლება აიხსნას სხვადასხვა მორფოგენეტიკური რეაქციებით, რომელთა ინდუცირება ხდება ქსოვილის კულტურაში მიკროგამრავლების რეალიზაციის პროცესში. რთული არაა იმ მაგალითების ჩამოთვლა, როცა საკვებში ვიტამინების, ამინომჟავების, მცენარეული ექსტრაქტების, კაზეინის ჰიდროლიზატის არსებობა საჭიროა კალუსის პროლიფერაციის ინდუცირებისა და მისგან ყლორტების და ემბრიოდების რეგენერაციისათვის. როცა ყლორტების განვითარება ხდება არსებული იღლიური მერისტემების, ან ფორმირებული კვირტების და ემბრიოდების ხარჯზე, ბიოლოგიური დანამატების გავლენა არაარსებითია, რადგანაც ყლორტებს აქვთ მათი სიცოცხლისუნარიანობისათვის საჭირო ნივთიერებების სინთეზის უნარი. სხვადასხვა მცენარის ქსოვილის კულტურაში იღლიური მერისტემების პროლიფერაციაზე ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების გავლენის შესწავლით დადგინდა, რომ საკვები არე, რომელიც შეიცავს დიდი დოზებით ინოზიტს, პირიდოქსინ_HCL, ნიკოტინის მჟავას, თიროზინს, რიბოფლავინს, კაზეინის ჰიდროლიზატს, ამინომჟავებს და მცენარეულ ექსტრაქტებს, აფერხებენ იღლიური კვირტების განვითარებას. მაღალი დოზით

ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები იწვევენ ჰიპერვიტამინოზს, რაც აჩერებს ზრდას, აგრეთვე ფოთლების გამუქებას და გახმობას, მცენარის მორფოლოგიის შეცვლას. ყველაზე აქტიური მიკროგამრავლება იმ ვარიანტებში იყო, როცა საკვები არედან ეს ნივთიერებები იყო ამოღებული. 19 შესწავლილი ნაერთიდან მხოლოდ ადენინი და თიამინ HCL დაბალი კონცეტრაციებით იწვევენ მიკროგამრავლების პროცესის სტიმულირებას. სხვა ნივთიერებების გამოყენება ან არავითარ ზეგავლენას არ ახდენს, ან უარყოფითად მოქმედებს იღლიური კვირტების განვითარებაზე. ასე რომ, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების გამოყენება არ უნდა იქნეს გაგებული, როგორც მათი უბრალოდ ჩართვა საკვებ არეში, არამედ უნდა იქნეს გამოყენებული კონკრეტული მორფოგენეტიკური რეაქციის გათვალისწინებით (Бутенко 1964, Lui, Cauce 2004).

1.2.5 ჰორმონალური ბუნების ზრდის რეგულატორები

ეგზოგენური ფიტოჰორმონებით მორფოგენეზის რეგულირება მცენარეთა კლონალური მიკროგამრავლების საფუძველს წარმოადგენს. დღესდღეობით ცნობილია ნაერთების ჯგუფი, რომლებიც ფიტოჰორმონებს მიეკუთვნება. ესენია: ციტოკინინები, აუქსინები, გიბერელინები, აბციზის მჟავა და ეთილენი. ფიტოჰორმონების პირველ სამ ჯგუფს, რომლებიც ფლობენ მასტიმულირებელი მოქმედების უნარს, მცენარეთა მიკრო-გამრავლებაში წამყვანი როლი ენიჭება.

ციტოკინინების ჯგუფს მიეკუთვნებიან ადენინის NNN–ჩანაცვლებული წარმოებულები: კინეტინი, ზეატინი, ბენზინამინოპურინი და სხვები.

ციტოკინინები აღმოჩენილი იქნა 1955 წელს, სკუგისა და მილერის მიერ ცხოველური დნმ-ს ხანგრძლივად შენახულ ეთერულ ექსტრაქტში, რომელიც სტიმულს აძლევდა უჯრედის დაყოფას, თამბაქოს ღეროს კალუსის ზრდას და იზოლირებული თამბაქოს ღეროს გულგულის ზრდას (Кулаева 1973).

აქტიურ კომპონენტს, რომელიც იზოლირებული და იდენტიფიცირებული იყო, როგორც 6- ფურფურილამინოპურინი ეწოდა კინეტინი. 1964 წ. ლეტამის მიერ სიმინდის მარცველებიდან იქნა გამოყოფილი და იდენტიფიცირებული პირველი ბუნებრივი ციტოკინინი _ ზეატინი. მცენარისათვის პათოგენური ბაქტერიების Corynebaqterium fascians კულტურიდან გამოყვეს კიდევ ერთი ნივთიერება, რომელიც

ციტოკინინური აქტიურობით გამოირჩევა, იგი წარმოდგენილია როგორც 6(3') მეთილ_2 ბუთენილ ამინოპურინი და იწოდება, როგორც N^6 იზოპენტილ ადენოზინი ან შემოკლებით იპა (Кулаева 1973).

ციტოკინინების სინთეზი უმეტესად ფესვებში ხდება, იქიდან კი ტრანსპორ-ტირდება ზევით, ღეროს გასწვრივ. ციტოკინინები თამაშობენ პირველხარისხოვან როლს დიფერენცირების პროცესში, რომელსაც მივყავართ უჯრედის დაყოფისა და კალუსური ქსოვილის ინდუქციისაკენ. სკუგის ნაშრომებში ნაჩვენები იყო, რომ თამბაქოს ღეროს გულგულის უჯრედული დაყოფა საჭიროებს ერთდროულად ორი ჰორმონის აუქსინისა და ციტოკინინის არსებობას (Anderson 1980) საკვებ არეში. კინეტინი ან მარტო იმმ არსებობა ვერ ასტიმულირებს უჯრედულ დაყოფას. დიმიტრიევას თანახმად (Дмитриева 1972) სპეციალიზირებულ პარენქიმულ უჯრედებში უჯრედული დაყოფის ჰორმონალური ინდუქცია დაკავშირებულია ორი სხვადასხვა ბლოკის მოხსნასთან. პირველი ბლოკი იხსნება აუქსინების მოქმედებით, რომელიც იწვევს რნმ-ის ყველა ფორმის გაძლიერებულ სინთეზს და შესაბამისად სპეციფიკური ცილების სინთეზს. შემდეგ იწყება დნმ სინთეზი, მაგრამ იმისათვის რომ უჯრედის გადასვლა მოხდეს კარიოკინეზზე და ციტოკინეზზე, საჭიროა მეორე ბლოკის მოხსნა, რასაც ასრულებს მარტო ციტოკინინი.

ციტოკინინები ხსნიან აპიკალურ დომინირებას და ინდუცირებენ იღლიური კვირ-ტების განვითარებას, ასევე არეგულირებენ სომატური ჩანასახების ზრდას და მცენარის ფორმირებას. ისინი საჭიროა კალუსური ქსოვილის კულტურაში ღეროს კვირტების რეგენერაციისათვის, დიფერენციისათვის და ექსპლანტის უჯრედებიდან ყლორტების რეგენერაციისათვის (Rlerk 2004, Boot 2004). მ.შ. ყველა მორფოგენეტიკური რეაქციის, რომლებიც გამოიყენება მცენარეთა მიკროგამრავლებისათვის, ნორმალური რეალიზაცია რომ მოხდეს აუცილებელია ეგზოგენური ციტოკინინები. ციტოკინინები აფერხებენ ორგანოს დაბერებას და ამაღლებენ გარემო პირობებთან გამძლეობას (Madhulatha 2004). ფიტოჰორმონების სხვა კლასს, რომლებიც ასევე გადამწყვეტ როლს თამაშობენ მცენარეთა მიკროგამრავლებაში, წარმოადგენს აუქსინები. იმმ (ინდოლილძმარმჟავა) ბუნებრივი აუქსინია, ხოლო მისი სინთეზური ანალოგია ნმმ (ნაფტილძმარმჟავა), იემ (ინდოლილერბომჟავა), 2,4- დ (2,4-დიქლორფენოქსიძმარმჟავა).

აუქსინების სინთეზის ძირითად ადგილს წარმოადგენს ღეროს აპიკალური მერისტემა. გარდა ამისა აუქსინების სინთეზი შეიძლება მოხდეს ფესვის აქტიურად მზარდ მერისტემაში, მზარდ ჩანასახსა და თესლკვირტში, ფოთლებსა და ლებნებში, აუქსინები მოძრაობენ მცენარეში აპოლარულად.

აუქსინები გავლენას ახდენენ უჯრედის დაყოფაზე, გაჭიმვაზე და დიფერენცირებაზე. ყველაზე მეტად აუქსინის ორგანოგენური ეფექტი _ ფესვების წარმოქმნის სტიმულაციაა (Boot 2004), აუქსინების გავლენით ყლორტების დაფესვიანება ფართოდ გამოიყენება სოფლის მეურნეობის პრაქტიკაში. აუქსინების გავლენით ხდება უჯრედული დაყოფის სტიმულაცია ღეროს პარენქიმაში, რაც იწვევს ღეროს ფესვის ჩანასახების დიფერენცირებას. ამიტომ აუქსინების ჭარბი კონცენტრაციებისათვის, განსაკუთრებით 2,4-D ნ.მ.ძ. დამახასიათებელია ფესვის ჩანასახების განვითარება, რომელთა ზრდა მნიშვნელოვნად დაქვეითებულია. ამ დროს ფესვები სიფართეში იზრდებიან. ნორმალურად განვითარებული ფესვები გასქელებულია და მოკლეა ნორმალურ ფესვთან შედარებით. ისინი იწვევენ ინ ვიტრო განვითარებული მცენარეების დაღუპვას მცენარეების ნიადაგში გადარგვისას.

ყლორტის ნორმალურად დაფესვიანებისათვის აუქსინების კონცენტრაციათა საკითხი არ შეიძლობოდა გადაწყვეტილიყო ერთმნიშვნელივნად, რადგან ეს პროცესი მრავალ მიზეზზეა დამოკიდებული. მათ შორისაა ყლორტების მემკვიდრული განპირობებულება დაფესვიანებისაკენ, განსაზღვრული მშობელი მცენარეების ჯიშობრივი და სახეობრივი თავისებურებებით, აუქსინის ტიპი, კონცენტერაცია და ფიტოჰორმონების თანაფარდობა საკუთრივ მიკროკლონალური გამრავლების ეტაპზე, ციტოკინინების მაღალი დოზების ზეგავლენით ყლორტების დაფესვიანებისას აუქსინების ეფექტურობა მნიშვნელოვნად მცირდება მიკროგამრავლების პირველ და მეორე ეტაპზე.

ეგზოგენური აუქსინები ასტიმულირებენ ქსოვილის კულტურაში ბოლქვების წარმოქმნას, იღებენ მონაწილეობას სომატური ემბრიოგენეზის რეგულაციაში, კალუსიდან და ექსპლანტის ქსოვილებიდან ყლორტების რეგენერაციაში.

გიბერელინები _ შენაერთების ფართო კლასია, რომელშიც 30-ზე მეტი ნივთიერება შედის. მიკროგამრავლებისას უმეტესად გამოიყენება გიბერელინი A_3 (გიბერელინის

მჟავა) ან შემოკლებით GA_3 ეგზოგენური გიბერელინები აძლიერებენ ზრდას, ღეროს და ფოთლის გაწელვას, თესლის აღმოცენების ინდუცირებას, გამოჰყავთ მოსვენებიდან, გრძელდება ყვავილსაჯდომი, იზრდება ყვავილის ზომა და რაოდენობა. გიბერელინები საკვებში შეჰყავთ უმეტესად იმიტომ, რომ დააჩქარონ ფორმირებული კვირტების ზრდა, მიიღონ მცენარეები კარგად განვითარებული მიწისზედა ნაწილით.

ფიტოჰორმონების მნიშვნელობა მიკროგამრავლებაში მართლაც ძალიან დიდია, მაგრამ გამოყენებული ეგზოგენური ფიტოჰორმონების არსენალი მნიშვნელოვნად შეზღუდულია. ბუნებრივი ფიტოჰორმონები, რომლებიც გამოირჩევიან მაღალი მორფოგენეტიკური პოტენციალით, ძვირია. მათი სინთეტიკური ანალოგების ეფექტურობა უმნიშვნელო, ამიტომ მრავალი სასოფლო-სამეურნეო მცენარისათვის მოკროგამრავლების მეთოდები არ შეიძლება იყოს რეალიზებული იმის გამო, რომ ცნობილი ფიტოჰორმონებით შეუძლებელია მორფოგენეტიკური რეაქციების ინდუცირება ქსოვილის კულტურაში. დღესდღეობით მეცნიერების ყურადღება მიმართულია ახალი ჰორმონალური პრეპარატების შესწავლისაკენ, რომლებიც მაღალ მორფოგენეტიკურ ეფექტს ფლობენ. შესწავლილ იქნა ახალი სინთეტიკური ზრდის სტიმულატორები DPX_4189, თიადიაზურონის, კასტროლინის გავლენა მცენარეთა მიკროგამრავლების პროცესზე.

ჰორმონალური ბუნების ზრდის რეგულატორების გამოყენებისას უნდა აღინიშნოს ქსოვილის კულტურაში მორფოგენეტიკური პროცესების ინდუქციის და სტიმულაციის შესაძლებლობა ეგზოგენური ფიტოჰორმონების დაბალი კონცენტრა-ციების საშუალებით და მცენარის დეაქტივაცია და დაღუპვა ფიტოჰორმონების სიჭარბისას საკვებ არეში. კულტივირებული ქსოვილების და ორგანოების ეს სპეციფიკა ფიტოჰორმონების შეტანაზე საკვებ არეში უნდა იქნეს გათვალისწინებული მცენარეების გამრავლებისას ზრდის რეგულატორების გამოყენებით (Madhulatha 2004, Makoveychuk 1994).

ნახშირწყლები. მცენარეთა მიკროგამრავლებისას საკვებ არეში ნახშირწყლების წყაროს წარმოადგენდს საქაროზა. ზოგჯერ მას ცვლიან გლუკოზით. საქაროზა გამოიყენება სხვადასხვა კონცენტრაციებით მიკროგამრავლების სტადიების შებასაბამისად. უმეტესად საქაროზა შეაქვთ პირველ და მეორე ეტაპზე საკვებ არეში

კონცენტრაციებით 87,6-116,8 მკმ. დაფესვიანებისას საქაროზას კონცენტრაცია დაჰყავთ 29,21_58,24 მკმ ან საერთოდ იღებენ საკვები არიდან. ფიტოჰორმონებთან ერთად საქაროზას მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს კულტურაში მორფოგენეზის რეგულაციაში. საქაროზის დონის შეცვლით შეიძლება არსებითი ზემოქმედება მორფოგენეტიკური ეფექტის რეგულაციაზე, გამოწვეული ეგზოგენური ზრდის რეგულატორებით. იაზავას თანახმად (yazawa 1979) დიოსკორეის იღლიური კვირტები ინვითარებენ ყლორტებს კნუდსონის არეზე, რომელიც შეიცავს საქაროზას 58,42 მკმ კონცენტრაციით. საქაროზას კონცენტრაციის გაზრდა 16,8 მკმ იწვევდა იღლიური კვირტებიდან საჰაერო ბოლქვების განვითარებას. არაორგანული აზოტით მდიდარი მურასიგასა და სკუგის არეზე საჰაერო ბოლქვების განვითარება შეიმჩნეოდა საკვებ არეში საქაროზას კონცენტრაციის გაზრდით 291,2 მკმ. იაზავას აზრით, საქაროზას გავლენა არაა დაკავშირებული ოსმოსურ ეფექტთან, არამედ არის ნახშირწყლების ფიზიოლოგიური მოქმედების რეზულტატი მორფოგენეზის პროცესზე. ამასთან მნიშვნელობა აქვს თანაფარდობას CN, საჰაერო ბოლქვების განვითარება იხშობა ანტიაუქსინებით. როგორც ჩანს საქაროზას გავლენა ქსოვილის კულტურაში მორფოგენეტიკურ რეაქციებზე, შეიძლება დაკავშირებული იყოს მისი მონაწილეობით ენდოგენური აუქსინის დონის რეგულაციაზე.

თავი II. კვლევის მასალა და მეთოდიკა

2.1. კვლევის ობიექტის დახასიათება

სტევია პირველად აღწერილი იქნა 1899 წელს, პარაგვაელი მეცნიერის დოქტორ ბერტონის მიერ Eupatorium Rebaudianum-ის სახელწოდებით. მოგვიანებით განსაზღვრული იქნა გენსლერის მიერ, როგორც Stevia –ს გვარის სახეობა და ეწოდა Stevia Rebaudiana.

სტევია ბალახოვანი, მრავალწლოვანი მცენარეა, მიწისზედა ნაწილების ყოველწლიურად კვდომადი და თავიდან ზრდადი ღეროებით. მიწიქვედა ნაწილი წარმოადგენს საკმაოდ მსხვილ ხორცოვან ფესურას. მიწისზედა კრონი აღწევს 86 სმ. ღეროები ოდნავ წვრილია და ოდნავ გაშლილი, ძირს ჩამოშვებული და ზემო ნაწილში

დატოტვილი. ღერო მთავრდება დიდი, იშვიათი საგველა ყვავილედებით. შეკრებილია ფარებად 2-6 ყვავილით.

ყვავილები წვრილია, თეთრი გვირგვინის ფურცლებით, ფოთლები კვერცხისებურად წაგრძელებული, ზემო ნაწილში ოდნავ მომრგვალო და დანაწევრებული, ქვედა ნაწილში კიდემთლიანი, ფუძე სოლისებური, ყუნწი მოკლე, მოპირდაპირედ მჯდომარე ფოთლებით.

სტევია შეიცავს ნივთიერება «სტევიოზიდს», რომელიც 300-ჯერ უფრო ტკბილია, ვიდრე შაქარი. მოქმედ ნივთიერებას შეიცავს მცენარის ყველა ორგანო, მაგრამ ძირითადად ფოთლები, სადაც შემცველობა მშრალი მასის 6_6,5%-ზე მოდის, ღეროში კი მხოლოდ 0,35%-ზე. სტევიოზიდი წარმოადგენს გლუკოზას, ფორმულით $C_{38}H_{60}O_{18}$ და ჰიდროლიზისას იძლევა სტევიოლს $C_{20}H_{30}O_3$ და 3 მოლეკულა გლუკოზას. მისი სიტკბო აღემატება საქაროზის სიტკბოს, სრულიად არაა შხამიანი ნებისმიერი დოზით და გაცილებით იაფია.

ცდებში შაქართან ერთად ნარევში მისი გამოყენების დროს, საკვები პროდუქტების კონსერვირებისას განსაზღვრული იქნა კონსერვანტობის ძვირფასი თვისება _ აჩერებს ობის სოკოებისა და ბაქტერიების განვითარებას.

სტევია ნაკლებად ცნობილი ტროპიკების ენდემური კულტურაა და დიდი რაოდენობით გვხვდება ველურად ბუჩქოვან ნაზარდებში სამხრეთ პარაგვაის პამპასებში. იგი ცნობილია გუარანის ტომის ინდიელებისათვის ძველი დროიდან და ფართოდ გამოიყენება ჩაის და სხვა სასმელების დატკბობისათვის. ადგილობრივი მოსახლეობა იყენებს ძირითადად პირდაპირ წვრილად დაჭრილ (როგორც თამბაქო) ან ფხვნილისებურად დაფქვულ მშრალ ფოთოლს. კულტურა გამოჰყავთ მცირე ოდენობით მხოლოდ პარაგვაიში და წარმოადგენს მონოპოლიას რამდენიმე კერძო სასოფლო-სამეურნეო დაწესებულებისათვის. წარმოების შეზღუდვასთან დაკავშირებით პროდუქციამ ვერ ნახა გამოყენება საკვებ მრეწველობაში საერთოშორისო ბაზარზე და გამოიყენება ძირითადად თავის სამშობლოში.

სტევია სითბოს მოყვარული მრავალწლოვანი ტროპიკული მცენარეა. ამიტომ მისი განვითარება ჩვენთან შეზღუდულია. ის მხოლოდ ერთწლიანი კულტურის სახით მოჰყავთ შავი ზღვისპირა ზოლში. ამის გამო საჭირო ხდება ყოველწლიურად მისი

ფართობების აღდგენა ახალი სარგავი მასალით, რაც ეკონომიურად არაა ხელსაყრელი. ამასთანავე ეს მცენარე მოითხოვს აგროტექნიკის ზუსტად დაცვას, გამორიცხულია რაიმე სახის ქიმიკატების და ჰერბიციდების გამოყენება.

ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, მიზანშეწონილია ამ მცენარის ტკბილი ნივთიერება გამოყოფილი იქნეს თანამედროვე ბიოტექნოლოგიის მეთოდების გამოყენებით მიღებული ბიომასიდან.

დღესაც, მიკრობიოლოგიის და ქიმიური მრეწველობის უდიდესი მიღწევების მიუხედავად, როცა უამრავი სახის სინთეზური თუ ბუნებრივი სამკურნალო ნივთიერება დიდი მასშტაბით იწარმოება, მცენარე მაინც და მეტად საჭირო შენაერთების მიღების წყაროა, ამიტომ მცენარეთა მწვანე საფარის შენარჩუნებას ბუნებრივ ლანდშაფტში უზრუნველყოფს მცენარის სარგავი მასალის მიღება ქსოვილის კულტურის მეთოდებით.

სუბტროპიკულ ზონაში სტევიის თესლით გამრავლება შეუძლებელია. ძირითადად ამრავლებენ ვეგეტაციური მეთოდით, რომელიც შეიძლება განხორციელდეს ორი გზით:

I _ პირდაპირ მწვანედ დაკალმება

II_ გამრავლება in vitro კულტურით

სურ. 1. ა) სტევიის ზრდასრული მოყვავილე მცენარე ჩსკჩმსსგ-ს ჩაქვის ფილიალის სალექციო ნაკვეთზე

ბ) სტევიის (შტევია ღებაუდიანა) მიწისზედა ვეგეტირებადი ნაწილი

2.2 სტერილიზაციის ხერხები

ა. პირველადი მასალის ზედაპირული სტერილიაცია

პირველადი მასლა, რომელიც განკუთვნილია ექსპლანტის იზოლაციისა და მისი საკვები არის ზედაპირზე მოთავსებისათვის, კარგად ირეცხებოდა საპნიან წყალში, შემდეგ 1-2 სთ-ით ვტოვებდით გამდინარე წყლის ქვეშ. ყველა დანარჩენი მანიპულაცია ტარდებოდა ლამინარ ბოქსში. მასტერილებელ ხსნარებად გამოიყენებოდა 0,2–0,5% დიოციდი, რომელსაც ამზადებენ ცხელ დისტილირებულ წყალში ცეტილპირიდინქლორიდის 2 ნაწილის და ეთანოლმერკური ქლორიდის 1 ნაწილის გახსნით. ყველაზე მეტად გამოიყენება ამ პრეპარატის 0,2% წყალხსნარი, 3-10% ქლორამინი B, კალციუმის ჰიპოქლორიდი, ზოგიერთ შემთხვევაში მცენარეული მასალის დასველებისათვის მასტერილებელ ხსნარებს ვუმატებდით ტვინ - 80-ის რამდენიმე წვეთს.

პირველად ექსპლანტებს რამდენიმე წამით ვათავსებდით 96%-იან ეთილის სპირტში. შემდეგ კი მასტერილებელი ნივთიერების წყალხსნარში, ექსპოზიციის დროს ვარჩევდით ემპირიულად, რაც დამოკიდებული იყო მასტერილებელ ნივთიერებათა სიძლიერეზე. პროცესის დამთავრების შემდეგ მასტერილებელ ნივთიერებებს ვასხამდით, ხოლო მასალას ვრეცხავდით სტერილური დისტი-ლირებული წყლით რამდენჯერმე (3-4-ჯერ) და წყლის ბოლო ულუფაში ვტოვებდით 20-30 წუთით. ეს პროცედურა ხელს უწყობდა ქიმიური ნივთიერებების გამოსვლას მცენარის ქსოვილებიდან და აგრეთვე მცენარის სიცოცხლისუნარიანობის ამაღლებას.

ყველა ამ პროცედურის ჩატარების შემდეგ ხდებოდა ექსპლანტების დათესვა ხელოვნურ საკვებ არეზე.

ბ. საკვები არეების სტერილიზაცია

მომზადებული საკვები არე ნაწილდებოდა კულტურალურ ჭურჭელში, რომლსაც თავი დაცული ჰქონდათ ალუმინის ფოლგით სტერილიზაცია ხდებოდა UP-100-2 ტიპის ავტოკლავში შემდეგი რეჟიმის ქვეშ:

P = 0,9 1 ატმ.

T = 115-120^{0}C

t =20-25 წთ.

გ. ჭურჭლისა და ინსტრუმენტების სტერილიზაცია.

საკვები არეების ლამინარ–ბოქსში განაწილების შემთხვევაში მინის ჭურჭლის და ინსტრუმენტების სტერილიზაციას ვახდენდით საშრობ კარადაში 2 სთ-ის განმავლობაში 170^0C ტემპერატურაზე. სტერილიზაციის შემდეგ ჭურჭელი და ინსტრუმენტები, როლებიც სტერილური სამუშაოსათვისაა განკუთვნილი, გადააქვთ საოპერაციო ოთახში, სადაც ისინი ზედაპირულად სტერილდება სამუშაოს დაწყების წინ 96^0-იან სპირტში დასველებითა და სპირტქურის ალზე მოწვით.

ინსტრუმენტების სტერილიზაცია შეიძლება აგრეთვე დუღილით. ეს რეკომენდებულია სახვადასხვა შპრიცებისათვის, მაკრატლებისათვის. ბამბა, საცობი, მარლა, ხალათები, თავსაფრები, ქაღალდები, ცელულოიდის თავსახურავები, ზეიცის ფილტრი, პიპეტები, წყალი, საკვები არე სტერილდებოდა ავტოკლავში.

დ. საოპერაციო ოთახისა და ლამინარ ბოქსის სტერილიზაცია.

საოპერაციო ოთახები კარგად ირეცხებოდა საპნიანი წყლით კვირაში ერთხელ. ლამინარ-ბოქსი სტერილდებოდა ულტრაიისფერი სხივებით, რომელსაც გვაძლევდა ულტრაიისფერი კვარცის ნათურები. სტერილიზაცია გრძელდებოდა 3-4 სთ-ის განმავლობაში ღამით.

2.3. ექსპლანტის ტიპები

ექსპლანტთა კულტივირებისათვის გამოიყენებოდა პირველადი მასალა, რომელიც აღებული იყო ველურად და სათბურში გაზრდილ მცენარეთა ვეგეტირებადი ყლორტების აპიკალური და იღლიური კვირტები. ხოლო საკუთრივ მიკროამრავლების შემდეგ ეტაპებზე გამოიყენებოდა ექსპლანტის სახით in vitro კულტივირებადი მცენარის კენწრული და ლატერალური კვირტები.

საერთოდ გამოყენებული იქნა ექსპლანტის შემდეგი ტიპები.

1. ზრდასრული მცენარეებიდან:

ა) აპიკალური კვირტები;

ბ). იღლიური კვირტები.

2. In vitro კულტურაში მამრავლი მცენარეებიდან:

ა) ფოთლები;

ბ) აპიკალური კვირტები;

გ) იღლიური კვირტები.

2.4. საკვები არეების შემადგენლობა და მომზადება

ძირითად საკვებ არეებად ვიყენებდით მურასიგე სკოგის (MS), გამბორგის (B_5) და ნიჩისა-ნიჩის მიერ შემუშავებულ საკვებ არეებს. პირველ ცხრილში მოცემულია ამ საკვები არეების შედგენილობა.

ნახშირწყალბადოვანი კვების წყაროდ ვიყენებდით საქაროზას 30 გ/ლ კონცენტრაციით. მყარი საკვები არის მისაღებად საკვებ არეს ვუმატებდით აგარს (Bacto-agar) 6-7 გ/ლ-ზე. საკვები არეების დასამზადებლად ვიყენებდით მაკრომარილების შემდეგ კონცენტრირებულ ხსნარებს:

ა. მაკრომარილები (1X40)

ბ. მიკრომარილები (1X100)

გ. კალციუმის ქლორიდი (1X100)

დ. რკინის ჰელატი (1X)

ე. ვიტამინები (1X100)

მეზოინოზიტს ვუმატებდით არეებს ფხვნილის სახით. მინერალური მარილების კონცენტრირებული ხსნარები და ვიტამინები ინახებოდა +4^{0}C-ზე.

ექსპერიმენტის შესაბამისად, ძირითადად საკვებ არეებს მცენარეთა განვითარებისათვის ვუმატებდით განსხვავებულ ზრდის რეგულატორებს. ზრდის რეგულატორების კონცენტრაცია გამოიხატებოდა მოლებში.

მე-2 ცხრილში მოცემულია ზრდის რეგულატორების კონცენტრაციები 10^{-6} მოლი (მკმ) 1 მლ ხსნარზე.

ცხრილი ¹ 1

სტევიის კულტივირებისათვის გამოყენებული ძირითადი საკვები არეების შემადგენლობა

კომპონენტები	შემადგენლობა მგ/ლ

	მურასიგე-სკოგი (MS) (MS)	გამბორგი (B_5)	ნიჩი_ნიჩი (NN)
I	II	III	IV
მაკრომარილები:			
NH_4NO_3	1650	_	720
KNO_3	1900	2500	950
KH_2PO_4	170	_	68

ცხრილი 1-ის გაგრძელება

1	2	3	4
$MgSO_4.7H_2O$	370	250	165
$NaH_2PO_4.2H_2O$	_	150	--
$(NH_4)_2SO_4$	_	134	--
მიკრომარილები:			
H_3BO_3	6,2	3,0	10.0
$Mn\ SO_4$	15,1	8,9	25.0
$Cu\ SO_4.5\ H_2O$	0,025	0,025	0,025
$Zn\ SO_4$	4,8	1,1	10.0
$Na_2MoO_4.\ 2H_2O$	0,25	0,25	0,25
KI	0,83	0,75	--
$CoCl_2.\ 6SO_4$	0,025	0,025	--
$CaCl_2.6\ H_2O$	655	213	328
$Fe\ SO_4.7H_2O$	27,8	28	27,8
ვიტამინები:			
თიამინ- HCl	0,1	10	0,5
პიროდოქსინ HCl	0,5	1	0,5
ნიკოტინის მჟავა	0,5	1	5.0
მეზოინოზიტი	100	100	100
გლიცინი	2,0	_	--
საქაროზა	3000	3000	3000
აგარი	7000	7000	7000

ცხრილი [1] 2

ზრდის რეგულატორების ხსნარები 1 მლ ხსნარში 1 მკმ ნივთიერებების შემადგენლობით

ზრდის რეგულატორები	MB	წონაკის მასა	გამხსნელი	მოცულობა

					გამხსნელის	წყლის
1	ზაპ	225,6	4	1 ნ HCl	0,3	17,5
2	კნ	215,2	4	1 ნ HCl	0,3	18,5
3	ნძმM	186,2	4	1 ნ NaOH	0,3	21,2
4	იემ	203,2	4	1 ნ NaOH	0,3	19,4
5	იმძ	175,2	4	1 ნ NaOH	0,3	22,6
6	2,4-D	221,0	4	C_2H_5OH	0,1	18,6

საკვებ არეებს ვამზადებდით შემდეგი თანამიმდევრობით: ვწონიდით აგარს, შემდეგ საქაროზას, ვამატებდით აუცილებელი რაოდენობის და გარკვეული კონცენტრაციის მაკრო და მიკრომარილებს, ზრდის რეგულატორებს. ხსნარებს ვავსებდით გარკვეულ მოცულობამდე დისტილირებული წყლით, შემდეგ ვსაზღვრავდით საკვები არის pH 1ნ NaOH და 1ნ HCl საშუალებით ვარეგულირებდით აუცილებელ ნორმამდე (5,6-5,8). შემდეგ ვაცხელებდით საკვებს, განუწყვეტლივ ვურევდით აგარის სრულ გალღობამდე. ცხელ გამზადებულ საკვებ არეს ვასხამდით კულტურალურ ჭურჭელში და ვასტერილებდით ავტოკლავში. ზოგიერთ შემთხვევაში გამზადებულ საკვებ არეს საკულტივაციო ჭურჭელში ჩამოვასხამდით სტერილურ პირობებში (ლამინარ ბოქსში), ხოლო თერმოლაბილურ ზრდის რეგულატორებს ვატარებდით ბაქტერიციდულ ფილტრში და ვუმატებდით საკვებ არეებს ავტოკლავირების შემდეგ.

საკვები არის გამყარების შემდეგ ოთახის ტემპერატურამდე, ასეპტიკური პირობების დაცვით ლამინარ--ბოქსში ვაწარმოებდით საკვებ არეებზე ექსპლანტთა გადათესვას.

2.5. კულტივირების პირობები

კულტივირება ხორციელდებოდა ფიტოტრონში. განათება 2-3 კ. ლუქსი, T = 27 ±2°C, 16 სთ განათება /8 სთ. სიბნელე ფიტოპერიოდით, ხოლო იმ ექსპლანტებს, რომლებიც კალუსოგენეზის იდუქციისათვის იყვნენ განკუთვნილი, ათავსებდნენ სიბნელის პირობებში, თერმოსტატებში 25±1°C ტემპერატურაზე, ორგანოგენეზულ საკვებ არეზე მოთავსებული კალუსების ინკუბაცია წარმოებდა ფიტოტრონში ზემოთ აღნიშნული პირობების გათვალისწინებით. Eექსპერიმენტის მიზნიდან გამოდინარე შერჩეული იქნა როგორც სიბნელეში, ასევე განათების პირობებში, ან ამ პირობების მონაცვლეობით, ექსპლანტთა კულტივირებისათვის ოპტიმალური ვადები.

2.6. მცენარე რეგენერანტების აკლიმატიზაცია

აკლიმატიზაციას ვაწარმოებდით სათბურებში 5-6 დღის განმავლობაში, შენარჩუნებული იყო 100% ტენიანობა, რომელიც თანდათან მცირდებოდა და 20 დღის შემდეგ რეგენერანტები ნორმალურად ვითარდებოდნენ ბუნებრივ პირობებში.

2.7. დაკვირვება და აღწერა

ექსპერიმენტის შედეგების აღრიცხვა წარმოებდა ყოველი 25-30 დღის შემდეგ, მიკროყლორტების რეგენერაციის ინტენსივობას აღრიცხავდნენ რეგენერირებული ინიციალების რაოდენობით. მიკროყლორტების საშუალო სიგრძის, მუხლთშორისების საშუალო და ადვენტური კვირტების რაოდენობათა გათვალისწინებით. კალუსის განვითარების ინტენსივობას აღრიცხავდნენ ბალების საშუალებით:

_ ზრდა არაა

+ სუსტი ზრდა

++ საშუალო ზრდა

+++ კარგი ზრდა

++++ ძალიან კარგი ზრდა

კალუსების განვითარების ეფექტურობას აღრიცხავდნენ იმ ექსპლანტების რაოდენობით, რომლებმაც წარმოქმნეს კალუსი, შეფარდებული დარგული მასალის საერთო რაოდენობასთან. კალუსის განვითარების ეფექტურობა განისაზღვრებოდა აგრეთვე ფერით და კომპაქტურობით. ხოლო შემდგომში კალუსის მორფოგენეზის უნარიანობას გასაზღვრავდნენ კალუსიდან ინდუცირებული კვირტების, ყლორტების და რიზოიდების საშუალო რაოდენობით.

დაფესვიანების აღრიცხვისას ვაწარმოებდით ფესვთა საერთო სიგრძის საშუალო არითმეტიკულის გამოთვლით.

მაშასადამე, ექსპერიმენტის მიზნიდან გამომდინარე, ირიცხებოდა ღეროსეული და ადვენტური კვირტების გამრავლების, ფესვების წარმოქმნის და ზრდის ინტენსივობა, კალუსის ზრდის ტემპი.

წარმოებდა ქსოვილური კულტურების ფოტოგრაფირება. მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავება ხდებოდა დოსპეხოვის მეთოდით (Доспехов 1985)

თავი III

სტევიის ექსპლანტების in vitro კულტურაში შეყვანა და მიკროკლონალური გამრავლება

3.1. პირველადი მასალის ზედაპირული სტერილიზაცია

საწყის მასალას ასეპტიკური კულტურის მისაღებად წარმოადგენდა ჩ.ს.კ. ჩმსსგ-ის ჩაქვის ფილიალის სასელექციო ნაკვეთზე გაშენებული სტევიას ვეგეტირებადი ყლორტების აპიკალური და მძინარე კვირტები (სურ 2).

პირველადი მასალის ზედაპირული სტერილიზაციისათვის გამოვიყენეთ და შევისწავლეთ შემდეგ ნივთიერებათა წყალხსნარების მოქმედება, 5-8-10%, კალციუმის ჰიპოქლორიდი, 5-8-10% ქლორამინ B, 0,2-0,5% დიოციდის წყალხსნარი, ექსპოზიციით 10-25 წთ. აგრეთვე 70 % ეთანოლისა და ზემოთ აღნიშნული მასტერილებელი ნივთიერებების მორიგეობითი ცვლა ექსპოზიციური თანაფართობით 1:15 წუთი.

პირველად მასალას ვრეცხავდით საპნიანი წყლით, 3-5 წთ ვტოვებდით წყლის ჭავლის ქვეშ, ვჭრიდით ერთ მძინარე კვირტის შემცველ ფრაგმენტებად, ვავლებდით დისტილირებულ წყალს 3-4-ჯერ. შემდგომ სამუშაოებს ვასრულებდით ასეპტიკურ პირობებში ლამინარ--ბოქსში. ექსპლანტებს ვათავსებდით მასტერილებელ ხსნარებში, სტერილიზაციის დროს ვსაზღვრავდით ემპირიულად, შემდგომ სტერილურ წყალში რამდენჯერმე გარეცხილ ექსპლანტებს ვთესავდით საკვებ არეზე. ჭურჭელს ინკუბაციისათვის ვათავსებდით ფიტოტრონში.

ზედაპირული სტერილიზაციის პროცედურის შედეგებმა ცხადყო, რომ სიცოცხლისუნარიანი ასეპტიკური მასალის გამოსავალზე გავლენას ახდენდა მასტერილებელი ნივთიერების ბუნება. სტერილიზაციის ექსპოზიცია, ექსპლანტის ანატომიურ-მორფოლოგიური აგებულება და აგრეთვე იმ ეკოლოგიური გარემოს სისუფთავე, საიდანაც ხდება მასალის იზოლაცია კულტურაში მუშაობისათვის. ეს უკანასკნელი მნიშვნელოვანი ფაქტორია ზედაპირული სტერილიზაციისათვის, ვინაიდან გარემოს დანაგვიანება აუცილებლად იწვევს მცენარეთა დასნებოვნებას, თუმცა ღია გრუნტში შესაძლებელია პათოლოგიური გამოვლინება მცენარეზე მობინადრე სხვადასხვა ეტიოლოგიის მიკროფლორას არ ჰქონდეს. მაგრამ in vitro კულტურაში მათი მოშორება მცენარის ზედაპირიდან პრობლემურია და მეტად შრომატევადი, ვინაიდან ოპტიმალური პირობების შემუშავება ხორციელდება

ინდივიდუალურად ყოველი მცენარისათვის და აუცილებლად ექსპერიმენტის შედეგების მიხედვით. ამასთან მასტერილებელი ნივთიერებები მცენარეთა ცოცხალ ქსოვილებზე სხვადასხვა სიძლიერის ტოქსიკურ მოქმედებას იწვევენ. ამიტომაც მნიშვნელოვანია ექსპლანტის ანატომიურ-მორფოლოგიური აგებულების გათვალისწინება მასტერილებელი ნივთიერების მოქმედების სიძლიერის შესარჩევად.

გამოყენებული მასტერილებელი ნივთიერებებიდან (ცხრილი 3) ყველაზე ეფექტური აღმოჩნდა დიოციდის 0,2% წყალხსნარი ექსპოზიციით 15 წუთი.

არაინფიცირებულთა ხარისხი შეადგენდა 97%, ხოლო მიღებულ დაუსნებოვნებელ ექსპლანტთა სიცოცხლისუნარიანობა 93%-ს. ინფიცირების ხარისხი შედარებით მაღალი იყო ამ სტერილენტის (0,1 %) კონცენტრაციის შემცირებისას, იგივე ეფექტი აღინიშნებოდა 0,2 % ხსნარის მოქმედების ექსპოზიციის შემცირებისას, (8-10 წუთი), მაგრამ ორივე შემთხვევაში მიღებული ყველა არაინფიცირებული მასალა ხასიათდებოდა სიცოცხლის უნარიანობით (100%). არაინფიცირებული მასალის გამოსავალი როგორც მეორე ცხრილიდან ჩანს დაბალი იყო ქლორამინ B-ს და კალციუმის ჰიპოქლორიდის წყალხსნართა გამოყენებისას, შედარებით უკეთესი ეფექტით ხასიათდებოდა ქლორამინ B-ს წყალხსნარი, არაინფიცირების ხარისხი რა თქმა უნდა დაბალი იყო, როგორც 5%, ასევე 10%-იანი ხსნარის გამოყენებისას, (30-50%, ცხრილი 3), მაგრამ სიცოცხლისუნარიანი ექსპლანტების რაოდენობა გაცილებით მეტი იყო, ვიდრე Ca-ის ჰიპოქლორიდის წყალხსნარის გამოყენებისას. სტერილიზაციის ექსპოზიციის ხანგრძლივობის მომატება ან შემცირება ზემოთ აღნიშნული ნივთიერებების გამოყენების შემთხვევაში უმნიშვნელოდ ზრდიდა ზედაპირული სტერილიზაციის ეფექტს ან კიდევ იწვევდა სიცოცხლისუნარიანი ექსპლანტების გამოსავლის შემცირებას, ხოლო ხსნართა კონცენტრაციათა მომატებას ან შემცირებას პრაქტიკულად არ მივყავართ მნიშვნელოვან დადებით შედეგებამდე. კონცენტრაციათა მაქსიმალურად გაზრდა იწვევდა ქსოვილთა ინტოქსიკაციას, რასაც ახლდა საკვებ არეზე რეგენერაციის ნაცვლად ნეკროზი, ხოლო კონცენტრაციათა მინიმუმამდე შემცირებას – პირველადი მასალის 100%-იანი ინფიცირება. მასტერილებელი ხსნარისათვის ეს შედეგი კანონზომიერებას წარმოადგენდა.

სურ. 2. ექსპლანტის ტიპები: ა) აპიკალური და იღლიური კვირტები
ბ)ფოთლის ფირფიტა

სურ. 3. კარგად მზარდი ასეპტიკური კულტურა 0-სუბკულტივირებისას საკვები არე B_5+ბაპ 5 მკმ+ნძმ0,5 მკმ

ცხრილი 3

მასტერილებელ ნივთიერებათა გავლენა სიცოცხლისუნარიანი ასეპტიკური ექსპლანტის გამოსავლიანობაზე

მასტერილე-ბელი ნივთიე-რება	კონცენტრა-ცია	ექსპოზიცია	ექსპლანტთა საერთო რაოდენობა	არაინფიც ირებულთა %	სიცოცხლისუნ არიანთა %
დიოციდი	0,2% 0,2%	10 15	50 50	70 97	100 93
კალციუმის ჰიპოქლორიდი	5% 5% 10%	15 25 15%	50 50 50	20 40 42	52 65 60
ქლორამინ Б	5% 10%	15 15	50 50	30 50	60 80

3.2. პირველად ექსპლანტთა სპეციფიკურობისა და ხნოვანების გავლენა სტევიის კვირტების პროლიფერაციაზე

ზედაპირული სტერილიზაციის ჩატარების შემდეგ ექსპლანტებს ვათავსებდით აგარიზებულ ხელოვნურ საკვებ არეზე, რომელსაც დამატებული ჰქონდა ექსპერიმენტის მიზნიდან გამომდინარე შესაბამისი ზრდის რეგულატორების გარკვეული კონცენტრაციები.

სტევიის სტერილური პირველადი კულტურის ზრდა-განვითარებასა და მორფო-გენეტიკურ პროცესებზე in vitro სისტემაში კულტივირების I ეტაპზე გავლენას ახდენდა ექსპლანტის ტიპი და ხნოვანება ანუ ექსპლანტის ფიზიოლოგიური მდგომარეობა.

პირველადი მასალის იზოლირება ხდებოდა ინტაქტური პლანტაციური მცენარიდან, როგორც იუვენილურ, ასევე ზრდასრულ გენერაციულ ფაზაში და აგრეთვე სათბურის პირობებში მზარდი ინტაქტური მცენარიდან, როგორც იუვენილურ, ასევე ზრდასრული გენერაციულ ფაზაში.

ექსპლანტებს, როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ წარმოადგენდა აპიკალური და იღლიური კვირტები, ფოთლის ფირფიტები.

როგორც ექსპლანტების შედეგებმა გვიჩვენა ზრდასრული მცენარის ახალგაზრდა ვეგეტირებადი კვირტები უფრო კარგი და სწრაფი ზრდა-განვითერებით ხასიათდებოდა in vitro კულტურაში, ვიდრე იგივე მცენარის საშუალო ფიზიოლოგიური ასაკის მქონე ექსპლანტები, მიუხედავად იმისა, რომ in vitro სისტემაში ნებისმიერი ასაკის ექსპლანტს ახასიათებს რეიუვენილიზაცია.

ექსპლანტები, რომელთა იზოლირება მოხდა განვითარების იუვენილურ ფაზაში მყოფი მცენარე დონორიდან ხასიათდებოდნენ პროლიფერაციის და რეგენერაციის მაღალი ტემპით, ვიდრე გენერაციულ ფაზაში მყოფი მცენარე – დონორიდან იზოლირებული ექსპლანტები (ცხრილი 4). ზემოთ აღნიშნულ პირველ შემთხვევაში მიკროგამრავლების პირველ ეტაპზე პირველადი ექსპლანტის მიერ მწვანე მასის რეგენერაცია კულტურაში გაცილებით სწრაფად და ენერგიულად მიმდინარეობდა, შესაბამისად სუბკულტივირების ხანგრძლივობაც მოკლე ჰქონდათ, ვიდრე გენერაციულ ფაზაში მყოფი მცენარიდან იზოლირებულ ექსპლანტებს.

ზრდასრულ მცენარე-დონორიდან იზოლირებული ექსპლანტები იუვენილურთან შედარებით ხანმოკლედ, მაგრამ მაინც 0-სუბკულტივირების პროცესში რამდენადმე აყოვნებდნენ რეგენერაციულ პროცესებს. ხნიერი ექსპლანტები ხასიათდებოდნენ დაბალი მორფოგენეტიკური პოტენციალით. 0-ვანი სუბკულტივირების ბოლოს უმნიშვნელოდ წარმოქმნიდნენ მწვანე მასას. როგორც ჩანს ეს გამოწვეული იყო ექსპლანტის ქსოვილის პლასტიკურობის განსხვავებული დონით. ნივთიერებათა ბალანსის ცვლილებით, მეტაბოლიტური პროცესების დესპეციალიზაციით და ამ ნივთიერებათა გადამოძრავების განსხვავებით.

აღსანიშნავია, რომ 0-ვან სუბკულტივირებისას პირველადი ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში, საკვებ არეში ჰორმონების ბუნებისა და კონცენტრაციათა თანაფარდობის მიხედვით, წარმოიქმნებოდა კალუსური ქსოვილი, კალუსური ქსოვილის წარმოქმნა უფრო მაღალი სიხშირით აღინიშნებოდა ზრდასრული ასაკოვანი ექსპლანტებიდან, ვიდრე ახალგაზრდა ექსპლანტებიდან. ეს გამოწვეული იყო იმით, რომ ამ უკანასკნელთა მიერ ორგანოთა (ფოთოლი, გვერდითი კვირტი) წარმოქმნის

უნარი გაცილებით მაღალი იყო და სწრაფი ტემპით მიმდინარეობდა, (სურ.3) ხნიერი ექსპლანტების მიერ ორგანოთა წარმოქმნა დაბალი სიხშირით ხასიათდებოდა, მაგრამ კალუსოგენეზი კარგი ტემპით ხდებოდა. თუმცა ამ უკანასკნელთა რეგენერაციული პოტენციალი განსხვავდებოდა და საკმაოდ დაბალი იყო ახალგაზრდა, იუვენილურ ფაზაში მყოფი ექსპლანტთან და აგრეთვე იმ ექსპლანტთან შედარებით, რომლებიც იუვენილურ ფაზაში მყოფი მცენარე დონორიდან იქნა იზოლირებული.

სტევიის სხვადასხვა ტიპის ექსპლანტების (კვირტი, ფოთოლი, ყვავილი, ფესვი) შეყვანამ კულტურაში გვიჩვენა, რომ ყველაზე ეფექტურია კვირტის (როგორც აპიკალური, ასევე იღლიური) კულტურა. ეს უპრიანიცაა, რადგანაც კვირტი მერისტემულ ქსოვილს შეიცავს, მას კი დედიფერენციაციის და პროლიფერაციის ფართო დიაპაზონი აქვს, რასაც ნაკლებად ვიტყვით ფოთოლსა და ყვავილზე, ფესვის ფრაგმენტების შეყვანამ კულტურაში სასურველი ეფექტი არ მოგვცა.

როგორც ექსპერიმენტის შედეგებმა გვიჩვენა სტევიის ექსპლანტების შეყვანა in vitro სისტემაში შესაძლებელი იყო წლის ნებისმიერ დროს, სიცოცხლის უნარიანი ვეგეტაციის მქონე კვირტები ვითარდებოდა წლის ნებისმიერ სეზონზე, მაგრამ პროლიფერაციის ტემპი რამდენადმე განსხვავდებოდა. სწრაფი ტემპით ეს პროცესი აღინიშნებოდა გაზაფხულიდან, კერძოდ მარტის მესამე დეკადიდან ივნისის ბოლომდე, ხოლო პირველადი ექსპლანტის სუსტი ტემპით ზრდა-განვითარება 0-სუბკულტივირებისას შეინიშნებოდა ზამთრის თვეებში. აქვე უნდა ავღნიშნოთ რომ, საქართველოს სუბტროპიკულ ზონაში ღია გრუნტში მოზარდი სტევიის კულტურები მოკლე დღის მცენარეებად ითვლებიან და აგვისტოს III დეკადიდან ან სექტემბრის I ნახევრიდან მიწის ზედა ნაწილები განიცდიან კვდომას. ამიტომ ექსპერიმენტისათვის დონორ მცენარეებს, რომლიდანაც ვახდენდით ექსპლანტთა იზოლირებას ვზრდიდით სათბურებში. სათბურებში სტევია ვეგეტირებდა მთელი წლის განმავლობაში, თუმცა სეზონურობის გავლენა აქაც აღინიშნებოდა მწვანე მასის წარმოქმნაზე. რაც შეეხება პირველადი მასალის იზოლაციას ღია გრუნტიდან და სათბურიდან აღმოჩნდა რომ სათბურში მზარდი მცენარეებიდან იზოლირებული ექსპლანტები უფრო კარგად და ადგილად ექვემდებარებოდნენ ზედაპირულ სტერილიზაციას, ვიდრე გრუნტის მცენარე-დონორიდან აღებული პირველადი მასალა. ეს უკანასკნელი მოითხოვდა

სტერილიზაციის უფრო მკაცრ პირობებს, რაც თავის მხრივ გავლენას ახდენდა ექსპლანტთა მორფოგენეტიკური პოტენციალის გამოვლინებაზე.

სურ.4.კალუსოგენეზი და ორგანოთა ფორმირება 0-სუბკულტივირებისას საკვებ არეზე: B_5+ბაპ 5$_{მკმ}$+ნძმ 3 მკმ

ცხრილი 4

ექსპლანტის ასაკის გავლენა ყლორტის ზრდა-განვითარებაზე

ექსპლანტის ტიპი	ექსპლანტის ასაკი	დათესილი ექსპლანტ-ების რაოდ-ენობა	0-პასა-ჟის ხა-ნგრძლ-ივობა (დღე)	ზრდის ტემპი	მწვანე მასის წარმო-ქმნის ინტენსი-ურობა	ყლორ-ტების საშუ-ალო სიმაღ-ლე მმ	მუხლთა-შორისე-ბის საშ-უალო რაოდე-ნობა
აპიკალური კვირტი	იუვენილური	20	25	მაღალი	მაღალი	59	14
აპიკალური კვირტი	გენერაციული	20	25	საშუალო	საშუალო	25	7
იღლიური კვირტი	იუვენილური	20	25	მაღალი	მაღალი	50	12
იღლიური კვირტი	გენერაციული	20	25	საშუალო	საშუალო	20	6

3.3. სტევიის კვირტების პროლიფერაცია. საკუთრივ მიკროგამრავლების ეტაპზე

საკუთრივ მიკროგამრავლების ეტაპებზე ექსპლანტის სახით გამოყენებული იყო in vitro კულტივირებადი მცენარის კენწრული და იღლიური კვირტები. მიკროგამრავლების მაქსიმალური კოეფიციენტის მიღწევის მიზნით ვაწარმოეთ საკვები არის კომპონენტების, ზრდის ჰორმონალური ნივთიერებების და კულტივირების ფიზიკური პირობების ოპტიმიზირება.

ა) საკვები არის კომპონენტების გავლენა

სტევიის აპიკალური და იღლიური კვირტები თავსებოდა სხვადასხვა მინერალური შედგენილობის საკვებ არეებზე. კერძოდ: გამბორგის (B_5), მურასიგე-სკოგის (MS) და ნიჩი-ნიჩის (NN). ზრდის რეგულატორებიდან საკვებ არეებს ემატებოდა ბენზილამინოპურინის (ბაპ) ერთიდაიგივე (10 მკმ) კონცენტრაცია.

სხვადასხვა შედგენილობის საკვებ არეზე ექსპლანტთა კულტივირებამ გვიჩვენა, რომ გამოყენებული საკვები არეებიდან ყვლაზე ნაკლებ ეფექტური იყო ნიჩისა და ნიჩის (NN) საკვები არის შედგენილობა. NN საკვებ არეზე განვითარდა სუსტი კვირტები (სურ. 1), რომელთა სიგრძე შეადგენდა საშუალოდ 20 მმ-ს, მაგრამ მუხლთაშორისების რაოდენობა მცირე იყო (2-3) და წარმოქმნილ ფოთლებს სხვადასხვა ფორმა ჰქონდათ (სურ.5) ახალი ფოთლების წარმოქმნა ნელა და სუსტად მიმდინარეობდა, ხოლო იღლიური კვირტების წარმოქმნა არ ხდებოდა. ექსპლანტების უმეტესობა სიმაღლეში იზრდებოდა ღეროს დაგრძელების ხარჯზე და არა მუხლთაშორისების წარმოქმნით. არაეფექტური აღმოჩნდა NN საკვებ არეში ჰორმონების კონცენტრაციის შემცირება ან მომატება. დამოკლებული მუხლთაშორისების მქონე კვირტების გადათესვას ახალ NN საკვებ არეზე თან ახლდა ისევ ზემოთ აღწერილი კანონზომიერების გამეორება. არაეფექტური აღმოჩნდა აგრეთვე NN საკვების უჰორმონო და ჰორმონშემცველი შემადგენლობის მორიგეობითი ცვლაც. შეიქმნა შთაბეჭდილება, რომ მინერალური მარილების რაოდენობა არასაკმაისი იყო კვირტების ნორმალური ზრდა-განვითარებისათვის. ამის გამო ნიჩისა და ნიჩის საკვები არე სრულებით უგულებელვყავით ექსპერიმენტიდან.

სურ. 5 სტევიის კვირტი ნემსისებური ფოთლებით საკვებ არეზე:N NN + ბაპ 10 მკმ.

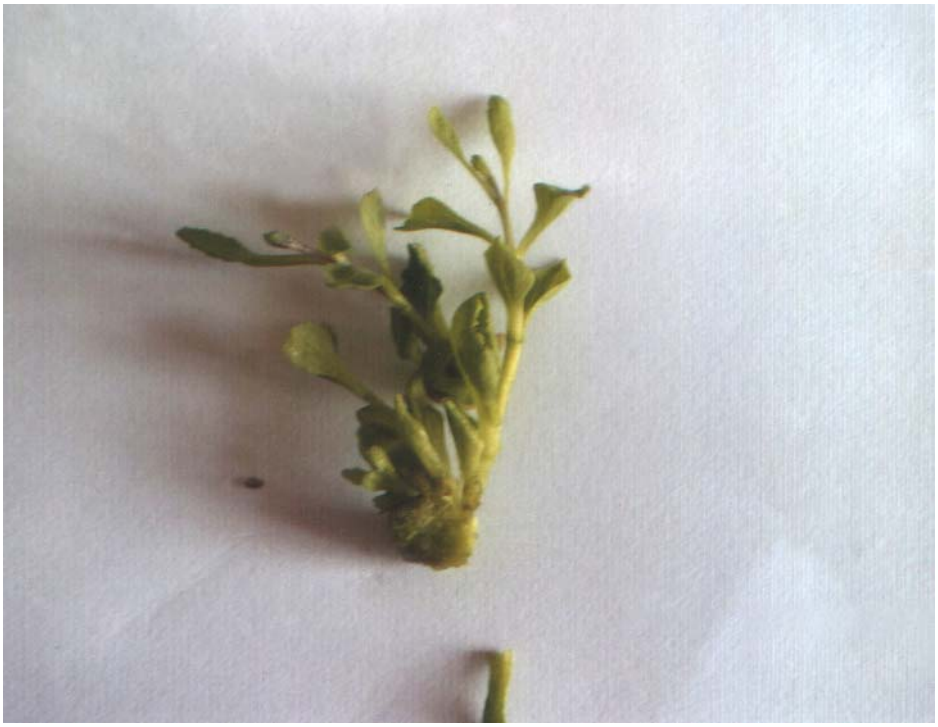
გამბორგის და მურასიგე-სკოგის შედგენილობის საკვები არის გამოყენებამ გვიჩვენა, რომ ორივე ტიპის საკვები ეფექტურად მოქმედებდა სტევიას როგორც კალუსოგენეზის, ასევე მიკროგამრავლებისა და რეგენერაციულ პროცესებზე. კვირტების განვითარების ფაზა შემცირდა, წარმოქმნილი ყლორტები ნორმალური ჰაბიტუსით ხასიათდებოდა. ფოთლებს ჰქონდათ დამახასიათებელი ფორმა და მორფოლოგია. კალუსის წარმოქმნა ჩქარი ტემპით მიმდინარეობდა ორივე შესწავლილ საკვებზე. ადგილი ჰქონდა კალუსის მერისტემატიზაციას და ამ დიფუზიურად განლაგებული უხვი რაოდენობის მერისტემული კვანძებიდან ნორმალური სიცოცხლის უნარიანი კვირტების განვითარებას. (სურ 6). ადგილი ჰქონდა აპიკალურად დომინირებადი ყლორტების დატოტიანებას იღლური კვირტების წარმოქმნის ხარჯზე (სურ 7).

მათი საშუალო რაოდენობა ექსპლანტზე, როგორც მე-5 ცხრილიდან ჩანს შეადგენს 8,0-8,2 ერთეულს, გაძლიერებული იყო ფოთოლწარმოქმნის პროცესიც. აღინიშნებოდა აგრეთვე ძირითადი ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში ადვენტური

სურ.6 ა) ბ)

ინდუცირებულ კალუსზე (10მკმ ნძმ) მასიური კვირტების წარმოქმნა

ა) MS+ ბაპ 10 μù ბ) B_5+ ბაპ 10 μ



სურ. 7. აპიკალურად დომინირებადი დატოტიანებული ყლორტი

საკვები არე: B_5+ ბაპ15 მკმ+ ნძმ 1 მკმ

კვირტწარმოქმნაც, რომელთა საშუალო რაოდენობა შეადგენდა გამბორგის შემცველ საკვებ არეზე 26,8, ხოლო MS საკვებ არეზე 25,1 (ცხრ. 5) არსებითი განსხვავება გამოყენებული საკვები არეების ეფექტს შორის უმნიშვნელო იყო, მაგრამ სხვადასხვა აზოტოვანი კვების წყაროს და ვიტამინების სხვადასხვაობამ მაინც განაპირობა რეგენერირებულ მცენარეებში ზოგიერთი მორფოლოგიური ცვლილება. B_5 საკვებ არეზე განვითარებული კვირტები უფრო კარგი და ლამაზი ვარჯით გამოირჩეოდა, კვირტები მსხვილი ღეროთი და ინტაქტური მცენარისათვის დამახასიათებელი მკვეთრი მწვანე ფოთლებით ხასიათდებოდა. ყლორტების საშუალო სიმაღლე შეადგენდა 126 მმ. ექსპლანტებს ბაზალურ ნაწილში უვითარდებოდათ მორფოგენური კალუსი (სურ. 8), რომელზეც მრავალი

სურ. 8. მორფოგენური კალუსის განვითარება აპიკალური კვირტის ბაზალურ ნაწილში. საკვები არე Ms + ბაპ 10 მკმ

ცხრილი [15]

საკვები არის შემადგენლობის გავლენა კვირტების წარმოქმნასა და ინდუქციაზე (III სუბკულტივირება)

n=10

საკვები არეები + მკმ ბაპ	აპიკალური ყლორტების საშუალო რაოდენობა	ადვენტური კვირტების საშუალო რაოდენობა	გააქტიურებული მონაცემების საშუალო რაოდენობა	კვირტების საშუალო რაოდენობა მმ	მორფოლოგიური კალუსის განვითარება
ნიჩისა და ნიჩის (NN)	2,1	6,6	-	2,9	+
გამბორგის	8,0	26,8	16,8	120,0	+++

B_5					
Mმურასიგე სკოგის (MS)	8,2	25,1	12,0	115,0	+++

კვირტი პროლიფერირდებოდა, ხოლო მიკროყლორტების ფოთლის იღლიიდან ახალი აქსელარული მერისტემის განვითარება აღინიშნა, რაც მიკროგამრავლების კოეფიციენტის ზრდაზეც აისახა. რაც შეეხება მურასიგე-სკოგის საკვებ არეზე ფორმირებულ კვირტებს ისინი ხასიათდებოდნენ უფრო წვრილი ღეროთი, შედარებით ვიწრო ფოთლიანი კვირტებით და შემოკლებული მუხლთაშორისებით.

საკვებ არეში მინერალური მარილებისა და ვიტამინების გავლენის გარდა შევისწავლეთ მიკროგამრავლების პროცესზე ნახშირბადოვანი კვების წყაროს "საქაროზას" მოქმედების ეფექტი. აღმოჩნდა, რომ რაც უფრო მეტი რაოდენობით (5%) შეიცავს საკვები არე საქაროზას მით უფრო უკეთესად მიმდინარეობს მორფოგენეტიკურ პროცესების რეალიზაცია. ნორმალური ზრდა-განვითარებისათვის საჭირო მინიმალური რაოდენობაა 3-3.5%.

ამრიგად, მინერალური საკვები ელემენტებით საკვები არის სწორად მომარაგება ექსპლანტთა კარგი ზრდა-განვითარების საფუძველია, რაც აისახება მიკროგამრავლების მაღალი კოეფიციენტის არსებობისა და მორფოგენეტიკური პოტენციალის სრულად რეალიზაციაზე, რა თქმა ზრდის რეგულატორების თანაობისას.

ბ) ზრდის რეგულატორების მოქმედების შესწავლა

საკუთრივ მიკროკლონალური გამრავლების ეტაპზე ექსპლანტის სახით გამოვიყენეთ in vitro კულტურების აპიკალური და იღლიური კვირტები, ასევე ადვენტური მინიატურული ყლორტები.

ზრდის რეგულატორებიდან შევისწავლეთ ციტოკინინების: ბაპ და კინეტინის სხვადასხვა კონცენტრაციათა მოქმედება კვირტების პროლიფერაციაზე, აგრეთვე ციტოკინინების და ნძმ; ბაპ-ის, ნძმ-სა და გიბერელინის მჟავას (გმ^3) ერთობლივი მოქმედება (ცხრილი 5).

კვირტების განვითარების ინდუქციის აუცილებელ პირობას წარმოადგენს საკვებ არეში ჰორმონების არსებობა, ამას ადასტურებს ის ფაქტი, რომ უჰორმონო საკვებ არეზე კვირტები ძალიან ცუდად ვითარდებოდა ან განვითარების ტემპი ძალზე შენელებული

იყო, (სურ. 9) თუმცა 10-12 სუბკულტივირების შემდეგ უჰორმონო საკვებ არეზე ჰორმონდამოკიდებული კვირტები ღეროსეული რეგენერაციის შესანიშნავი ეფექტით ხასიათდებოდნენ რაც ინტენსიურ ზრდასა და სპონტანურ დაფესვიანებაში გამოიხატებოდა.

მიკროგამრავლების I ეტაპზე გამრავლების კოეფიციენტის ზრდა აღინიშნებოდა ციტოკინინების გავლენით, თუმცა უნდა ავღნიშნოთ, რომ 0 და I სუბკულტივირებისას მათი გავლენა განსხვავებული ეფექტით მიმდინარეობდა, მაგრამ ორივე შესწავლილი ციტოკინინი იწვევდა ძირითად ექსპლანტზე ახალი აქსელარული კვირტების ჩასახვასა და განვითარებას. 0-სუბკულტივირებისას სტევიის აქტიური ზრდა არ აღინიშნებოდა არც ერთ ჰორმონზე. ეს გასაგებიცაა, რადგანაც მიმდინარეობდა ტესტი სტერილიზაციის ეფექტის დასადგენად და ამასთანავე კვირტები ეჩვეოდნენ ხელოვნურ საკვებ არეზე დამოუკიდებლად, დედა-მცენარის გარეშე ზრდა-განვითარებას, ანუ I სუბკულტივირების ბოლოს სტევიის კულტურები უკვე კარგად მზარდი გამრავლების უნარიანი ექსპლანტები იყვნენ.

ექსპერიმენტის შედეგებმა გვიჩვენა, რომ გამრავლების კოეფიციენტის მაჩვენებელი კვირტებისა და ყლორტების ზრდის ფორმა და ხასიათი იღლიური მერისტემის აქტივაცია და დამატებითი ადვენტური კვირტის წარმოქმნა დამოკიდებული იყო გამოყენებულ ციტოკინინთა მოქმედების სიძლიერეზე და

სურ. 9 კვირტების განვითარება უჰორმონო საკვებ არეზე

კონცენტრაციაზე. როგორც ბაპ, ასევე კინენტანი დადებითად მოქმედებდა მიკროგამრავლების პროცესზე. ორივე შემთხვევაში ადგილი ჰქონდა ღეროსეულ მორფოგენეზს და in vitro კვირტების წარმოქმნას ბაზალურ ნაწილში და იღლიური კვირტების ინდუქციას.

გამოცდილი ციტოკინინებიდან ეფექტური აღმოჩნდა ბაპ. 0 და 1 სუბკულტივირების ბოლოს მთავარი ყლორტის სიმაღლე 5 მკმ ბაპ შემცველ საკვებ არეზე შეადგენდა 100-118 მმ (ცხრილი 6), ხოლო ზოგიერთი მიკროყლორტი აპიკალურ ზრდასთან ერთად მის ბაზალურ ნაწილში ივითარებდა 1-3 დამატებით კვირტს

(სურ10), ხშირ შემთხვევაში ადგილი ჰქონდა დამატებითი მერისტემების გააქტიურებას, კერძოდ, იღლიური კვირტების ინდუქციას. მთავარი ღეროს ქვედა მოპირდაპირედ განლაგებული ორივე კვირტი ვითარდებოდა ერთდროულად, უმეტესად პირველი იღლიური კვირტების განვითარებას თან ახლდა მეორე რიგის იღლიური კვირტების ზრდის ინიცირება. ეს პროცესი უფრო ინტენსიური იყო საკვებ არეზე ბაპ და ნმძ კომბინაციით, (სურ 11) ვიდრე მხოლოდ ბაპ შემცველზე, აპიკალური ყლორტის მუხლთაშორისების რაოდენობა შეადგენდა 10,2-12,6 ერთეულს (ცხრილი 6).

ფოთოლთგანლაგება პარალელურია და იღლიური მერისტემაც ორჯერ მეტია, რის გამოც სუბკულტივირების ბოლოს ერთი მთავარი ყლორტიდან ვღებულობთ 18-22 აპიკალურად დომონირებად კვირტებს გამრავლების შემდეგი ციკლისთვის.

ბაპ კონცენტრაციის მომატება (10 მკმ) საკვებ არეში იწვევდა (ცხრილი 6) მთავარი ყლორტის რამდენადმე დამოკლებას (72,8-86,8 მმ), შესაბამისად შემცირდა მუხლთაშორისების რაოდენობაც (6,8), სანაცვლოდ უფრო ინტენსიური იყო იღლიური კვირტების გააქტიურება, რიგ შემთხვევაში ეს პროცესი იწყებოდა აპიკალური კვირტებიდან მხოლოდ მე-2 ან მე-3 იღლიის უბანში და 1 კვირტის ნაცვლად ვითარდებოდა კვირტების კონა (სურ.12). დანარჩენი იღლიური მერისტემები მოსვენების მდგომარეობიდან არ გამოდიოდნენ, სავარაუდოა, რომ ასეთ აქტიურ უბნებში ადგილი აქვს ჰორმონების კონცენტრირებას, რაც ხელს უწყობდა საუღლე კვირტის ბაზალურ ნაწილში პრიმორდიალური კვირტების ჩასახვას და ზრდის ინიცირებას.

მუხლთაშორისების რაოდენობის შემცირებას თან ახლდა ადვენტური კვირტების წარმოქმნა, კვირტის ბაზალურ ნაწილში წარმოიქმნებოდა მორფოგენური კალუსი, რომელზეც ფორმირდებოდა უამრავი 0,4-0,6 მმ სიგრძის მინიატურული კვირტები (22,4-28,8). ისინი გამრავლების შემდეგი ციკლისათვის წარმოადგენენ მეორად ექსპლანტებს (სურ.13).

სურ. 10. აპიკალური კვირტის ბაზალურ ნაწილში დამატებითი კვირტების განვითარება

სურ. 11. იღლიური მერისტემების გააქტიურება

საკვები არე B_5+ბაპ 5მკმ+ნძმ 1 მკმ

სურ. 12. კვირტების კონის განვითარება სტევიის ყლორტის იღლიაში

საკვები არე: არე B_5+ბაპ 10მკმ+ ნძმ 1 მკმ

სურ. 13. მინიატურული კვირტების განვითარება მთავარი ყლორტის ბაზალურ ნაწილში

ცხრილი [1]6

ჰორმონების გავლენა სტევიის მიკროყლორტების პროლიფერაციის ინტენსივობაზე

n=10

ფიტოჰორმონები (მკმოლი)				მიკროყლორტების საშუალო სიგრძე (მმ)	მუხლთაშორისების საერთო რაოდენობა	Aადვენტური კვირტების საშუალო რაოდენობა
ბაპ	კნ	ნძმ	Gგმ$_3$			
	5	-		100	9,0	3
	10	-		65	4,6	22,4
	5	1		120	11,2	4,5
	10	1		78	6,8	28,8
	15	1		50	5,0	36,0
	20	1		20	4,0	50,1
5	-	-		118	10,2	4,1
10	-	-		72,8	6,8	38,9
15	-	-		138	12,6	44,9
20	-	1		31,0	4,0	52,0
10	-	1	5	145	8,5	13,1

კინეტინი ახორციელებდა მსგავს მორფოგენეტიკურ პროცესებს შედარებით ნაკლებ ინტენსიურად, ვიდრე ბაპ, ხშირად ადგილი ჰქონდა ერთდროულად რამდენიმე აპიკალურად მზარდი ყლორტის განვითარებას, რომელთა შორის მთავარის გამორჩევა გაძნელებული იყო. კინეტინის ასეთი მოქმედება განპირობებული იყო ჩვენი მოსაზრებით იმით, რომ სტევია წარმოადგენს ბალახოვან მცენარეს, გენოტიპი მეტად მობილურია და მისი მორფოგენეტიკური პოტენციალის სრულად გამოვლენისათვის საკმარისია კინეტინის ზემოქმედებაც ანუ კინეტინი თავისი ნაზი ქმედებით საშუალებას აძლევს მცენარეს მოახდინოს თავისი ტოტიპოტენტურობის უნარის რეალიზაცია, კინეტინის შემცველ საკვებ არეზე განვითარებული მცენარე-მიკროკლონები სრულებით იმეორებდნენ დედა-მცენარისათვის მსგავს მორფოლოგიას, ხოლო ბაპ-ის შემცველ საკვებ არეზე განვითარებული კვირტები, უმნიშვნელოდ, მაგრამ (სურ. 15) ფოთლის ფირფიტის ფორმით მაინც განსხვავდებოდნენ. მიუხედავად იმისა, რომ კნ, როგორც ჰორმონი საკმაოდ ეფექტური იყო, ყლორტების განვითარებისთვის უფრო ხანგრძლივი დრო სჭირდებოდა ბაპ-თან შედარებით.

სურ. 14. ერთდროულად რამდენიმე აპიკალური კვირტის განვითარება

საკვები არეები: B_5+კნ 5 მკმ+ ნმმ 1 მკმ

ა) ბ)

სურ. 15. მიკროყლორტები – განვითარებული

ა) B_5+ბაპ 10 მკმ

ბ) B_5+ კნ 10 მკმ

კინეტინის ოპტიმალური კონცენტარაცია შეადგენდა 15 მკმ, ხოლო ბენზიალამინოპურინისათვის ეს მაჩვენებელი 10 მკმ-ს უდრიდა. მორფოგენეტიკურ პროცესებზე თვალსაჩინო ზემოქმედება შეინიშნებოდა ამ ჰორმონთა დაბალ კონცენტრაციებზეც. კვირტები სწრაფად იზრდებოდნენ სიმაღლეში. ციტოკინინთა მატებასთან ერთად იღლიური მერისტემების გააქტიურება ჩერდებოდა, ღერო მსხვილდებოდა (სურ.16) ფუძეში წარმოიქმნებოდა დამატებითი კვირტები.

ციტოკინინების უფრო მაღალი კონცენტრაციების გამოყენება (15—10 მკმ) დადებითად ზემოქმედებდა გამრავლების კოეფიციენტზე, ეს მაჩვენებელი რეგენერაციული პროცესების გაძლიერებასთან ერთად იზრდებოდა: მთავარი ყლორტის ბაზალური ნაწილის ჰიპოკოტილიდან განვითარდა კალუსი, პრიმორდიალური კვირტებით, რასაც თან მოჰყვა აპიკალური ყლორტის ზრდის პროცესების შეყოვნება. 0,4--0,6 მმ სიგრძის პრიმორდიალური კვირტები გამრავლების შემდეგი ციკლისათვის წარმოადგენენ მეორად ექსპლანტებს. თითოეული კვირტი სიცოცხლის უნარიანი იყო დანაწილებისა და ახალ საკვებ

სურ. 16. მთავარი ყლორტის გამსხვილება საკვებ არეზე

B_5+ ბაპ 20 მკმ+ ნმმ 1 მკმ

არეზე გადატანის შემდეგ. გამოცდილი იქნა 10 მკმ ბაპ, 1 მკმ ნმმ და 5 მკმ გმ^3 ერთობლივი მოქმედება სტევიის მიკროგამრავლების პროცესზე, აღნიშნულ ვარიანტზე ყლორტები იზრდებოდნენ ერთი თვის განმავლობაში. საკონტროლოსთან (საკონტროლო ვარიანტი: 10 მკმ ბაპ : 1 მკმ ნმმ) შედარებით კვირტები, რომლებიც მოთავსებული იყო საცდელ არეზე, 7-10 დღით ადრე გამოდიოდნენ მოსვენების მდგომარეობიდან და იწყებდნენ სწრაფ ზრდას. ადგილი ჰქონდა ყლორტის ღეროს და ფოთლის ყუნწის დაგრძელებას. შემდეგი სუბკულტივირებისას აღინიშნებოდა გმ^3 უარყოფითი მოქმედება, კერძოდ ადგილი ჰქონდა ყლორტის ნორმალური მორფოლოგიიდან გადახრას. იცვლებოდა ფოთლის ფირფიტის ფორმა, ნემსისებურად გრძელდებოდა, ღერო წვრილდებოდა, მუხლთაშორისების რაოდენობა არ იზრდებოდა. ზოგიერთი ყლორტი საერთოდ აჩერებდა ზრდა-განვითარებას, ზოგი კი პირიქით. მიკროყლორტის საშუალო სიგრძე 145 მმ, მუხლთაშორისების რაოდენობაც 8,5 და ადვენტური კვირტების საშუალო რაოდენობა 13,1 ერთეულს შეადგენდა. ეს მაჩვენებელი გაცილებით დაბალია საკონტროლოსთან შედარებით. ამიტომ ბაპ-თან ერთად გმ^3 გამოყენება მიზანშეწონილად მიგვაჩნია მხოლოდ დაბალი კონცენტრაციებით (1-2 მკმ). ამასთან მხოლოდ პირველი დათესვის დროს, რათა უფრო სწრაფად იქნეს გამოყვანილი კვირტი მოსვენების მდგომარეობიდან. შემდგომი სუბკულტივირების პერიოდში საკვებიდან გიბერელინის მჟავას გამორიცხვის შემდეგ ყლორტები უფრო კარგად იზრდებოდნენ, ვიდრე ეს აღინიშნებოდა საკვებ არეში გმ^3-ის შეტანამდე.

სტევიის კულტურისათვის ბაპ-ის 20 მკმ კონცენტრაცია ოპტიუმის ზედა ზღვარს წარმოადგენდა, ხოლო 5 მკმ ქვედა ზღვარს. ზედა ზღვარზე მეტი კონცენტრაციის გამოყენება იწვევდა კვირტების მაქსიმალურ დამოკლებას სიგრძეში, ექსპლანტი ღებულობდა ასიმეტრიულ, მორფოგენური კვანძების შემცველ ფორმას (სურ.17), კვირტის წარმოქმნისა და მიკროყლორტის განვითარებისთვის, რომელიც ჩართული იქნებოდა შემდგომ მორფოგენეტიკურ პროცესებში, საჭირო იყო დამატებითი ეტაპის

ე.წ. “გაზრდის” სტადიის გავლა, ჰორმონთა მინიმალური კონცენტრაციის შემცველ ან უჰორმონო საკვებ არეებზე.

მე-7 ცხრილში მოტანილია ბენზილამინოპურის სხვადასხვა კონცენტრაციათა გავლენა სტევიის იღლიური კვირტების განვითარებაზე.

ყლორტების ნორმალური ზრდა-განვითარება აღინიშნებოდა ყველა გამოყენებულ კონცენტრაციაზე. განსხვავდებოდა მხოლოდ შესწავლილი პარამეტრები, რომლებიც პროპორციულად იცვლებოდა კონცენტრაციათა მატების მიხედვით.

სურ.17. დამოკლებული და გამსხვილებული კვირტის
წარმოქმნა საკვებ არეზე B5+ ბაპ 28 მკმ

ცხრილი 17

ბენზილამინოპურინის სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა სტევიის იღლიური კვირტების განვითარებაზე

n=10

ბაპ კონცენტრაცია მკ მოლი	ყლორტის სიგრძე მმ		დიფერენცირებული კვირტების რაოდენობა ყლორტზე		კალუსის განვითარება
	4 კვირა	8 კვირა	4 კვირა	8 კვირა	

5 10 15 20	118 72,8 50 30	130 90 60 40	14,3 25,7 10,5 7,6	20,3 40,5 18 10	+ - - -

როგორც მე-8 ცხრილიდან ჩანს ციტოკინინების ბუნება გავლენას ახდენდა მიკროგამრავლების კოეფიციენტზე. სუბკულტივირების რიცხვის მატებასთან ერთად პროპორციულად მატულობდა გამრავლების კოეფიციენტიც. პირველი სუბკულტივირების ბოლოს იგი შეადგენდა 12 ერთეულს, ხოლო მე-5 სუბკულტივირების ბოლოს 68 ერთეულს.

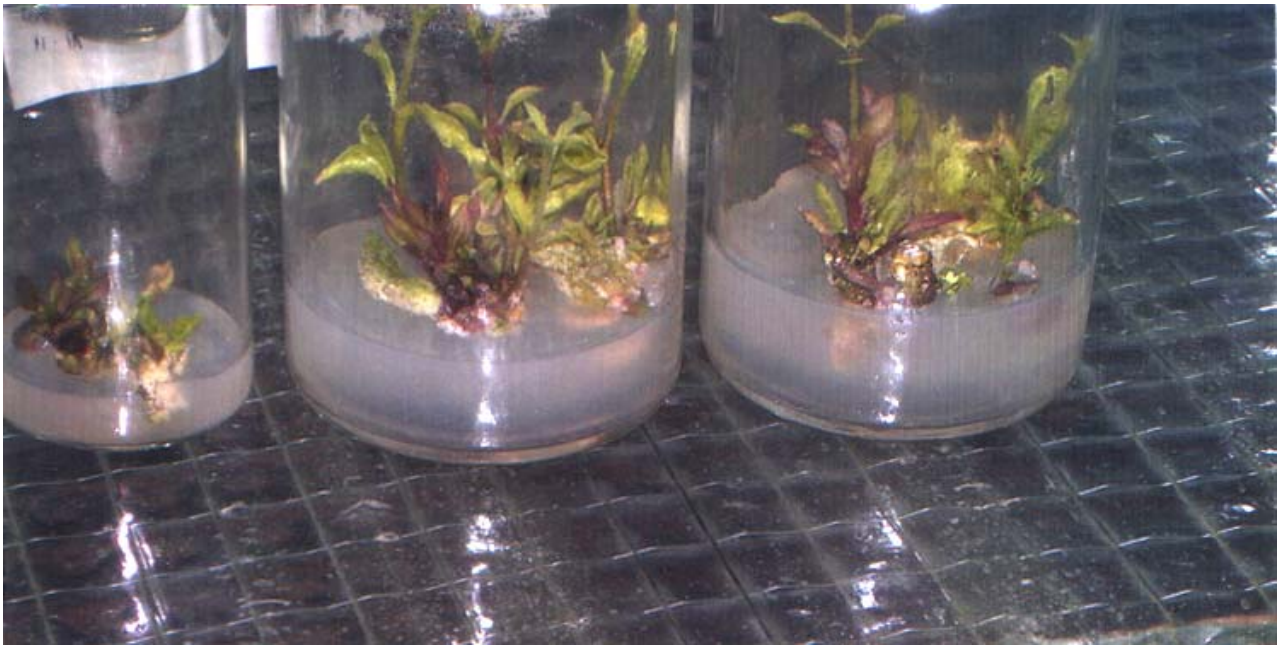
ცხრილი [1]8

ციტოკინინების გავლენა სტევიის კვირტების მიკროგამრავლების კოეფიციენტზე

n=10

ფიტოჰორმონები B_5+ 10 მკმ	გამრავლების კოეფიციენტი				
	I სუბკულ-ტივირება	II სუბკულ-ტივირება	III სუბკულ-ტივირება	IV სუბკულ-ტივირება	V სუბკულ-ტივირება
ბაპ კნ	12,0 8,0	23,6 28,8	38,0 40,0	50,0 55,0	61,0 68,0

ექსპერიმენტის ამ ეტაპზე შევისწავლეთ ციტოკინინებთან, კერძოდ ბაპ-თან ერთად ნმმ-ს გავლენა კვირტწარმოქმნის პროცესზე. როგორც მე-9 ცხრილიდან ჩანს სტევიის კულტურაში ადვენტური კვირტწარმოქმნა სტიმულირდებოდა ნმმ-ს დაბალი კონცენტრაციის შეტანით საკვებ არეში ბაპ-თან ერთად. იგი ხელს უწყობდა მორფოგენური კალუსის წარმოქმნას ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში. ეს პროცესი უფრო ინტენსიურად მიმდინარეობდა ნმმ-ს კონცენტრაციის (2;3 მკმ) გაზრდით ამ უკანასკნელ კალუსთა მორფოგენეტიკური პოტენციალი ძლიერდებოდა და მიკროგამრავლების კოეფიციენტიც იზრდებოდა (სურ.18) აუქსინების კონცენტრაციათა მატება არაეფექტური აღმოჩნდა, რადგანაც ადგილი ჰქონდა კალუსის მასურ წარმოქმნას და გამრავლების კოეფიციენტის შემცირებას.



სურ.18. ყლორტების წარმოქმნა ძირითადი ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში განვითარებული კალუსიდან. ნძმ-ს შემცველ საკვებ არეზე

ცხრილი 19

ბაპ-სა და ნძმ-ს ერთობლივი მოქმედება სტევიის მიკროკალმების პროლიფერაციაზე

ფიტოჰორმონები (მკმ) ბაპ : ნძმ	კალუსის ზრდის ინტენსივობა	კვირტების საშ. რაოდენობა	რიზოგენეზი
10 კონტროლი	+	18,9	-
10 1	++	23,6	-
10 2	+++	29,0	-
10 3	+++	34,0	+

გ) კულტივირების პირობების გავლენა

სტევიის მიკროგამრავლების პოტენციალის მაქსიმალური გამოვლენისათვის შევისწავლეთ ექსპერიმენტზე კულტივირების ფიზიკური პირობების გავლენა. აღმოჩნდა, რომ ამ პროცესზე მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ხელოვნური განათების რეჟიმი.

ექსპლანტთა კულტივირება ხორციელდებოდა 2-3 კილოლუქსის ლუმინესცენციური განათების პირობებში (ნათურა: დღის გრძელი ნათება-40):

ა) ფიტოპერიოდით – 12 საათი განათება : 12 სიბნელე;

ბ) ფიტოპერიოდით – 16 საათი განათება : 8 საათი სიბნელე;

გ) 24 საათი უწყვეტი განათება.

სამივე შემთხვევაში ჰაერის ტემპერატურა ფიტოტრონში შეადგენდა 26±1^{0}C .

ექსპერიმენტულ პირობებში ექსპლანტთა კულტივირებამ გვიჩვენა, რომ საუკეთესო შედეგი ახლდა მეორე რეჟიმს, კერძოდ ფოტოპერიოდით 16/8 საათი.

როგორც მე-10 ცხრილიდან ჩანს ინტენსიური კვირტწარმოქმნას, როგორც ადვენტურ, ასევე იღლიურ მერისტემთა გააქტიურებას, ადგილი ჰქონდა უწყვეტი განათების პირობებში (32,1), თუმცა აღსანიშნავია, რომ ამ დროს აპიკალური ყლორტების განვითარება ფიტოპერიოდთან შედარებით შენელებული იყო (4,0) წარმოქმნილ ყლორტებს ჰქონდათ ჩვეულებრივი მწვანე შეფერილობა, გამსხვილებული ღეროები დამოკლებული მუხლთაშორისებით.

ადვენტური კვირტების ინდუქცია და კვირტების აპიკალური დომინირება კორელაციურად მიმდინარეობდა 16/8 საათი ფოტოპერიოდის პირობებში. (სურ. 19). კვირტების საშუალო სიმაღლე შეადგენდა 100 მმ-ს, აპიკალურად დომინირებად კვირტებზე მიმდინარეობდა იღლიური კვირტების ინდუქცია, ექსპლანტებს ჰქონდათ მკვეთრი მწვანე შეფერილობა, ლამაზი ჰაბიტუსი და ლანცეტისებური ფოთლები.

კულტივირების შემდეგი რეჟიმი: 12/12 საათი ფოტოპერიოდით აძლიერებდა კვირტების აპიკალურ ზრდას და ზღუდავდა კვირტწარმოქმნას (სურ. 20) სიმაღლეში დომინირებად მზარდ ყლორტებს გააჩნდათ დაგრძელებული მუხლთაშორისები. ადვენტური კვირტების და მუხლთაშორისების რაოდენობრივი შემცირება გავლენას ახდენდა მიკროგამრავლების კოეფიციენტზე, თუმცა საკუთრივ მიკროგამრავლების

შემდეგ ეტაპებზე საწყისი ექსპლანტების საკმაოდ კარგი მარაგი იქმნებოდა ერთი იღლიური მიკროკალმების სახით.

ცხრილი [1]10

კულტივირების პირობების გავლენა მიკროყლორტების განვითარებაზე

ექსპლანტთა მახასიათებლები (n=10)	კულტივირების რეჟიმის პარამეტრები		
	12სთ განათება 12სთ სიბნელე	16 სთ განათება 8 სთ სიბნელე	24 სთ განათება
საკვები არე: B_5+ბაპ 10 მკმ +ნძმ 1 მკმ			
ადვენტური კვირტების საშუალო რაოდენობა ექსპლანტზე	18,0	23,6	32,1
კვირტების საშ. სიგრძე (მმ)	100,0	86,8	72,8
აპიკალურად დომინირებადი ყლორტების საშ. რაოდენობა	12,0	9,0	4,0

კარგად პროლიფერირებადი მასალის კულტივირებამ სიბნელეში გამოიწვია ადვენტური კვირტწარმოქმნის შეჩერება. ყლორტები თანდათანობით ეთიოლირდებოდა პიგმენტაციის შესუსტების ხარჯზე, სუბკულტივირების ბოლოს ვიტრიფიცირდებოდნენ, იწელებოდნენ სიგრძეში მუხლთაშორისების წარმოქმნის გარეშე. ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში ვითარდებოდა გაურკვეველი ეტიოლოგიის კალუსი, მისი მოთავსებისას ორგანოგენულ საკვებ არეზე, მიმდინარეობდა კვირტების მასიური რეგენერაცია.

ამდენად, შეიძლება დავასკვნათ, რომ სიბნელეში კულტურათა მოთავსება 10-14 დღის განმავლობაში დადებითად მოქმედებდა მიკროყლორტების ბაზალურ ნაწილში წარმოქმნილ კალუსში კვირტების ჩასახვაზე. თუმცა კიდევ უფრო ხანგრძლივად

სიბნელეში დაყოვნება (20) დღე აღარ იძლეოდა სასურველ ეფექტს. ადგილი ჰქონდა ორგანოთა ფორმირების შეჩერებას.

მიკროყლორტებისათვის სასარგებლო იყო განათების ინტენსივობა 2-3 კილოლუქსი. 2 კილოლუქსზე ნაკლები განათება იწვევდა დამატებითი კვირტების ჩასახვის და ინიცირების შენელებას, მაგრამ აღინიშნებოდა მთავარი ყლორტების დაჩქარებული ზრდა სიმაღლეში. 3 კილოლუქსზე მეტი განათება გარკვეულწილად აფერხებდა ძირითადი ყლორტის აპიკალურ დომინირებას და ააქტიურებდა იღლიურ დატოტიანებასა და ადვენტურ კვირტწარმოქმნას. ხანგრძლივად ძლიერი განათების პირობებში კულტივირება უარყოფითი შედეგებით მიმდინარეობდა. ზრდის პროცესი ჩერდებოდა და ფოთლები ყვითლდებოდა, სუბკულტივირების ბოლოს ცვიოდა კოლბაში, მაგრამ თვით იღლიური მძინარე კვირტები ნორმალურ პირობებში ინდუცირებდა ყლორტებს.

ექსპლანტთა ინკუბაციისათვის ოპტიმალურ ტემპერატურას, ისევე როგორც ბევრი სხვა კულტურისათვის, წარმოადგენდა 26±1^{0}C. ფიტოტრონის ტემპერატურული ინტერვალი მერყეობდა 24-27^{0}C-ს შორის. ამ ინტერვალზე მაღალ ან დაბალ ტემპერატურაზე მცენარეები ზრდა-განვითარების პროცესების უკუჩვენებას იძლეოდა. არ იზრდებოდნენ ან ზრდის ინტენსივობა მინიმალური იყო.

სურ. 19. ყლორტების განვითარება 16/8 საათი ფიტოპერიოდის პირობებში

სურ. 20. ყლორტების განვითარება 12/12 საათი ფიტოპერიოდის პირობები

თავი IV

სტევიის მიკროყლორტების დაფესვიანების თავისებურებათა შესწავლა

4.1. აუქსინების გავლენა მიკროგამრავლებასა და დაფესვიანების პროცესზე

მცენარე-რეგენერანტების მიღების მიზნით საწყის მასალად გამოყენებული იყო სტევიის მცენარის მუხლთაშორისები, რომელიც შეიცავდა 2 ლატერალურ და 1 აპიკალურ ზრდის წერტილს.

დაფესვიანებისათვის საკვებ არეს ვუმატებდით შემდეგი კონცენტრაციების ზრდის რეგულატორებს. ინდოლილერბომჟავა (იემ) 3-5-8 მკ მოლი, αα-ნაფტილძმარჟავა (ნმძ)- 3-5-8 მკ მოლი, ინდოლილ ძმარმჟავა – 3–5-8 მკ მოლი. ძირითადი საკვები არე შედგებოდა გამბორგის (B_5) მინერალური მარილებისაგან, როგორც სრული, ასევე განახევრებული ($\frac{1}{2}$) შემადგენლობით. როგორც შედგებმა გვიჩვენა მინერალური მარილებისა და ვიტამინების სრული შემადგენლობა აუქსინების თანაობით იწვევდა მასიურ კალუსოგენეზს ექსპლანტის (კვირტის) ბაზალურ ნაწილში. სუბკულტივირების ბოლოს ხშირ შემთხვევაში ექსპლანტი მთლიანად კალუსირდებოდა და მისი ზრდა სიმაღლეში აღარ ხდებოდა. (სურ. 21) იშვიათად ადგილი ჰქონდა კალუსის მორფოგენეზს, მაგრამ ასეთი ექსპლანტები აკლიმატიზაციისთვის გამოუსადეგარი იყო.

დაფესვიანების პროცესის შესწავლისათვის გამოვცადეთ რამდენიმე ხერხი:

1. აუქსინები შეგვქონდა უშუალოდ $\frac{1}{2}$ B_5 საკვებ არეში და მასზე ვთესავდით ყლორტებს.
2. კვირტებს ვთესავდით უჰორმონო, აგარიზებულ $\frac{1}{2}$ B_5 საკვებ არეზე
3. ყლორტებს 5-8 საათის განმავლობაში ვამუშავებდით აუქსინთა მაღალი კონცენტრაციის (80-100 მკმ) შემცველობის ხსნარით ასეპტიკურ პირობებში და შემდეგ გადაგვქონდა დასაფესვიანებლად უჰორმონო საკვებ არეზე.

დაფესვიანების გამოყენებული მეთოდებიდან ყველაზე ეფექტური და მისაღები აღმოჩნდა I ხერხი, რომელიც მიმდინარეობდა ყლორტის მაქსიმალურად სიმაღლეში

ზრდა-განვითარებით, პარალელურად კარგი ფესვთა სისტემის წარმოქმნით. (სურ. 2.2) საკვებ არეზე ექსპლანტის დათესვიდან მე-3-4 დღეს შეინიშნებოდა აპიკალური წერტილების ინიცირება, რომელიც გრძელდებოდა 3-4 კვირის განმავლობაში და სუბკულტივირების ბოლოს მიიღებოდა დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტები. თითოეულ ყლორტზე მუხლთაშორისების რაოდენობა შეადგენდა საშუალოდ 12 ერთეულს. ყლორტზე ფოთოლგანლაგება პარალელურია ე.ი. ერთი მცენარე-რეგენერანტი საშუალოდ შეიცავდა 22-24 იღლიურ კვირტს. დაფესვიანებული მცენარის მიკროყლორტები შეიძლება გამოყენებული იქნას გამრავლების შემდეგი ციკლისათვის, როგორც საწყისი ექსპლანტი. გამრავლების მეორე ეტაპზე ერთი წყვილი ფოთლებისა და ერთი მუხლთაშორისის შემცველი მიკროკალმიდან წარმოიქმნა ორი თანაბრად მზარდი მცენარე-რეგენერანტი საერთო ფესვებითურთ (სურ.22),

სურ. 21 სტევიის კალუსირებული კვირტები საკვებ არეზე: B_5 +ნძმ 10 მკმ

მუხლთაშორისების საშუალო რაოდენობა სუბკულტივირების ბოლოს შეადგენდა თითოეულისათვის 10-12 ერთეულს ე.ი. სულ 20-24 ექსპლანტს ერთი მუხლით და ორი მძინარე კვირტით. გამრავლების მესამე და შემდგომ ეტაპებზე კანონზომიერება მეორდებოდა ე.ი. გამრავლების კოეფიციენტი ყველა შემდგომ სუბკულტივირებისას იზრდებოდა არითმეტიკული პროგრესის შესაბამისად. დაფესვიანებულ მცენარე-რეგენერანტებს, რომელთა მუხლთაშორისების რაოდენობა შეადგენდა 10-15 ერთეულს ვაცლიდით 8-10 მუხლთაშორის მქონე აპიკალურ ნაწილს, ვყოფდით ერთ მუხლის შემცველ მიკროკალმებად და ვათავსებდით ახალ საკვებ არეზე გამრავლების შემდეგი ციკლისათვის, ხოლო 3-5 მუხლთაშორისის შემცველი დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტი გადაგვქონდა არასტერილურ პირობებში აკლიმატიზაციისათვის.

რაც შეეხება ფესვწარმოქმნის ინტენსიურობას, მორფოლოგიას, დატოტიანებას, იგი დამოკიდებული იყო აუქსინების ბუნებასა და კონცენტრაციაზე. როგორც ცხრილი მე-11-დან ჩანს იძმ-ს გამოცდილი კონცენტრაციები (3-5 –8 მკმ) ნაკლებ ეფექტური აღმოჩნდა, ვიდრე ნძმ და იემ.

იძმ-ს შემცველ საკვებ არეზე ფესვწარმოქმნის ინიცირება გვიან იწყებოდა და ხანგრძლივ პროცესს წარმოადგენდა, განვითარებული ფესვები მეტად სუსტი, ძაფისებრი ტიპის დაუტოტავი და შეუბუსავი იყო. რაოდენობა 4-9 ერთეულს შეადგენდა, ფესვების განვითარებას სჭირდებოდა 35-40 დღე.

ცხრილი [1]11

აუქსინების გავლენა მიკროკალმების ზრდა-განვითარებასა და დაფესვიანებაზე

ვარიან- ტი	ფესვთა რა-ბა (ცალი)	ერთი ფესვის სიგრძე (მმ)	ყლორტის სიგრძე (მმ)	მუხლთ-შორი-სების რ-ბა (ცალი)	კალუსის განვ-ბა (+) ან განვით-ბა (-)	დაფესვია-ნება %	დაფესვიან ების ხანგრძლი ვობა (დღე)
იემ 3	16,3	17,2	98,5	3,6	-	100	30
5	14,1	18,5	89,0	4,0	+	100	25
8	20,6	24,0	103,0	3,8	+	90	20
ნძმ 3	12,5	15,2	85,5	3,6	-	80	33
5	11,1	17,6	76,5	3,5	+	80	30
8	9,1	7,9	57,0	2,0	+	60	26
იძმ 3	4,1	12,0	50,0	3,8	+	50	40
5	6,0	6,0	42,6	2,0	+	50	35
8	9,0	10,2	10	0,5	+	40	35

იძმ-ს ყველა კონცენტრაციის შემცველ საკვებ არეზე მიმდინარეობდა მიკროკალმების დაფესვიანება, მაგრამ სუსტი ფესვთა სისტემის განვითერების გამო აკლიმატიზაციის პროცესში ისინი ვერ ახერხებდნენ მინერალური კვების უზრუნველყოფას მცენარის მიწისზედა ნაწილებისთვის. ეს კი განაპირობებდა მცენარე-რეგენერანტების ცუდად აკლიმატიზირებას და მათი უმეტესობა იღუპებოდა..

ნძმ-ს შეტანა საკვებ არეში იწვევდა იძმ-სთან შედარებით უფრო ძლიერ ფესვთა სისტემის განვითარებას. ზოგ შემთხვევაში ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში წარმოიქმნებოდა კალუსური ქსოვილი, განსაკუთრებით ინტენსიურად ეს აღინიშნებოდა 5 და 8 მკმ კონცენტრაციის შემცველ საკვებ არეეზე. კულტივირებიდან მე-20-25-ე დღიდან შეინიშნებოდა კალუსიდან რიზოიდების განვითარება, მათი რაოდენობა კულტივირების ბოლოს შეადგენდა 9-12 ერთეულს, რაც იძმ-ს ვარიანტთან შედარებით 3-8 ერთეულით მეტი იყო. ფესვთა კარგი სისტემის განვითარება აკლიმატიზაციის პროცესის უფრო ეფექტურად ჩატარების საფუძველს წარმოადგენდა დაფესვიანების ხანგრძლივობა შეადგენდა 30-35 დღეს. ნძმ-ს გამოცდილი კონცენტრაციებიდან მნიშვნელოვანი და ეფექტური იყო 8 მკ მოლი კონცენტრაცია, იგი აპირობებდა დაფესვიანებას 70 %-ით. უნდა ავღნიშნოთ, რომუფრო მაღალი კონცენტრაციის (10-12 მკმ) გამოყენებისას დაფესვიანების მაჩვენებელი კლებულობდა, რადგანაც ექსპლანტთა ქსოვილები იწყებდნენ დედიფერენცირებულ დაყოფას და კალუსი მთელ ექსპლანტს მოიცავდა სუბკულტივირების ბოლოს.

დაფესვიანებისთვის ძალიან კარგი აუქსინი აღმოჩნდა ინდოლილერბომჟავა, ყველა გამოცდილი კონცენტრაცია უზრუნველყოფდა მიკროკალმების დაფესვიანებას და ზრდა-განვითარებას. დაფესვიანების ხანგრძლივობა, როგორც მე-12 ცხრილიდან ჩანს შეადგენდა 25-30 დღეს. მცენარე-რეგენერანტებს სუბკულტივირების ბოლოს კარგად განვითარებული ფესვთა სისტემა ჰქონდათ (სურ. 22,23) ფესვები შებუსული და დატოტვილი იყო. ფესვთწარმოქმნას თან ახლდა ფესვისზედა მწვანე ნაწილის კორელაციური ზრდა-განვითარება, ზოგიერთ შემთხვევაში იღლიური მძინარე კვირტების ზრდის ინიცირებაც. მცენარე-რეგენერანტთა ასეთი ფორმით მორფო-გენეტიკური პოტენციალის გამოვლინება მოწმობს სტევიის მაღალ პლასტიკურობასა და ტოლერანტობას საკვები არის კონცენტრატების და ფიტოჰორმონების მიმართ. იეძ-ს

კონცენტრაციის მომატება იწვევდა კალუსოგენეზს, დაფესვიანების %-ის შემცირებას და მცენარე-რეგენერანტის მორფოლოგიურ ცვლილებებს. იმმ-ს შემცველ საკვებ არეზე დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტები ადვილად აკლიმატიზირდებოდნენ და ნორმალურად იზრდებოდნენ გრუნტში.

ცხრილი [1]12

აუქსინების მოქმედების ზოგიერთი მაჩვენებელი სტევიის მიკროკალმების დაფესვიანებაზე

აუქსინები მკ მოლი	დაფესვიანებ ის %	დაფესვიანების ხანგრძლივობა	ფესვის შებუსულობა	ფესვისზედა ნაწილის ზრდა-განვითარება
იმმ 3 5 8	50 60 60	90 38 35	- - +	+ - -
ნმმ 3 5 8	60 80 85	35 32 30	- - +	+ + -
იემ 3 5 8	 80 100 100	 30 25 25	 + + +	 + + +

დაფესვიანების II ხერხის გამოყენებით პრაქტიკულად არ მიმდინარეობდა სტევიის მიკროკალმების დაფესვიანება მწვანე ვეგეტირებადი ნაწილი კი სწრაფად ვითარდებოდა და იზრდებოდა სიმაღლეში. სუბკულტურების ბოლოს ზოგჯერ ადგილი ჰქონდა სპონტანური დაფესვიანებას, განვითარებული ფესვები ძალზე სუსტი-როზოიდული ტიპის იყო და ასეთი რეგენერანტები აკლიმატიზაციას არ ექვემდებარებოდნენ.

III ხერხის გამოყენებით შესაძლებელი გახდა დამუშავებული ყლორტების 35-40%-ის დაფესვიანება (ცხრილი 13) დაფესვიანების ხანგრძლივობა შეადგენდა 30-60 დღეს. გამოყენებული აუქსინების ხსნართა გავლენა დაფესვიანებაზე იზრდებოდა შემდგომი მიმართულებით იმმ ნმმ იმმ დაფესვიანების პროცენტი დაბალი იყო. იმმ-ს

ხსნარის გამოყენებისას (30-35%) ნძმ-თი დამუშავებული ყლორტებიდან დაფესვიანდა 50-65%, ხოლო იემ-ს ხსნარით დამუშავებული ყლორტებიდან დაფესვიანდა 60-70%. არცერთ ვარიანტზე ფესვწარმოქმნას არ უსწრებდა წინ

სურ. 22 დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტები
$\frac{1}{2}$ B_5+იემ 8 მკმ

სურ.23 იღლიური კვირტიდან განვითარებული ყლორტები საერთო ფესვებით

$\frac{1}{2}$ B5+იემ 5 მკმ

კალუსოგენეზი მხოლოდ აღინიშნებოდა ბაზალური ნაწილის საგრძნობი გამსხვილება და შემდეგ ხდებოდა ფესვების განვითარება. ფესვების განვითარებას თან ახლდა მიკროყლორტების ზრდა-განვითარება სიმაღლეში, მაგრამ იმის გამო, რომ დასაფესვიანებელი ხსნარით დამუშავების შემდეგ მასალა გადაგვქონდა საკვებ არეზე, ზრდა-განვითარების ინტენსიურობა არაადეკვატური იყო პოტენციალისა. დასაფესვიანებელ ხსნართა კონცენტრაციის გაზრდა ან შემცირება დაფესვიანების კოეფიციენტს ამცირებდა, ხოლო ექსპოზიციის გაზრდა უმნიშვნელო

ცხრილი [1]13

აუქსინთა წყალხსნარების გავლენა სტევიას ყლორტების დაფესვიანებაზე

ჰორმონები მკმოლი	ექსპოზიცია სთ	დაფესვიანების ხანგრძლივობა (დღე)	დაფესვიანების %	ფესვის შებუსულობა
იმმ 80 100	5	60 60	30 35	-
ნმმ 80 100	5	50 45	50 65	- +
იემ 80 100	5	40 30	60 70	+ +

ეფექტს იძლეოდა, შემცირება ახანგრძლივებდა დაფესვიანების პროცესს. ამ მეთოდით მიღებული მცენარე-რეგენერანტები აკლიმატიზირდებოდნენ კარგად და გრუნტში იზრდებოდნენ ნორმალურად.

4.2. მცენარე-რეგენერანტთა აკლიმატიზაციის პროცესის ოპტიმიზაცია

სტევიის დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტები, რომელთაც გააჩნდათ კარგად განვითარებული ფესვთა სისტემა, 4-6 გვერდითი ფოთოლი, იღლიური კვირტების ჩანასახით და კარგად მზარდი აპიკალური ნაწილით გადაგვქონდა

აკლიმატიზაციიათვის სპეციალურ სააკლიმატიზაციო ოთახში ან უშუალოდ ამ პროცესს ვახორციელებდით სათბურში.

აკლიმატიზაციისათვის განკუთვნილი მცენარე-რეგენერანტებს ვრგავდით სპეციალურ 40X50სმ და 18-20სმ სიმაღლის, ფუძეზე 1-2 სმ დიამეტრიც მქონე ნასვრეტებიან ყუთში. ყუთებში მცენარის ტროფიკული უზრუნველყოფისათვის და დარგვისათვის მოთავსებული იყო 8-10სმ სიმაღლეზე სპეციალური სუბსტრატი. კვების ოპტიმალურ ფართობს ამგვარ ყუთებში შეადგენდა 6X4 სმ, რაც სავსებით საკმირისი იყო 40-45 დღის განმავლობაში ნარგავების ზრდა-განვითარებისათვის.

სტევიის მცენარე-რეგენერანტების დარგვისათვის ვამზადებდით ორგვარ სუბსტრატს: 1. მიწისა და ქვიშის ნარევი 1:1 თანაფარდობით და 2. ქვიშისა და პერლიტის ნარევი 1:3 თანაფარდობით.

აღნიშნულ სუბსტრატს ვამდიდრებდით სპეციალური სასუქით. სასუქად ვიყენებდით მურასიგე სკოგის (MS) ან გამბორგის (B_5) ფორმულის მიხედვით მინერალური მარილებისა და ვიტამინების ხსნარებს. თავდაპირველად სრული შედგენილობით, ხოლო შემდეგ ეტაპზე ½1/2 ან 1/3 შედგენილობით. ხსნარებს წინასწარ ვასტერილებდით, რათა მორწყვის შემდეგ აკლიმატიზაციის პირველ პერიოდში სუბსტრატზე სწრაფად არ განვითარებულიყო ხავსნაირები. მცენარეთა სიცოცხლისუნარიანობის მაქსიმალურად გაზრდისათვის დარგვამდე ეტაპზე ვახორციელებდით მასალის გადარჩევას. პირველ რიგში უგულებელყოფას ექვემდებარებოდა ინფიცირებული მცენარეები, აგრეთვე სუსტად ან არასრულყოფილად განვითარებული ფესვთა სისტემის მქონე მცენარეები, დაზიანებული ღეროს ან ფოთლის მქონე რეგენერანტები.

სუბსტრატთან უკეთ შეგუებისა და ტრანსპირაციის შემცირებისათვის უმჯობესი იყო მცენარე-რეგენერანტების ღერო გადაგვეჭრა ბაზალური ნაწილიდან 2-3 იღლიური კვირტის (მუხლთშორისის) სიმაღლეზე. ამ პროცესის დაცვით მცენარე-რეგენერანტები უფრო კარგად აკლიმატიზირდებოდნენ, ვიდრე ფიზიოლოგიური სიმაღლე შენარჩუნებული მცენარე-რეგენერანტები. კოლბიდან გადარგვას ვახდენდით რაც შეიძლება სწრაფად და სუბსტრატში ვამაგრებდით მჭიდროდ, რათა არ წარმოქმნილიყო

სუბსტრატსა და მცენარის ფესვს შორის ჰაერი, რაც ხელს უშლიდა რიგ შემთხვევაში ნივთიერებათა შეწოვას და ადგილი ჰქონდა ამ უბნებში ფესვთა ნეკროზს.

სუბსტრატზე დარგვის შემდეგ ყუთებს ვახურავდით მინას ან პოლიეთილენის აპკს მჭიდროდ, რის მეშვეობითაც ნარგავი წარმოქმნიდა თავის მიკროკლიმატს. 6-7 დღის შემდეგ თანდათანობით ვამცირებდით ტენიანობას მიკროკლიმატის დარღვევის გზით. გამოწრთობა თავდაპირველად ხდებოდა დღის განმავლობაში 5-10 წუთით, ხოლო შემდეგ დღეებში იზრდებოდა ყოველი ხუთი წუთით, 7-8 დღის შემდეგ კი მინას აპკს სრულიად ვაცლიდით. ჰაერის გავლენით სუსტი მცენარე – რეგენერანტები იღუპებოდნენ. ლეთალური ეფექტი შეადგენდა 20-30%, ხოლო 70-80% მცენარეებისა ეგუებოდნენ სათბურის პირობებს. მცენარეებზე ვითარდებოდა იღლიური კვირტებიდან ყლორტები და საკმაოდ სწრაფად იზრდებოდნენ. 40 – 55 დღის შემდეგ მათი სიმაღლე 40 – 50 სმ-ს აღწევდა. ასეთი მცენარეები მზად იყვნენ გრუნტში გადასატანად (სურ.24).

აკლიმატიზაციის შედეგებმა გვაჩვენა, რომ სუბსტრატის სახით უმჯობესია გამოვიყენოთ მიწისა და ქვიშის ნარევი 1:1 თანაფარდობით. სუბსტრატზე აკლიმატიზაციის კოეფიციენტი შეადგენდა 80%, მაშინ როცა ქვიშისა და პერლიტის ნარევის გამოყენებისას ეს მაჩვენებელი 65-70% უტოლდებოდა, ამასთანავე პირველ სუბსტრატზე მცენარეები უფრო ინტენსიურად იზრდებოდა, ვიდრე მეორე სუბსტრატზე.

ჩვენი აზრით ეს გამოწვეული იყო იმით, რომ ბუნებრივი სუბსტრატი საკვების უფრო კარგი მიმწოდებელი იყო მცენარეებისათვის, ვიდრე ნახევრად ხელოვნური, ამასთანავე "პერლიტი" იჯირჯვებოდა ხსნარით და ძნელად თმობდა და ცუდათ აწვდიდა მასთან დაკავშირებულ ხსნარს, თუმცა აქვე უნდა ავღნიშნოთ, რომ ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით ბევრი ავტორი შესანიშნავად იყენებს "პერლიტი": ქვიშის ნარევს მცენარის აკლიმატიზაციისათვის, როგორც სუბსტრატს.

დადებითი ეფექტი ჰქონდა აგრეთვე სასუქების სახით მინერალური მარილებისა და ვიტამინების წყალხსნარების გამოყენებას. სანიმუშო ეფექტი ახლდა ორთავე: როგორც MS, ასევე B_5 ფორმულის შედგენილობის ხსნარებს. საუკეთესო იყო მინერალური მარილების მიხედვით 1/2 შედგენილობის ხსნარები.

გრუნტში გადატანილი მცენარე-რეგენერანტები სხვადასხვა ტემპით და სიჩქარით იზრდებოდნენ სიმაღლეში და იფოთლებოდნენ. ეს ფაქტორი დამოკიდებული იყო მცენარის გენოტიპის ტოტიპოტენტურობაზე, ასევე გრუნტის ტროფიკულ ფაქტორზე მიუხედავად იმისა, რომ ზრდა-განვიტარებით ერთი და იგივე ასაკის მცენარე-რეგენერანტები განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან და რაიმე კანონზომიერების დადგენა ამ კრიტერიუმის მიხედვით არ მოხერხდა.

აკლიმატიზაციის შემდგომ ეს აკლიმატიზირებული მცენარეები შესანიშნავად იზრდებოდნენ, ინტენსიურად იძლეოდნენ მწვანე მასას და თავისუფლად ყვავილობდნენ, როგორც მოკლე დღის მცენარეებისთვისაა დამახასიათებელი. შემოდგომაზე მიწის ზედა ნაწილები ხმებოდა და მეორე წელს ფესურებიდან ვითარდებოდა ახალი მცენარეები.

სურ. 24. სტევიის აკლიმატიზირებელი მცენარე-რეგენერანტები.

თავი V

მორფოგენეზი სტევიის კულტურაში

5.1. ზრდის რეგულატორების გავლენა ფოთლისა და ღეროს კალუსოგენეზის ინდუქციასა და პროლიფერაციაზე

ექსპლანტის სახით ექსპერიმენტში გამოვიყენეთ in vitro კულტივირებადი ყლორტებიდან იზოლირებული ერთი და იგივე ფიზიოლოგიური ასაკის ფოთლის ფირფიტის 10-12 მმ ზომის ფრაგმენტები. კულტურალურ ჭურჭლებს ექსპლანტებით კალუსის ინდუქციისათვის ვათავსებდით თერმოსტატში, სიბნელეში 25±1^0 C ტემპერატურაზე. სუბკულტივირება წარმოებდა ყოველ 25-28 დღეში.

კალუსოგენეზისათვის და წარმოქმნილი კალუსის შემდეგი პროლიფერაციისათვის B_5 საკვებ არეს ვუმატებდით აუქსინური და ციტოკინინური (ბაპ) ბუნების ჰორმონებს; საკვებ არეებში პირველი კომპონენტი (ჰორმონი) კონცენტრაციით რამდენჯერმე აჭარბებდა მეორეს, ხოლო ორგანოგენეზის გამოწვევისათვის მეორე კომპონენტის კონცენტრაცია ბევრად იზრდებოდა პირველთან შედარებით, ზოგიერთ შემთხვევაში პირველ კომპონენტს (აუქსინი) სრულებით გამოვრიცხავდით საკვები არის შედგენილობიდან და ვტოვებდით მხოლოდ ციტოკინინს. კალუსებს ვღებულობდით ნმმ, იემ, 2,4 დ-ს და ბაპ-ის შემცველ საკვებ არეებზე. თითოეული აუქსინი შეგვქონდა 2, 6, 10, 14 მკმ კონცენტრაციით, ხოლო ბაპ 2 მკმ კონცენტრაციით.

ექსპერიმენტის შედეგებმა გვიჩვენა, რომ სტევიის შერჩეული ექსპლანტები ხასიათდებოდა კალუსის ინდუქციის კარგი უნარით, მაგრამ კალუსის ინდუქციაზე, ზრდის ტემპზე, ქსოვილის ეტიოლოგიაზე, მორფოლოგიასა და მორფოგენეზზე გავლენას ახდენდა გამოყენებული აუქსინების ბუნება და კონცენტრაცია. უჰორმონო საკვებ არეზე კალუსის წარმოქმნა არ მიმდინარეობდა, (ცხრილი 14) ექსპლანტები საკვები არის ძირითადი კომპონენტების გავლენით მხოლოდ იზრდებოდნენ მოცულობაში, ფარავდნენ მყარი საკვები არის მთლიან ზედაპირს, უხეშდებოდნენ და სუბკულტივირების ბოლოს, დაახლოებით 22-25 დღის შემდეგ, ექსპლენტები ყვითლდებოდნენ დაბერების გამო.

კალუსის წარმოქმნა ძირითადად მიმდინარეობდა ფოთლის დისკის პერიფერიული ნაწილიდან, სადაც იზოლაციის დროს მოხდა დაზიანება, ცენტრისკენ და ფოთლის ღერძის გასწვრივ. პირველი კალუსური უჯრედი წარმოიქმნებოდა დათესვიდან მე-6-10 დღეს, რაც დამოკიდებული იყო აუქსინების ბუნებასა და კონცენტრაციაზე.

ექსპლანტის სახით ღეროს ფრაგმენტების გამოყენებისას კალუსის ინდუქცია იწყებოდა ღეროს ორივე ბოლოდან და მიემართებოდა ჭურჭლის კედლებისაკენ, პირველი კალუსური უჯრედი წარმოიქმნებოდა მე-8-12 დღეს და სუბკულტივირების ბოლოს (26-28 დღე) სრულებით ფარავდა ჭურჭლის დიამეტრს.

წარმოქმნილი კალუსების ეტიოლოგია და მორფოლოგია ორივე ექსპლანტის შემთხვევაში დამოკიდებული იყო აუქსინების ბუნებაზე. აღსანიშნავია, რომ ისინი განსხვავდებოდნენ კალუსის ინიციაციის დროის მიხედვითაც. 2.4 დ-ს მოქმედების შედეგად ექსპლანტებიდან კალუსის ინიციაცია იწყებოდა 3-4 დღით ადრე, ვიდრე ნმმ-ს და იემ-ს შემცველ საკვებ არეზე. წარმოიქმნებოდა ფაშარი, ვაკუილიზირებული, წყლის მაქსიმალური რაოდენობის შემცველი, დიდი ზომის უჯრედებისაგან შემდგარი ქსოვილი, რის გამოც კალუსი გამჭვირვალე იყო, ნმმ-ს შემცველ საკვებ არეზე განვითარდა მკვრივი, პატარა უჯრედებისაგან შემდგარი დაკუთხული მოყავისფრო-რძისფერი ან მოყვითალო-რძისფერი კალუსი, (სურ. 25), ხოლო საკვებ არეებზე, რომელთაც დამატებული ჰქონდა იემ ფორმირდებოდა საშუალო სიმკვრივის, შედარებით მსუბუქი ფორმის წვრილი და საშუალო ზომის უჯრედებისგან შემდგარი კალუსური ქსოვილი (სურ.26) იემ-ს მაღალი კონცენტრაციის შემცველ საკვებ არეებზე განვითარებული კალუსები ივითარებდნენ რიზოიდებს, რიზოგენეზი იწყებოდა 6 მკმ კონცენტრაციის არსებობისას (ცხრილი 14) და მათი სიხშირე იზრდებოდა კონცენტრაციათა მატებასთან ერთად, რიზოიდები ხასიათდებოდნენ დადებითი გეოტროპიზმით. რიზოიდები განსაკუთრებით იემ-ს მაღალი შემცველობის საკვებ არეზე (12-14 მკმ), უხვად იყო შებუსული, წარმოქმნის ადგილიდან 2-3 სმ სიგრძეზე ფესვები განსაკუთრებულად მსხვილი იყო, კონუსისკენ წვრილდებოდნენ და რაც უფრო მსხვილი იყო ფესვები, მით უფრო ნაკლები იყო შებუსულობა. ამ შემთხვევაში შებუსული იყო მხოლოდ კონუსი, ხოლო ის რიზოიდები, რომლებიც მთელ სიგრძეზე ერთნაირი

სიმსხოსი იყო თანაბარი სიხშირით იბუსებოდა. ამასთან ფესვების ზრდას თან ახლდა კალუსის პროლიფერაციის შეჩერება. ფესვწარმოქმნა ინტენსიური იყო სიბნელეში, იმ შემთხვევაში, როცა ფესვთა ზრდა აღარ იყო დამოკიდებული კულტივირების ფიზიკურ პირობებზე, ორივე რეჟიმში, როგორც სიბნელეში, ასევე სინათლეში ეს პროცესი თანაბარი მნიშვნელობისა იყო, ე.ი. ერთნაირი

სურ. 25 ფოთლური წარმოშობის კალუსი მიღებული B_5+ნძმ 14 მკმ + ბაპ 2 მკმ

სურ. 26 ფოთლური წარმოშობის კალუსი მიღებული

B_5+იემ 10 მკმ + ბაპ 2 მკმ

ინტენსიურობით ხასიათდებოდა. რიზოიდებიდან მეორადი კალუსის წარმოქმნა არ ხდებოდა. აღნიშნული კალუსებისათვის რიზოგენეზი წარმოადგენდა ორგანოგენული პოტენციალის გამოვლინებას, მასზე სხვა მორფოგენეტიკური პროცესების რეალიზება აღარ ხდებოდა. ასეთი კალუსები შემდეგი ეტაპების შესწავლისათვის ექსპერიმენტიდან გამოირიცხებოდა.

აქვე უნდა ავღნიშნოთ, რომ ფოთლისაგან წარმოქმნილი კალუსები ავლენდნენ ზემოთ აღნიშნულ კანონზომიერებას, ხოლო ღეროსაგან წარმოქმნილი კალუსები ხასიათდებოდნენ ზრდის ნელი ტემპით, კალუსის ინიციაცია იწყებოდა 2-4 დღის დაგვიანებით, თუმცა ნძმ-ს შემცველ საკვებ არეზე ზრდის პროცესი უთანაბრდებოდა ფოთლისგან წარმოქმნილი კალუსის ზრდის პარამეტრებს. ნძმ-სა და იემ-ს შემცველ საკვებ არეზე ღეროს ექსპლანტისგან წარმოქმნილი კალუსები მორფოლოგით თითქმის ერთნაირი იყო. 2.4 დ შემცველ საკვებ არეზე წარმოქმნილი კი იყო ნაკლებად ვაკუოლიზებული, შედარებით მკვრივი ფორმის. ზოგადად შეიძლება ვთქვათ, რომ

ყველა შესწავლილ აუქსინთა შემცველ საკვებ არეებზე წარმოქმნილი კალუსების მორფოლოგია არ ექვემდებარებოდა რაიმე კანონზომიერებას, ანუ პროლიფერაციის შედეგად წარმოქმნილ კალუსებს არ ჰქონდა ზრდის განსაზღვრული ფორმა და მიმართულება. ე.ი. განუსაზღვრელი ფორმის იყვნენ. ღეროსეულ კალუსზე წარმოქმნილი რიზოიდები ახალ საკვებ არეზე მეორადი კალუსის ინდუქციის უნარით ხასიათდებოდა. კერძოდ, რიზოიდების ზედა მხარეს ანუ კენწეროსკენ განვითარდა მეორადი კალუსი, კალუსის ეტიოლოგია მსგავსი იყო ძირითადი კალუსისა.

კალუსთა ზრდის ტემპი და პროლიფერაციის ინტენსიურობა პირდაპირპროპორციულ დამოკიდებულებაში იყო გამოყენებული აუქსინების კონცენტრაციასთან. მაგ. 0-ვან სუბკულტივირების 10 მკმ 2,4 დ ან 10 მკმ იემ-ს შემცველ საკვებ არეზე წარმოიქმნებოდა კალუსი, რომელიც ხასიათდებოდა (ცხრილი 14) "საშუალო" ზრდის ტემპით, მაშინ, როცა ზრდის რეგულატორების კონცენტრაციის გაზრდა (14-20 მკმ) ჯერადად და უფრო მეტად მნიშვნელოვნად აძლიერებდა კალუსწარმოქმნას და ჰქონდათ "კარგი" და "ძალზე კარგი" ზრდის ტემპი. საკვებ არეში აუქსინებთან ერთად ციტოკინინის, კერძოდ ბაპ-ის (2 მკმ) კონცენტრაციის შეტანა იწვევდა კალუსის პროლიფერაციის ინტენსიურობის გაძლიერებას. შესწავლილი იყო ბაპ-ის სხვადასხვა კონცენტრატები (1; 2; 3 მკმ), მაგრამ ყველაზე ოპტიმალური ეფექტი ჰქონდა 2 მკმ კონცენტრაციას. მხოლოდ აუქსინის, ციტოკინის გარეშე, შემცველ საკვებ არეზე კალუსის ინიციაცია, ინდუქცია და შემდგომი პროლიფერაცია შეფასდა, როგორც "კარგი" ზრდა, მაშინ როცა ციტოკინინი საკვებ არეზე გამოზრდილი კალუსები "ძალიან კარგი" ზრდით ხასიათდებოდნენ. რიზოგენეზიც ნაკლებ ინტენსიური იყო და კალუსების მორფოლოგიაც მნიშვნელოვნად განსხვავებული, უფრო დიდი რაოდენობით (5 მკმ და მეტი) შეტანა საკვებ არეში უარყოფით გავლენას ახდენდა კალუსის ზრდის ტემპზე, რადგან კორელაციური ბალანსი აუქსინ-ციტოკინინს შორის კალუსის ბიომასის ზრდის ინდუქციისათვის იხრებოდა ციტოკინინისაკენ, თუმცა ასეთ საკვებ არეებზე მიღებული კალუსების მხოლოდ მცირე რაოდენობა იყო მორფოგენური, ვიდრე აუქსინის გავლენით ციტოკინინთან ერთად მიღებული კალუსებისა.

როგორც [1]14 ცხრილიდან ჩანს კალუსის წარმოქმნა აუქსინთა ყველა შესწავლილ კონცენტრაციაზე მიმდინარეობდა, მაგრამ კალუსის აქტიური ზრდა აღინიშნებოდა 14

მკმ აუქსინის შემცველ საკვებ არეზე. გამოყენებული აუქსინებიდან ყველაზე ინტენსიურ კალუსოგენეზს იწვევდა 2,4 დ და მოქმედება მცირდებოდა შემდეგი მიმართულებით 2,4 დ→იძმ→იემ.

ცხრილი [1]14

კალუსოგენეზი სტევიის ქსოვილის კულტურაში

n=20

ფიტოჰორმონები მკმ				ექსპლანტის ტიპი (ფრაგმენტი)	კალუსის წარმოქმნის სიხშირე %	ზრდის ტემპი	ორგანოგენეზის ფორმა		
ნძმ	2,4 დ	იემ	ბაპ				რიზოიდი	ფოთოლი	კვირტი
0	0 -	0 -	0 -	ფოთოლი ღერო	- -	- -	-		
2	- -	- -	- -	ფოთოლი ღერო	65,6 58,1	+ +	- -		
6	- -	- -	- -	ფოთოლი ღერო	78,0 68,3	++ +	- -		
10	- -	- -	- -	ფოთოლი ღერო	80,0 75,6	+++ ++	- -		
14	- -	- -	- -	ფოთოლი ღერო	92,0 90,0	++++ +++	+ -		
14	- -	- -	2 -	ფოთოლი ღერო	94,8 91,0	+++++ ++	- -	++ +	++ +
-	2	-	-	ფოთოლი ღერო	73,2 62,0	++ +	- -		
-	6	-	-	ფოთოლი ღერო	80,.1 70,4	++ +++	- -		
-	10	-	-	ფოთოლი ღერო	100,0 90,0	+++ ++++	- -		
-	14	-	-	ფოთოლი ღერო	100 90,1	++++ ++++	- -		
-	14		2	ფოთოლი ღერო	100 93,1	+++++ ++++	- -		
-	-	2	-	ფოთოლი ღერო	50,7 51,2	+ -	- -		
-	-	6	-	ფოთოლი ღერო	69,3 61,1	++ +	+ -		
-	-	10	-	ფოთოლი ღერო	69,9 60,0	++ ++	+ +		
-	-	14	-	ფოთოლი ღერო	75,0 70,0	+++ ++	+ +		
-	-	14	2	ფოთოლი ღერო	81,1 80,0	+++++ ++++	+ +	++ +	+

+ - ცუდი ზრდა
++ - სუსტი ზრდა
+++ - საშუალო ზრდა

++++ - კარგი ზრდა
+++++ - ძალიან კარგი ზრდა

0-ოვანი და I-ლი სუბკულტივირების ცვლის შემდეგ კალუსების 1/2 ნაწილი გადაგვქონდა რეგენერაციულ საკვებ არეზე პროლიფერაციის და მორფოგენეტიკური პოტენციალის ხანგრძლივობის შესწავლისათვის. სუბკულტივირებათა რიცხვის მატებასთან ერთად ადგილი ჰქონდა კალუსების პროლიფერაციას, ახალი ზრდის ზონების წარმოქმნას და პარალელურად მორფოგენეტიკური პოტენციალის შენარჩუნებას 2,5-3 წლის განმავლობაში.

5.2. კალუსთა რეგენერაციული პოტენციალის შესწავლა

როგორც ზემოთ ავღნიშნეთ, კალუსების ½ ნაწილი გადაგვქონდა ორგანოგენულ საკვებ არეებზე, რომელთაც გააჩნდათ იგივე მინერალური შედგენილობა, განსხვავდებოდნენ მხოლოდ აუქსინ-ციტოკინინის თანაფარდობით, კერძოდ, ციტოკინინი საგრძნობლად ჭარბობდა აუქსინს, ზოგიერთ შემთხვევაში აუქსინი სრულებით გამოირიცხებოდა საკვები არის შედგენილობიდან.

ორგანოგენეზის ინდუქციისათვის კულტურალურ ჭურჭლებს ექსპლანტებით ვათავსებდით განათებაზე ფოტოპერიოდით 16/8 სთ, 26±1^{0}C ტემპერატურაზე. ორგანოგენურ საკვებ არეებზე სტევიას კალუსები განიცდიდნენ შემდეგი სახის ცვლილებებს:

1) 2,4 დ შემცველ საკვებ არეზე განვითარებული კალუსების ნაწილი:

   ა)ნეკროზირდებოდა და ლეთალური ეფექტით ხასიათდებოდა;

   ბ) ნაწილი აგრძელებდა სუსტი ტემპით ზრდა-განვითარებას, ვაკულიზებული უჯრედები მკვრივდებოდა, ღებულობდა ბაცი მომწვანო შეფერილობას, ეს პროცესი გრძელდებოდა 20-25 დღის განმავლობაში, შემდეგი სუბკულტივირების პირველ კვირაში იღუპებოდნენ, ისე რომ, რაიმე ორგანოგენური პროცესი არ აღინიშნებოდა;

2) ზოგიერთი აგრძელებდა ინტენსიურ ზრდა-განვითარებას მორფოგენეტიკური პოტენციალის გამოვლინების გარეშე და ღებულობდნენ მწვანე შეფერილობას;

3) ზოგიერთი კალუსური ქსოვილი ინდუცირებდა ფესვებს;

4) ზოგიერთი იძლეოდა მხოლოდ ერთეულ რეგენერანტს;

5) ზოგიერთი მათგანი ივითარებდა მორფოგენეტიკურ კვანძებს, რომელთა რეალიზება სრულყოფილ მცენარედ არ ხდებოდა;
6) კალუსური ქსოვილების უმეტესი ნაწილი დაახლოებით 80-85 % იძლეოდა მასიურ რეგენერაციას.

აქვე უნდა ავღნიშნოთ, რომ 2-6 პუნქტში აღნიშნულ ცვლილებებს განიცდიდნენ ერთი და იგივე პირველადი ექსპლანტიდან, ნძს-ს და იემ-ს შემცველ საკვებ არეებზე მიღებული კალუსური ქსოვილები.
ზემოთ აღნიშნული კალუსური ქსოვილის ეს თავისებურებები სტევიის კულტურაში მოწმობს მათ მაღალ ჰეტეროგენურობაზე, რომელიც წარმოიქმნება ექსპლანტთა დედიფერენციაციის პროცესში განვითრებისას.

მეორე პუნქტში აღნიშნული ინტენსიურად მზარდი კალუსური ქსოვილების მორფოგენეტიკური პოტენციალი განისაზღვრებოდა მხოლოდ ჰისტოლოგიური სტრუქტურების – ტრაქეიდებისა და ტრაქეების განვითარებით. ამგვარ კალუსებზე არავითარი ორგანოთწარმომქმნელი პროცესი არ მიმდინარეობდა.

მაღალი მორფოგენეტიკური პოტენციალის მქონე კალუსური ქსოვილების ზრდა-განვითარება ორგანოგენულ საკვებ არეზე 0-ვან სუბკულტივირებასთან შედარებით განსხვავებული იყო. ბიომასის ზრდის ინტენსიურობა მნიშვნელოვნად დაბალი იყო, სანაცვლოდ ადგილი ჰქონდა კალუსის გამწვანებას, პარალელურად მიმდინარეობდა მორფოგენეტიკური კვანძების ფორმირება და პირველადი ფოთლების წარმოქმნა. (სურ. 27) უფრო მოგვიანებით II-III სუბკულტივირებიდან მერისტემული უბნები ახალი ქსოვილების მასიური რეგენერაციის კერებად ჩამოყალიბდა და კალუსები უამრავი პატარა კვირტების და ყლორტების შემცველ სტრუქტურებად გადაიქცა (სურ. 29-30).

კვირტების მასიური რეგენერაცია კალუსური ქსოვილიდან დამოკიდებული იყო ერთის მხრივ იმ ფაქტორზე თუ რომელი აუქსინის შემცველ საკვებ არეზე იქნა მიღებული პირველადი კალუსი, ხოლო მეორეს მხრივ ორგანოგენური საკვები არე რომელ ციტოკინინს შეიცავდა და როგორი კონცენტრაციით.

როგორც კვლევის შედეგებმა გვიჩვენა, ყველაზე მაღალი მორფოგენეტიკური პოტენციალით ხასიათდებოდა ნძმ-ს ზემოქმედებით ინდუცირებული კალუსები (ცხრილი 15). ამ კრიტერიუმით სულ ცოტათი ჩამორჩებოდა ის კალუსები, რომლებიც

მიღებული იქნა იემ-ს შემცველ საკვებ არეზე.აქვე უნდა ავღნიშნოთ, რომ იემ-ს მაღალი კონცენტრაციის (16,20,22, მკმ) შემცველ საკვებ არეზე კალუსების მიღება არაეფექტურია მასიური რეგენერაციის მისაღებად, რადგანაც ადგილი ჰქონდა რიზოგენეზს. კალუსებზე წარმოქმნილი ფესვები მორფოლოგიურად განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან. ეს განსხვავება დამოკიდებული იყო აუქსინთან ერთად საკვებში შეტანილი ციტოკინინის ბუნებასა და კონცენტრაციაზე, რაც მეტი იყო საკვებში იემ და ნაკლები ბაპ და ზეატინი ცალ-ცალკე, მით უხვი იყო რიზოგენეზი, ეს უკანასკნელი კი უფრო ინტენსიურად მიმდინარეობდა ზეატინისა და ინდოლიილერბომჟავას შემცველ საკვებ არეზე, ვიდრე ბაპ-ის თანაობისას. იემ გავლენით მიღებული კალუსების რიზოიდების მორფოგენეზური პოტენციალის გამოვლენა არ წარმოადგენდა ექსპერიმენტის მიზანს. თუმცა რიზოგენეზიც მორფოგენეზის ერთ-ერთი ფორმაა.

მიუხედავად იმისა, რომ 2,4 დ-ს შემცველ საკვებ არეზე მიღებული კალუსები ინტენსიური ზრდით ხასიათდებოდა ორგანოგენულ საკვებ არეზე. ისინი წყვეტდნენ ზრდა-განვითარებას და ნეკროზირდებოდნენ. მათი ორგანოგენური პოტენციალი თითქმის ნულის ტოლი იყო, თუ არ ჩავთვლით თითო-ოროლა შემთხვევას კვირტის რეგენერაციის (სურ. 31). რეგენერირებული მარტოული კვირტები სწრაფი ზრდით ხასიათდებოდნენ (სურ.32) და ჩვეულებრივად ფესვიანდებოდნენ დასაფესვიანებელ საკვებ არეზე. რადგანაც ეს კალუსები მასიური რეგენერაციის უნარს არ ავლენდნენ, ისინი შემდეგი სუბკულტივირების პროცესიდან უგულებელყოფილი იქნენ.

სურ. 27. მორფოგენეტიკური კვანძების ფორმირება და პირველადი ფოთლების წარმოქმნა საკვებ არეზე: B_5+ბაპ 10მკმ + ნძმ 5მკმ

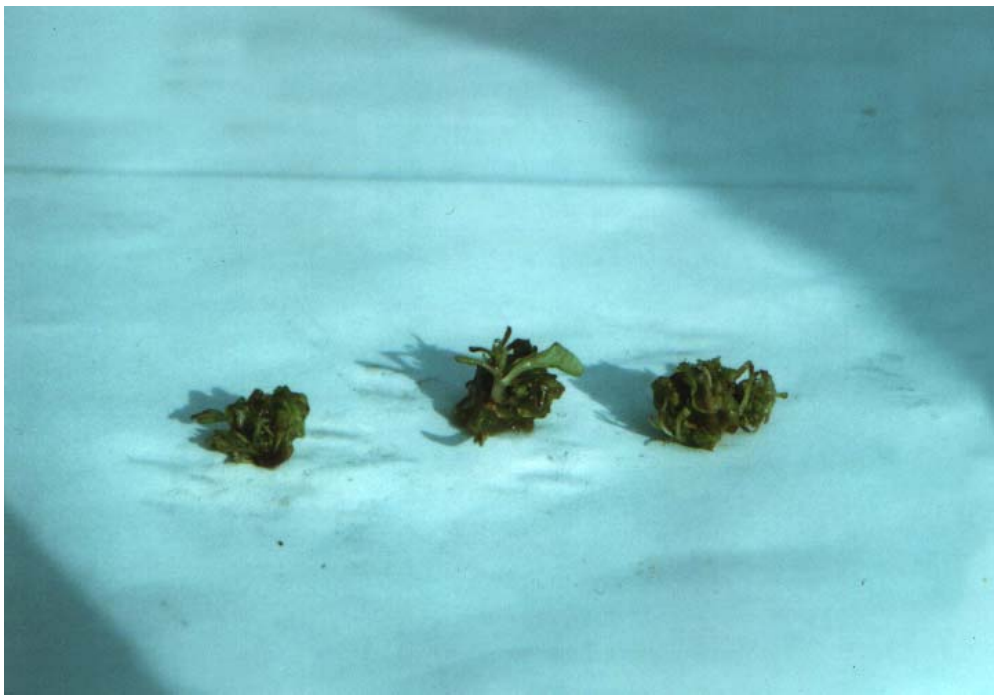
სურ.28. კვირტების რეგენერაცია კალუსიდან საკვები არე

B_5+ბაპ 15მკმ+ნძმ 5 მკმ

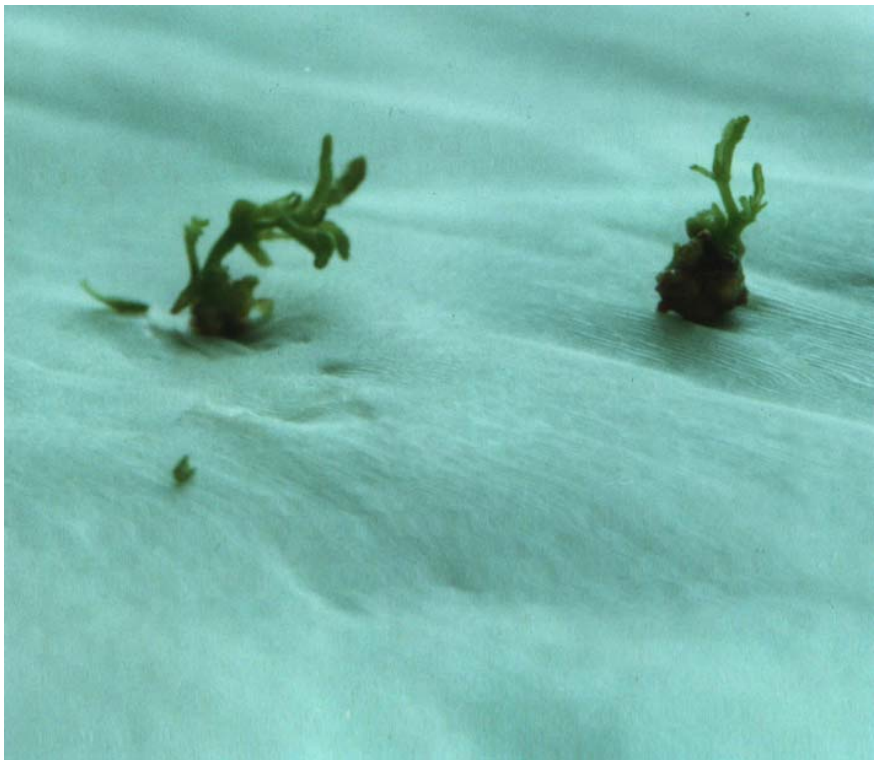
სურ. 29. კვირტების მასიური რეგენერაცია და ყლორტების განვითარება კალუსიდან ინდუქციურ საკვებ არეზე. B_5+10 მკმ ნძმ+კმკმ ნძმ

სურ. 30. მასიური ყლორტების განვითარება საკვებ არეზე:

B_5+10მკმ ბაპ+ 1მკმ ნძმ



სურ.31. მარტოული კვირტების რეგენერაცია 2,4-_დ შემცველ საკვებ არეზე მიღებული კალუსიდან ორგანოგენურ საკვებ არეზე: B_5+ 15 მკმ +ნძმ 1მკმ



სურ.32. მარტოული ყლორტების განვითარება 2,4_ დ-ს შემცველ საკვებ არეზე მიღებული კალუსიდან

სხვადასხვა ჰორმონალური შედგენილობისა და კონცენტრაციის საკვებ არეზე კალუსების მორფოგენეტიკური პოტენციალი საგრძნობლად განსხვავდებოდა ერთმანეთისაგან. რეგენერაციის რეალიზაციისთვის ნძმ-სა და იემ-ს (დაბალი კონცენტრაციის) გავლენით ინდუცირებული კალუსები გადავიტანეთ საკვებ B_5 არეზე, რომელთაც ჰორმონების სახით დამატებული ჰქონდა ბაპ 5; 10; 15 მკმ და აუქსინები (ნძმ, იემ) 1;5 მკმ კონცენტრაციით. აღმოჩნდა, რომ (ცხრილი 15) კალუსთა რეგენერაციულ უნარზე გავლენას ახდენდა ბაპ და ნძმ გარკვეულ კონცენტრაციათა თანაფარდობა. როგორც მე-15 ცხრილიდან ჩანს სხვადასხვა კონცენტრაციის ჰორმონების შეტანა საკვებ არეებში იწვევს კალუსების მორფოგენეტიკური პოტენციალი გამოვლინების სხვადასხვა ფაქტს.

ცხრილი 15

ზრდის რეგულატორების გავლენა სტევიის ფოთლის კალუსური ქსოვილის რეგენერაციულ პოტენციალზე (III სუბკულტივირება)

n:10

ფიტოჰორმონები: მკმ				რეგენერირ-ებად კა-ლუსთა სიხშირე %	რეგენერირებუ-ლი კვირტების და ყლორტების საერთო რაო-დენობა	კვირტების საშუალო რაოდენობა კალუსზე	რიზოგენეზი %
ბაპ	ზე	ნძმ	იემ				
5	-	-	-	60	40	7,0	-
10	-	-	-	80	52	10,0	-
15	-	-	-	80	75	18,0	-
5	-	1	-	60	70	11,6	-
10		1	-	91	150	16,3	-
15	-	1	-	86	189	22,0	-
5	-	5	-	92	89,2	9,7	-
10	-	5	-	100	200	20,0	-
15	-	5	-	95	220	23,2	-
10	-	-	1	85	149	17,6	7
10	-	-	5	94	180	21,2	10
	10	1	-	83	100	12,0	-
	10	5	-	92	140	15,2	-

	10 10	- -	1 5	80 90	102 124	12,8 13,8	11 15

ბაპ-ის დაბალი კონცენტრაცია (5 მკმ) განაპირობებდა ორგანოგენეზის ინდუქციას, რეგენერაციის სიხშირე შეადგენდა 60%-ს, რეგენერირებული კვირტების და ყლორტების საერთო რაოდენობა 70-ს, ბაპ-ის კონცენტრაციის მომატება (10-15 მკმ) უდაოდ აძლიერებდა კალუსის რეგენერაციულ პროცესს, კერძოდ კალუსში უკვე ჩასახული ორგანოსტრუქტურებისა და კვირტების განვითარებას. რეგენერაციის სიხშირე შეადგენდა 86-100%-ს. (ცხრილი 15), ხოლო წარმოქმნილი კვირტებისა და ყლორტების საერთო რაოდენობა 89,2 -220 ერთეულს (სურ. 33; 34). ბაპ-ის გამოყენებული კონცენტრაციები კალუსურ ქსოვილებზე იწვევდა მაქსიმალური რაოდენობით ახალ-ახალი მორფოგენეზური კვანძების გაჩენას. Aახალი უბნების წარმოქმნა მიმდინარეობდა ჯგუფებად, რომელთაგან ერთდროულად ვითარდებოდა 5-8 კვირტის აპიკალური ნაწილები. პირველი ჯგუფის წარმოქმნას თან მოჰყვებოდა მეორე ჯგუფის წარმოქმნა. შემდეგ მესამე და ა.შ. კალუსი თანდათანობით იფარებოდა კვირტებით (სურ. 33-34). კვირტთა ჯგუფების წარმოქმნა კალუსზე ხდებოდა ასიმეტრიულად ანუ ზოგჯერ ცენტრალური ნაწილიდან და ზოგჯერ პერიფერიულიდან. კვირტთა ჯგუფები თანდათანობით ეწეოდნენ ერთმანეთს ზრდა-განვითარებაში. რეგენერაციული კვირტების ჯგუფების დანაწილებას ახალ, იგივე შედგენილობის საკვებ არეზე მივყავდით ნორმალური ფენოტიპის მქონე კვირტებისა და ყლორტების დაჩქარებულ განვითარებამდე, რაც გამოწვეული იყო საკვები ნივთიერებების განახლებით და კარგად მიწოდებით. აღსანიშნავია, რომ ახალ საკვებ არეებზე კვირტების კონის ზრდა-განვითარებასთან ერთად მიმდინარეობდა de novo კვირტების ფორმირება, ეს კი თავისთავად ზრდიდა რეგენერაციის კოეფიციენტს.

ღეროსეული მორფოგენეზის მაქსიმალური გამოვლენა აღინიშნა საკვებ არეებზე ბაპ და ნძმ-ს თანაობისას, სადაც მათი თანაფარდობა შეადგენდა 10:5 მკმ; 15:5 მკმ შესაბამისად. აღნიშნულ კონცენტრაციებს დამაჯერებლად შეიძლება ვუწოდოთ ჰორმონთა ოპტიმალური რაოდენობა. ბაპ-ის გაზრდა 20 მკმ და 25 მკმ კონცენტრაციამდე ინდუცირებდა ორგანოგენეზს, მაგრამ აღმოჩნდა, რომ ეს კონცენტრაციები იწვევდა უფრო მეტად მორფოგენური კვანძების დიდი რაოდენობით

წარმოქმნას კალუსზე, ვიდრე აკვირტოგენეზს. საჭირო იყო წარმოქმნილი მორფოგენური კვანძების გადატანა დაბალი კონცენტრაციის ჰორმონთა შემცველ საკვებ არეებზე, რათა რეგენერირებულიყო კვირტები.

სურ. 33. მასიური კვირტების წარმოქმნა საკვებ არეზე:

B_5 + ბაპ+15 მკმ+ნძმ 5 მკმ

სურ. 34. მორფოგენეტიკური კვანძების განვითარება და კვირტების რეგენერაცია ალაგ-ალაგ ყლორტების დომინირებით

როგორც ცხრილი 15-დან ჩანს საკვებ არეში აუქსინის სახით ნძმ-ს დამატება ხელს უწყობდა კვირტების რეგენერაციას. გამოყენებული კონცენტრაციიდან უფრო ეფექტური იყო 5 მკმ კონცენტრაცია. იგი განაპირობებდა რეგენერაციის პროცესის ნორმალურად მიმდინარეობას და მისი გავლენით წარმოქმნილი კვირტები კარგი ზრდა-განვითარებით ხასიათდებოდა. ნძმ-ს გამორიცხვა საკვები არედან გარკვეულ წილად აქვეითებდა კალუსების რეგენერაციულ მახასიათებლებს (ცხრილი 15). ნძმ-ს 5 მკმ-ზე მაღალი კონცენტრაცია (8 მკმ) იწვევდა კალუსოგენეზს უფრო ინტენსიურად, მორფოგენეტიკური კვანძების შემცირებას და ნორმალური მორფოლოგიის მქონე კვირტების განვითარებას. წარმოქმნილ ყლორტებს ჰქონდათ მსხვილი გაუხეშებული ღეროები, მუხლთაშორისების განვითარების გარეშე, შეუფოთლავი ვარჯი, აპიკალურ ნაწილში განუვითარებელი ჩანასახოვანი ფოთლებით.

ექსპლანტთა მსგავსი პასუხი აღინიშნა საკვებ არეში ბაპ-თან ერთად იემ-ს შეტანისას. რეგენერაციის ინდუქცია აღინიშნა ექსპლანტის დათესვიდან 8-12 დღის შემდეგ, ხოლო მე-16-18 დღიდან მთლიანად დაიფარა ექსპლანტი კვირტებით. ბაპ და იემ-ს თანაფარდობის შემცველი საკვები არეების გამოყენებამ გვიჩვენა, რომ ისინი გავლენას ახდენენ რეგენერაციული პოტენციალის გამოვლინების რიცხობრივ მაჩვენებლებზე (ცხრილი 15). აქვე უნდა ავღნიშნოთ, რომ იემ შემცველ საკვებ არეზე რეგენერირებული ყლორტები უფრო კარგად ფესვიანდებოდა, ვიდრე საკვებ არეზე მიღებული ყლორტები. რაც შეეხება ბაპ-ის ნაცვლად ზეატინის ზემოქმედებას
მორფოგენეზულ პროცესებზე მსგავსი იყო, პრინციპული განსხვავება, გარდა რეგენერაციის კოეფიციენტისა არ აღნიშნულა.

აღმოჩნდა, რომ 0-სუბკულტივირების პროცესში სხვადასხვა აუქსინის გავლენით მიღებული კალუსების რეგენერაციული პოტენციალი განსხვავდებოდა ერთმანეთისაგან (ცხრილი 16). ჰორმონთა ბუნების გავლენა აისახა ექსპლანტების უჯრედების დედიფერენციაცაზე, მათ ტოპიპოტენცურობასა და შესაბამისად

ომნიპოტენტურობაზეც, კერძოდ, კალუსებზე მორფოგენეტიკური კვანძების ფორმირებასა და მათ რეალიზაციაზე, ფორმირების დროსა და ინდუქციაზე, რიზოგენეზის განვითარებაზე.

ცხრილი 16

აუქსინების ბუნების გავლენა კალუსთა რეგენერაციულ პოტენციალზე

(I-სუბკულტივირება)

n=10

უქსინები	კალუსის ზრდის ინტენსიურობა	კონსისტენცია	მორფოგე-ნურობა	პირველი რეგენერანტის წარმოქმნის ხანგრძლივობა (დღე)	რეგენე-რაცია საშ. რ-ბა
2,4_დ	++++	ფხვიერი	დაბალი	25-28	11,6
ნმმ	+++	მკვრივი	ძალიან კარგი	15-18	70,0
		დაკუთხულ-კვანძოვანი	კარგი (კვირტები+		
იემ	+++	მკვრივი	რიზოიდები)	18-22	58,0
		დაკუთხული			

ყველა ამ პროცესზე პასუხს აგებს კალუსური ქსოვილის ნებისმიერი უჯრედი, რომელიც ზრდის რეგულატორების გავლენით თავის თავზე იღებს პასუხისმგებლობას მოიქცეს ზიგოტური უჯრედის მსგავსად _ დასაბამი მისცეს სომატურ ჩანასახებს, კალუსური ქსოვილის მორფოგენეტიკური პოტენციალი ვლინდებოდა მთელი ექსპერიმენტის განმავლობაში, მანამ, სანამ კალუსების მოცულობა არ შემცირდა მინიმუმამდე.

ღეროსეული წარმოშობის კალუსური ქსოვილების მორფოგენეტიკური პოტენციალი ფოთლიდან მიღებული კალუსური ქსოვილებთან შეადარებით დაბალი იყო. თუმცა უნდა ავღნიშნოთ, რომ ღეროს ფრაგმენტები, როგორც ექსპლანტი შესანიშნავად შეიძლება იქნას გამოყენებული სტევიის კულტურაში მორფოგენეტიკური პროცესების შესწავლისათვის.

სტევიის კულტურაში აღინიშნა პირდაპირი რეგენერაციის შემთხვევებიც ანუ სომატური ქსოვილი კალუსოგენეზის სტადიის გავლის გარეშე იძლეოდა ადვენტურ კვირტებს (სურ.35) წარმოქმნილი კვირტების სტატისტიკა მაღალი იყო. აღნიშნული

პროცესი დამოკიდებული იყო საკვებ არეში შესწავლილ ჰორმონთა კონცენტრაციასა და თანაფარდობაზე. იმ საკვებ არეებზე, რომელიც შეიცავდა ციტოკინინის (ბაპ) მაღალ რაოდენობას (20-25 მკმ) და აუქსინის (ნმმ) დაბალ კონცენტრაციას (1-5 მკმ) მიმდინარეობდა ექსპლანტის ტოტიპოტენზურობის გამოვლენა პირდაპირი რეგენერაციის სახით დედიფერენციაციის გვერდის ავლით. Pპირველადი ექსპლანტის კულტივირება ხდებოდა უშუალოდ განათებაზე. ექსპლანტი თავდაპირველად იზრდებოდა მოცულობაში, მსხვილდებოდა ქსოვილი, ცოტათი უხეშდებოდა, იქმნებოდა შთაბეჭდილება, რომ ქსოვილი იწყებდა კალუსოგენეზს, კერძოდ უჯრედები იბერებოდა და თითქოს ვიტრიფიცირდებოდა, სწორედ ამ ეტაპზე ჩნდებოდა სომატური ემბრიო-მსგავსი სტრუქტურები ექსპლანტის ცენტრალურ ნაწილში და კვირტები ვითარდებოდა მყისიერად, ორგანიზებულად იზრდებოდნენ და ქმნიდნენ ექსპლანტის შუა ნაწილში კვირტების კოლონიას.

კვირტები ახალ ჰორმონების მინიმალური კონცენტრაციის შემცველ საკვებ არეზე გადათესვის შემდეგ იზრდებოდნენ კარგად და კარგადაც ფესვიანდებოდნენ, ექვემდებარებოდნენ აკლიმატიზაციას.

არაპირდაპირი და პირდაპირი გზით მიღებული კვირტების ფენოტიპი ვიზუალურად არ განსხვავდებოდა ერთმანეთისაგან, თუმცა რიგ შემთხვევაში მორფოლოგიური ვარიანტების გამოყოფა შესაძლებელი იყო. სომაკლონალური ცვალებადობის მოლეკულურ დონეზე შესწავლა მოგვცემდა სრულ სურათს ვარიაბელობის გენეტიკური ბუნების შესახებ მოცემულ შემთხვევაში.

5.3.კულტივირების ფიზიკური პირობების გავლენის შესწავლა

შესწავლილი ფიტოჰორმონების განსაზღვრული კონცენტრაციისა და ბუნების გავლენის გარდა სტევიის მორფოგენეტიკურ პოტენციალზე გავლენას ახდენდა კულტივირების ფიზიკური პირობები. 0-სუბკულტივირების პროცესში კულტურების ინკუბაცია წარმოებდა რამდენიმე რეჟიმად:

1) 1/3 ნაწილი სიბნელეში, თერმოსტატში 25±1^{0}C ტემპერატურაზე, 30 დღის განმავლობაში.

2) 1/3 ნაწილი სიბნელეში, თერმოსტატში 25±1^{0}C ტემპერატურაზე 30 დღის განმავლობაში, შემდგომ განათებაზე გადატანით, განათება 2-3 კილოლუქსი. ფოტპერიოდი 16/8 საათი, 27±1^{0}C ტემპერატურა.
3) 1/3 ნაწილი უშუალოდ განათებაზე ფიტოტრონში, ზემოთ აღნიშნულ პირობებში.

ექსპერიმენტის შედეგებმა გვიჩვენა, რომ კალუსოგენეზზე და შემდგომში მასზე კვირტების ინდუქციასა და განვითარების სიხშირეზე დადებით გავლენას ახდენდა I რეჟიმი.

სურ. 35. პირდაპირი რეგენერაცია ფოთლის ფირფიტის ექსპლანტიდან საკვებ არეზე B_5+ბაპ 20 მკმ ნმმ 5 მკმ

სიბნელე ხელს უწყობდა ინტენსიურ კალუსოგენეზს, ბიომასის ზრდის ინდექსი მაღალი იყო. წარმოქმნილი კალუსი მოთეთრო-რძისფერ შეფერილობას ატარებდა. ამ რეჟიმში მიღებული კულტურების მორფოგენეტიკური და ორგანოგენეტიკური პოტენციალი გაცილებით მაღალი იყო შესაბამის საკვებ არეზე გადატანის შემდეგ (ცხრილი 17).

მეორე რეჟიმის გავლენით მიღებული კულტურების მორფოგენეტიკური პოტენციალი რამდენადმე ჩამორჩებოდა დროში I რეჟიმის კულტურებს. კალუსოგენეზი სინათლეზე გადატანის დროს ჯერ კიდევ არ იყო დასრულებული და პროლიფერაცია გრძელდებოდა სინათლეზეც დაახლოებით კიდევ 5-6 დღე, ამ პერიოდისათვის კალუსის შეფერილობა მოთეთრო რძისფერი შეიცვალა მწვანეთი, ბიომასის ზრდას თან ახლდა მორფოგენეტიკური კვანძების ფორმირება II-სუბკულტივირების პროცესში, რომელთა რეალიზაციისთვის საჭირო იყო უკვე საკვები არის ზრდის რეგულატორების ბალანსის ცვლილება ციტოკინინების უპირატესობით. კვირტების რეგენერაციისა და განვითარების კანონზომიერებანი შემდგომ პერიოდში მსგავსი იყო I რეჟიმის კალუსებისა (ცხრილი 17). Mმესამე რეჟიმში ექსპლანტების კულტივირებას სასურველი ეფექტი არ ახლდა. სინათლეზე ექსპლანტებს უჭირდათ კალუსის ინდუქცია, თუმცა ზოგ შემთხვევაში აღინიშნებოდა დედიფერენცირებული დაყოფა. უმეტესად პირველადი ექსპლანტის ქსოვილები მატულობდნენ ზომაში, მსხვილდებოდნენ და უხეშდებოდნენ, სუბკულტივირების ბოლოს უვარგისი ხდებოდნენ შემდგომ სამუშაოებში ჩართვისათვის.

მ.შ. კარგად მზარდი კულტურების მიღებისათვის რეჟიმის გავლენა იზრდებოდა შემდეგი მიმართულებით III რეჟიმი→II რეჟიმი → I რეჟიმი.

ცხრილი [1]17

კულტივირების პირობების გავლენა კალუსოგენეზსა და ორგანოგენეზზე

კულტივირების პირობები	კულტივირების რაოდენობა	კალუსის ზრდის ინტენსიურობა	ორგანოგენეზის ინტენსიურობა	რეგენერირებული კვირტების რაოდენობა
I რეჟიმი (სიბნელე)	10	++++	++++	220
II რეჟიმი (სიბნელე-სინათლე)	10	+++	+++	180
III რეჟიმი (სინათლე)	10	+	-	-

5.4 რეგენერანტების მორფოლოგიური დახასიათება

ექსპერიმენტის ბოლო ეტაპს წარმოადგენდა მცენარე-რეგენერანტების ფენოლოგიურ თავისებურებათა შესწავლა ღია გრუნტში. Aმის აუცილებლობა განაპირობა მორფოლოგიური ნიშან-თვისებების ცვალებადობის საკმაო ფართო სპექტრის არსებობამ.

ერთი თვის აკლიმატიზირებული მცენარე-რეგენერანტები გადაგვქონდა ჩსკჩმსსგ-ის ჩაქვის ფილიალის საცდელ ნაკვეთზე. შტევია, როგორც II თავში ავღნიშნეთ, ტენიან სუბტროპიკულ ზონაში წარმოადგენს ერთწლიან მოკლე დღის კულტურას, მაშინ, როცა თავის სამშობლოში იგი მრავალწლიანი მცენარეა. ჩვენში მისი სავეგეტაციო პერიოდი სამ თვეს მოიცავს (ივნისი, ივლისი, აგვისტო) ნედლეულის ანუ მწვანე მასის აღება სამ ეტაპად, რაც დაკავშირებულია ვეგეტაციური ყლორტების ზრდის ტემპის ინტენსიობასთან, ბიომასის მომწიფების ხანგრძლივობაზე. აღნიშნული კრიტერიუმის გათვალისწინებით, ვიზუალური დაკვირვების შედეგად შენიშნული იქნა მორფოლოგიურ ნიშან-თვისებათა ცვალებადობის ფართო სპექტრი. Aაქვე უნდა ავღნიშნოთ, რომ ყოველი ვარიაბელური ფენოტიპური ჯგუფი მიკროგამრავლების შედეგად იძლეოდა თავისივე მსგავს კლონებს, რაც მიუთითებს იმ გარემოებაზე, რომ მცენარე რეგენერანტთა შორის შენიშნული ცვალებადობა სტაბილური ხასიათის და გენოტიპურად მდგრადი იყო.

საკონტროლო მცენარე წარმოდგენილი იყო პლანტაციის ინტაქტური მცენარე. შესწავლილი იქნა 100 აკლიმატიზირებული, კარგად გაზრდილი მცენარე-რეგენერანტი. ცვალებადობამ, რასაც ადგილი ჰქონდა მცენარე-რეგენერანტებს შორის, საშუალება მოგვცა დაგვეყო ისინი ორ დიდ ჯგუფად:

I. მცენარე-რეგენერანტები, რომელიც იდენტურია საწყისი ფენოტიპის

II.მცენარე-რეგენერანტები, რომელიც განსხვავდება დონორი მცენარისაგან

რეგენერანტებს, აღენიშნათ მორფოლოგიური ცვალებადობა შემდეგი ნიშნების მიხედვით: ღეროს ტიპის მიხედვით, ყლორტების ზრდის ნტენსიობის მიხედვით, ბიო-მასის წარმოქმნის და დაგროვების მიხედვით, შეფოთვლის ინტენსიურობის და ფოთლის ფირფიტის ფორმის მიხედვით.

როგორც მე-18 ცრილიდან ჩანს ჩამოთვლილი ნიშან-თვისებებიდან მკაფიო ცვალებადობა აღინიშნა ღეროს ტიპის მიხედვით, რომლის სიხშირე შეადგენდა 24,7 % და მდგომარეობდა შემდეგში:

1) მცენარე-რეგენერანტები ძლიერ დაგრძელებული ღეროთი. ასეთი რეგენერანტებს გააჩნიათ დაგრძელებული და ვიწრო ღერო, ხასიათდებიან იშვიათი შეფოთვლით და შესაბამისად მუხლთაშორისების გაიშვიათებით.

ზოგიერთ შემთხვევაში აღინიშნებოდა რეგენერანტების განვითარება რედუცირებული ფოთლებით. დაფესვიანების ეტაპზე შესაძლებელი გახდა ასეთი რეგენერანტების მხოლოდ მცირე რაოდენობის დაფესვიანება (3-4%), ამასთან დაფესვიანებულ ყლორტებს გააჩნდა სუსტად განვითარებული ფესვთა სისტემა, რაც განაპირობებდა მათ ცუდ აკლიმატიზაციას.

2) მცენარე-ჯუჯები. ჯუჯა მცენარეების განვითარება აღინიშნება იშვიათად. Aმ მორფოლოგიური ჯგუფის გამოყოფა განაპირობა ძირითადად იმ გარემოებამ, რომ ზოგიერთი მცენარე-რეგენერანტი იზრდებოდა განსაზღვრულ სიმაღლემდე, ამ ფორმების ზრდის ინტენსიურობის შეფასება შეუძლებელი აღმოჩნდა. ისინი ხასიათდებიან ნორმალური შეფოთვლით და ფოთლის ფირფიტის ნორმალური ზომებით. ცუდად აკლიმატიზირდებოდნენ. ისინი სელექციური სამუშაოებისათვის ნაკლებ საყურადღებო იყო, რადგანაც ბიომასის წარმოქმნის დაბალი სიხშირით ხასიათდებოდნენ.

3) მცენარე-რეგენერანტები “მინი-ლიანას ტიპის” ღეროთი. ისინი ხასითდებოდნენ ძლიერ დაგრძელებული ღეროთი. წარმოქმნილი ფოთლები ძალიან შორს ლაგდებოდნენ ერთმანეთის მიმართ, მუხლთაშორისებიც შესაბამისად დაგძელებული ჰქონდათ. სიმაღლეში ზრდა მკვეთრად გაძლიერებული იყო, ახალი ფოთლების წარმოქმნა მიმდინარეობდა. ღერო ეხვეოდა ბოლოში ასეთი რეგენერანტები ვეგეტაციის დადგომამდე იღუპებოდნენ.

4) მახინჯი ყლორტები. ამ ჯგუფში გავაერთიანოთ ძირითადად ის მორფოტიპები, რომლებიც ხასიათდებოდნენ ფენოტიპის ძლიერი ცვლილებით რეგენირებადი ღეროს ძლიერი განსხვავებით. შეუფოთლავი, მსხვილი ღეროთი და განუვითერებელი

ფოთლებით. ქლოროფილ-დეფექტური რეგენერანტები, რომელიც ერთეული იყო 5 ასეულ რეგენერანტთა შორის, რა თქმა უნდა ასეთი რეგენერანტები იღუპებოდნენ.

ცვალებადობა ფოთლის ფირფიტის მორფოლოგიის მიხედვით აღინიშნა დაბალი სიხშირით (4,8). საყურადღებოა, რომ მცენარე-რეგენერანტები, სრული განვითარების ეტაპზე უხვი შეფოთვლით და მწვანე ბიომასის მაღალი მოსავლით ხასაითდებოდა. კოლერაციის არსებობა ამ ორ ნიშან-თვისებას შორის აშკარა იყო.

ცხრილი 18

მცენარე-რეგენერანტების მორფოლოგიური ცვალებადობის ტიპები და სიხშირე

ტიპები	Mმორფოლოგიური ცვალებადობა	სიხშიერე
I	მცენარე-რეგენერანტები, რომლებიც იდენტურია საწყისი დონორი მცენარის	71,9
II	მცენარე-რეგენერანტები, რომლებიც განსხვავდება საწყისი დონორი მცენარისაგან	28,1
1	ცვალებადობა ღეროს ტიპის მიხედვით	20,2
	ა) მცენარე-რეგენერანტები ძლიერ დაგრძელებული ღეროთი	12,1
	ბ) მცენარე-ჯუჯები	3,6
	გ) მცენარე-რეგენერანტები “მინილიანას” ტიპის ღეროთი	1,5
	დ) მახინჯი ყლორტები	3,0
2	ფოთლის ფირფიტის ცვლილების მიხედვით	4,8
	ა) მცენარე-რეგენერანტები ფოთლის ფირფიტის გაორმაგებული ბოლოთი, ძლიერ დანაკვთული	2,2
	ბ) დაგრძელებული, გადაგრეხილი ფოთლის ფირფიტა ნახევრად დანაკვთული	1,0
3	ფოთლის ფირფიტის შეფერილობის მიხედვით	3,1

აღინიშნა აგრეთვე ვარიაბილობა ფოთლის შეფერილობის მიხედვით. იგი იცვლებოდა მწვანე-მოყვითალო შეფერილობიდან – მუქ-მწვანე შეფერილობამდე. ნიშანი სტაბილური იყო ინდივიდის ონტოგენეზის მთელ პროცესში.

საბოლოოდ უნდა ავღნიშნოთ, რომ ცვალებადობა, რომელსაც ადგილი ჰქონდა სტევიას ქსოვილის კულტურაში ატარებდა გენეტიკურ ხასიათს.

დასკვნა

1. ჩატარებულმა ექსპერიმენტულმა კვლევამ გვიჩვენა იზოლირებული ქსოვილის, უჯრედისა და ორგანოს in vitro მეთოდის წარმატებით გამოყენების შესაძლებლობა სტევიის კლონალური მიკროგამრავლებისა და მასიური რეგენერაციის მიღების საქმეში.

2. დადგენილი იქნა, რომ სიცოცხლისუნარიანი ექსპლანტების მიღებისთვის საუკეთესო პირველად მასალას წარმოადგენს ვეგეტირებადი ყლორტის აპიკალური და იღლიური კვირტები.

3. არაინფიცირებული, სტერილური კულტურების მისაღებად საუკეთესო აღმოჩნდა დიოციდის 0.2% წყალხსნარი, ექსპოზიციით 15-20 წუთი.

4. სტევიის მიკროგამრავლების მაღალი კოეფიციენტის უზრუნველსაყოფად აუცილებელია მიკროკალმების კულტივირება გამბორგის ფორმულით შედგენილ საკვებ არეზე.

5. სტევიის მიკროკლონალური გამრავლებისათვის აუცილებელია საკვებ არეში ციტოკინინური ბუნების ჰორმონთა შეტანა. საუკეთესო შედეგი მოგვცა ბაპ-ის 5-15 მკმ კონცენტრაციის გამოყენებამ. მიკროგამრავლების პროცესის სტიმულირებისათვის მიზანშეწონილია საკვებ არეზე ციტოკინინებთან ერთად აუქსინური ბუნების (ნმმ) ჰორმონების მცირე დოზების შეტანა.

6. მიკროკლონალური გამრავლების მაღალი ინტენსიურობის მიღწევის მიზნით უმჯობესია კულტურების ინკუბაცია 16/8 საათი ფიტოპერიოდის, განათება 2.3 კილოლუქსის ინტერვალსა და 26 ± 1^0 C ტემპერატურის პირობებში.

7. დადგინდა, რომ სტევიის მიკროკალმები ხასიათდება დაფესვიანების კარგი უნარით, შემუშავებულია დაფესვიანების და მიკროგამრავლების პროცესების მორიგეობა აუქსინების, კერძოდ იემ-ს მოქმედების მეშვეობით.

8. დაფესვიანების ყველაზე ეფექტურ მეთოდს წარმოადგენს ½1/2 B_5 საკვებ არეში აუქსინის გარკვეული კონცენტრაციის შეტანა. გამოყენებული აუქსინებიდან ყველაზე კარგი შედეგი მოგვცა იემ-ს 5-8 მკმ კონცენტრაციის გამოყენებამ

9. შემუშავებულია მორფოგენური კალუსური ქსოვილების მიღების გზები ფოთლის ექსპლანტისაგან. კალუსების ზრდის ინტენსიურობის დამოკიდებულება ჰორმონების ბუნებასა და კონცენტრაციაზე.

10. ნაჩვენებია კალუსური კულტურების მორფოგენეტიკური პოტენციალის რეალიზაციის გზები და ამ უნარის დამოკიდებულება ფიტოჰორმონების ბუნებასა და კონცენტრაციაზე. შერჩეულია მათი ოპტიმალური კონცენტრაციები.

11. სტევიის მცენარე-რეგენერანტები ხასიათდებიან საკმაოდ მაღალი აკლიმატიზაციის უნარით არასტერილური პირობებისადმი და შეიძლება მათი გადატანა სათბურში წლის ნებისმიერ დროს.

12. შესწავლილია მორფოლოგიური ცვალებადობის სპექტრი მცენარე-რეგენერანტებში, გამოყოფილია ცვალებადობის ფორმები და დადგენილია, რომ ცვალებადობის ეს ფორმები გენეტიკური ბუნებისაა.

13. სტევიის მორფოგენეზის შესწავლამ ცხადყო, რომ შემუშავებული მეთოდები შეიძლება წარმატებით და ეფექტურად იქნას გამოყენებული ამ კულტურის სელექციურ-გენეტიკურ სამუშაოებში, როგორც პრაქტიკული, ასევე თეორიული თვალსაზრისით.

ლიტერატურა

1 .ნ.ალასანია, ნ.ზარნაძე, ბ.კორახაშვილი – ჰორმონების გავლენა პასიფლორას მიკროყლორტების ფორმირებაზე in vitro კულტურაში გამრავლებისას. // სამ.შრომ.კრებული. “აგრარული მეცნიერების პრობლემები”, 2001 ტ. 12.

2. ნ.ალასანია, ნ.ზარნაძე, ლ.ლაზიშვილი – პასიფლორას (passiflora incarnate) ასეპტიკური კულტურის მიღება // მეცნიერება და ტექნიკა 1998. ¹7-9.

3. ნ.ზარნაძე, ნ.ლომთათიძე, ნ.ალასანია-იაპონური მუშმულას (Eriobotrea japonica) სომაკლონური რეგენერაციის თავისებურებანი in vitro კულტურაში // ბათუმი, საქსტის შრომები, 2002, გვ. 144-147.

4. ს.მანჯგალაძე, ნ.ზარნაძე- მასტერილებელი ნივთიერებების გავლენა ხარიშუბლა ასეპტიკური კულტურების მიღებაზე // თბილისი, ახალგაზრდა აგრარიკოს მეცნიერ-

მუშაკთა და ასპირანტთა სამეცნიერო შრომების კრებული, წიგნი 2. ტ. 2, 1999 წ. გვ. 71-74,.

5. ს.მანჯგალაძე, ნ.ზარნაძე, რ.ზარნაძე –ხარიშუბლას მიკროკლონალური გამრავლების თავისებურებანი ქსოვილის კულტურაში. // ბაბბის სამეცნიერო შრომათა კრებული, ბათუმი, 2003, გვ. 45-49.

6. ს.მანჯგალაძე, ნ.ზარნაძე, ნ.ლომთათიძე, ნ.ალასანია – ვაზის ჯიშის "ჩხავერი"-ის in vitro კულტურაში მიკროკლონალური გამრავლების რეგულირება ზრდის რეგულატორების თანაფარდობის ცვალებადობის მიხედვით. //ბათუმის ბოტანიკური ბაღის მოამბე 2003, 32, გვ. 121-123.

7. Батягина Т.В., Васильева., Маметьева Т.Б.-Проблемы морфогенеза in vitro и in vivo, Эмбриогенез у покрытосеменных растении. // Ботанический ж. 1978. – т.63, №1, с. 87-111.

8. Бутенко Р.Г. –Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растении // М. "Наука" 1964 272 е.

9. Бутенко Р.Г. –Дифференцировка и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов // В.кн. Биология развития растений // М. Наука. 1979, с. 48- 65.

10. Бутенко Р.Г.- Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растении // М. "Наука". 1975. с. 50.

11. Бутенко Р.Г.- Клеточные культуры: новый взгляд, новые технологии // Будущее Науки : Межд. ежегодник, М. Наука, 1983, Вып. 16, с. 136-146.

12. Бутенко Р.Г ., Грушвицкий И., Слепян Л.- Органогенез и соматический эмбриогенез в в культуре тканей женьшеня и других представителей рода Panax L // Бот. журн. 1968 №7. с 906-911.

13. Высоцкий В.А. –Клональное микроразмножение растений // В кн.: Культура клеток растений и биотехнология, М. «Наука» 1986, с. 91-102.

14. Давыдова Ю., Мелик –Саркисов О., Аветисов В.- Морфологическая активность различных типов эксплантов картофеля в культуре in vitro // Биотехнология 1995, 12. с. 15-18.

15. Дмитриева Н.Н. – Индукция клеточных делений в сердцевинной паренхиме стебля табака: // Автореф. дис. канд. биолог. наук. М, ИФР АН СССР 1972.

16. Зарнадзе Н.Ж. – К вопросу введения актинидии в культуру, in vitro Субтропические культуры 1991, №6.

17. Зарнадзе Н.Ж. Микроклональное размножение актинидии // Сообщения А.Н. Грузии Т.152 №2 1995.
18. Зарнадзе Н.Ж., Кунах В.Л. - Регенерация растении в культуре соматических тканей актинидии // Субтропические культуры 1994 №12
19. Зарнадзе Н.Ж. Кутубидзе В.В., Кунах В.А. –Получение каллусных тканей от двух видов актинидии.// Субтропические культуры. 1993 №12
20.Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. – «Клональное микро размножение растении». Издательство «Наука», 1983.
21. Кефели В.И. – Рост растения и природные регуляторы // Физиология растении, // 1978, т. 25, Вып.5, с. 975-989.
22.Корнова К. – Микроразмножение дикой черешни К-1 // Растениеводство Наука, 1995, 32, №7-8, с 97-98.
23. Кулаева О.Н. –Цитокинины, их структура и функция // М. Наука 1973, с. 264.
24. Кунах В.А., Алпатова Л.К.- Роль фитогормонов в изменчивости числа хромосом в культуре тканей Haplopappus gracilis // ДАН СССР, 1979 245 №4 с.967-970.
25. Попов Ю.Г. –Культура in vitro меристематических верхушек стебля как метод оздоровления и размножения растении // Биол. науки, 1976 №6 с.13-24.
26. Попов Ю.Г., Высоцкий В.А.- Культура стеблевых верхушек in vitro как метод ускоренного размножения плодовых и ягодных растений. // Вестник с-х , науки 1978. №4, с. 124-127.
27. Сидорович Е.А., Кутас У.Н., Брель Н.Г.- Регенерация in vitro из листовых эксплантов брусники обыкновенной // Докл А.Н. Беларусии, 1996, т-40, №1. с 77-80.
28. Синнот Э. – Морфогенез растении // М. Иностр. лит., 1963. с. 603
29. Сытник К.Я., Процко Р.Ф., Варшавская В.Б. – Апикальное доминирование и уровень фитогормонов.
30. Фролова Л.В. – Особенности популяций культивируемых клеток. // В кн. культура клеток растений. М.Наука, 1981. с. 5-16.
31. Шарова А.П., Давидова Ю.В., Мелик-Саркисов О.С., Аветисов В.А. – Морфологическая активность различных типов эксплантов картофеля в культуре in vitro // Биотехнология, 1995, №12, с. 15-18.
32. Acker M., Scholten H. – Development of axillary buds of roso in vitro // Sci hort 1995, 63, № 1-2, pp. 47-45
33. Anderson W.C. – Tissue culture propagation of red raspberries. // In, Proc. conf. on nursery production of fruit plants through tissue culture application and feasi biluty, 1980, pp. 27-34.

34. Bacchetta L., Remotti P., Bernardini C., Saccardo F. –Adventitious shoot regeneration from luaf exsplants and stem nodes of Lilium. // Plant cell, Tissue and organ culture 2003, 74(1) pp. 37-44.
35. Beauchesne G. – Interet de la culture in vitro pour la multiplication vegetative. C.z. Acad. agr. France, 1980. 66 №8, pp. 638-649.
36. Bonnier L.J., Steponkus P.L. –Organogenesis in Cultured Pinus sylvestris tissue // Ztschr. Pflanzenplysiol. 1980, 96, № 1, pp. 1-6.
37. Borges M., Ceiro W., Meneses S., Aguilera N. – Regeneration and multiplication of Dioscorea alafa germplasm maintai ned in vitro // Plant cell, Tissul and Organ Culture 76 (1) pp. 87-90, 2004.
38. Boot K.- Auxin Molecular biology // Plant Cell, Tissue and organ culture 2004 76 (1).
39.Brandao I, Salema R. – Callus and plantlet development from Cultured leaf explants of Sedum telephium L. // Ztschr. Pflanzenphysiol 1977, 85, №1, pp. 1-8.
40. Branka P., Charles M., Sibila J. –Microclonal multiplication of wied cherry (Prunus avium L) from shoot tips and root sucker buds // Acta bot. croat. 1994. 53. pp. 31-38.
41.Burg S.P., Burg E.A. –The interaction between auxin and ethylene and its zole in plant growth // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1966, 55. N2, pp. 262-269.
42. Brosard D. – Heoformation de bourgeons vegetatifs et inflores centiels a pastir de disgues foliaires du Crepis capillaries L. Waller. Cultives in vitro Pflanrenphysiol 1979, 93, №1, pp . 69-81.
43. Button J., Kochha J. – Tissue Culture in the Citrus industry – In Apple and fundam. aspeets plant cell, tissue and organ Cult. 1977, pp . 70-92.
44. Choi Y.E., Jeong J.H., Shin C.K., - Hormone independent embriogenic callus production from ginseng cotyledons using high concentratios of $NHuNO_3$ and progress touards bioreactor production. // Plant cell, Tissue and organ Culture. 2003, 72/3, pp. 229-235
45.Chrysothemis V., Vogiatzis D.G. – In vitro shoot proliferation rates of the rose cv (hybrid tea) Dr.Verhade as affected by apical dominance regulation substances // Sci hort (neth) -1995, 61, № 3-4, pp 241-249
46. Conger B.V., Carabja J. V. – Callus induction and plantlet regeneration in orchardgrass – Crop Sci 1978, 18, №1, pp. 157-159
47. Couee I., Hummel I., Sulmon C. – Involvement of polyamines in root development // plant Cell, Tissul and organ culture 2004, 76 (1), pp 1-10
48. Cresswell R., Nitsch C. – Organ culture of Eucalyptus grandis L. – Planta, 1975, 125, №1, pp 87-90
49. David H., Iscmukeli K., David A. – Obtention de plants de Pin maritime a partir de brachybastes ou dapex caulianaires de tres jeunes sujets cultives in vitro. C- r. Acad. Sci. D. 1978, 287, №4, pp 245-248

50. Dobergh P.C., Maene L. J. – A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue Culture.// Sci. Hort. 1981, 14, №4, pp 335-345
51. Dorica B., Nadela G.., Moisuc A. – Influenta conditielor in vitro asupra comportamentului citogenetic al unor genotipuri de sfecla furajera // Gerc genet veg si anim 1996, ;4, pp 153-156
52.Egunyomi A., Harrington A.I. – Studies on regeneration from the Leaves of octobepharum albidum Hedw. // Bryol lichenol. 1980, 1. № 1, p p 73-74
53. Tridborg G., Pedersen M., Landsrom L. E., Eriksson T.. The affect of activated charcoal on tissue cultures, adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis. // _ Physiol, plant., 1978, 43 №2
54. Gahan P.B., Wang L, Bower I.D. – Citocinin –induced apoptotic nuclear changes in Cot yledons Of Solanum aviculore and lycopesicon sculentum. // Plant cell,Tissue and organ culture. 2003. V 72/3 pp.237-245.
55. Gregori L,E, Veale J.A. - A reassessment of the problem of apical dominance. –// in: Soc, Bxp. Biol. Symp Cambridge: Univ. Press. 1957, 11 pp 1-20.
56. Greval S et al ., Koul S., Sachdeva U., Atalc. K., - Regeneration of plants of Dioscorea deltoidea wall. Bu apical meristem cultures-Ind –J.Exp. Biol. 1977;15, №3. pp 201-203.
57. Iazawa S., Asahira T., - Bulbie formation; of Dioscorea opposita cultured un vitro.// Mem Coll Agr Kyoto univ. 1979 13 pp 39-53.
58. Jones O.P. Hopgood M .E. The successful propagation in vitro of two rootstocks of Prunus; The plum rootstocks Pixy. and the cherry rootstocs f 12/1—j Hort Sci 1979, 54 №1 pp 63-66.
59. Kadota M., Wiini I, Efects of cytokinin tupes and their conantrations of shoot proli feration and huperhudricity in vitro pear cultivar shoots // plant cell, Tisue-and organ culture. 2003 v 73/3 pp.261-265.
60. Камаев Н.В. Култура тканей и органов фреезии // Физиологиа растаянии 1981,28, № 5, с1062-1064.
61. Kaul R, Sabharwal P. S. Morfhogenetic studies on Haworthia effects of unositoe on growth and differentiation - Amer. I. Bot 1975. 62 №6 pp 655-659.
62. Klerk G. J. Introduction to plant Biotecnology. Plant cell, Tissue and organ culture 2004 76 [1] p 97.
63. Kobayashi A. K., Bespalhok j. c. Plant regereration of weet orange (Citrus sinensis) from thin sections of mature Stem segments // Plant cell Tissue and organ Culture 2003 74 (1) pp 99-102.
64. Lec. L. Efect du thiosulfate d argent sur la croissance de la pomme de terre cultivee in vitro / Rev suisse agr..,- 1996, - 28 , №1. pp 43-45.

65. Leguillon S., Charles G. Plant regenation from thin layers in Spinaci aoleracea. Plant cell. Tissue and organ Culture 2003, v, 74 (3) pp 257 – 265 .
66. Liao Z., Chen M, Tan F, Micropropagation of endangeren chinese aloe. Plant cell, Tissue and organ culture 2004 , 76 (1) pp 83 – 86 .
67. Lundergan GF, Janik j . Regulation of apple shoot 1980 proliferation and growth in vitro . - Horts, Res 1980, 20. №1. pp 19 – 24 .
68. Lui G. S., Liu D. M. Chu C. C. Factors affecting plant regeneration from Tussue cultures of Chinese leymus // Plant cell, Tissue and organ culture 76 (2) 175 – 178 . 2004. pp 99.
69. Madhulathe P, Anbalagan M. Influence of liguid pulse Treatment with Growth regurators on in vitro propagation of Banana // Plant cell , Tissue and organ. culture 2004 76 (2) pp 189 -192 .
70. Makoveghu A. I. Hormonal control of somatic embryogenesis in rauwolfia vomitoria. // Biol plant 1994 – 36 Suppl. pp – 30.
71. Malabadi R. B. , Mulgund G. S. Efectient regeneration of vanda coerulea, an Endan gerid orchid using Tridiazuron // Plant , Tissue and organ culture 2004 , 76 (3) pp289 – 293 .
72 . Meier M. M., Fuchigami L . H., Roberts A . N . , Propagation of tall bearded irises bu tissue culture. – Hortscience , 1975 , 10 №5 , pp 479 - 480 .
73. Miura G. A. Miller C. O. Cutokinins from a vaziant strain of cultured soybean cells . - Plent fhysiol. , 1969-44 , №7 pp 1035 – 1039 .
74 . Monaco L . C., Sondahl M . R ., Cazvalho A . et al Application of tissue culture in the improvement of coffee. - In : Appl . and fundam aspects. // Plant cell, Tissue and organ cult. B . etc . . Spzing . Verl., 1977 , pp 109 - 130 .
75 . Muraschige T., Skoog T . A . Zevised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures .-Physiol plant 1962 , 15 , №3 . pp 473 – 497 .
76 . Muraschige T., Tusker T . A .revised medium for rapid grouth and bioassays with tobacco tissue cultures – Physiol. plant . 1962 15 №3 pp 473 – 497 .
77 . Murashige T. Clonal crops througb tissue culturein: Plant Tssue culture and Its Bio - technolog Appl, B . elc ., Spring-Vert, 1977, pp 392 – 403 .
78. Naya S . Sens. In vitro propagation of Ornitogalum umbellatum through direct organogenesis . // Indian J. Exp . Biol. -1995 . -33 №2 c 144 - 146 .
79 .Negrutiu J., Jacobs M . Greefw . In vitro morphogenesis of Arabidopsis thaliano the origin of the exsplant . // Pflanzen physol. 1987, 90 , № 4 . pp 363 – 372 .
80. Orellana P.P., Echevarria M., Perr B. – Influencia de varios factores en la micropropagacion in vitro del clon de banano “Gran Enano” //Gent.agr. Rev. Min educ. super. Res. Cua. 1993. 20. №3. PP 69-80.

81. Peixe A, Baroso J, Potes A. – Induction of Haploid Morphogenesis Calluses from in vitro cultured Anthers of Prunes Armeniaca cv. “Harcot” // Plant call, Tussul and Organ Culture 2004 v. 77 (1) pp 35-41.
82. Parrot-Rechenmann G., Hagen G. Auxin molecular biology Plant cell, Tissul and organ Culture 2004 76(1) pp 99.
83. Phillips J.D.J. – Apical dominance – Ann. Rev. Plant physiol. 1975, 26 p 341-367.
84. Prehn D., Serrano C., Mercado A. – Rodereration of whole plants from apical meristems of pinus radiate // Plant cell, Tissul and Organ Culture. 2003 73(1) pp 91-94.
85. Quraishi A., Koche V., Sharma P., Mishra S. – In vitro clonal propagation of Neem (Azadirachta indiea) // Plant cell, Tissul and Organ Cullture – 2004. 78(3), pp 281-284.
86. Raman K., Walden D.B., Greyson R.I. – Propagation of Zea mays L. by shoot tip culture: a feasibility study Ann. Bot 1980, 45, №2, pp 183-189.
87. Rardan M.K.- Book Rewiew: Introduction to Plant Tissul culture 2004, v, 77 (1) PP 117.
88. Raji M., Mann H., Regenerative studies in the defached leaves of Echeveria elegans: Canad J. Bot 1990 48, №10, pp 1887-91
89. Rilkey P.C., Mocown B.H., Hildebrandt A.C.- Micropropagation of African violet from petiole cross-sections. – Hortsaence 1978, 13, №1, pp 36-38.
90. Reynold J.F., Muraschige T. Asexual embryogenesis in callus cultures of palms – in vitro, 1979, 15, №5, pp 383-387.
91. Sanal Kumar P., Mathur V.- Chromosomal instabi lit y in callus culture of Pisum sativum, // Plant cell, Tissul and Organ 2004 . 77 (1) 55-6, April
92.Sakvistan M.O., Melehers G. – The caryological analysis of plants regenerated from tumorous Molc. Gener. Genet. 1969, 105, №4 pp 317-334.
93.Shimada T., Sasakuma T., Tsuncwakik. – In vitro Culture of wheat tissuen callus formation, organ redifferetiation and single cell culture. – Canace J. Genet. Cytol., 1969, 11, №2. pp 294-305.
94.Sing J., Effect of nitrogen sourels on shoot bud differentiation of Dioscorea delfoidea.
95. Skirvin R.M., Janick J.- Tissue Culture – intuced variation in scented Pelargonium SPP –J. Amer. Sos. Hort. Sci, 1976, 101, №3, pp 281-290.
96.Skirvin R.M.- Natural and induced variation in tissue culture. – Euphytica 1978, 27, №1, pp 241-266.
97. Skoog F., Miller C.O.- Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. – In The biological action of growth substances: Symp. Soc. Exp. Biof Cambridge. Univ. press 1957, 11, pp118-131.

98. Smith S.M., Street H.E.- The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot are serially subcultured. – Ann Bot. 1974 38, № 115, pp 223-241.
99. Snow R.A. – Hormone for correlative inhibition. New Phytol., 1940. 39. №2. pp 177-184.
100. Sountavius K., Haber M. – Plant regeneration in cicer species trough tissul culture – Ind J. Exp Biol. 1999, 17, №6, pp 607-609.
101. Susheelamma B.N., Shekar K., Sarkas A.- Genotype and hormonal effects on callus formation and regeneration in mulberry // Euphytica, 1996. №1, pp 25-29.
102. Tragane S.R., Kulkarni D.K., Shrikhande S.P. et al Influence of medium composition of callus indudi on and camptothecin (s) accumulation in Nothapodytes foetida // Plant cell, Tissul and organ Culture. 2003. v. 72/3 pp. 247-251.
103.Thomas E., I Streef H.- E. Organogenesis in cell suspension cultures of Atropa belladonna L. and Atropa belladonna cultivar luted Do//Ann. Bot., 1970, 34, №136, pp 657-669.
104.Torrey J.G.- Kinetin as trigger for mitosis in mature end omitotic cells. – Exp. Cell Res. 1961, 23, №2, pp 281-299.
105. Tran Thanh Van M., Chlyah H., Chfyah A. – Regulation of organogesis in thin leyers of epidermal and sub-epidermal cells. – In Tissue culture and plant seienel .N. I. Acad. press 1974, pp 101-141.
106. Watanabe K., Tanaka K. – The growth promoting effect of phytic acid on Callus tissues of rise seid. // plant and Cell phylsiol. l 1971, 12, №1, pp 161
107. Wickson M., Thimmann K.V.- The antagonism of auxin ant kinetin in apical. dominance. – Physiol. plant, 1958, №11, №1, pp 62-73.
108. Wickson M., Thimann K.V. – The antagonism of auxsin and kinetin in apical dominance. // The transport of IAA in Pea stems in relation to apical dominance – Physiol.plant, 1960, 13, №3, pp 539-554.
109. Wochok Z.S., Wetherell D.F. – Restoration of declining morphogenetic capacity in long term tisse cultures of Daucus carota dg kinetin – Experientia, 1972, 28, №1, pp 104-105.
110. Wooleg D.J., Warang P.F. – The interaction between growth promoters in apical dominance – New phytol, 1972, 71, №5, pp 781-793.
111. Zale J., Borcharad – Wier H., Kidwell K. – Callus indiction and plant regeneration from mature Embryos of a Diverse Set of Wheat Genotypes. Plant Cell, Tissul and organ Culture 2004, 78 (3), pp 277-281.
112. Zhang S., Zhong H., Sticklen M.B. – Production of multiple shoots from shoot apical meristems of dat // J. Plant prysiol. 1996, 148, №6, 667-671.