მ. ღოღბერიძე, ნ. ჭელიძე

მცენარეთა ბიოტექნოლოგიის საფუძვლები

მცენარეთა IN VITRO კულტივირების მეთოდები

თბილისი
2009

მ. ღოღობერიძე, ნ. ჭელიძე

მცენარეთა ბიოტექნოლოგიის საფუძვლები

მცენარეთა *in vitro* კულტივირების მეთოდები

გამომცემლობა

ISBN:

თბილისი
2009

სახელმძღვანელოში წარმოდგენილია მცენარეთა თანამედროვე ბიოტექ-ნოლოგიები, რომლებიც ემყარება უმაღლეს მცენარეთა ორგანოების, ქსოვილების, უჯრედებისა და იზოლირებული პროტოპლასტების *in vitro* კულტივირებას. აღწერილია მარტივი ხერხები: კალუსების, სუსპენზიური კულტურების მიღების; აპიკალური მერისტემის მეთოდი; მცენარე-რეგენერანტების მიღება; ბიოლოგიუ-რად აქტიურ ნაერთთა ბიოსინთეზის რეგულაციის საშუალებები; მცენარეთა სომატური ჰიბრიდების მიღების მეთოდოლოგია; მცენარეული მაღალროდუქტიული შტამების მიღების საშუალებები ქიმიური მუტაგენეზის და უჯრედთა სელექციის გზით. აღწერილია ასევე არაუჯრედული სისტემების კულტივირების მეთოდები და მათი ბიოტექნოლოგიური გამოყენება.

თითოეულ თემაზე გათვალისწინებულია: თეორიული მასალის მინიმუმი, სამუშაოს შესრულების მეთოდიკა, აუცილებელი ხელსაწყოებისა და რეაქტივების ნუსხა. ასევე თითოეულ თემაზე მოყვანილია სერგი დურმიშიძის სახ. ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში ჩატარებული კვლევის შედეგები.

სახემძღვანელო განკუთვნილია ბიოლოგიური და სასოფლო-სამეურნეო სპე-ციალობების სტუდენტებისათვის და დოქტორანტებისთვის, ასევე ბიოლოგიის და სოფლის-მეურნეობის სხვადასხვა დარგში მოღვაწე სპეციალისტებისათვის.

რედაქტორები: საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის წევრ-კორესპოდენტი, პროფესორი,
დ. უგრეხელიძე,
ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი,
დ. ჭრიკიშვილი.
რეცეზენტი: ბიოლოგიურ მეცნიერებათა დოქტორი, პროფესორი,
დ. ძიძიგური

ეძღვნება აკადემიკოს
სერგი დურმიშიძის დაბადების
მე – 100 წლისთავს

შ ე ს ა ვ ა ლ ი

ბიოტექნოლოგია – ეს არის ცოცხალი ორგანიზმების, *in vitro* კულტურების და ბიოლოგიური პროცესების საშუალებით ადამიანისათვის აუცილებელი პროდუქტების და ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების წარმოება.

ბიოტექნოლოგია უძველესი დროიდან გამოიყენებოდა მეღვინეობაში, პურის ცხობაში, რძის პროდუქტების მიღებისას, სელის და ტყავის დამუშავებისას, ანუ იმ პროცესებში, რომლებიც ეფუძნებოდა მიკროორგანიზმების გამოყენებას. უკანასკნელ ათწლეულებში ბიოტექნოლოგიის შესაძლებლობები მნიშვნელოვნად გაფართოვდა.

ამჟამად ბიოტექნოლოგიის ობიექტებს წარმოადგენენ: ვირუსები, ბაქტერიები, უმარტივესები, საფუვრები, მცენარეები, ცხოველები ან იზოლირებული უჯრედები და სუბუჯრედული სტრუქტურები.

თანამედროვე ბიოტექნოლოგია არის მეცნიერება და წარმოების დარგი, რომელიც ვითარდება სამი ძირითადი მიმართულებით:

- მოლეკულური ბიოლოგია და გენური ინჟინერია;
- მიკრობიოლოგია და მიკრობიოლოგიური მრეწველობა;
- უჯრედებისა და ქსოვილთა *in vitro* კულტურები.

"In vitro" პირდაპირი მნიშვნელობით ნიშნავს "შუშაში" და გულისხმობს ხელოვნურ საკვებ არეზე მიკროორგანიზმების, მცენარეთა და ცხოველთა იზოლირებული ქსოვილების, უჯრედების და ორგანოების კულტივირებას. უჯრედულ ტექნოლოგიებს, რომლებიც ემყარება უმაღლეს მცენარეთა ორგანოების, ქსოვილების, უჯრედებისა და იზოლირებული პროტოპლასტების *in vitro* კულტივირებას, შეუძლიათ გაამარტივონ და დააჩქარონ ახალი ჯიშებისა და სახეობების შექმნის ტრადიციული პროცესი. გენეტიკური მრავალფეროვნების შესაქმნელად და საძიებელი ნიშან-თვისებების მქონე ფორმების შესარჩევად ისინი გვთავაზობენ პრინციპულად ახალ გზებს, როგორიცაა სომაკლონური ცვალებადობა, მუტაგენეზი უჯრედულ დონეზე, უჯრედული სელექცია და სომატური ჰიბრიდიზაცია. გარდა ამისა, უჯრედული ტექნოლოგიები ეფექტურია ვეგეტატიურად გამრავლებადი მცენარეების უვირუსო მასალის შესაქმნელად და ასევე ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების მისაღებად, მათი ბიოსინთეზის რეგულაციის და ეპიგენეტიკური ცვლილებების შესასწავლად.

ტერმინი "უჯრედთა, ქსოვილთა, ორგანოთა კულტურა" მცენარეთა ბიოტექნოლოგიაში გამოიყენება სტერილურ პირობებში გაზრდილ მცენარეთა ნაწილებისათვის, როგორებიცაა:

1. მყარ არეზე მზარდი კალუსური ქსოვილი;
2. თხევად არეში მზარდი უჯრედების და მცირე აგრეგატების სუსპენზიური კულტურა;
3. პროტოპლასტების კულტურა;
4. იზოლირებული ჩანასახები;
5. იზოლირებული ორგანოები.

ჯერ კიდევ დიდი ხნის წინ იყო მცდელობა მცენარეთა ქსოვილების იზოლირებული უჯრედების კულტივირებისა. ამ მეთოდის განვითარების ისტორიაში შეიძლება გამოვყოთ რამდენიმე ეტაპი:

I ეტაპი (1892-1902 წწ.) დაკავშირებულია გერმანელ მეცნიერთა ხაბერლანდტის, ფიოხტინგის და რეხინგერის სახელებთან. ეს მეცნიერები ცდილობდნენ საქაროზის ხსნარში მცენარის სხვადასხვა ქსოვილის კულტივირებას. ვერ მიაღწიეს რა სასურველ მიზანს, მეცნიერებმა გამოთქვეს რამდენიმე ჰიპოთეზა, რომლებიც მოგვიანებით დადასტურდა. ასე მაგალითად: ხაბერლანდტმა წამოაყენა მცენარის ნებისმიერი სომატური უჯრედის ტოტიპოტენტურობის ჰიპოთეზა, ანუ ამ უჯრედთა უნარი მოახდინონ რეალიზება თავისი განვითარების პოტენციალის და კულტივირების განსაზღვრულ პირობებში დასაბამი მიცენ მთლიანი მცენარის განვითარებას.

II ეტაპი (1902 – 1922 წწ.) შეიქმნა პირველი საკვები არეები ცხოველთა ქსოვილების კულტივირებისათვის. საკვები არეები ბუნებრივი წარმოშობის იყვნენ და შეიცავდნენ სისხლის პლაზმას და ჩანასახოვან სითხეს. ამავე დროს მცენარეთა იზოლირებული ქსოვილების მცენარეულ ექსტრაქტებზე გაზრდის მცდელობები წარუმატებლად დამთავრდა.

III ეტაპი (1922 – 1932 წწ.) ამერიკელმა და გერმანელმა მეცნიერებმა რობინსმა და კოტტემ აჩვენეს მყარ არეზე პომიდვრის და სიმინდის ფესვის წვერის მერისტემის კულტივირების შესაძლებლობა, თუმცა გარკვეული დროის შემდეგ მცენარეული ქსოვილები იღუპებოდნენ.

IV ეტაპი (1932 – 1940 წწ.) ფრანგმა მეცნიერმა გოტრემ მიაღწია მიზანს და შეძლო ხანგრძლივი დროის განმავლობაში, პერიოდული გადათესვების საშუალებით, *in vitro* პირობებში მცენარეული ქსოვილების კულტივირება. მოგვიანებით ამ მეთოდის საშუალებით მრავალი მცენარის ქსოვილი იყო კულტივირებული.

V ეტაპი (1940 - 1960 წწ.) 1955 წ ფიტოჰორმონების ახალი კლასის – ციტოკინინების აღმოჩენის შემდგომ, ზრდის სტიმულატორების კონცენტრაციის და ურთიერთშეფარდებისგან დამოკიდებულებით, შესაძლებელი გახდა ექსპლანტების უჯრედების დაყოფის სტიმულირება, კალუსური ქსოვილის ზრდის ხანგრძლივი შენარჩუნება, მორფოგენეზის ინდუცირება.

VI ეტაპი (1960 – 1975 წწ.) ნოტინგემის უნივერსიტეტის პროფესორის ე. კოკინგის მიერ დამუშავებულ იქნა პომიდვრის ფესვებიდან და ნაყოფიდან იზოლირებული პროტოპლასტების გამოყოფის ფერმენტული მეთოდი და შესაძლებელი გახდა კონტროლირებად პირობებში მათი კულტივირება. მისი თანამშრომლის პაუერის მიერ განხორციელდა პროტოპლასტების ხელოვნური შერწყმა, რამაც გახსნა ახალი გზა სომატური ჰიბრიდების შესაქმნელად. ფრანგმა მეცნიერმა ჟ. მორელმა დაამუშავა *in vitro* პირობებში მცენარეთა მიკროგამრავლების მეთოდი და გამოიყენა იგი გაჯანსაღებული სათესი მასალის მისაღებად.

VII ეტაპი (1975 წ. – ჩვენს დრომდე გრძელდება) ხდება *in vitro* ტექნიკის სწრაფი განვითარება, კულტივირებული ობიექტების ბიოლოგიის შესწავლა, მუშავდება იზოლირებული პროტოპლასტების ელექტროშერწყმის, მუტაგენეზისა და უჯრედული სელექციის მეთოდები, ჰაპლოიდური მცენარეების მიღების მეთოდები, სულ უფრო სრულყოფილი ხდება უჯრედთა სიღრმული კულტივირების მეთოდები იზოლირებული პროტოპლასტების და ვექტორების გამოყენებით. ამ უკანასკნელთა შექმნა მოხდა *Agrobacterium tumefaciens*-ის და *Agrobacterium rhizogenes*-ის Ti და Ri პლაზმიდების საფუძველზე. გენური ინჟინერიის მეთოდებით დამუშავებულია გენების გადატანის მეთოდი ორლებნიანი მცენარეებისათვის. ამგვარად, უკანასკნელ ათწლეულებში გადადგმულ იქნა მნიშვნელოვანი ნაბიჯები მცენარეთა იზოლირებულ უჯრედებსა და ქსოვილებთან მუშაობის ტექნიკის დახვეწაში. უნდა აღინიშნოს, რომ კვლევის ობიექტებს ძირითადად წარმოადგენენ ერთლებნიანი და ორლებნიანი ბალახოვანი მცენარეები და იშვიათად მერქნიანები.

წინამდებარე სახელმძღვანელოში წარმოდგენილია ბიოლოგიური და სასოფლო-სამეურნეო სპეციალობების სტუდენტებისათვის ასათვისებლად მცენარეთა *in*

vitro კულტივირების ყველაზე უფრო მარტივი ხერხები: კალუსების, სუსპენზიური კულტურების მიღება; აპიკალური მერისტემის მეთოდი; მცენარე-რეგენერანტების მიღება; ბიოლოგიურად აქტიურ ნაერთთა ბიოსინთეზის რეგულაციის საშუალებები; მცენარეთა სომატური ჰიბრიდების მიღების მეთოდოლოგია; მცენარეული მაღალპროდუქტიული შტამების მიღების საშუალებები ქიმიური მუტაგენეზის და უჯრედთა სელექციის გზით.

თითოეულ თემაზე გათვალისწინებულია: თეორიული მასალის მინიმუმი, სამუშაოს შესრულების მეთოდიკა, აუცილებელი ხელსაწყოებისა და რეაქტივების ნუსხა. ასევე თითოეულ თემაზე მოყვანილია სერგი დურმიშიძის სახ. ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში ჩატარებული კვლევის შედეგები. მოყვანილია ასევე არაუჯრედული სისტემების კულტივირების მეთოდები და მათი ბიოტექნოლოგიური გამოყენება.

I. ხელოვნურ საკვებ არეებზე მცენარეული მასალის კულტივირების ტექნიკა

I. 1. ბიოტექნოლოგიური ლაბორატორიის ორგანიზაცია

ბიოტექნოლოგიური ლაბორატორიის ორგანიზაციისათვის აუცილებელია ვრცელი იზოლირებული ოთახები, აგრეთვე თანამედროვე მოწყობილობა და მაღალი ხარისხის რეაქტივები.

შენობაში დეზინფექციის მოხერხებულად ჩასატარებლად, იატაკსა და კედლებს უნდა ჰქონდეს კაფელის და მეტლახის საფარი, ხოლო ჭერი უნდა იყოს შეთეთრებული.

სამრეცხაო ოთახის მოწყობილობა: ნიჟარა ცივი და ცხელი წყლით; გამოხდილი წყლისთვის დისტილატორი და ბიდისტილატორი; საშრობი კარადები ჭურჭლის გასაშრობად 100 – 130^{0}C სამუშაო რეჟიმით, ინსტრუმენტებისათვის – 170^0 C-მდე; კარადები სუფთა ჭურჭლისა და ხელსაწყო-იარაღების შესანახად; სათავსო გამრეცხი საშუალებების შესანახად; ამწოვი კარადა ექსიკატორებით ბიქრომატის შესანახად (კონც. $H_2SO_4 + K_2Cr_2O_7$).

საკვები არის მოსამზადებელი ოთახის მოწყობილობა: ლაბორატორიული მაგიდები; მაცივარი მარილების, ჰორმონებისა და ვიტამინების დედახსნარების შესანახად; ანალიზური და ტორზიული სასწორები; მაგნიტური სარეველები, ელექტროქურები, გაზის სანათური, ქიმიური ჭურჭლის ნაკრები (კოლბები, ჭიქები, საზომი ცილინდრები, მენზურები, სინჯარები და სხვ.); ქიმიური რეაქტივების აუცილებელი ნაკრები სათანადო სისუფთავის ხარისხით (ქს, ს , ქსა).

სასტერილიზაციო ოთახის მოწყობილობა: ავტოკლავები სამუშაო რეჟიმით: 1 – 2 ატმ. წნევა და 120^0 C ტემპერატურა, სტელაჟები საკვებ არეებიანი შტატივებისათვის, სტერილური მასალის შესანახი კარადები, შენობა მოწყობილი უნდა იყოს ნაკადურ-გამწოვი ვენტილიაციით და ჰქონდეს საკანალიზაციო ჩასაშვები ავტოკლავიდან კონდენსატის მოსაცილებლად.

საკვებ არეზე მცენარეული ექსპლანტების დასათესი ოთახის მოწყობილობა: ლამინარ-ბოქსები, ლაბორატორიული მაგიდები, სტელაჟები, ბაქტერიოციდული ნათურები, კარადები მასალებისა და ხელსაწყო-იარაღებისათვის.

საკულტივაციო ოთახების მოწყობილობა: განათებული განყოფილება – განათების წყარო, რომლის სპექტრი ახლოსაა დღის სინათლის სპექტრთან (3 –4 კილოლუქსი) კონდიციონერის ტემპერატურისა (25 ± 2^{0}C) და ჰაერის ტენიანობის (70%) რეგულირებისათვის, სტელაჟები კულტივირებული მასალების

შტატივებისათვის (სურ.1) – ისევე მოწყობილი განყოფილება სინათლის წყაროს გარეშე. საკვებ არეზე ექსპლანტების კულტივირებისათვის სასურველია თერმოსტატები, რომლებსაც შეუძლიათ მაქსიმალური სიზუსტით შეინარჩუნონ ტემპერატურისა და ჰაერის ტენიანობის მოცემული რეჟიმი.

სურ.1 საკულტივაციო ოთახი

ჭურჭლის, ხელსაწყო-იარაღებისა და მასალების აუცილებელი ნაკრები ბიოტექნოლოგიურ ლაბორატორიაში: საზომი კოლბები, ერლენმეიერის კოლბები, ქიმიური ჭიქები, საზომი ცილინდრები, პეტრის თასები, სინჯარები, ბოთლები, პიპეტები, ლანცეტები (მათ შორის თვალის, ქირურგიული, ანატომიური), მაკრატლები, პინცეტები, დანები, სამართებლის პირები, პრეპარატული ნემსები, შპადელები, ქაღალდი (გასახვევი, პერგამენტის, ფილტრის, ალუმინის ფოლგა, ბამბა, ბინტი, კანაფი).

I. 2. საკვები არეების მომზადება უჯრედებისა და ქსოვილების *in vitro* კულტივირებისათვის

მცენარეული უჯრედებისა და ქსოვილების გამრავლებისათვის საჭირო კომპონენტები შეიძლება დავყოთ 6 ძირითად ჯგუფად, რაც როგორც წესი, გულისხმობს კონცენტრირებული დედახსნარების მომზადების რიგს: მაკროელემენტები, მიკროელემენტები, რკინის წყაროები, ვიტამინები, ნახშირბადის წყაროები, ფიტოჰორმონები.

მცენარეული ექსპლანტების კულტივირებისათვის საჭირო ყველა საკვები არის საფუძველს მინერალური მარილები წარმოადგენს. ეს არის აზოტის მჟავას მარილების- ნიტრატების, ნიტრიტებისა და ამონიუმის მარილების სახით; ფოსფორის – ფოსფატების სახით; გოგირდის – სულფატების სახით; აგრეთვე K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}-ის ხსნადი მარილები. რკინა გამოიყენება ჰელატების სახით [FeO_4 + ედტა (ეთილენდიამინტეტრაძმარმჟავა) ან მისი ნატრიუმის მარილი Na ედტა (ტრილონ Б)], რომელიც მცენარეული უჯრედისათვის შესათვისებლად უფრო მისაწვდომი ფორმაა. რკინა, ცინკი, მანგანუმი, მოლიბდენი, კობალტი პორფირინებთან შეთავსებით წარმოქმნის ფოტოსინთეზის პიგმენტების (ქლოროფილი) და ჟანგვა-აღდგენითი ფერმენტების (კატალაზები, პეროქსიდაზები, პოლიფენოლოქსიდაზები) მაკრომოლეკულებს. მაშასადამე, ყველა ეს ნაერთი უჯრედებსა და ქსოვილებში ასრულებს სტრუქტურულ ფუნქციას.

იმავდროულად, K^+, Na^+, Ca^{2+}, Cl^-, H^+ აუცილებელია საკვები არის pH-ის რეგულირებისათვის და უჯრედის ფიზიოლოგიური გრადიენტების შესანარჩუნებლად (ტურგორი, ოსმოსური წნევა, პოლარობა). ბიოლოგიური მაკრომოლეკულებისათვის ნახშირბადის წყაროს სახით, აგრეთვე ჰეტეროტროფული ქსოვილების (კალუსები და სუსპენზიები) კულტივირებისას საკვებ არეს უმატებენ ნახშირწყლებს კონცენტრაციით 20-60 გ/ლ. ჩვეულებრივად, ეს არის დისაქარიდები (საქაროზა), მონოსაქარიდები (ჰექსოზები: გლუკოზა და ფრუქტოზა, პენტოზები: ქსილოზა და სხვ.). საკვებ არეებში პოლისაქარიდები პრაქტიკულად არ გამოიყენება. მხოლოდ ზოგიერთი ტიპის ქსოვილს (სიმსივნური), რომლებიც შეიცავს ჰიდროლიზის ფერმენტებს, ზრდიან სახამებლის, რაფინოზას, ცელობიოზას შემცველ არეებზე. უჯრედში ბიოქიმიური რეაქციების სტიმულირებისათვის იყენებენ ბიოლოგიურ კატალიზატორებს – ვიტამინებს: B ჯგუფის (B_1, B_6, B_{12}), C (ასკორბინის მჟავას), PP (ნიკოტინის მჟავას), მეზოინოზიტს.

თიამინი (B_1) შედის ფერმენტ პირუვატდეკარბოქსილაზას შედგენილობაში, მონაწილეობს ნახშირწყლების გარდაქმნებში. თიამინპიროფოსფატი შედის კეტომჟავების (პიროყურძნის და კეტოგლუტარის) ჟანგვითი დეკარბოქსილირების მაკატალიზებელი ფერმენტების შედგენილობაში, წარმოადგენს ტრანსკეტოლაზას კოფერმენტს. პირიდოქსინი (B_1) შედის ამინომჟავების დეკარბოქსილირებისა და გადაამინირების მაკატალიზებელი ფერმენტების შედგენილობაში. ნიკოტინის მჟავა (PP) ამიდის სახით შედის იმ დეჰიდროგენაზების NAD და NADH-ის შედგენილობაში, რომლებიც აკატალიზებენ დონორულ-აქცეპტორულ H^+ ჯაჭვს (ორგანული ნაერთის მოლეკულიდან H^+-ის მოწყვეტა).

ქსოვილთა კულტურაში სტრუქტურების წარმოქმნის პროცესების მართვისათვის აუცილებელია ზრდისა და განვითარების ბიოლოგიური რეგულატორები – ფიტოჰორმონები. ეს ნივთიერებები ზემოქმედებენ უჯრედებისა და ქსოვილების დიფერენციაციასა და დედიფერენციაციაზე, აინიცირებენ ჰისტოგენეზს, აინდუცირებენ უჯრედების დაყოფასა და გაწელვას, მონაწილეობენ მომწიფებისა და დაბერების პროცესებში, ასტიმულირებენ და აინჰიბირებენ კულტურების უჯრედების ზრდასა და განვითარებას, განაპირობებენ სქესის ჩამოყალიბებას. ბიოტექნოლოგიურ კვლევებში ხშირად იყენებენ ზრდისა და განვითარების მასტიმულირებელ ჰორმონებს: აუქსინებს, ციტოკინინებს, ჰიბერელინებს.

აუქსინებია: იძმ - β -ინდოლილძმარმჟავა, ნძმ - α -ნაფტილძმარმჟავა, 2,4-დ – დიქლორფენოქსიძმარმჟავა.

ციტოკინინებია: კინეტინ-6-ფურფურილამინოპურინი, ზეატინი, NN-დიფენილშარდოვანა, 6-ბაპ – 6-ბენზილამინოპურინი.

ჰიბერელინებს მიეკუთვნება ჰიბერელინის მჟავა. პირველადი კალუსის ინდუქციისათვის ბიოლოგიური დანამატის სახით შეიძლება მცენარეული ექსტრაქტების გამოყენება (არის საერთო მოცულობის 10-15%): ქოქოსის რძე (ქოქოსის კაკლის თხევადი ენდოსპერმი), ნედლი სიმინდის მარცვლების გამონაწვლილი (უმჯობესია რძის შემცველობის პერიოდში), რომელიც შეიცავს ციტოკინინებს – კინეტინს და ზეატინს (6-ჩანაცვლებული ამინოპურინები) და NN-დიფენილშარდოვანა.

In vitro კულტურებისას იყენებენ თხევად და აგარიზებულ (მყარ) არეებს. თხევადი არეები გამოიყენება სუსპენზიების, კალუსების, იზოლირებული ორგანოებისა და ქსოვილების, მცენარე-რეგენერანტების კულტივირებისათვის. ამასთან ერთად, ზოგჯერ, ექსპლანტების შესანარჩუნებლად საკვებ არეან სინჯარებში ათავსებენ ფილტრის ქაღალდის ან სინთეზური ფოროვანი მასალის სპეციალურ დამცავ–შემაკავებელ ხიდებს. აგარიზებულ არეებს ამზადებენ

პოლისაქარიდის – აგარ-აგარისაგან, რომელსაც შეიცავს ზღვის წყალმცენარეები და რომელიც pH 5,6 – 6,0 პირობებში წყალთან წარმოქმნის გელს.

ზოგჯერ გამამკვრივებლად და აგარ-აგარის შემცვლელად გამოიყენება პოლიაკრილ-ამიდის გელი (ბიოგელი) P_{10} და P_{20}. ხელოვნური საკვები არეებისათვის მაკრო და მიკრომარილების ხსნარებს წინასწარ ამზადებენ და მრავალგზის იყენებენ. ეს არის კონცენტრირებული დედახსნარები. ისინი ინახება სპეციალურ პირობებში: მაკრო- და მიკრომარილები – მილესილყელიან ჭურჭლებში მაცივარში 0^0 - 4^0 C – ზე; ვიტამინები, ფიტოჰორმონები, ფერმენტები, მცენარეული ექსტრაქტები – 20^0 C-ზე 5 – 10 მლ საცობიან ჭურჭლებში (პენიცილინის ფლაკონები).

მაკრომარილების დედახსნარების კონცენტრაცია, როგორც წესი, აღემატება სამუშაო ხსნარების კონცენტრაციას 10 – 40-ჯერ, მიკრომარილებისას – 100 – 1000-ჯერ, ვიტამინებისას – 1000-ჯერ.

ფიტოჰორმონების ხსნარები სასურველია დამზადდეს უშუალოდ საკვები არეების დამზადების წინ.

მაკრო- და მიკრომარილების დედახსნარების მოსამზადებლად თითეულ მარილს ხსნიან ცალცალკე ჭიქებში გაცხელებით, შემდეგ აერთებენ და მიჰყავთ საჭირო მოცულობამდე. მიკრომარილების გაციებულ ხსნარებს ბოლოს ამატებენ მოლიბდენის მარილის ხსნარს, ხოლო მაკრომარილების ხსნარებს – მაგნიუმის მარილის ხსნარს (გამოლექის თავიდან ასაცილებლად).

კალციუმის ქლორიდისა და რკინის ჰელატის (რკინის სულფატი + ედტა ან Na ედტა - ტრილონ Б) დედახსნარებს ამზადებენ და ინახავენ სხვა მარილებისაგან განცალკევებით.

ვიტამინების კონცენტრირებულ ხსნარებს ამზადებენ შემდეგნაირად: ათჯერად წონაკს ხსნიან ცალ-ცალკე 10-10 მლ დისტირილებულ წყალში. ფიტოჰორმონები ცუდად იხსნება წყალში, ამიტომ 100 მგ ნივთიერებას წინასწარ ხსნიან მცირე რაოდენობის (0,5 – 2მლ) ეთანოლში (აუქსინები, ჰიბერელინები), 0,5N HCl ან KOH (ციტოკინინები). შემდეგ აცხელებენ სრულ გახსნამდე (აბსცისის მჟავისა და კინეტინის გარდა) და მიჰყავთ 100 მლ მოცულობამდე (1 მლ შეიცავს 1 მგ ნივთიერებას).

I. 3. სტერილიზაციის ხერხები მცენარეთა ბიოტექნოლოგიაში

ყველა სამუშაო *in vitro* ქსოვილებისა და უჯრედების კულტურებთან ტარდება სტერილურ (ასეპტიკურ) პირობებში სტერილურ ბოქსში ან ლამინარ-ბოქსში, სტერილური ინსტრუმენტებით, სტერილურ ჭურჭელში, სტერილურ საკვებ არეებზე. სტერილობის დარღვევის შემთხვევაში საკვებ არეებზე კარგად მრავლდება მიკროორგანიზმები (მიკროსკოპული სოკოები, ბაქტერიები), რაც არღვევს საკვები არის შედგენილობას და იწვევს მცენარეული ექსპლანტების ზრდის დათრგუნვას. ხშირად ოთახის (ქსოვილების გადასათესი ბოქსები, საკულტივაციო ოთახები) სტერილიზაციისათვის იყენებენ ბაქტერიციდული ნათურების ულტრაიისფერ გამოსხივებას 0,5 – 2 სთ განმავლობაში (სათავსის ფართობის მიხედვით). დასხივებულ ოთახში მუშაობას იწყებენ ბაქტერიციდული ნათურების გამორთვიდან 15 – 20 წთ შემდეგ, ვინაიდან ულტრაიისფერი გამოსხივების მოქმედებით ჟანგბადის ორატომიანი მოლეკულა გარდაიქმნება სამატომიან ოზონად, რომელიც ტოქსიკურია ადამიანისათვის. მაქსიმალური სტერილობის მისაღწევად ულტრაიისფერი სინათლით დამუშა-ვების წინ ყველაფრის ზედაპირი გულმოდგინედ უნდა გასუფთავდეს გამრეცხი საშუალებებით, წყლით და ქლორის შემცველი ნივთიერებებით, ლამინარ-ბოქსის ზედაპირს მუშავდება 96% ეთანოლით.

ჭურჭელი, ხალათები, ბამბა, ქაღალდი, გამოხდილი წყალი, საკვები არეები სტერილდება ავტოკლავში 1 – 2 ატმ. ორთქლის წნევასა და 120^{0}C ტემპერატურეზე 20 – 60 წთ განმავლობაში გასასტერილებელი მასალის მოცულობის მიხედვით.

კოლბებს, საკვები არის შტატივებს, ბამბას, ქაღალდს, ხალათებს ავტოკლავირების წინ ახვევენ პერგამენტის ქაღალდებში ან ათავსებენ ბიუქსებში. მეტალის ინსტრუმენტების ავტოკლავირება არ შეიძლება, რადგან ორთქლის მოქმედებით წარმოიქმნება ჟანგი, ამიტომ მათ ასტერილებენ თერმოსტატში მშრალად 170^0 – 250^0 C 1 – 2 სთ განმავლობაში.

I. 4. მცენარეული ექსპლანტების სტერილიზაციის ხერხები

კალუსური და სიმსივნური კულტურების მისაღებად, მიკროკლონური გამრავლებისთვის და ჰორმონალური რეგულაციის შესასწავლად საჭირო ექსპლანტების მიღების მიზნით იყენებენ სტერილურ ნაზარდებს. გასაზრდელად საჭირო თესლებს თესავენ სტერილურ წყალზე ან საკვებ არეზე. მცენარეულ ობიექტებს სტერილიზაციის წინ გულმოდგინედ რეცხავენ გამდინარე წყლით, ხანდახან გამრეცხი საშუალებებით. ასუფთავებენ ზედმეტი ქსოვილისაგან. ძირხვენებსა და ფესვებს აცლიან კანს, ყლორტებს ქერქს, კვირტებს საფარ ქერცლებს. ექსპლანტებს ასტერილებენ ისეთ ნივთიერებათა ხსნარებით, რომლებიც შეიცავენ აქტიურ ქლორს (ქლორამინი, კალციუმის და ნატრიუმის ჰიპოქლორიდი, სულემა), ბრომს (ბრომიანი წყალი). ასევე გამოიყენება წყალბადის ზეჟანგი, ეთანოლი, ვერცხლის ნიტრატი, დიაციდი, ანტიბიოტიკები. ეთანოლს ხშირად ხმარობენ წინასწარი სტრილიზაციისათვის, მასალის ზედაპირს წმენდენ ან მასალას რამდენიმე წამით ათავსებენ აბსოლუტურ სპირტში. ხანდახან ასეთი სტერილიზაცია საკმარისია, მას იყენებენ ნაყოფებთან, თესლებთან, ყლორტებთან, ნასკვებთან მუშაობისას. კალციუმის ჰიპოქლორიდი (ქლორიანი კირი) გამოიყენება 5 -7% ხსნარის სახით კვირტების, ნასკვების, ყვავილების, თესლების, ყლორტების დასამუშავებლად 5-8 წთ განმავლობაში. ნატრიუმის ჰიპოქლორიდი გამოიყენება 0,5 – 5% ხსნარის სახით ნებისმიერ ექსპლანტის დასამუშავებლად 1 – 20 წთ განმავლობაში. ეს ნივთიერება წარმოადგენს საწამლავს უჯრედისათვის, ამიტომ სტერილიზაციის დროს მისი ხსნარის კონცენტრაციას ექსპერიმენტულად ადგენენ. მაგ: იზოლირებული ჩანასახებისათვის იყენებენ 2 – 3% ხსნარს 10 – 15 წთ, ხოლო მშრალი თესლებისათვის 3 – 5% ხსნარს 1 სთ განმავლობაში. ნატრიუმის ჰიპოქლორიდის ნარჩენს გასტერილებული მასალიდან აცილებენ ჯერ 0,1 N HCl – ით, შემდეგ 8–ჯერ რეცხავენ ავტოკლავირებული გამოხდილი წყლით.

ქლორამინი გამოიყენება 1 – 6% კონცენტრაციით. მტვრიანებს და ახალგაზრდა ჩანასახებს ამუშავებენ 1 – 3 წთ განმავლობაში, მშრალ თესლებს – 30 – 60 წთ განმავლობაში, შემდეგ 2 – 3 –ჯერ რეცხავენ სტერილური გამოხდილი წყლით.

სულემა ($HgCl_2$) ტოქსიკური ნივთიერებაა და მოითხოვს განსაკუთრებულ ყურადღებას, როგორც შენახვის, ასევე ცალკეული ობიექტებისათვის კონცენტრაციის შერჩევის დროს. ჩანასახების, ფოთლების, ყლორტების სტერილიზაციისათვის გამოიყენება 0,1% ხსნარი 1 – 3 წთ განმავლობაში, ძირხვენებისა და ბოლქვებისათვის (ტუბერებისათვის) – 10 – 20 წთ.

აქტიური ქლორის შემცველი ხსნარები გამოიყენება ერთხელ და მათ ამზადებენ უშუალოდ მუშაობის წინ.

დიაციდის 0,2% ხსნარი გამოიყენება ძირხვენების, თესლების, ქსოვილების ნაჭრების, წვერული მერისტემის, იზოლირებული ჩანასახების, მტვრიანების გასასტერილებლად. დიაციდის ხსნარის მოსამზადებლად ცალ-ცალკე ხსნიან 330 მგ ეთანოლმერკურქლორიდს და 660 მგ აცეტილპირიდინქლორიდს 330 მლ ცხელ წყალში, შემდეგ შეურევენ ერთმანეთს და მიჰყავთ 1 ლ-მდე, უმატებენ დეტერგენტ ტვინ-80 –ის რამდენიმე წვეთს, ინახავენ სიბნელეში მჭიდროდ დახურულ კოლბაში.

ანტიბიოტიკებს იყენებენ ბაქტერიებით ინფიცირებული მცენარეული მასალის სტერილიზაციისათვის. უფრო ხშირად გამოიყენება სტრეპტომიცინი და ტეტრამიცინი 10 – 80 მგ/ლ, ამპიცილინი – 200 – 400 მგ/ლ, ლევომიცეტინი, კანამიცინი და სხვა.

I. 5. ლამინარულ ბოქსში მუშაობის ტექნიკა სტერილური ნაზარდების კულტივირებისას

სტერილური ნაზარდების კულტივირებისათვის აუცილებელია ლამინარ-ბოქსების გამოყენება (სურ. 2), რომლებიც უზრუნველყოფენ ექსპლანტების მოთავსებას საკვებ არეზე მიკროორგანიზმებით დასნებოვნების გარეშე.

ლამინარის მთელი ზედაპირი მუშავდება 96% ეთანოლით, გასტერილებული ინსტრუმენტები, მასალები, მცენარეული მასალა თავსდება ლამინარის მაგიდაზე და ჩაირთვება უი-გამოსხივება. 20 წუთის შემდეგ გამოირთვება უი-გამოსხივება და ჩაირთვება ბიოფილტრები. ლამინარ-ბოქსში სამუშაოდ იცვამენ გასტერილებულ ხალათს და იხურავენ ქუდს, ხელები მუშავდება 96% ეთანოლით. პინცეტები, სკალპელები და საპრეპარაციო ნემსები თავსდება 96% ეთანოლიან ჭიქაში. ყოველი მანიპულაციის წინ ინსტრუმენტები გამოწვავება სპირტქურის ალზე.

სურ..2. ლამინარბოქსი

II. დედიფერენციაცია და კალუსოგენეზი მცენარეული უჯრედებისა და ქსოვილების კულტურაში

II. 1. კალუსების მიღება

კალუსური უჯრედი, რომლის დაყოფის შედეგადაც წარმოიქმნება კალუსი, წარმოადგენს უჯრედული დიფერენცირების ერთ-ერთ ტიპს. *In vivo* მცენარისათვის კალუსი არის უჯრედების ჯგუფი, რომელიც წარმოიქმნება ტრავმების დროს და იცავს დაზიანების ადგილს (ჭრილობის პარენქიმა). მასში გროვდება საკვები ნივთიერებები ანატომიური სტრუქტურების ან დაკარგული ორგანოს რეგენერაციისათვის. მცენარეული დიფერენცირებული უჯრედები ერთიანდება ქსოვილებში და ასრულებენ განსაზღვრულ ფუნქციებს. უჯრედები განირჩევა არა მარტო ფუნქციურად, არამედ მორფოლოგიურადაც.

საკვებ არეებზე, რომლებიც დიდი რაოდენობით შეიცავენ აუქსინებს (მაგ. 2,4–დ), ექსპლანტის უჯრედები დედიფერენცირდება და იწყებს პროლიფერირებას. ექსპლანტის უჯრედების დედიფერენცირების თავისებურებანი დამოკიდებულია ექსპლანტის გენეტიკასა და ეპიგენეტიკაზე. უჯრედები კარგავენ ძირითად ფუნქციებსა და მორფოლოგიურ ნიშნებს. ამასთან, რამდენადაც ექსპლანტის უჯრედები სტრუქტურულად და ქიმიურად ნაკლებადაა დიფერენცირებული, იმდენად უფრო ადვილია კალუსის მიღება.

კალუსის უჯრედში, რომელიც ემზადება გასაყოფად, სტიმულირდება რნმ-ის ყველა ფორმის სინთეზი, იწყება დნმ-ის რეპლიკაცია, ქრება სპეციფიკური ქსოვილოვანი ცილა – ანტიგენები, სინთეზირდება ახლები სპეციფიკური კალუსური უჯრედებისათვის. იცვლება უჯრედების სტრუქტურული გენებისა და ცილოვანი აპარატის აქტიურობა. იწყება მათი გამდიდრება ციტოპლაზმის ელემენტებით: მიკრომილებით, ენდოპლაზმატური ბადის (ეპბ) მემბრანებით და გოლჯის კომპლექსებით, რიბოსომებით, ქრება ქლორო – და ქრომოპლასტები, მათი მოქმედების პროდუქტები; შეიძლება წარმოიქმნას ბევრი ბირთვი და გაიზარდოს ქრომოსომების რიცხვი (პოლიპლოიდია), მსხვილდება ვაკუოლები.

ზედაპირული ხერხით (მყარ არეზე) გაზრდილი კალუსი წარმოადგენს თხელკედლიანი პარენქიმული უჯრედების ამორფულ მასას, რომელსაც არა აქვს მკაცრად განსაზღვრული სტრუქტურა. კალუსის უჯრედები ან უფეროა, ან აქვს მოყვითალო ელფერი. წარმოშობისა და კულტივირების პირობების მიხედვით, არჩევენ შემდეგ კალუსებს: ფაშარი – ძლიერ წყლიანი, რომლის უჯრედები ერთმანეთს ადვილად სცილდებიან; საშუალო სიმკვრივის – მერისტემული აქტიურობის ზონებით; მკვრივი – რედუცირებული კამბიუმისა და გამტარი ჭურჭლების ზონებით.

ბიოტექნოლოგიაში კულტივირების მეთოდის შესამუშავებლად ყველაზე ხშირად იყენებენ მცენარეთა იმ სახეობებს, რომლებიც ჩვეულებრივ პირობებში ადვილად ფესვიანდება, რეგენერირდება და წარმოქმნის კალუსს. ამიტომ, კალუსის მიღებისა და კულტივირების მეთოდების უმრავლესობა თამბაქოსათვის არის დამუშავებული. კალუსების მიღება შეიძლება პრაქტიკულად მცენარის ყველა ნაწილიდან, ვინაიდან თამბაქოს უჯრედები ადვილად დედიფერენცირდება და იწყებს პროლიფერირებას. თამბაქოს ფოთლებიდან კალუსების კულტივირებისათვის გამოიყენება მურასიგე-სკუგის საკვები არე აუქსინის (2,4 – დ) დამატებით.

საქართველოს ს. დურმიშიძის სახ. ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში ა. მესხის ხელმძღვანელობით მიღებულ იქნა იუკა დიდებულის – ***Yucca glorioza L***. კალუსური კულტურა. იუკა დიდებულის ქსოვილური, ანუ კალუსური კულტურის მისაღებად გამოყენებული იყო ***Yucca gloriosa L.*** მრავალწლიანი მცენარე, რომელიც საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მცენარეთა ბიოქიმიის ინსტიტუტის საცდელ ნაკვეთზე იზრდებოდა. აღნიშნული მცენარე კვლევისათვის არჩეული იყო, როგორც სტეროიდული ნაერთების, კერძოდ,

ფუროსტანოლური გლიკოზიდების პროდუცენტი. ამ ნაერთების ბიოტექნოლოგიურ მნიშვნელობაზე ქვემოთ გვექნება საუბარი.

ამოცანას შეადგენდა იუკა დიდებულის ინტაქტური მცენარის სხვადასხვა ორგანოდან, სტერილურ პირობებში, იზოლირებული კულტურის მიღება. ვინაიდან გრუნტში გაზრდილი მცენარე შეიცავს არა მარტო გარეგან, ასევე ზოგჯერ უჯრედშიდა ინფექციასაც, პირველ რიგში დადგინდა სტერილიზაციის პირობები. ექსპერიმენტისთვის აღებულ იქნა იუკა დიდებულის ფოთლები, ღერო და კოკრები, რომლებიც ჯერ საპნით ირეცხებოდა ზედაპირული ინფექციის მოსაშორებლად, ხოლო შემდეგ ბოქსში დამატებით სტერილდებოდა სხვადასხვა კონცენტრაციის სულემის ხსნარში (0.1–დან 1%–მდე), დროის სხვადასხვა ინტერვალით (2–დან 10წთ–მდე), ოპტიმალური აღმოჩნდა 0.1–0.3%–იანი სულემის ხსნარში 3–4 წთ გასტერილება.

იუკა დიდებულის სხვადასხვა ორგანოს გასტერილებული ნაწილები სტერილური წყლით ოთხჯერადი გარეცხვის შემდეგ თავსდება პეტრის თასზე და სტერილურ პირობებში იჭრება ნაწილებად. ფოთლები ნაწევრდება 2სმ სიგანისა და 2.5 სმ სიგრძის ნაჭრებად, განიკვეთება ძარღვებზე და დაზიანებული ადგილებით თავსდება საკვებ არეზე. ღეროები იჭრება 0.8–1.0 სმ სიგრძის სეგმენტებად და თავსდება საკვებ არიან სინჯრებში, ისე რომ, სეგმენტის აპიკალური ბოლო 1/3 სიგრძით უნდა ეფლობოდეს საკვებ არეში. კოკრები რამდენიმე ადგილას ჩაიჭრება და ასევე თავსდებიანნ სინჯრებში. იუკა დიდებულის ყველა იზოლირებული ორგანო ათჯერადი განმეორებით განითესება მურასიგესა და სკუგის (Murashige, Skoog 1962), ჰელერის (Heller, 1953), ბოლის (Boll,1965) და ერიქსონის (Erikson, 1965) საკვებ არეებზე, კოლბები ნიმუშებით თავსდება წყლის თერმოსტატებში კონტაქტური თერმომეტრებით $26^0 \pm 1^0$-ზე 70%–იანი შეფარდებითი ტენიანობით. საკვებ არეებში ზრდის სტიმელატორებად ემატება α –ნაფტილძმარმჟავა, ინდოლძმარმჟავა და 2,4 – დიქლორფენოქსიძმარმჟავა რაოდენობით 1 მგ$^{-1}$ ლ. ცდის შედეგები წარმოდგენილია ცხრილ 1–ში.

როგორც ცხრილი 1-ის მონაცემებიდან ჩანს, ფოთლის ექსპლანტებზე არცერთ საკვებ არეზე არ ხდება კალუსის წარმოქმნა. ყველაზე კარგი პირველადი კალუსების წარმოიქმნებოდა ღეროს ნაჭრებსა და კოკრების ბოლოებზე. სამწუხაროდ, უჯრედშიდა ინფექციამ ღეროს კალუსური ქსოვილის კულტურაში გადაყვანა შეუძლებელი გახადა.

ბოლის და ერიქსონის საკვებ არეებზე წარმოიქმნა ცუდად მზარდი კალუსური ქსოვილები. ყველაზე კარგად მზარდი ქსოვილი კი მიღებულ იქნა მურასიგესა და სკუგის (მს) საკვებ არეზე.

შემდგომი კვლევა მიმდინარეობდა კოკრის კალუსურ ქსოვილზე (სურ.3). კალუსური კულტურის მისაღებად ზრდის სტიმულატორებიდან საუკეთესოა 2,4–დ. მაგრამ მურასიგესა და სკუგის მოდიფიცირებულ არეზე, რომელიც 2,4–დ–ს შეიცავს 1 მგ.ლ$^{-1}$ რაოდენობით შემდგომ პასაჟებში შეიმჩნევა სპონტანური მორფოგენეზი (სურ. 4).

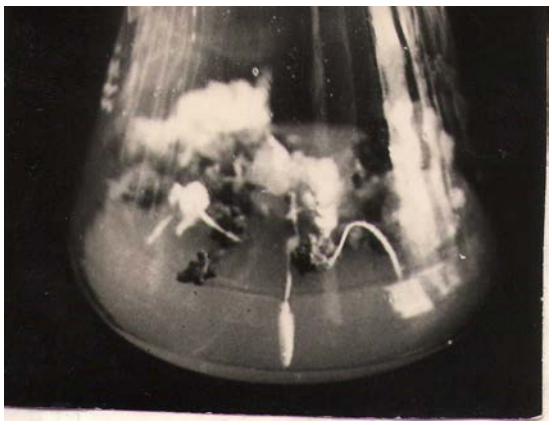
სურ.3. იუკა დიდებულის კოკრის პირველადი კალუსი

ცხრილი 1

სხვადასხვა საკვებ არეებზე იუკა დიდებულის იზოლირებულ ორგანოებზე კალუსური ქსოვილის წარმოქმნა

საკვები არეები	ფოთოლი			ღერო			კოკორი		
	ზრდის სტიმელატორები								
	2,4–დ	ნძმ	იძმ	2,4–დ	ნძმ	იძმ	2,4–დ	ნძმ	იძმ
ბოლის	–	–	–	+	+	+	+	+	+
ჰელერის	–	–	–	++	+	–	–	–	–
ერიქსონის	–	–	–	+	+	+	–	–	–
მურასიგეს და სკუგის (მს)	–	–	–	+++	++	+	+++	++	+

აღნიშვნები: +++ კალუსის კარგი ზრდა;
++ კალუსის საშუალო ზრდა;
+ კალუსის ნელი ზრდა;
– ქსოვილის ნეკროზი.



სურ. 4. იუკა დიდებულის კოკრის კალუსურ ქსოვილში სპონტანური მორფოგენეზი

2.4–დ–ს თანდათანობითი შემცირება კონცენტრაციამდე 0,025 მგ.ლ$^{-1}$ ხელს უწყობს სპონტანური მორფოგენეზის დათრგუნვას, მაგრამ ამასთანავე აუარესებს ქსოვილის ზრდას.

სპონტანური მორფოგენეზის დასათრგუნავად დაყენებულ იქნა ორფაქტორიანი ექსპერიმენტი, რომელშიდაც 2.4–დ–ს ნაცვლად ზრდის სტიმულატორად გამოყენებულ იქნა α –ნაფტილძმარმჟავა და ადენინის სხვადასხვა კონცენტრაცია.

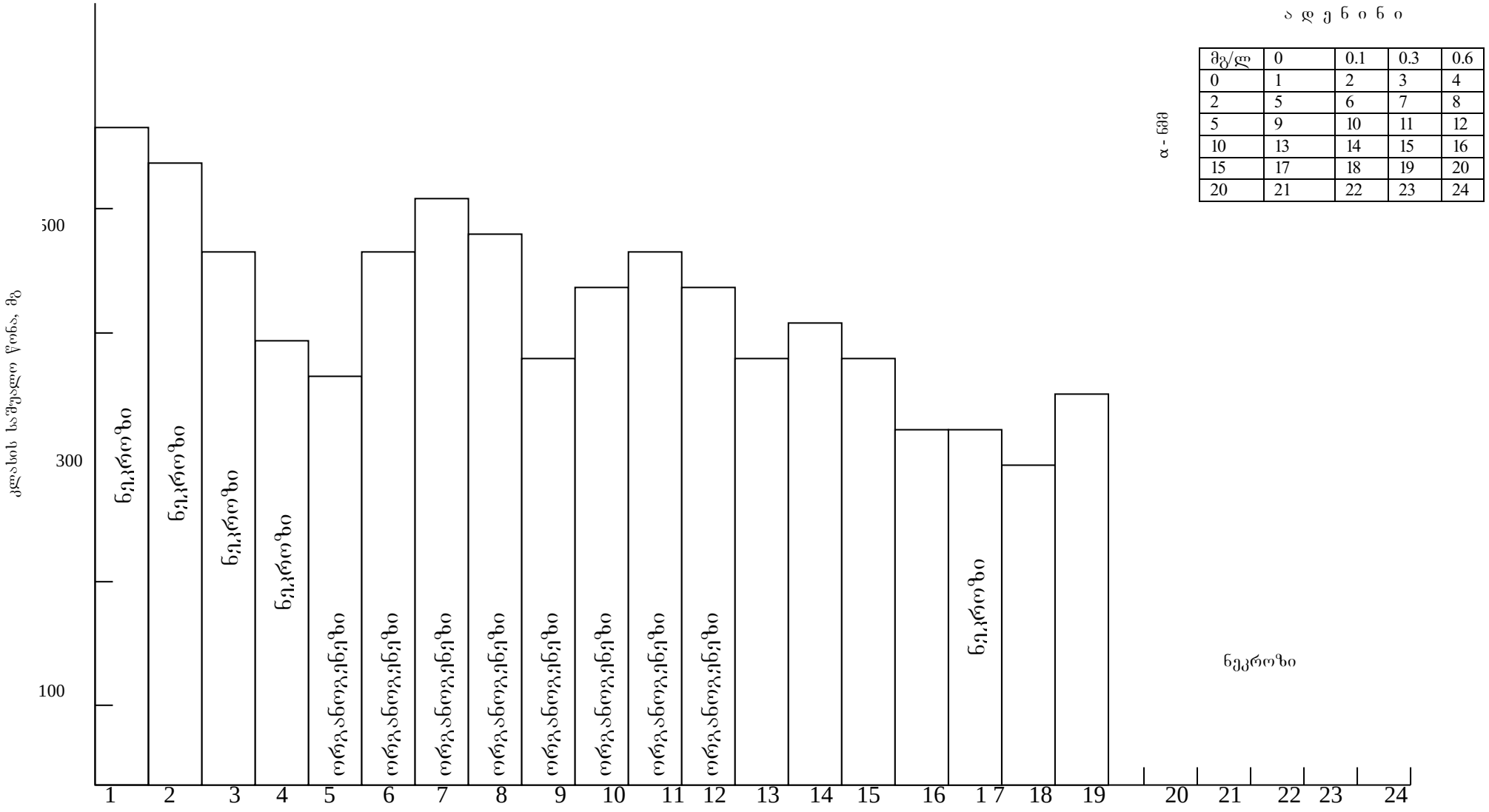
ექსპერიმენტის შედეგი ნაჩვენებია მე-5 სურათზე. იუკა დიდებულის კოკრის ქსოვილური კულტურა იღუპება საკვებ არეში ზრდის სტიმულატორების არ არსებობისას. α–ნაფტილძმარმჟავას საკვებ არეში მაღალი კონცენტრაციით 10-15 მგ. ლ$^{-1}$ შეტანა იწვევს სპონტანური მორფოგენეზის სრულ დათრგუნვას და ზრდის პროცესის შენელებას, ხოლო უფრო მაღალი კონცენტრაციებით გამოყენებისას – ქსოვილის ნეკროზს. კალუსის ზრდისათვის საუკეთესოა 10 მგ.ლ$^{-1}$ α –ნაფტილძმარმჟავა და 0,3 მგ.ლ$^{-1}$ ადენინი. 6-7 პასაჟის შემდეგ შესაძლებელია α-ნძმ რაოდენობის შემცირება 2 მგ.ლ$^{-1}$ –მდე. ქსოვილი საკმაოდ მკვრივია, კომპაქტური. შემდგომი პასირებისას α–ნძმ კვლავ შეცვლილ იქნა 2.4–დ–თი 2მგ.ლ$^{-1}$ რაოდენობით. სპონტანური მორფოგენეზი აღარ აღინიშნება და დედიფერენცირებული ქსოვილი გახდა ფაშარი და ღია სპილოსძვლისფერი. ამგვარად, იუკა დიდებულის კალუსური ქსოვილის ნორმალური განვითარებისათვის საკვები არე მოდიფიცირებულ მს არეს წარმოადგენს (ცხრ.2)

მიღებული ქსოვილის (სურ. 6) ციტოლოგიური ანალიზისას ქსოვილი რბილია და ადვილად ისრისება, უჯრედები ნორმალურად იღებება. უჯრედები დასრესილ პრეპარატებში კარგად ჩანან, ისინი ძირითადად პარენქიმული ტიპისაა. მათი ფორმა მომრგვალოა, მკვეთრად გამოკვეთილი კონტურით. ციტოპლაზმაში ვაკუოლები არ ჩანს და იგი სუსტად იღებება. უჯრედები შეიცავს თითო ბირთვს, მკვეთრად გამოხატული გრანულარული სტრუქტურებით, ერთი ბირთვაკით, შეიმჩნევა სახამებლის ჩანართები (სურ. 7).

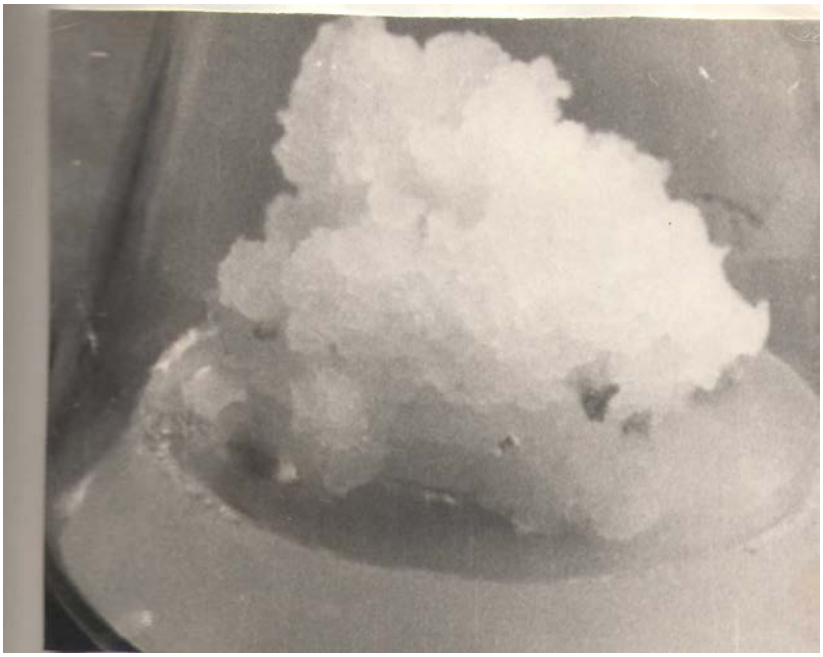
ცხრილი 2

იუკა დიდებულის კალუსური ქსოვილის ზრდისთვის შერჩეული არე (მს მოდიფიცირებული არე)

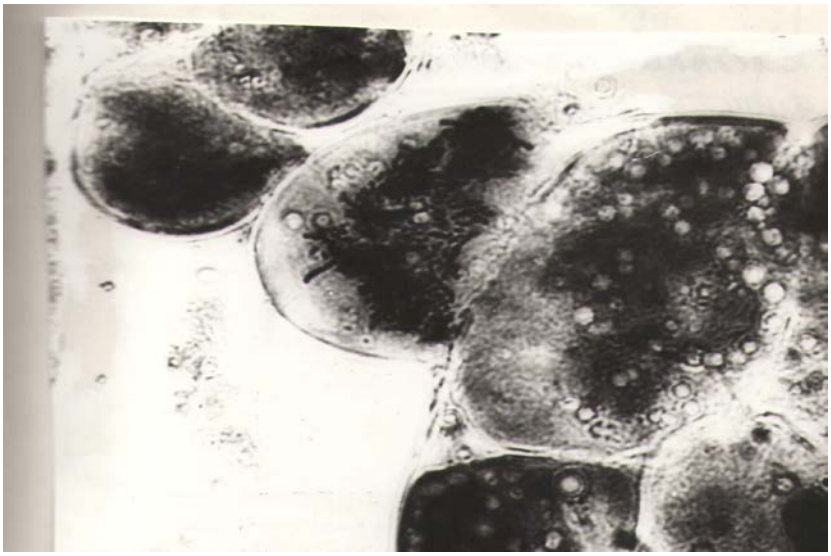
არის კომპონენტები	არის კომპონენ-ტების კონცენ-ტრაცია მგ.ლ$^{-1}$	არის კომპონენტები	არის კომპონენ-ტების კონცენ-ტრაცია მგ.ლ$^{-1}$
NH_4NO_3	1850	აგარი	8000 - 9000
KNO_3	1900	საქაროზა	30000
$CaCl_2 * 2H_2O$	440	კაზეინის ჰიდროლიზატი	500
$MgSO_4 * 7 H_2O$	330	B_1	0,1
KH_2PO_4	170	B_6	0,1
H_3BO_3	8,2	PP (ნიკოტინის მჟავა)	0,5
$MnSO_4 * 5 H_2O$	24,1	მეზოინოზიტი	200
$ZnSO_4 * 7 H_2O$	10,6	ადენინი	0,3
KI	0,83	2,4-დ	2,0
$Na_2MoO_4 * 2H_2O$	0,25	კინეტინი	1,0
$Cu SO_4 * 5 H_2O$	0,025	**$Co Cl_2 * 6 H_2O$**	0,025
$FeSO_4 * 7 H_2O$	27,8	**Na_2 EDTA**	37,3



სურ. 5. α-ნძმ და ადენინის კონცენტრაციების გავლენა იუკა დიდებულის კოკრების კალუსური ქსოვილის სპონტანურ მორფიგენეზზე. აბსცისთა ღერძზე – ვარიანტის ნომერი, რომელიც მარჯვენა სქემაში α-ნძმ-ს და ადენინის – კონცენტრაციებს შეესაბამება



სურ.6. იუკა დიდებულის კოკრების დედიფერენცირებული ქსოვილი

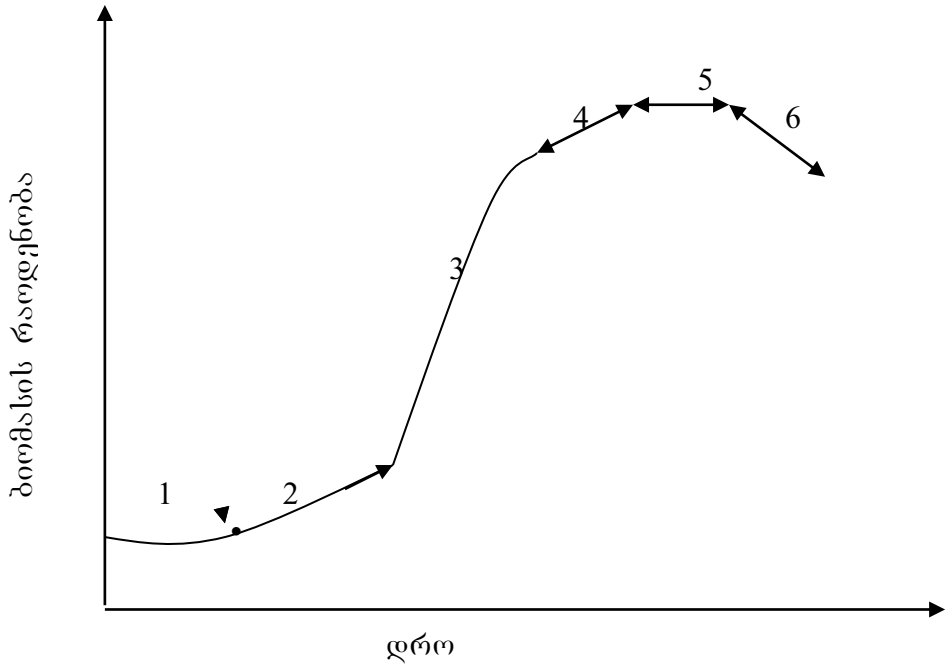


სურ. 7. იუკა დიდებულის კალუსური ქსოვილის უჯრედები (16X2)

II. 2. კალუსების სუბკულტივირება

ზრდის ციკლში კალუსური უჯრედები რიგი დაყოფის შემდეგ გადიან ჩვეულებრივ ონტოგენეზს, იზრდებიან გაწელვით და დეგრადირდებიან. კალუსის ზრდას ასახავს დამახასიათებელი S ფორმის მრუდი (სურ. 8). ზრდის ციკლი იწყება ექსპლანტის გადატანით საკვებ არეზე (კულტივირების დასაწყისი), ხოლო მთავრდება მიტოზის შეწყვეტის მომენტში (სტაციონალური ფაზა).

ლაგ-ფაზაში (ლატენტური ფაზა) უჯრედები არ იყოფა, არ იზრდება ზომებში, აქვთ დაბალი მეტაბოლური აქტიურობა. ექსპონენციალურ ფაზაში (ლოგარითმული ზრდის ფაზა) უჯრედები აქტიურად იყოფა მიტოზით. ადრეულ ექსპონენციაში იზრდება მიტოქონდრიების (სინთეზირდება ატფ), რიბოსომების, ყველა სახის რნმ-ის რაოდენობა. სინთეზირდება ცილები, აქტიურდება მეტაბოლიზმი, ინტენსიურად შთაინთქმება ჟანგბადი. ზრდის შენელების ფაზა ხასიათდება ზრდის ხვედრითი სიჩქარის კლებით, უჯრედული დაყოფის შენელებით, უჯრედების საშუალო ზომების ზრდით გაწელვის ხარჯზე. სტაციონალურ ფაზაში უჯრედების ზომა განაგრძობს ზრდას, ხოლო მათი დაყოფა წყდება. გვიანდელ სტაციონალურ ფაზაში (დეგრადაციის ფაზა) საკვები არის გამოფიტვის შედეგად უჯრედები ბერდებიან და კვდებიან. კალუსური უჯრედების ზრდის ციკლის ხანგრძლივობა 21 – 35 დღეა. კულტივირების პროცესში კალუსს გადათესავენ ყოველ 4 – 6 კვირაში. ტრანპლანტის მასა (ქსოვილის ფრაგმენტი, რომელსაც გადათესავენ ახალ საკვებ არეზე) შეადგენს 50 – 100 მგ-ს 20 – 40 მლ საკვებ არეზე.



სურ. 8. კალუსური ქსოვილის ზრდის მრუდი

1. ლატენტური ფაზა; 2. ექსპონენციონალური ფაზა; 3. ხაზობრივი ზრდის ფაზა; 4. ზრდის შენელების ფაზა; 5. სტაციონალური ფაზა; 6. გვიანი სტაციონალური ანუ დეგრადაციის ფაზა.

III. სუსპენზიური კულტურები

III. 1. . მცენარეთა უჯრედების სუსპენზიური კულტურის მიღება და კულტივირება

წინა საუკუნის 70–იანი წლებიდან საგრძნობლად გაიზარდა ინტერესი მცენარეთა სომატური უჯრედების სიღრმული კულტივირების სამეცნიერო და გამოყენებითი ასპექტების მიმართ. ამ მეთოდმა მკვლევართა წინაშე გახსნა პრინციპულად ახალი შესაძლებლობანი უმაღლესი მცენარეების უჯრედების ზრდის, დიფერენცირებისა და ბიოსინთეზური აპარატის ფუნქციონირების შესასწავლად. მცენარეთა უჯრედების სიღრმული კულტივირება აფართოვებს *in vitro* მცენარეული უჯრედების ზრდის და მეტაბოლიზმის რეგულაციის შესწავლის შესაძლებლობებს, ასევე ქმნის საფუძველს საწარმოო მასშტაბით უჯრედული კულტურების გაზრდის ტექნოლოგიური პროექტირებისათვის. იქმნება საშუალება უჯრედული კულტურების გამოყენებისა ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების საწარმოო მასშტაბით მიღებისათვის.

მცენარეული უჯრედების პირველადი სუსპენზიის მიღება ხორციელდება სამი პროცესის შედეგად: 1. კალუსური ქსოვილის ნაწილის დაშლა უჯრედებად და მცირე ზომის უჯრედულ აგრეგატებად თხევად საკვებ არეში შეტანის მომენტში; 2. პირველი სუბკულტივირების პროცესების დროს ქსოვილის ზედაპირიდან უჯრედების და უჯრედული აგრეგატების გამოყოფა; 3. პირველი ორი საშუალებით გამოყოფილი უჯრედების დაყოფა და ზრდა და მსხვილი უჯრედული აგრეგატების დაშლა უფრო მცირე აგრეგატებად და უჯრედებად.

სუსპენზიის ზრდის მოდელურ მრუდს აქვს S – მაგვარი ფორმა და მოიცავს: ლაგ- ფაზას, ექსპონენციალურ, სტაციონარულ და დეგრადაციის ფაზებს. რეალური ზრდის მრუდების ფორმა ერთმანეთისაგან განსხვავდება ფაზების ხანგრძლივობით. ეს დამოკიდებულია პოპულაციის გენეტიკაზე, ინოკულუმის რაოდენობაზე და საკვები არის შედგენილობაზე. ბიომასის ზრდის სიჩქარე მერყეობს 15 – 70 დღე-ღამე.

სუსპენზიებს იყენებენ მნიშვნელოვანი ქიმიური ნაერთების მისაღებად, როგორიცაა: ორგანული მჟავები, ფერმენტები, ალკალოიდები, სტეროიდები, საღებავები, ცილები, ამინომჟავები, რომლებიც გამოიყენება ფარმაკოლოგიაში, პარფიუმერიაში, კვების და ქიმიურ მრეწველობაში, სოფლის მეურნეობაში.

სუსპენზიურ კულტურებს დიდი მნიშვნელობა აქვს გენეტიკაში და განსაკუთრებით მოლეკულურ ბიოლოგიაში. სუსპენზიური კულტურებიდან ღებულობენ პროტოპლასტებს, რომელიც აუცილებელია სომატური ჰიბრიდიზაციისათვის, **გენური** ინჟინერიისათვის და უჯრედების მეტაბოლიზმის შესასწავლად.

III. 2.სუსპენზიის სიმკვრივის გამოთვლა

სუსპენზიის სიმკვრივის მიხედვით, შეიძლება არა მარტო უჯრედული პოპულაციის მდგომარეობის დახასიათება, არამედ სუბკულტივირების დროის განსაზღვრა, ინოკულატის შერჩევა და გადატანა ახალ საკვებ არეზე. უმრავლეს შემთხვევაში სუბკულტივირებისათვის სუსპენზიას არჩევენ ექსპონენციალური ფაზის ბოლოს (კულტივირების დაწყებიდან 14 – 16 დღის შემდეგ). ზრდის მრუდის აგებისას მაჩვენებლებს იღებენ დღეგამოშვებით. კულტივირების 2 – 3 კვირის განმავლობაში სუსპენზიის სიმკვრივე იზრდება 20 – ჯერ. სუსპენზიის დათვლა ყველაზე მოხერხებულია ფუქსროზენტალის

სპეციალურ გამომთვლელ კამერებში (ჰემოციტომეტრებში). სუსპენზიის უჯრედების დასათვლელად ხანდახან სარგებლობენ დროებითი პრეპარატებით, მაგრამ ეს უფრო შრომატევადი პროცესია, მნიშვნელოვნად იზრდება განმეორებათა რიცხვი.

უჯრედების დათვლა ძნელდება, თუ სუსპენზიაში სჭარბობს აგრეგატების ფრაქცია. ასეთ შემთხვევაში 1 მოცულობა კულტურას უმატებენ 2 მოცულობა 8% ქრომის ოქსიდს და აცხელებენ 70^0C - ზე 2 – 15 წუთის განმავლობაში. გაციების შემდეგ კულტურას ანჯღრევენ, რომ აგრეგატები დაიშალოს. აგრეგატების დასაშლელად სუსპენზიაში უმატებენ პექტინაზას (0,25 მოცულობითი პროცენტი). სუსპენზიის სიმკვრივე შეიძლება განისაზღვროს აგრეთვე ბიომასის მოცულობის შეფარდებით სუსპენზიის საერთო მოცულობასთან.

III. 3. სუსპენზიის აგრეგაციის და სიცოცხლისუნარიანობის ხარისხის განსაზღვრა

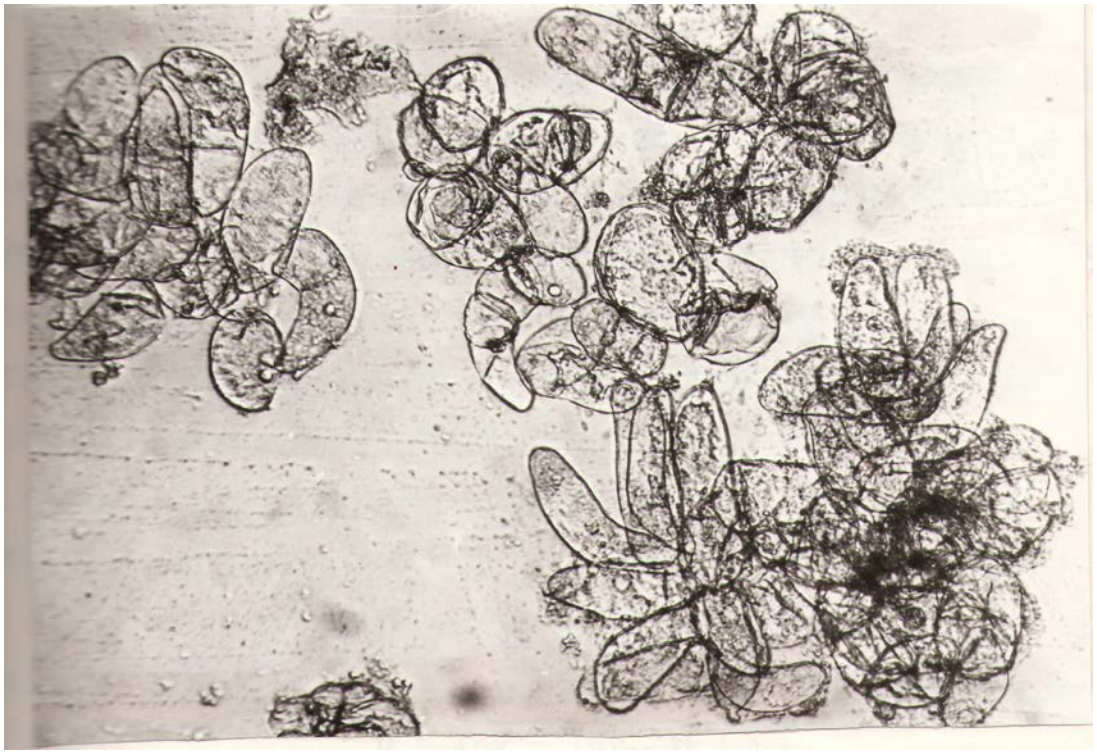
გამოკვლევის მიზნის მიხედვით, კულტივირების პირობებს და საკვები არის შედგენილობას არჩევენ ისე, რომ სუსპენზიაში სჭარბობდეს უჯრედების გარკვეული ფრაქცია. ჩვეულებრივად, სუსპენზიაში არჩევენ 4 ძირითად ფრაქციას: ცალკეული უჯრედები, წვრილი, საშუალო და მსხვილი აგრეგატები. აგრეგაციის ხარისხს საზღვრავენ მიკროსკოპის ქვეშ რამდენიმე მხედველობის არეში უჯრედების დათვლით დროებით პრეპარატებზე (არანაკლებ 1000 უჯრედისა). სუსპენზიასთან მუშაობისას აუცილებელია მხედველობაში მივიღოთ მისი სიცოცხლისუნარიანობაც. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე შეიძლება ვიმსჯელოთ: ციტოპლაზმის მოძრაობის მიხედვით, საღებავებისთვის უჯრედის კედლის განვლადობის ხარისხის მიხედვით, ფერმენტების აქტიურობის მიხედვით. ცოცხალი უჯრედის შესაღები საღებავები, როგორიცაა მეთილენის ლურჯი, უჯრედებს არ კლავენ და ცოცხალი უჯრედის გარსის გავლით ციტოპლაზმაში ვერ აღწევენ. სუსპენზია ითვლება სიცოცხლისუნარიანად, თუ უჯრედების 70% - ზე მეტი არ იღებება ლურჯად; აგრეგატი სიცოცხლისუნარიანია, თუ მისი უჯრედების 50% - ზე მეტი არ იღებება. უჯრედების შეღებვა ტეტრაზოლის მარილებით უფლებას იძლევა განისაზღვროს უჯრედის სუნთქვის ინტენსივობა.

საქართველოს ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში სუსპენზიური კულტურის მისაღებად მ. მამალაძის და მ ღოღობერიძის მიერ გამოყენებულ იქნა იუკა დიდებულის ფაშარი კალუსური ქსოვილი, რომელსაც არ გააჩნდა ჰისტოლო-გიური დიფერენცირების ნიშნები. უჯრედული სუსპენზია იზრდებოდა თხევად საკვებ არეში, რომლის საფუძველს შეადგენდა კალუსური ქსოვილისათვის აღწერილი არე (ცხრ. 2). უჯრედების სუსპენზიური კულტურის ზრდა ხდებოდა ბრტყელძირა 750 მლ მოცულობის ერლენმეიერის კოლბებში ორპლატფორმიან, წრიულად მბრუნავ სანჯღრეველაზე ექსცენტრისიტეტით 8 ± 2 მმ ბრუნვებზე: 100, 150, 180 ბრ. $წთ^{-1}$. კულტურების გაზრდა ხდებოდა 27^0 ± 1, 70% შეფარდებითი ტენიანობისას, სიბნელეში. გადათესვა ხდებოდა ყოველ მე-17 დღეს, განზავებით 1:5 (მოცულობით), ანუ ინოკულატის 20 მლ შეიტანებოდა 100 მლ ახალ საკვებ არეში. უჯრედის ზრდის დინამიკის ანალიზი ხდებოდა პარალელურად 4 კოლბიდან.

პირველი სუბკულტივირებისას უჯრედების მსხვილი აგრეგატების მოსაცილებლად წარმოებდა უჯრედების ფრაქციონირება 100 მლ–იან ცილინდრში. მსხვილი და წვრილი უჯრედული აგრეგატების დაყოფა წარმოებდა მათი სედიმენტაციის სიჩქარის მიხედვით. სუბკულტივირებისათვის ირჩეოდა ზედა ფრაქცია.

სხვადასხვა ბრუნვითი სიჩქარის მქონე სანჯღრეველებზე კულტივირებისას იუკა დიდებულის უჯრედების ზრდის უნარი არაერთგვაროვანია. მაღალი ბრუნვითი სიჩქარის სანჯღრეველებზე (150-180 ბრ წთ$^{-1}$) სუსპენზიაში ჭარბობს ერთეული უჯრედები და წვრილი აგრეგატები (სურ.9), მაგრამ, ამ დროს უჯრედების ზრდის ინტენსივობა დაბალია (6.0 x10^{5} უჯრედი მლ$^{-1}$) ამასთანავე ციტოლოგიური გამოკვლევისას შეინიშნება ბევრი დაზიანებული უჯრედი. სუსპენზიის კულტივირებისას სანჯღრეველაზე 100 ბრ.წთ$^{-1}$ უჯრედული აგრეგატების დისოციაციის ხარისხი მცირდება. ამ შემთხვევაში აგრეგატების ზომები მატულობს 20-30 უჯრედის შემცველობამდე (სურ. 10), მაგრამ მატულობს ზრდის ინტენსივობაც (12.0 x10^{5} უჯრედი მლ$^{-1}$).

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე დადგენილ იქნა, რომ შესწავლილი ვარიანტებიდან იუკა დიდებულის სუსპენზიური კულტურის უჯრედებისათვის ყველაზე ოპტიმალურს წარმოადგენს კულტივირება 100 ბრ. წთ$^{-1}$ სიჩქარის სანჯღრეველაზე, ექსცენტრისიტეტით 8 ± 2 მმ. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ ხანგრძლივი პასირებისას უჯრედების ზრდის ინტენსივობამ საგრძნობლად იმატა –12–დან 19 x 10^{5} უჯრ. მლ$^{-1}$ –მდე.



სურ. 9. წვრილი აგრეგატები იუკა დიდებულის სუსპენზიური კულტურის კულტივირებისას სანჯღრეველაზე ბრუნვითი სიჩქარით 180 ბრ.წთ$^{-1}$

სურ.10. მსხვილი აგრეგატები იუკა დიდებულის სუსპენზიური კულტურის კულტივირებისას სანჯღრეველაზე ბრუნვითი სიჩქარით 100 ბრ.წთ$^{-1}$

III. 4. უჯრედების კლონების მიღება აგარიზებულ არეებზე

ცალკეული (ერთეული) უჯრედების კულტივირება საშუალევას იძლევა მიღებულ იქნას კლონები და გამოკვლეულ იქნას კლონური მასალის გენეტიკური და ფიზიოლოგიური სტაბილურობა ან ცვალობადობა. ცალკეული უჯრედები ან იზოლირებული პროტოპლასტები გამოიყენება მუტანტების, ჰიბრიდების და ტრანსფორმირებული ხაზების კლონურ სელექციაში. ამ უჯრედებში შეიძლება შევიყვანოთ ახალი გენები. იმავდროულად ეს კარგი მოდელია ონთოგენეზისა და უჯრედის ფიზიოლოგიის შესასწავლად.

ცალკეული უჯრედების წყაროს წარმოადგენს: თხევად საკვებ არეზე გაზრდილი უჯრედული სუსპენზიები; მცენარის მაცერირებული უჯრედები (ფოთლის მეზოფილი); იზოლირებული პროტოპლასტები უჯრედული კედლის აღდგენის შემდეგ.

ცალკეული უჯრედების მისაღებად ყველაზე ეფექტურ მეთოდებს წარმოადგენს: კონდიცირებული არის "მკვებავი ფენის" ან "ძიძა-კულტურების" მეთოდი; მიკროწვეთი.

გენეტიკურად მდგრადი კლონების მისაღებად და უჯრედული სელექციისათვის გამოიყენება პლეიტინგის მეთოდი.

IV. მცენარეთა კალუსური და უჯრედული კულტურების გამოყენება ბიოლოგიურად აქტიურ მეტაბოლიზმის მეორეულ ნაერთთა მისაღებად

IV.1. *In vitro* კულტურები ბუნებრივი ქიმიური ნაერთების ალტერნატიული წყარო. სახალხო-სამეურნეო მნიშვნელობის ბუნებრივ ნაერთთა უმრავლესობა

წარმოადგენენ ე.წ. მეტაბოლიზმის მეორეულ ნაერთებს. გამოთვლილია, რომ არსებულ მცენარეთა მხოლოდ 10%-ია ქიმიურად შესწავლილი და ისიც 2-3 კლასის ნაერთის შემცველობაზე. მეორეული ნაერთები აღმოჩენილია, როგორც მიკროორგანიზმებში, ასევე მცენარეულ და ცხოველურ ორგანიზმებში, მაგრამ მათი შემცველობით განსაკუთრებით მდიდარია მცენარეთა სამყარო. მეორად მეტაბოლიტთა სინთეზი უკავშირდება მცენარის ონტოგენეზის გარკვეულ ეტაპებს და გვხვდება მორფოლოგიურად განსხვავებული დიფერენციაციის მქონე სხვადასხვა ორგანოთა უჯრედებში. ამ ნაერთებს უდიდესი მნიშვნელობა აქვთ მცენარის გარემოსთან ურთიერთკავშირისათვის: შეუძლიათ მავნებლების დაფრთხობა, მონაწილეობენ მცენარის დაცვაში პათოგენებისა და სტრესული სიტუაციებისაგან.

მეორეული ნაერთები ადამიანის მიერ სახალხო მეურნეობაშიც ფართოდაა გამოყენებული: მედიცინაში - როგოც სამკურნალო ნივთიერებები (მაღალი თერაპევტული აქტივობის გამო), სოფლის მეურნეობაში - ინსექტიციდები, პარფიუმერიაში - სუნამოს დანამატები, კვების მრეწველობაში - გემოს მიმცემი არომატული ნივთიერებები, საკვები საღებავები და სხვა.

მიკრობიოლოგიური და ქიმიური მეთოდების თანამედროვე განვითარების პირობებშიც კი მათი მიღების ძირითადი წყარო მცენარეებია. როგორც წესი, ისინი ძირითადად მიიღებიან ტროპიკული მცენარეებიდან, რომლებიც ძნელად ინტროდუცირდებიან. გარდა ამისა, თანდათან მცირდება მათი ბუნებრივი გარემო, მოშენების სიძნელეების გამო იზრდება თვითღირებულება. ყოველივე ეს მოითხოვს ალტერნატიული რესურსების ძიებას. ქიმიური სინთეზის განსახორციელებლად გაწეული ძალისხმევა ხშირად წარუმატებლად მთავრდება პროდუქტის დაბალი გამოსავლის, მაღალი ღირებულებისა და ქიმიური რეაქციების სირთულის გამო. ამასთან საბოლოო პროდუქტი ხშირად წარმოადგენს სტერეოზომერთა ნარევს, მაშინ როდესაც მცენარეული უჯრედი წარმოქმნის ერთ სტეროიზომერს.

დაახლოებით ნახევარი საუკუნის წინ გამოითქვა მოსაზრება, რომ მცენარეული ქსოვილური და უჯრედული კულტურები გამოყენებულ იქნან სასარგებლო ნივთიერებების წყაროდ. ამ ნივთიერებების *in vitro* პირობებში *de novo* სინთეზი დღეისათვის დადასტურებული ფაქტია. ცნობილია, რომ ზოგიერთი რთული სტრუქტურის მქონე ნივთიერებების (ინდოლური ალკალოიდები, მორფინული ალკალოიდები, კარდენოლიდები) გარდა ქსოვილური და უჯრედული კულტურებით შესაძლებელია მეორეული მეტაბოლიტების პრაქტიკულად ყველა კლასის ნაერთის სინთეზი.

არსებობს უამრავი გამოკვლევა, რომლებითაც წარმოებდა მცენარეული უჯრედული კულტურების საშუალებით ბუნებრივ ნაერთთა პროდუცირების უნარის შესწავლა. ამ საკითხთან დაკავშირებით დაწვრილებითი ინფორმაციები შეიძლება მიღებულ იქნას მრავალრიცხოვანი მიმოხილვითი სტატიებით.

***In vitro* კულტურები ბუნებრივი ქიმიური ნაერთების ალტერნატიულ წყაროდ განიხილებიან მრავალი მიზეზის გამო. ეს მიზეზებია: მთელი წლის განმავლობაში მცენარეული ბიომასის მიღების შესაძლებლობა გარემოს სხვადასხვა პირობებისგან დამოუკიდებლად (კლიმატური პირობები, გეოგრაფიული და სეზონური ცვლილებები, მავნებლების ზემოქმედება); წარმოების სისტემების სიზუსტე, რაც განაპირობებს აუცილებელი პროდუქტის მოცემულ ვადებში და საჭირო რაოდენობით წარმოებას და აქედან გამომდინარე ბაზრის მომარაგების კონტროლს; პროდუქტის უფრო მაღალი გამოსავალი და ხარისხი; სასოფლო-სამეურნეო კულტურებისთვის გამოყენებული ფართობის შემცირება.**

კულტივირებული უჯრედების გენომების ვარიაბილობა ჭარბობს ინტაქტური მცენარის სახეობრივი ცვალებადობის შესაძლებლობებს, რაც საშუალებას იძლევა მცენარეული ქსოვილური და უჯრედული კულტურები განვიხილოთ ახალი ნივთიერებების წყაროდ. გარდა ამისა, მათ შესწევთ უნარი მოახდინონ იაფფასიანი წინამორბედების ძვირადღირებულ საბოლოო პროდუქტებად ბიოტრანსფორმაცია.

ბიოტრანსფორმაცია წარმოადგენს მცენარეული უჯრედების სინთეზური შესაძლებლობების ეფექტურად გამოყენების ერთ-ერთ მეთოდს. კულტვირებული უჯრედებით ბიოტრანსფორმაცია პრაქტიკულ ინტერესს წარმოადგენს იმ შემთხვევაში, თუ მისი განხორციელება არ ხერხდება მიკრობული უჯრედებით, რომლებიც გაცილებით ეფექტურნი არიან. ამასთან მათი საშუალებით ნივთიერებათა მიღებას უპირატესობა უნდა ჰქონდეს ქიმიურ სინთეზთან შედარებითაც.

სამწუხაროდ, მცენარეულ უჯრედულ კულტურებთან მუშაობისას ძნელია განსაზღვრული ნივთიერებების მასშტაბური წარმოებისას მიკრობიოლოგიურ მრეწველობაში მიღწეული წარმატებების განმეორება. ფართო მასშტაბიანი კულტივირებისათვის მცენარეთა *in vitro* კულტურების გამოყენებას ხელს უშლის მრავალ ფაქტორი: პროდუქტის დაბალი გამოსავალი, უჯრედების ნელი ზრდა, გადარჩეული უჯრედული ხაზების არასტაბილურობა, სტრესებისადმი მგრძნობიარობა, მიკრობული უჯრედებისაგან განსხვავებით მაღალი უჯრედული ორგანიზაცია და სპეციალიზაცია (ცხრ. 3).

უმაღლესი მცენარეების ქსოვილური და უჯრედული კულტურებიდან მეორეული ნაერთების მიღებისას აუცილებელია მაქსიმალურად იქნას გამოყენებული კონკრეტული შტამ-პროდუცენტის გენოტიპის შესაძლებლობები. ამჟამად, გენეტიკური ინფორმაციის რეალიზაციის პირობები, როგორც მცენარეული კულტურების ზრდისთვის, ასევე სასურველი პროდუქტის სინთეზისათვის ძირითადად ემპირიულად განისაზღვრება. სასურველი პროდუქტის ფუნქციების შესახებ ინფორმაციაზე და უჯრედული პოპულაციებისა და იმ ფაქტორების ურთიერთქმედების შესწავლაზე დაყრდნობით, რომლებიც გავლენას ახდენენ მათ არსებობაზე, შესაძლებელია გარკვეული ფიზიოლოგიური პირობების ალგორითმის შედგენა, რომლის დროსაც სრულად იქნება რეალიზებული შტამის შესაძლებლობები. ალგორითმი შეიცავს უნიფიცირებული მიდგომების კომბინაციას (მსუბუქი სტრესი, სხვადასხვა ქიმიური და ფიზიკური ფაქტორების ლიმიტირება, ზრდის ინჰიბირება) და მეორეული მეტაბოლიზმის სპეციფიკური პირობების განსაზღვრას.

წლების განმავლობაში განიხილებოდა საკითხი: არსებობს თუ არა კორელაცია მცენარისა და იზოლირებული კულტურის პროდუქტიულობას შორის. *C.rouseus*-ის ინტაქტურ მცენარეებსა და *in vitro* კულტურებში ალკალოიდების ბიოსინთეზის შესწავლამ აჩვენა, რომ მაღალპროდუქტიული მცენარეებიდან მიღებული კულტურები ამჟღავნებენ ალკალოიდების მნიშვნელოვანი რაოდენობით სინთეზის ტენდენციას დაბალპროდუქტიული მცენარეებიდან წარმოქმნილ კულტურებთან შედარებით. რადგან ლიტერა-ტურაში არსებობდა საწინააღმდეგო მონაცემებიც, ობიექტური ინფორმაციის მისაღებად ჩატარებულ იქნას სპეციალური გამოკვლევები, რომლებითაც ნაჩვე-ნებია, რომ ნაერთის წარმოქმნა მკაცრად დეტერმინებულია საწყისი მცენარის გენოტიპით.

მრავალრიცხოვანი მონაცემების მიხედვით, იზოლირებულ ქსოვილურ კულტურებში სინთეზირებულ მეორეული ნაერთების თვისობრივ და რაოდენობრივ შემადგენლობაზე გავლენას ახდენს ექსპლანტის ეპიგენეტიკური

მახასიათებლები. რიგ შემთხვევებში ისინი წარმოქმნიან მხოლოდ ექსპლანტის ქსოვილისათვის დამახასიათებელ ნაერთებს. თუმცა, უფრო ხშირად მეორეული

ცხრილი 3

მიკრობული და მცენარეული უჯრედების ზოგიერთი
მახასიათებლების შედარება (Brodelius, 1985)

მახასიათებლები	მიკრობული უჯრედები	მცენარეთა in vitro უჯრედები
ზომა	$2\mu^3$	$10^5\ \mu^3$
სტრესი	არამგრძნობიარე	მგრძნობიარე
წყლის შემცველობა	75%	90%
გაორმაგების დრო	1 სთ	დღეები
კულტივაციის დრო	დღეები	კვირები (2-3)
პროდუქტი	უჯრედგარე	უჯრედშიდა
საკვები არის ფასი	6 აშშ $/მ^3	50 აშშ $/მ^3
მუტაცია	შესაძლებელია	საჭიროებს ჰაპლოიდურ უჯრედებს

ნაერთების სინთეზის მიმართ *in vitro* კულტურები ამჟღავნებენ ტოტიპოტენ-ტურობას. *Rauwolfia Serpentina*-ს ღეროსეული წარმოშობის კულტურა შეიცავს, როგორც ღეროს ძირითად ალკალოიდს - სერპენტინს, ისე ინტაქტური მცენარის ფესვში აღმოჩენილ აიმალიცინს.

მცენარეთა უჯრედული კულტურები ხასიათდებიან პოპულაციაში უჯრედების მნიშვნელოვანი ჰეტეროგენურობით. კულტივირებული უჯრედების გენეტიკური არასტაბილურობის რამდენიმე მიზეზია: საწყისი მასალის გენეტიკური ჰეტეროგენულობა; გენეტიკური ცვლილებების დაგროვება ქსოვილურ და უჯრედულ კულტურებში ხანგრძლივი პასირებისას; კორელაციური კავშირების დარღვევა მცენარის ქსოვილების ნაწილების იზოლაციისას და მათი საკვებ არეზე მოთავსებისას; კულტივაციის პირობების გავლენა ფიტოჰორმონების მუტაგენური მოქმედება და სხვა.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე დღეისათვის უდავოა, რომ მცენარეთა *in vitro* კულტურები პესრსპექტიულ ნედლეულს წარმოადგენენ ბიოლოგიურად აქტიური მეორადი მეტაბოლიტების მისაღებად.

ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური მეთოდების განვითარებასთან ერთად შესაძლოა მიიღწეს ბიოტექნოლოგიური პროგრამის მიზანი - ქსოვილური და უჯრედული კულტურები გამოყენებულ იქნან მეორეული მეტაბოლიტების წყაროდ. თუმცა, დღევანდელი ცოდნის საფუძველზე ძნელია ითქვას, როდის განხორციელდება ყოველივე ეს.

როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული, იუკა დიდებული შერჩეულ იქნა, როგორც სტეროიდული გლიკოზიდების პროდუცენტი. სტეროიდული გლიკოზიდები ბიოლოგიურად აქტიური სტეროიდული ნაერთებია, რომელთა არანახშირწყლოვანი ნაწილი ე.წ. აგლიკონი - საპოგენინებია (ანუ გენინები) – მათ ყოფენ 2 ძირითად ჯგუფად: სპიროსტანოლურ (წყალში უხსნად) და ფუროსტანოლურ (წყალში ხსნად) გლიკოზიდებად, ანუ იგივე ფუროსტანოზიდებად.

ფუროსტანოლურ გლიკოზიდებს ბოლო ხანებში დიდი ყურადღება მიექცა, დადგინდა რა მათი მრავალმხრივი ბიოლოგიური აქტივობა. განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მათი ანტიოქსიდანტური თვისება. *In vitro* ცდებით ამ გლიკოზიდების საკმაოდ დაბალი კონცენტრაციებისას (10 მგ/მლ) აღინიშნებოდა მნიშვნელოვანი მატება ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობისა: სუპეროქსიდისმუტაზის, გლუტატიონრედუქტაზის, კატალაზის. ხდება კანის ჰიდროტროპული და ბიოქიმიური მაჩვენებლების ცვლილება უი დასხივებისას. ამ უკანასკნელი მაჩვენებლებით ფურასტანოლური გლიკოზიდები რეკომენდირებულია, როგორც პროტექტორები კანის ატმოსფეროს მავნე ზეგავლენებისგან და დაბერებისგან დასაცავად. ფურასტანოლური გლიკოზიდების ანტიოქსიდანტური თვისებები გამოყენებულ იქნა სასოფლო-სამეურნეო ცხოველების სპერმის კრიოკონსერვაციისათვის. ნაჩვენებია, რომ გლიკოზიდების ეს ფორმა აქვეითებს რა ლიპიდების დაჟანგვას (9-15%) 40%-ით ზრდის სპერმატოზოიდების მოძრაობის უნარს გამოყინვის შემდეგ, გარდა ამისა მოქმედებენ რა ცხოველთა რეპროდუქტიულ ორგანოებზე ახდენენ ოვულაციის და სპერმატოგენეზის სტიმულირებას. *D. Deltoidea*-ს უჯრედულ კულტურიდან გამოყოფილ ფუროსტანოლურ გლიკოზიდებს ლიმფოციტების სხვადასხვა სუბპოპულიაციებზე ზემოქმედებისას აღმოაჩნდათ მაღალი იმუნომოდულური აქტივობა.

შესწავლილია გულის კუნთში ბიოპოლიმერების (ცილა, რნმ, დნმ) სინთეზზე ფუროსტანოლური გლიკოზიდების გავლენა. დადგინდა, რომ აღნიშნული სტეროიდული გლიკოზიდების გავლენით გულის კუნთში ხდება ცილების აქტიური სინთეზი. შესაძლოა ამის გამო ფუროსტანოლურმა გლიკოზიდებმა მოიპოვონ ფართო მოხმარება კარდეოლოგიაში გულში რეპარაციული პროცესების დასაჩქარებლად მიოკარდის ინფარქტის მკურნალობისას.

ფურასტანოლური გლიკოზიდები შეიძლება განვიხილოთ როგორც ბუნებრივი ადაპტოგენები. ამ ნაერთებით ხსნარით თესლების დამუშავებისას მნიშვნელოვნად იზრდება მათი გაღივების და აღმოცენების სისწრაფე, მცენარის ადაპტაციის უნარი გარემო პირობების სტრესულ ფაქტორებისადმი. პომიდვრის თესლების დამუშავებისას *D. deltoidea* –ს უჯრედული კულტურიდან გამოყოფილი ფურასტანოლური გლიკოზიდების 1.- 10 M ხსნარით მათი აღმოცენება დაჩქარდა 2-3 დღით, ხოლო შაქრის ჭარხლის მოსავლიანობა 30-40%-ით გაიზარდა. თამბაქოს მცენარე გახდა თამბაქოს მოზაიკისა და სხვა ვირუსული დაავადებების მიმართ სენშეუვალი. ამ დროს თამბაქოს მცენარის ფერმენტ რნმ-ზის აქტივობის გაზრდამ შესაძლებელი გახადა გაკეთებულიყო დასკვნა, რომ როგორც ჩანს, ამ დროს ხდება ვირუსის რნმ-ის დეპოლარიზაცია. დასენიანებული მცენარის სტეროიდული გლიკოზიდებით დამუშავებისას ხდება ვირუსული ინფექციით დარღვეული უჯრედების ულტრასტრუქტურის აღდგენა.

დადგენილ იქნა, რომ ფუროსტანოლური გლიკოზიდებით დამუშავება მცენარეების არის პირობა მათი დაცვისა გალებიანი ნემატოდისგან, რაც ამ ნაერთებს სოფლის მეურნეობისათვის მნიშვნელოვანი მცენარეების ბიოლოგიური საშუალებით დაცვის საუკეთესო საშუალებად სახავს.

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე სტეროიდული ნართების ერთერთი პროდუცენტი მცენარის იუკა დიდებულის ქსოვილურ და სუსპენზიურ კულტუ-

რაში შესწავლილ იქნა ფურასტანოლური გლიკოზიდების ბიოსითეზის რეგულაციის პირობები.

ვინაიდან მეორეული ნაერთების რეგულუცია იმყოფება ეპიგენეტიკური კონტროლის ქვეშ, ციტოპლაზმაში მომხდარმა ნებისმიერმა ცვლილებებმა შეიძლება გამოიწვიონ თვისობრივი და რაოდენობრივი ცვლილებები ამ ნივთიერებების წარმოქმნაში. გენომის ციტოპლაზმური გარემოცვა დინამიური სისტემაა, რომელიც თავად იმყოფება გარემო პირობების გავლენის ქვეშ. *In vitro* კულტურების შემთხვევაში ეს ნიშნავს გარემომცველი უჯრედების და ასევე გარემომცველი ატმოსფეროს ან თხევადი საკვები არის გავლენას. ამდენად, კულტივაციის პირობებს (ქიმიურ და ფიზიკურ ფაქტორებს) მნიშვნელოვანი გავლენა აქვს მეორეული ნაერთების წარმოქმნაზე იზოლირებულ უჯრედებში. ამიტომ მცენარეული უჯრედების ხელოვნურ პირობებში გამრავლების მეთოდების სიძნელეების დაძლევის შემდეგ დაიწყო მუშაობა კულტივირების პირობების ოპტიმიზაციაზე, როგორც ბიომასის ასევე ფუროსტანოლურ გლიკოზიდების დაგროვების ხარისხის გასაუმჯობესებლად.

ლიტერატურაში ძალზე მწირი მონაცემებია იზოლირებული კულტურების ზრდასა და მათ ბიოსინთეზურ უნარზე სეზონური მოვლენების გავლენით.

მე-4 ცხრილში ასახულია *Y.gloriosa*–ს უჯრედული კულტურის ზრდის სეზონური ცვლილებების მონაცემები. როგორც ცხრილიდან ჩანს, ზამთარში, ზაფხულის პერიოდთან შედარებით, მლ სუსპენზიაში უჯრედების რაოდენობის ზრდის ინდექსი მცირდება 86%-მდე, ნედლი ბიომასის – 90%-მდე, ხოლო მშრალი ბიომასის – 92%-მდე.

ზამთარში ლატენტური ფაზის ხანგრძლივობა უჯრედების რაოდენობის, ნედლი და მშრალი ბიომასების მიხედვით შესაბამისად იზრდება 1-დან 2 დღემდე, 1.5-დან 2.6 დღემდე და 1-დან 2.8 დღემდე.

კულტურის ზრდის დინამიკაში ფუროსტანოლების დაგროვების შესწავლამ აჩვენა, რომ სეზონურობა არ ახდენს გავლენას მათი რაოდენობის მაქსიმალურ მნიშვნელობაზე (სურ.11). ოლიგიფუროსტანოზიდების მაქსიმალური შემცველობა *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედებში ზამთარსა და ზაფხულში 0.20-22%-ია. წელიწადის ორივე დროს აღნიშნული ნაერთების დაგროვება კულტივირების ადრეულ საფეხურზე იწყება. თუმცა, თუ ზამთარში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვების მრუდი თანსდევს ბიომასის დაგროვების მრუდს და მათი მაქსიმუმი სტაციონალურ ფაზასა და დეგრადაციის ფაზის დასაწყისში აღინიშნება, ზაფხულში სხვაგვარი სურათი წარმოგვიდგება. წელიწადის ამ დროს ფუროსტანოლების დაგროვება უფრო ინ-ტესიურად მიმდინარეობს. რის შედეგად მათი რაოდენობა უკვე ექსპონენციალურ ფაზაში აღწევს მაქსიმალურ მნიშვნელობას.

როგორც ჩანს, *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურა სტანდარტულ პირობებში დიდი ხნის ზრდის მიუხედავად ამა თუ იმ ხარისხით მაინც ინარჩუნებს გენეტიკურ ინფორმაციას საწყისი მცენარის ზრდის და განვითარების სეზონურობაზე.

ცხრილი 4

Y.gloriosa–ს სუსპენზიური კულტურის ზრდის ძირითადი მახასიათებლები წლის სხვადასხვა დროს

ნიშან-თვისება	წლის დრო 1989	N_o P_o	N_{max} P_{max}	N_t/N_o P_t/P_o	ლაგ-ფაზის ხანგრძლივობა	μ_{max} დღე$^{-1}$	q_{min} დღე$^{-1}$
უჯრედების რაოდენობა მლ 10^5	VI XII	3.50 3.50	21.0 18.2	6.00 5.20	1.0 2.0	0.250 0.203	2.77 3.41

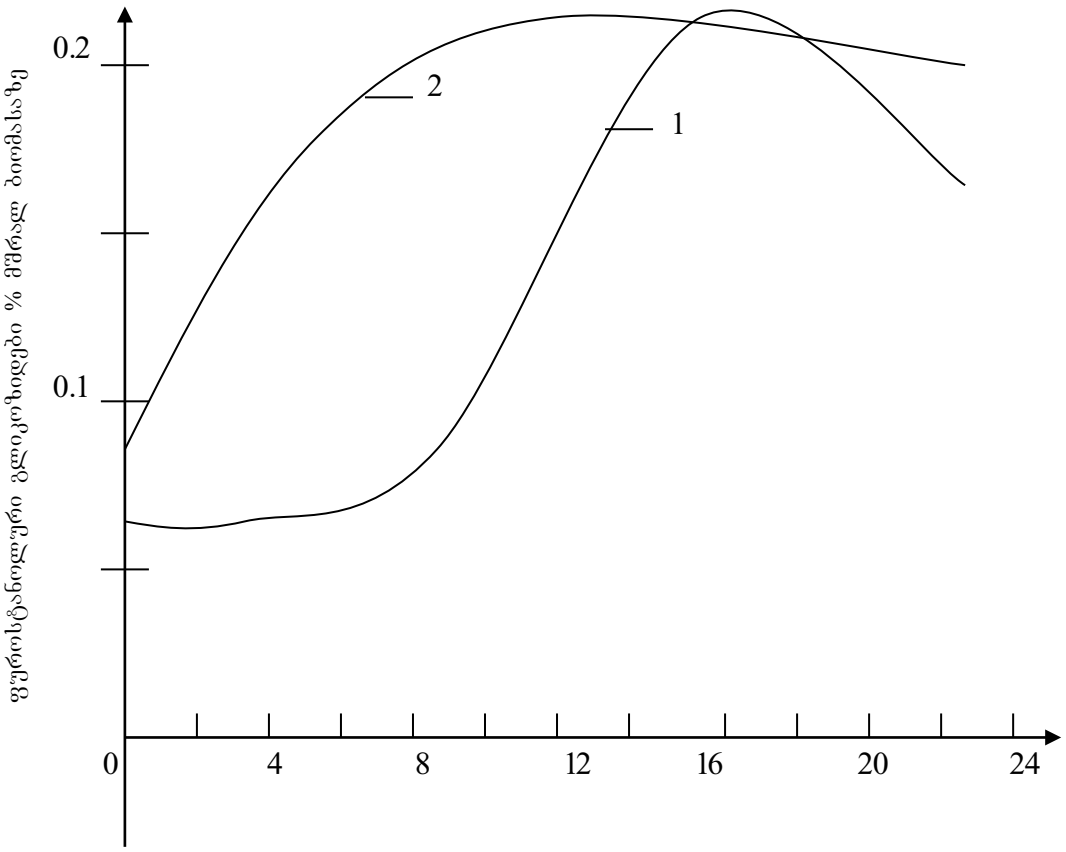
ნედლი ბიომასა,	VI	3.70	23.3	6.29	1.5	0.193	3.59
გ/100 მლ	XII	3.21	18.2	5.68	2.6	0.193	3.59
მშრალი ბიომასა,	VI	0.42	23.0	5.50	1.0	0.123	5.60
გ/100 მლ	XII	0.36	18.5	5.10	1.8	0.163	4.25

IV. 2. საკვები არის კომპონენტების გავლენა *Yucca gloriora*-ს სუსპენზიური კულტურის ზრდაზე და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე. ცნობილია, რომ ბიომასის დაგროვების დონე მჭიდროდ არის დაკავშირებული საკვებ არეში ნახშირწყლების შემცველობასთან, მათი გავლენა იწვევს სტაციონალური ფაზის დაწყებას. ლიტერატურული მონაცემები მიუთითებენ, რომ *in vitro* კულტურებს სტრუქტურულად ძლიერ განსხვავებული მთელი რიგი ნახშირწყლების გამოყენების უნარი შესწევთ, რაც იზოლირებული უჯრედების ნახშირწყალბადოვანი ცვლის ფართო შესაძლებლობებზე მეტყველებს.

Y.gloriosa–ს სუსპენზიური კულტურისთვის ნახშირბადის ოპტიმალური წყაროს დადგენის მიზნით, საქაროზის გარდა, გამოცდილ იქნა 8 ნახშირწყალი, მათ შორის მონოსაქარიდები: ჰექსოზები – გლუკოზა და ფრუქტოზა, დეზოქსი-სპირტი – რამნოზა, პენტოზები – ქსილოზა და არაბინოზა; დისაქარიდები – მალტოზა და ლაქტოზა; პოლისაქარიდი – სახამებელი.

საკვებ არეში აღნიშნული ნახშირწყლების კონცენტრაცია 3%-ს შეადგენდა. გავლენა ზრდაზე და ფუროსტანოლების დაგროვებაზე ფასდებოდა ზრდის ციკლის ბოლოს, მე-16 დღეს. ხდებოდა მათი მოქმედების ეფექტის საქაროზა-სთან შედარება.

მ. გოგავას მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტის შედეგად მიღებული შედეგე-ბი გვიჩვენებენ, რომ *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედებს უნარი შესწევთ გამოიყენონ ნახშირბადის სხვადასხვა წყარო. ამასთან უნდა აღინიშნოს, რომ შესწავლილი ნახშირწყლებიდან ვერც ერთმა ვერ შეძლო ზრდისა და სტეროიდული გლიკოზიდების დაგროვების უზრუნ-ველყოფა საქაროზაზე უკეთესად.



დღეები

სურ.11. *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედებში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვების სეზონური სურათი. 1. ზამთარში; 2. ზაფხულში

აზოტის შემცველი მარილები აუცილებელია, როგორც *in vitro* კულტურების ზრდისთვის, ასევე მათში მეორეული ნაერთების წარმოქმნისათვის. ამასთან ნაჩვენებია, რომ დიდი მნიშვნელობა ენიჭება აზოტის წყაროსა და კონცენტრაციას.

Y.gloriosa–ს სუსპენზიური კულტურის ზრდაზე და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე აზოტის მინერალური ფორმების გავლენის შესწავლის მიზნით შეცვლილ იქნა მს საკვები არის შემადგენლობა. ნიტრატის იონების გამორიცხვის შემთხვევაში NH_4NO_3 –ის ნაცვლად გამოიყენებოდა $NH_4H_2PO_4$ (2.37 გ/ლ), ხოლო KNO_3 –ის ნაცვლად KCI (1.40 გ/ლ). ამონიუმის იონების გამორიცხვისას ნიტრატის იონების დეფიციტი ივსებოდა $NaNo_3$ –ით (1.75 გ/ლ). შედეგები ასახულია მე-5 ცხრილში

ცხრილი 5

აზოტის მინერალური ფორმებისა და მათი ურთიერთშეფარდების გავლენა *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის ზრდასა და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე (N_0=3.5 . 10^5 უჯრედი/მლ)

ნიმუში	ნედლი ბიომასა გ/100მლ	მშრალი ბიომასა გ/100 მლ	უჯრედების რაოდენობა მლ. 10^5	გლიკოზიდები % მშრალ ბიომასაზე
კონტროლი NH_4^+/NO_3^-(1/2)	18.48±1.2	1.77±0.02	20.05±0.8	0.22±0.003
NH_4^+-ის გარეშე	12.2 ±0.5	1.01 ±0.02	10.10 ±0.4	0.02 ±0.004
NO_3^- - ის გარეშე	7.2 ±0.6	0.56 ±0.02	5.91 ±0.4	0.06 ±0.001
NH_4^+/ NO_3^- (1/3)	22.6 ±0.7	1.88 ±0.03	22.40 ±0.5	0.18 ±0.002
NH_4^+/ NO_3^- (1/4)	16.4 ±0.4	1.54 ±0.04	19.46 ±0.6	0.15 ±0.003
NH_4^+/ NO_3^-(2/4)	16.7 ±0.3	1.30 ±0.03	19.62 ±0.5	0.14 ±0.001

სუსპენზიური კულტურის უჯრედები მკვეთრად რეაგირებდნენ საკვებ არეში აზოტის მხოლოდ ერთი წყაროს (ან ამონიუმის, ან ნიტრატის) არსებობაზე. ამონიუმის იონების გარეშე მნიშვნელოვნად მცირდებოდა ზრდის მაჩვენებლები, ხოლო სტეროიდული გლიკოზიდები წარმოიქმნებოდნენ კვალის სახით. საკვებ არეში აზოტის ერთადერთ წყაროდ ამონიუმის იონების არსებობის შემთხვევაში კი ზრდა უფრო მეტად ითრგუნებოდა, ვიდრე მათი გამორიცხვის დროს. ამასთან ფუროსტანოლების დაგროვება საკონტროლო ნიმუშთან შედარებით 3.3-ჯერ მცირდებოდა. როგორც ჩანს, *Y.gloriosa*–ს უჯრედული კულტურის ზრდისთვის და მასში სტეროიდული გლიკოზიდების წარმოქმნისთვის აუცილებელია აზოტის ორივე მინერალური ფორმა.

საკვები არისთვის დამახასიათებელია გარკვეული შეფარდება აზოტის ამონიუმისა და ნიტრატულ ფორმებს შორის. მს არისთვის ეს შეფარდება არის 1/2. NH_4^+ და NO_3^- იონების თანაფარდობის შეცვლამ 1/2-დან 1/3-მდე, 1/4-მდე და 2/4-მდე ზრდის მაჩვენებლების მიხედვით მოგვცა არაერთგვაროვანი შედეგები. შეფარდება 1/3 სტიმულს აძლევდა ბიომასის დაგროვებას, ხოლო 1/4 და 2/4 ოდნავ ამცირებდა სუსპენზიური კულტურის ზრდის მაჩვენებლებს. აზოტის მინერალური ფორმების თანაფარდობის ცვლილება უარყოფითად მოქმედებდა ოლიგოფუროსტანოზიდების დაგროვებაზე.

ზრდის ჰორმონები აუცილებელია კულტურის ხანგრძლივი შენარ-ჩუნებისათვის. მეორად მეტაბოლიზმზე მათი გავლენა არაერთგვაროვანია და დამოკიდებულია მეორეული ნაერთის კლასზე, კულტურის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე, კულტივაციის პირობებზე და სხვა. ფაქტორებზე.

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედების რეაქციის შესწავლა უჰორმონო ან ჰორმონების დაბალი კონცენ-ტრაციის შემცველ არეზე ზრდის დროს (საკონტროლო ნიმუშის საკვებ არეში 2.4-დ -ს რაოდენობა შეადგენდა 1 მგ/ლ) (ცხრილი 6). ნიმუში, რომლის საკვები არე არ შეიცავდა 2.4-დ-ს ნედლი ბიომასის დაგროვება მცირდებოდა 3.5 – ჯერ, მშრალი ბიომასის - 3.3-ჯერ, ხოლო უჯრედების რაოდენობა მლ სუსპენზიაში – 4.8-ჯერ. შესაბამისად ითრგუნებოდა ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვება (3.1-ჯერ).

საკვებ არეში 0.1 მგ/ლ 2.4-დ -ს შეტანის დროს უკვე შეინიშნებოდა ზრდის მაჩვენებლების გამუჯობესება. რაც შეეხება ოლიგოფუროსტანოზიდების წარმოქმნას, ზრდასთან შედარებით იგი ნაკლებად ითრგუნება. უკეთესი შედეგები მიღება, როდესაც 2.4-დ -ს შემცველობა იზრდება 0.5მგ/ლ-მდე, თუმცა ზრდის ინდექსი და სტეროიდული გლიკოზიდების დაგროვება საკონტროლო ნიმუშთან შედარებით დაბალია შესაბამისად 1.4-ჯერ და 1.3-ჯერ. ჩანს, რომ *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედები არ იზრდებიან 2.4-დ -ს გარეშე. ამ შემთხვევაში ეცემა კულტურის ბიოსინთეზის უნარიც. 2.4-დ ს კონცენტრაციის გაზრდა 0.5 მგ/ლ - მდე იწვევს როგორც ზრდის, ასევე ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვების გაძლიერებას.

საკვებ არეში გიბერელინის მჟავის 10^{-5} M კონცენტრაციით გამოყენების შემთხვევაში მცირდება, როგორც უჯრედული კულტურის ზრდის მაჩვენებლები, ასევე წარმოქმნილი ფუროსტანოლური გლიკოზიდების რაოდენობა. მისი დაბალი კონცენტრაცია (10^{-6} M ან 10^{-7} M) კი სტიმულს აძლევს უჯრედების ზრდას, მაგრამ ხელს არ უწყობს გლიკოზიდების დაგროვებას, რომელთა გამოსავალი საკონტროლო ნიმუშთან შედარებით მცირდება 1.4-ჯერ. საკვებ არეში გიბერელინის მჟავისა (10^{-6} M) და 2.4 დ (1 მგ/ლ) ერთდროული შეტანა კი აძლიერებს ზრდასაც და ოლიგოფუროსტანოზიდების დაგროვებასაც (მათი რაოდენობა აღწევს საკონტროლო ნიმუშის დონეს).

უკანასკნელი წლების გამოკვლევებმა აჩვენეს, რომ მეორეული ნაერთების წარმოქმნა შეიძლება სწრაფად შეიცვალოს მცენარეთათვის სტრესული

ფაქტორების ზეგავლენით. ამ ფაქტორებით მცენარეულ სომატურ უჯრედებში მეორეული ნაერთების ინდუქციისთვის საუკეთესო მოდელს წარმოადგენენ მცენარეთა იზოლირებული ქსოვილური და უჯრედული კულტურები.

In vitro კულტივირებული უჯრედების მაგალითზე ნაჩვენებია, რომ აღნიშნული ნაერთების სინთეზის სტიმულირება ხდება ექსტრმალურ პირობებში, როგორიცაა საკვები არის კომპონენტების დეფიციტის, ანოქსიის (ჟანგბადის დეფიციტი), ულტრაიისფერი დასხივების, კულტივირების ტემპერატურის ცვლილების და სხვა ფაქტორთა ზეგავლენით.

შესწავლილ იქნა ანოქსიის გავლენა *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის ზრდასა და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე. ჟანგბადის ლიმიტირების მიზნით ხდებოდა აერაციის რეჟიმის დარღვევა სუსპენზიური უჯრედების ნჯღრევის შეწყვეტით. ანოქსია ხელოვნურად იქმნებოდა ზრდის ორ სხვადასხვა ფაზაში: ექსპონენტციალურსა (მე-7 დღეს) და სტაციონალური ფაზის დასაწყისში (მე-13 დღეს). გამოიცადა სტრესული ფაქტორის მოქმედების ორი დონე: „რბილი“ (24 სთ-იანი) და „მკაცრი“ (48 სთ-იანი). შედეგები ასახულია მე-12 სურათზე.

ცხრილი 6

ზრდის ჰორმონების სხვადასხვა კონცენტრაციის გავლენა *Y.gloriosa*–ს სუსპენზიური კულტურის ზრდასა და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე (N_0=3.5 . 10^5 უჯრედი/მლ)

ნიმუში	ნედლი ბიომასა გ/100მლ	მშრალი ბიომასა გ/100 მლ	უჯრედების რაოდენობა მლ. 10^5	გლიკოზიდები % მშრალ ბიომასაზე
კონტროლი (1 მგ/ლ 2.4 - D)	18.48±1.2	1.77±0.02	20.05±0.8	0.22±0.003
2.4-D-ს გარეშე	5.33±0.7	0.54±0.03	4.20±0.4	0.07±0.004
2.4-D-ს (0.1 მგ/ლ)	8.42±0.6	1.02±0.03	7.70±0.3	0.13±0.006
2.4-D-ს (0.5 მგ/ლ)	12.52±0.9	1.20±0.05	14.70±0.6	0.17±0.001
გიბერელინის მჟავა (10^{-5} მ)	14.00±0.1	1.22±0.01	16.10±0.4	0.13±0.005
გიბერელინის მჟავა (10^{-6} მ)	22.40±0.3	1.85±0.03	23.80±0.8	0.16±0.001
გიბერელინის მჟავა (10^{-7} მ)	19.70±0.2	1.72±0.04	22.00±0.8	0.16±0.001
გიბერელინის მჟავა (10^{-6} მ) +2.4 –D (1 მგ/მლ)	23.80±0.9	1.88±0.02	23.50±0.7	0.23±0.003

სურათიდან ჩანს, რომ ექსპონენციალურ ზრდის ფაზაში გამოწვეული როგორც „რბილი“, ასევე „მკაცრი“ ანოქსია უმნიშვნელოდ მოქმედებს *Y.gloriosa*–ს ზრდის ინდექსის ცვალებადობაზე. ამასთან ჟანგბადის დეფიციტი პოზიტიურ გავლენას ახდენს სტეროიდული გლიკოზიდების დაგროვების დონეზე.

შესწავლილია ტემპერატურული რეჟიმის გავლენა *Y.gloriosa*–ს ქსოვილური კულტურის ზრდასა და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე. საკონტროლო ნიმუში იზრდებოდა 26^0 C –ზე. ბიომასის შეგროვება და ანალიზი ხდება კულტივირების 30-ე დღეს. აღნიშნული ფაქტ**ორის** შესწავლის მიზნით კალუსური ქსოვილი იზრდებოდა 19^0 C და 4^0 C ტემპერატურებზე (ცხრილი 7) დაბალი ტემპერატურა (4^0C) უარყოფითად მოქმედებს როგორც ბიომასის, ასევე სტეროიდული გლიკოზიდების **დ**აგროვებაზე. ტემპერატურის დაწევა 26^0 C–დან 19^0 C–მდე კი უმნიშვნელოდ ცვლის ოლიგოფუროსტანოზიდების გამოსავალს.

ცხრილი 7

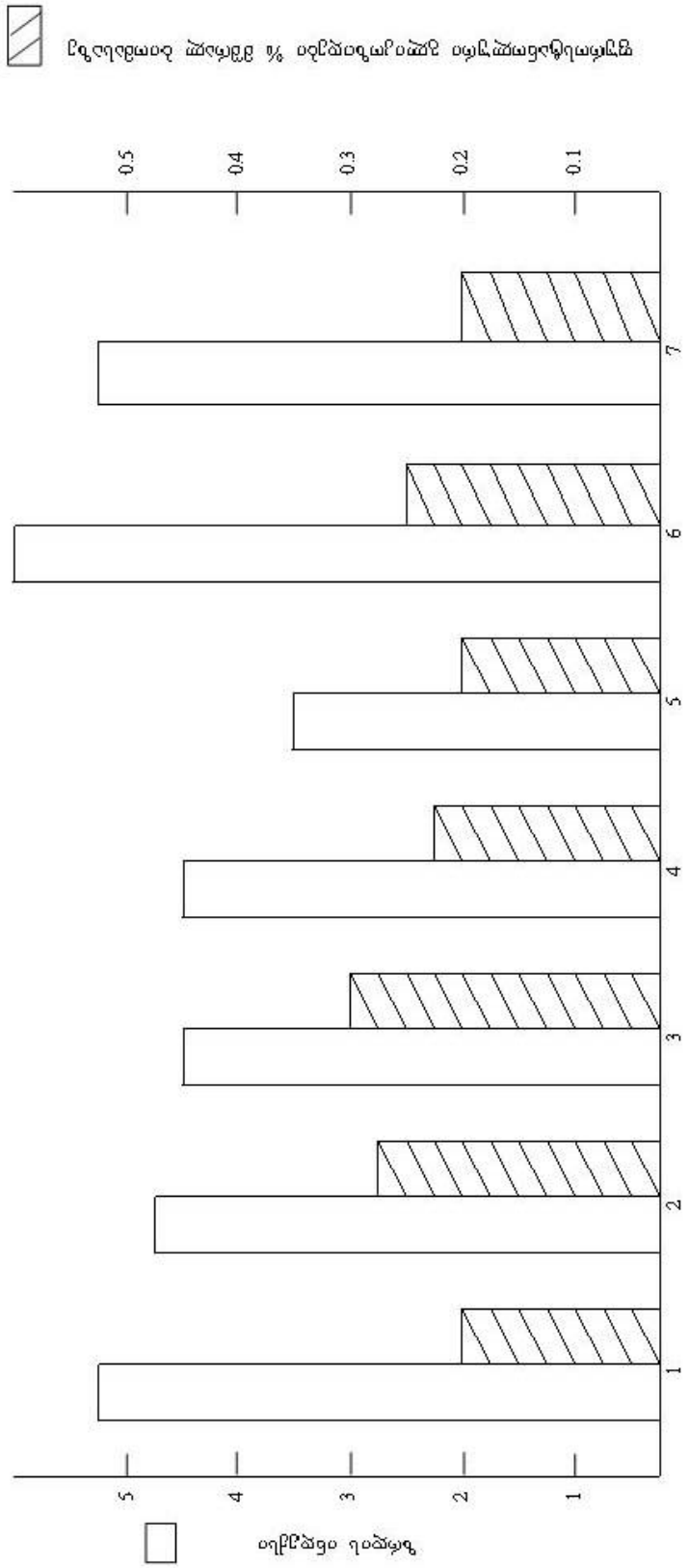
ტემპერატურული რეჟიმის გავლენა *Y.gloriosa*–ს ქსოვილური კულტურის ზრდასა და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე

ნიმუში	ნედლი ბიომასა გ/40 მლ	მშრალი ბიომასა გ/40 მლ	გლიკოზიდები % მშრალ ბიომასაზე
კონტროლი (26^0C)	21.13±0.7	0.6±0.01	0.18±0.003
19^0C	17.92 ±0..2	0.48±0.04	0.16±0.002
4^0C	6.78±0.4	0.27±0.03	0.08±0.005
26^0C-13^0C	14..22±0.5	0.40±0.06	0.13±0.001

შემდგომ ცდებში მ. გოგავას და ხ. ვარსიმაშვილის მიერ შესწავლილ იქნა კულტივირების პერიოდში ტემპერა-ტურის ცვალებადობის გავლენა *Y.gloriosa*–ს კალუსური ქსოვილის ზრდასა და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე. ქსოვილური კულტურა განვითარების პირველი ცხრა დღის განმავლობაში იზრდებოდა ჩვეულებრივ, 26^0C^0 –ზე. მე-10 დღიდან იცვლებოდა ტემპერატორული რეჟიმი – კულტურა 8სთ-ის განმავლობაში იმყოფებოდა 13^0C–ზე, 48 სთ–ის განმავლობაში კი – 26^0C –ზე. ეს პროცედურა მეორდებოდა 4-ჯერ. შემდეგ ხდებოდა ბიომასის შეგროვება და ანალიზი. როგორც მე-7 ცხრილიდან ჩანს, იზოლირებული ქსოვილის ასეთ პირობებში ზრდის დროს ხდება, როგორც ზრდის მაჩვენებლების, ასევე კულტურის ბიოსინთეზის უნარის დაქვეითება.

მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ ტემპერატურის დაწევით გამოწვეულ სტრესულ მდგომარეობას *Y.gloriosa*–ს ქსოვილური კულტურის უჯრედები არ პასუხობენ მეორეული ნაერთების გაძლიერებული წარმოქმნით. პირიქით, ამ დროს ხდება იზოლირებული ქსოვილის როგორც ზრდის, ასევე მისი ბიოსინთეზის უნარის დათრგუნვა. ამასთან რაც უფრო დაბალია ტემპერატურა,

მით უფრო მკვეთრია ეს დათრგუნვა. აქედან გამოტანილ იქნა დასკვნა, რომ გამოკვლეული სტეროიდული გლიკოზიდები (ოლიგოფუროსტანოლები) არ



სურ. 12. სხვადასხვა სიძლიერის ანოქსიის გავლენა Y.gloriosa-ს სუსპენზიური კულტურის ზრდის ინდექსსა და მათში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე. 1. კონტროლი; ანოქსია - 2. მე-7 დღეს (24 სთ); 3. მე-7 დღეს (48 სთ); 4. მე-13 დღეს (24 სთ); 5. მე-13 დღეს (48 სთ); 6. მე-7 დღეს (24 სთ)+ფოსფატი-200%; მე-7 დღეს (48 სთ)+ NH_4^+ / NO_3^- (1/3).

ემსახურებიან შესწავლილი მცენარის დაცვას ტემპერატურის დაწევით გამოწვეული სტრესული ფაქტორისგან.

სიბნელეში კულტივირებული მცენარეული უჯრედები ჰეტეროტროფებს წარმოადგენენ. მათი ნახშირბადის ძირითადი წყარო საკვებ არეში შეტანილი ნახშირწყლებია. განათების გავლენით რიგი ქსოვილური კულტურის უჯრედები მწვანდება, ეს მიუთითებს იმაზე, რომ სინათლეზე მზარდ უჯრედებს შეუძლია ფოტოსინთეზური რეაქციების განხორციელება ნაწილობრივ ან მთლიანად. აქედან გამომდინარე, როგორც მოდელური სისტემები, ისინი შეიძლება გამოყენებულ იქნან უმაღლეს მცენარეებში ფოტოსინთეზის რეგულაციისა და ნახშირბადის ასიმილაციის პროცესების შესასწავლად. გარდა ამისა, სინათლეზე კულტივირებული ქსოვილების საშუალებით შესაძლებელია მეორად მეტაბოლიზმში ქლოროპლასტებისა და ფოტოსინთეზის როლის გარკვევა.

კვლევის ამოცანას წარმოადგენდა სინათლის როლის დადგენა *Y.gloriosa*–ს კალუსური ქსოვილის ზრდის თავისებურებებსა და მასში ქლოროფილისა და ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე. ამ მიზნით კულტურა იზრდებოდა განათების სხვადასხვა რეჟიმის პირობებში: 1. სიბნელე – სინათლე: ქსოვილები 21 დღე იზრდებოდნენ სიბნელეში, 25 დღე – სინათლეზე; 2. სინათლე- კალუსური ქსოვილის კულტივირება მიმდინარეობდა განათლების რეჟიმით: 16სთ სინათლე + 8 სთ. სიბნელე, ლუმინესცენციური ნათურების გამოყენებით, 3,5 ათასი ლუქსის ინტენსივობის განათებისას, 26^0C±1 ტემპერატურაზე. საკონტროლო ნიმუშს სიბნელეში გაზრდილი ქსოვილური კულტურა წარმოადგენდა.

სინათლეზე კალუსიური ქსოვილი სინათლეზე მოთავსებიდან 25 დღის შემდეგ იწყებს გაშავებას და ნეკროზდება, ამიტომ ცდები ტარდებოდა 25 დღის განმავლობაში (საკონტროლო ნიმუშიც). ცდის შედეგები ასახულია მე-8 ცხრილში.

სიბნელეში გაზრდილ და შემდომ სინათლეზე გადატანილ კულტურაში ქლოროფილის წარმოქმნა არ შეინიშნება. საკონტროლო ნიმუშის მსგავსად იგი კრემისფერ, ფაშარ ქსოვილს წარმოადგენს. პასაჟის 0-ოვანი დღიდან სინათლეზე კულტივირებული ქსოვილი ჰეტეროტროფული ქსოვილისგან მორფოლოგიურად განსხვავდება. განათების გავლენით ჩამოყალიბდა მკვრივი, ღია მწვანე ფერის კალუსი. ვიზუალურად ქლოროფილის წარმოქმნა მე-15 დღიდან შეინიშნება, შემდეგ მისი შემცველობა თანდათან მატულობს. ზრდის ციკლის 25-ე დღეს მისი რაოდენობა შეადგენს 0,022 მგ/გ ნედლ ბიომასაზე.

განათება იწვევს *Y.gloriosa*–ს ქსოვილური კულტურის ზრდის ძლიერ ინჰიბირებას. ნედლი ბიომასის დაგროვების მიხედვით ზრდა თითქმის ორჯერ ითრგუნება, მშრალი ბიომასის დაგროვების მიხედვით კი - 1,5–ჯერ ზრდის შენელებას თან სდევს ფუროსტანოლური გლიკოზიდების რაოდენობის მატება (0,31%).

განათლების ხანგრძლივობის გავლენის შესწავლის მიზნით, მიმდინარეობდა ფოტომიქსოტროფული ქსოვილის სინათლეზე კულტივირება 11 პასაჟის განმავლობაში. ხანგრძლივი პასირებისას, სინათლეზე ერთი პასაჟის განმავლობაში მზარდ ქსოვილთან შედარებით, უმნიშვნელოდ იცვლება ზრდის მაჩვენებლები, იზრდება ფუროსტანოლებისა და ქლოროფილის შემცველობა. როგორც ჩანს, ციტოდიფერენცირება, რომელიც ხდება სინათლის გავლენით, ხელს უწყობს ფუროსტანოლური გლკოზიდების დაგროვების პროცესს, თუმცა, პლასტიდების

გრანებში ქლოროფილის შემცველობა არ არის ამ პროცესის განმსაზღვრელი პირობა.

ცხრილი 8

სინათლის გავლენა განსხვავებულ პირობებში კულტივირებულ *Y.gloriosa*–ს კალუსურ ქსოვილში ბიომასის, ქლოროფილისა და ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე

ნიმუში	ნედლი ბიომასა გ/400მლ	მშრალი ბიომასა გ/400 მლ	ქლოროფილი მგ/ნედლ ბიომასაზე	გლიკოზიდები % მშრალ ბიომასაზე
კონტროლი (სიბნელე)	21.95±0.5	0.61±0.03	-	0.17±0.003
სინათლე – 16 სთ სიბნელე – 8 სთ..	15.64±0.6	0.50±0.04	-	0.019±0.002
სინათლე (1 პ)	13.18±0.2	0.44±0.06	0.022± 0.0005	0.31±0.004
სინათლე (მე-11 პ)	11.28±0.5	0.37±0.01	0.030±0.0002	0.55±0.003

IV. 3. მცენარეული მაღალპროდუქტიური შტამების მიღების საშუალებები ქიმიური მუტაგენეზის და უჯრედთა სელექციის გზით

სელექციური მიზნებისთვის *in vitro* პირობებში კულტივირებულ უჯრედებზე ქიმიურ მუტაგენთა ზემოქმედების შესწავლამ, განსაკუთრებით სუპერმუტაგენების ეფექტის გამოვლენამ საფუძველი ჩაუყარა სრულიად ახალ მიმართულებას ექსპერიმენტული მეტაგენეზის სფეროში – მცენარეთა სომატური უჯრედების მუტაციურ სელექციას.

კლასიკური შრომები მუტანტთა სელექციაში ეკუთვნის მალიგასა და მის კოლეგებს. ექსპერიმენტულ მუტაგენეზის საწყის მასალას წარმოადგენს კალუსური, სუსპენზიური კულტურები ან იზოლირებული პროტოპლასტები. ობიექტის შერჩევა დამოკიდებულია სხვადასხვა მცენარისთვის შემუშავებულ ტექნოლოგიაზე, აგრეთვე, კვლევის საბოლოო მიზანზე.

სელექციის დროის სწორი შერჩევა ექვემდებარება მუტაციის ტიპს, უჯრედული ციკლის სტადიას, საწყის კოლონიაში უჯრედთა რიცხვს, სელექციის დაწყებამდე მუტანტურ უჯრედებში დაყოფათა სავარაუდო რიცხვს.

სხვადასხვა მუტანტთა შესარჩევად იყენებენ შემდეგი სახის მიდგომებს:

- პირდაპირი (დადებითი) სელექცია, როცა გადარჩება უჯრედთა მხოლოდ გარკვეული საძებნი ტიპი.
- არაპირდაპირი (უარყოფითი), რომელიც ემყარება ველური ტიპის გაყოფისუნარიან უჯრედთა შერჩევით დაღუპვასა და მეტაბოლურად არააქტიურ უჯრედთა გადარჩენადობას, მაგრამ საჭიროებს მათში მუტაციური ცვლილებების დამატებით იდენტიფიკაციას.

- ტოტალური სელექცია, რომლის დროსაც ინდივიდუალურად ტესტირებულია ყველა უჯრედული კლონი.

ვიზუალური სელექცია და არასელექტური გადარჩევა, როცა ვარიანტული ხაზი იდენტიფიცირებულია მთელ პოპულაციაში ვიზუალურად ან ბიოქიმიურ მეთოდთა გამოყენებით.

მუტაგენეზის და სელექციისთვის გარკვეული უპირატესობა ენიჭება კალუსური ქსოვილის თხევად არეში რესუსპენდირებით მიღებულ სუსპენზიურ კულტურას. რამდენიმე პასაჟის შემდეგ შეირჩევა მდგრადი უჯრედული ხაზები უშუალოდ ამ კულტურაში. განსაკუთრებული ყურადღება ეთმობა აქტიურ მუტაგენთა გავლენას უჯრედულ კულტურათა გადარჩენის უნარზე. ნმშ-ს (ნიტროზომეთილშარდოვანა) გამოყენებით შერჩეულია აუქსოტროფულ ვარიანტები, რომლებთაც აღნშნული მუტაგენის ფარგლებში მაღალი სიცოცხლისუნარიანობა გააჩნია.

სუსპენზიური და კალუსური კულტურის შემთხვევაში სიცოცხლისუნარიანობა შესაძლოა განსხვავებული იყოს იმის მიხედვით, კულტურის განვითარების რომელ სტადიაზე ხდება მუტაგენით დამუშავება. მუტანტურ კლონთა გამოსაყოფად მიზანშეწონილია ცალკეულ უჯრედთა მუტაგენით დამუშავება მათ პირველდაყოფამდე. ლეტალურობის მაღალი პროცენტი დაკავშირებულია ქიმიურ მუტაგენთა დიდ დოზებთან, რაც საბოლოოდ იწვევს მთელი პოპულაციის დაღუპვას. ამდენად, სარგებლობენ ძირითადად მუტაგენის დაბალი დოზით, თუმცა ლიტერატურაში მოიპოვება ექსპერიმენტული მონაცემები იმის თაობაზე, რომ უჯრედთა გამძლეობასა და მუტაგენის დოზას შორის შექცევადი დამოკიდებულება არსებობს. საჭიროა დოზური ეფექტის მრუდების აგება, რომლებიც გამოავლენს ყველაზე ოპტიმალურ დოზას უჯრედთა გადარჩენის თვალსაზრისით.

უჯრედთა სიცოცხლისუნარიანობა მუტაგენით დამუშავების შემთხვევაში მნიშვნელოვან წილად არის დამოკიდებული უჯრედთა პლოიდურობაზე. უკეთეს შედეგებს იძლევა ჰაპლოიდურ უჯრედთა გამოყენება, რომელთა დათესვის ეფექტურობა შეიმჩნეოდა მუტაგენთა დაბალ დოზებზე. მართალია, ვარიაბილურ კლონთა წარმოშობის სიხშირე იზრდება მუტაგენის დოზის გადიდების შესაბამისად, მაგრამ ამ დოზებს შეუძლიათ არასასურველ მუტაციურ ცვლილებათა ინდუცირება-უჯრედთა მორფოგენეტიკური პოტენციალის დარღვევა ანდა ანომალიურ მორფოლოგიურ ცვლილებათა წარმოშობა რეგენერირებულ მცენარეებში. ამიტომ მათი თავიდან აცილების მიზნით, უჯრედულ მუტანტთა სე-ლექციისას შემოთავაზებულია მუტაგენების შედარებით დაბალი დოზებით მუშაობა.

რამდენადაც ქიმიურ მუტაგენთა და სუპერმუტაგენთა მოქმედება ხასიათდება მაღალი სპეციფიურობით, მნიშვნელოვანი მოწესრიგებულობით და მუტაგენური ეფექტის მაღალი ინტენსივობით, საკმაოდ გაფართოვდა ინდუცირებული მუტაგენეზის როლი სელექციურ სამუშაოთა საწარმოებლად. კვლევის თანამედროვე ეტაპზე ჰიბრიდიზაციის და მუტაგენეზის ტრადიციულ მეთოდთა პარალელურად დიდი წარმატებით სარგელობენ *in vitro* კულტურების მეთოდით, რომელიც ქმნის უშუალოდ სომატურ უჯრედზე ექსპერიმენტული ზემოქმედების პირობას, ხოლო ტოტიპოტენტურობა-კულტივირებულ უჯრედებიდან მცენარეთა რეგენერაციის უნარი-საშუალებას იძლევა შეცვლილი უჯრედებიდან მიღებულ იქნას შეცვლილი ფორმები.

მაგრამ მუტაგენით სუსპენზიის დამუშავება, სელექტურ პირობებში დათესვა და შეცვლილი კოლონიების მიღება როდი წარმოადგენს დასრულებულ სამუშაოს უჯრედულ დონეზე. აუცილებელია მიღებულ ცვლილებათა გენეტიკური ბუნების დასაბუთება. ამისთვის სარგებლობენ რამდენიმე

კრიტერიუმით, რომელთა ერთობლიობა შეცვლილი კლონის გენეტიკური ბუნების უცილობელი საბუთია. ეს კრიტერიუმებია:

1. შეცვლილ უჯრედთა სიხშირე უნდა იყოს დაბალი (ე.ი. $1x10^{-4}$-10^{-5}).
2. შეცვლილ უჯრედებს ხანგრძლვი სტაბილური ზრდის უნარი აქვს.
3. შეცვლილი ნიშნის სტაბილურობა შენარჩუნებულია სელექტიური ზეწოლის უქონლობისას;
4. ვლინდება გენის შეცვლილი ექსპრესიის პროდუქტი.

ამათგან ყველაზე სარწმუნოა სწორედ ბოლო კრიტერიუმი.

სომატურ უჯრედთა გენეტიკას და მუტაგენეზში დაგროვლი თეორიული ცოდნის საუძველზე ხელსაყრელი ხდება ახალი ბიოტექნოლოგიური მეთოდების გამოყენება მცენარეთა მიზანმიმართული სელექციის განსახორციელებლად.

ლიტერატურაში არა ერთ გზის განხილულია *in vitro* კულტურათა ციტოგენეტიკური ცვალებადობის მიზეზები, რაც შესაძლოა დამოკიდებული იყოს საკვები არეს შემადგენლობასა და კულტივირების სხვა პირობებზე. მისი გამომწვევი შეიძლება იყოს უჯრედთა იზოლირებული მდგომარეობა. მაგრამ გადამწყვეტად ითვლება სახეობის გენეტიკური კონსტიტუცია. შემჩნეულია, რომ ციტოგენეტიკურ სტაბილურობას ავლენს ის გენეტიკური პოპულაციები, რომელთა ქსოვილოვანი დიფერენციაცია არ უკავშირდება უჯრედთა პოლიპლოიდიზაციას.

არსებობს გამოკვლევები *in vitro* გამრავლებულ მცენარეებში ეპიგენეტიკურ არასტაბილურობის შესახებ. სავარაუდოა, რომ მისი გამომწვევია რეგენერაციის პროცესი, განსაკუთრებით კალუსის ფორმირების ეტაპზე. ამ ლიტერატურულ მონაცემთა თანახმად, ქსოვილოვან კულტურებში გენეტიკური არასტაბილურობის ხარისხი გავლენას ახდენს რეგენერატთა სტაბილურობაზე. ამიტომ სასურველია უჯრედულ კულტურათა სტაბილიზაცია გენეტიკურად, როგორც სელექციის განმავლობაში, ასევე რეგენერაციის დაწყების წინ.

ქრომოსომთა სტაბილური რიცხვის მქონე ჰაპლოიდურ, დიპლოიდურ და პოლიპლოიდურ უჯრედულ ხაზთა მიღება აუცილებელი ეტაპია გენურ მუტაციათა გამოსავლენად და *in vitro* მცენარეულ კულტურათა სამრეწველო მიზნებისათვის გამოსაყენებლად.

უჯრედებისთვის დამახასიათებელი გენეტიკური და ეპიგენეტიკური არასტაბილურობა სერიოზულ დაბრკოლებას ქმნის უჯრედული კულტურების მიერ ბიოლოგიურ ნაერთთა სინთეზის პროცესისთვის. ეს კი, თავის მხრივ, ართულებს იმ უჯრედთა სელექციას, რომლეთაც უნარი შესწევს წარმოქმნას ნაერთები მათი პროდუქტიულობის შენარჩუნების მიზნით. იმ შემთხვევაში, როცა უჯრედები ხდება სპეციფიური თავიანთი პროდუქტის მიმართ, შესაბამისი ნაერთის წარმოქმნა შეიძლება მოხდეს ყოველ პასაჟში.

ყველაზე ფართოდ გამოყენებული პროცედურა მაღალპროდუქტიულ კულტურათა მისაღებად სწორედ ცალკეულ უჯრედთა მომზადება და შემდგომ, პროდუქტიულობის მიხედვით მათი დახარისხებაა. ამ შემთხვევაში სარგებლობენ სხვადასხვა მიდგომებით, მაგრამ საკმაოდ ეფექტური აღმოჩნდა იმუნოანალიზზე დაფუძნებული ნახევრადუწყვეტი მეთოდი.

ბოლო ხანებში იაპონიაში ფართოდ გავრცელდა კალუსური კულტურის სელექციის მეთოდი საინტერესო ნაერთის შედარებით მაღალი შემცველობით მისაღებად. ეს მეთოდი მოიცავს კალუსის დაყოფას რამდენიმე ნაჭრებად და სუბკულტივირების პროცედურას, რომელიც მეორდება დამაკმაყოფილებელი შედეგის მიღებამდე. ამ გზით უზრუნველყოფილია შედარებით მდგრადი მაღალ-პროდუქტიული უჯრედული კულტურების შექმნა.

ლიტერატურაში ციტირებულია მრავალი მაგალითი, რომელთა მიხედვით ამა თუ იმ ნაერთის დიდი ოდენობით მასინთეზირებელი მცენარეები წარმოქმნის ჩვეულებრივ მაღალი გამოსავლიანობის მქონე კულტურებს, ხოლო იმ

შემთხვევაში, როცა პროდუქტთა სინთეზი დაკავშირებულია კულტურაში აგრეგატთა ზომასთან, მაღალპროდუქტიულ ხაზთა მიღება შესაძლებელია შესაბამისი უჯრედული აგრეგატების შერჩევით. აქ ადგილი აქვს უწყვეტ სელექციას, რაც გულისხმობს განთესვის პროცედურის ჩატარებას ახალ საკვებ არეზე ყოველი გადატანისას. *In vitro* სელექცია საშუალებას იძლევა ჩატარდეს ვარიანტთა მიმართული გადარჩევა, თუმცა გამოკვლეული უნდა იქნას კორელაცია უჯრედულ დონეზე მდგრადობასა და მთლიანი მცენარის დონეზე ამ ნიშან-თვისებათა შორის. კვლევის ამ მიმართულების ინტენსიფიკაციისთვის გარკვეული მნიშვნელობა ენიჭება სომაკლონალურ ცვალებადობის სპექტრის გაფართოებას *in vitro* მუტაგენეზის გზით. სხვადასხვა მკვლევართა მიერ ფართოდაა დანერგილი *in vitro* ინდუცირებული სომაკლონალური ცვალებადობის პრაქტკული გამოყენების პერსპექტივები.

თეორიულად საინტერესო და პრაქტკული ღირებულების მქონე ხაზთა მიმართული გადარჩევის საწარმოებლად გარკვეული დანიშნულება ენიჭება სომატურ უჯრედთა პოპულაციაში ინდუცირებული მუტაგენეზის რაოდენობრივ შესწავლას.

სომატურ უჯრედთა *in vitro* კულტურა პრინციპულად ახალი სისტემაა მუტაგენური ეფექტის გამოსავლენად, ინტენსიურად მზარდი სუსპენზიური კულტურის მიღებისა და კლონირების მეთოდის ჩასატარებლად. *Dioscorea deltoidea*-ს მაგალითზე ნაჩვენებია მუტაგენის მოქმედებისადმი უჯრედთა დამოკიდებულება მათი ფიზიოლოგიური მდგომარეობის მიხედვით და გამოვლენილია მუტანტური რეზისტენტულობა. .მუტაგენის სხვადასხვა დოზებით დამუშავების შემდეგ ხდება შტამების შერჩევა „ზრდის ინტენსივობის“ ნიშნის მიხედვით, ხოლო იმის დასადგენად, არის თუ არა ეს ნიშანი მუტაგენური ეფექტის შედეგი, ტარდება აღნიშნულ პოპულაციათა სტატისტიკური მონაცემების ანალიზი რაოდენობრივი ნიშნის „ბიომასის დაგროვების ” მიხედვით.

ინტაქტურ მცენარეებზე ჩატარებული სტატისტიკური მეთოდებით დადასტურდა, რომ მუტაგენები მნიშვნელოვანწილად ამაღლებს კონტროლთან შედარებით სხვადასხვა მორფოლოგიური ნიშნების, აგრეთვე პროდუქტიულობის ნიშნის ცვალებადობას მუტაგენით დამუშავებულ პოპულაციებში. ამ პოპულაციათა ცვალებადობის შესახებ მიღებული მონაცემების მიხედვით სავარაუდოა, რომ ისინი გენეტკურად განსხვავებული პოპულაციებია. ანალოგიური შედეგები იქნა მიღებული სხვა მკვლევართა მიერ შესრულებულ სამუშაოებშიც.

Dioscorea deltoidea-ს უჯრედული კულტურის ნიტროზომეთილშარდოვანას (ნმშ) სხვადასხვა დოზებით დამუშავების შედეგად გამოყოფილია ინტენსიური ზრდის უნარის მქონე ორი ვარიანტი. მათთვის დამახასიათებელია გენეტიკური ცვალებადობა და შემდგომი პასირებისას სასურველია სელექციის ჩატარება ამ ნიშნის მიმართულებით ქსოვილის ზრდის სტაბილიზაციის მისაღწევად.

მუტაგენეზის შესწავლის პროცესში ხორციელდება პრაქტიკული გამოყენების თვალსაზრისით საინტერესო მაღალპროდუქტიულ უჯრედულ ხაზთა მიღება. ცნობილია, რომ პროდუქტიულობა განისაზღვრება ზრდის ინტენსივობით და საკვლევი ნვთიერების დაგროვების ხარისხით. მნიშვნელოვან პირობას წარმოადგენს დეზაგრეგირებული ზრდა გამარტივებული შემადგენლობის თხევად საკვებ არეში. მიღებული უჯრედული ხაზები და კლონები პერსპექტიულია სამრეწველო წარმოებისთვის.

იაპონელმა მეცნიერმა იამადამ დაადგინა, რომ საუკეთესო შედეგის მომცემია უჯრედულ კლონთა მიღება და მათი სელექციის ჩატარება. წარმო-

ქმნილ მაღალპროდუქტიულ უჯრედულ ხაზთა უმეტესობა არასტაბილურია, ამის მიზეზი შესაძლოა იყოს სუბკულტივირებისას ზრდის მიხედვით სელექცია, ან ქრომოსომული აბერაციები. შემუშავებულია ზოგიერთი მეთოდოლოგიური მიდგომა სტაბილურ მაღალპროდუქტიულ უჯრედულ ხაზთა მისაღებად. ასე მაგალითად, წარმატებით იქნა გამოყენებული კრიოპეზერვაციის პროცესი *Catharanthus roseus*-ის ქსოვილოვანი კულტურებისთვის.

ყოველივე ზემოთქმულის შეჯამებით შეიძლება დავასკვნათ, რომ ინდუცირებული მუტაგენეზი ქსოვილოვან კულტურათა პრაქტიკულ სელექციაში თვალსაჩინო ადგილს იკავებს.

IV. 4. *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის საკონტროლო და მუტანტური შტამების მიერ სტეროიდულ გლიკოზიდთა დაგროვების უნარის შესწავლა

სიღრმულ პირობებში კულტივირებული უჯრედები, როგორც წესი, ინარჩუნებს ინტაქტური მცენარისთვის დამახასიათებელ ბიოსინთეზურ უნარს, თუმცა გამორიცხული არ არის იზოლირებულ მდგომარეობაში გადაყვანისას ამა თუ იმ ნაერთის თვისობრივი და რაოდენობრივი ცვლილებები.

Yucca gloriosa-ს კულტურის უჯრედებზე მ. ჯაოშვილის მიერ ჩატარებული ქიმიური ანალიზით გამოვლინდა, რომ კალუსური ქსოვილის მსგავსად, ისინი ასინთეზირებს მხოლოდ ფუროსტანოლურ გლიკოზიდებს, რაც დედიფერენცირებულ ქსოვილებში – β გლუკოზიდაზური აქტივობის უქონლობით აიხსნება.

სუსპენზიური კულტურის მუტანტურ შტამებში სტეროიდული ნაერთების ექსტრაგირების და იდენტიფიცირების შედეგად ქრომატოგრამაზე გამჟღავნებული ლაქების შეფერვის ინტენსივობა მიუთითებს მათ უჯრედებში გლიკოზიდების, სახელდობრ, ფუროსტანოლური გლიკოზიდების საკმარისი ოდენობით არსებობაზე.

საკვლევ ობიექტში აღნიშნული ნაერთების რაოდენობრივი განსაზღვრა იმავე პრინციპით ხორციელდება, რაც გამოიყენებოდა კულუსური ქსოვილის შემთხვევაში.

აღმოჩნდა, რომ სუსპენზიური კულტურის საწყის პოპულაციაში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების შემცველობა მშრალ ბიომასაზე გაანგარიშებით 0.30-0.35%-ს შეადგენს.

მუტაგენით ინდუცირების შედეგად მიებულ *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის შტამებზე ჩატარებულმა კვლევამ დაასაბუთა ის ფაქტი, რომ მუტაგენ ნმშ-ს მასტიმულირებელი ეფექტი მჟღავნდება, როგორც ბიომასის გამოსავლიანობის გადიდებაში, ასევე ფუროსტანოლურ გლიკოზიდთა პროცენტული შემცველობის მატებაში (ცხრ.9).

როგორც მე-9 ცხრილის შედეგები აჩვენებს, მუტაგენით სტიმულაცია არსებითად აუმჯობესებს სუსპენზიური კულტურის შტამებში სტეროიდულ გლიკოზიდთა ბიოსინთეზის პროცესს. მათში ფუროსტანოლთა რაოდენობრივი მატება საკონტროლო პოპულაციასთან შედარებით, რაც ნულოვან პასაჟშივე აღინიშნება, უშუალოდ მუტაგენური ეფექტით არის განპირობებული. ამასთან გამოიკვეთა ერთგვარი კანონზომიერება: ფუროსტანოლებს სინთეზი ინტენსიფიცირდება ნმშ-ს დოზის აქტიურობის შესაბამისად; მუტაგენის დაბალი დოზების ფარგალში – 0.1-0.4 mM.სთ გლიკოზიდთა შემცველობა 1.2-1.5-ჯერ არის გაზრდილი. აღნიშნული დოზების გავლენით მიღებულ შტამებში ბიომასის გამოსავლიანობა საკონტროლო პოპულაციასთან შედარებით შეცვლილი არ არის. რაც შეეხება 0.5 და 2mM-სთ დოზებს, მათი მოქმედების ეფექტურობა იმაში

გამოიხატება, რომ სტეროიდულ გლიკოზიდთა რაოდენობა მომატებულია 2-2.4-ჯერ, ამასთან ბიომასის დაგროვების უნარიც შესამჩნევად არის გადიდებული.

ცხრილი 9

Y.gloriosa –ს სუსპენზიური კულტურის საკონტროლო და მუტანტური შტამების მიერ ფუროსტნოლურ გლიკოზიდთა დაგროვება

შტამი	გლიკოზიდთა %-ული შემცველობა	
	0 პასაჟი	მე-3 პასაჟი
K	0.30 ± 0.05	0.32 ± 0.03
Y-0.1	0.42 ± 0.06	0.45 ± 0.05
Y-0.2	0.45 ± 0.04	0.46 ± 0.07
Y-0.3	0.47 ± 0.07	0.45 ± 0.05
Y-0.4	0.54 ± 0.03	0.52 ± 0.04
Y-0.5	0.72 ± 0.03	0.74 ± 0.03
Y-2	0.63 ± 0.05	0.65 ± 0.02

პროდუქტიულობის შეფასება, როგორც ითქვა, ზრდის ინტენსივობის და გლიკოზიდთა სინთეზის მიხედვით ხდება, ამდენად *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის მუტანტური შტამები Y-0.5 და Y-2, რომლებიც აქტიური ზრდით და გაძლიერებული მეტაბოლური აქტივობით ხასიათდება, პრაქტიკული დანიშნულებისათვის ყველაზე უფრო პერსპექტიულ მასალას წარმოადგენს.

საერთო პროდუქტიულობის განსაზღვრისას, რაც გულისხმობს ყოველი 1ლ საკვები არესთვის მშრალ ბიომასაზე გაანგარიშებას, გამოვლინდა მათი უპირატესობა საკონტროლო პოპულაციასთან შედარებით. ზრდის საშუალო ინტენსივობის მიხედვით, ფუროსტანოლურ გლიკოზიდთა ნამატი Y-0.5 შტამისთვის 274%-ს შეადგენს, ხოლო Y შტამისთვის – 212.6%-ს.

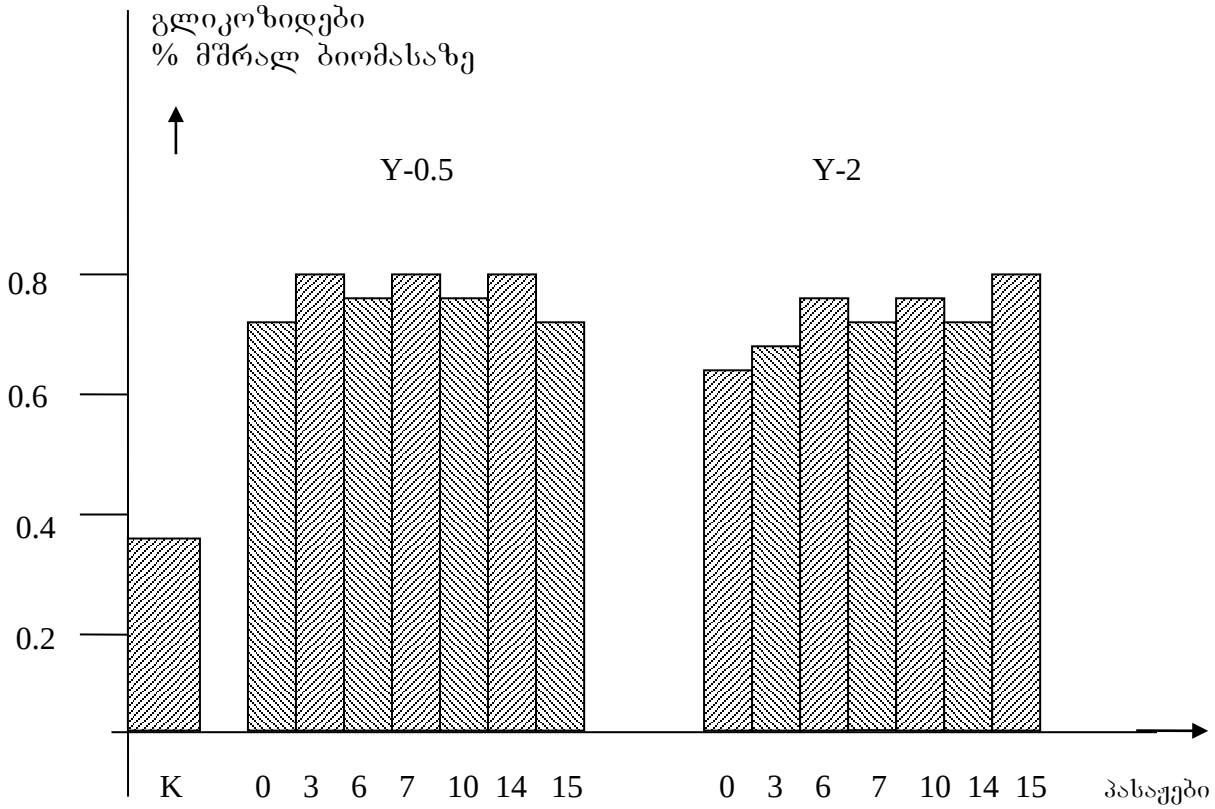
აღნიშნულ შტამებს მუტაგენური მოქმედების მიმართ რეზისტენტული ბუნება ახასიათებს. ხანგრძლივი კულტივირების პროცესში დასაბუთებულია გაზრდილი პროდუქტიულობის მუდმივ დონეზე შენარჩუნების უნარი (სურ 13).

მიღებულ მონაცემთა სტატისტიკურმა დამუშავებამ სარწმუნო გახადა, რომ Y-0.5 და Y-2 შტამები შეცვლილია ბიოქიმიური ნიშნის მიხედვით სელექციურ-გენეტიკურ სამუშაოთა ჩატარების შედეგად.

სტეროიდულ ნაერთთა ბიოსინთეზის პროცესი გარკვეულ კორელაციაშია სიღრმულ პირობებში კულტივირებულ უჯრედვთა ზრდის ინტენსივობასთან. საინტერესო იყო *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის მუტანტურ შტამების მიერ სტეროიდულ გლიკოზიდთა დაგროვების შესწავლა განვითარების ციკლში.

Yucca gloriosa-ს სუსპენზიური კულტურის ზრდის დინამიკაში სტეროიდულ გლიკოზიდთა რაოდენობრივი ცვლილებების ანალიზით ნაჩვენებია, რომ მათი რაოდენობის მაქსიმუმი აღინიშნება სტაციონალურ ფაზაში. ზრდის

ინტენსივობის მრუდი წინ უსწრებს გლიკოზიდთა დაგროვების მრუდს (სურ. 14), მუტანტურ შტამებში კი გლიკოზიდთა მაქსიმალური რაოდენობა სინთეზირდება ექსპონენციალურ ფაზაში. ამ პერიოდში უჯრედთა დაყოფისა და პროლიფერაციული პროცესები გაძლიერებული ინტენსივობით მიმდინარეობს. აღნიშნულ შტამთა ზრდის ინდექსის მაჩვენებელიც შესაბამისად მაღალია. აქედან გამომდინარე, უნდა ვიფიქროთ, რომ ფუროსტანოლური გლიკოზიდები



სურ.13. *Y. gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის პროდუქტიულ შტამებში ფუროსტანოლურ გლიკოზიდთა შემცველობა

ზრდასთან დაკავშირებული პროდუქტებია. ეს არ შეესაბამება ადრე გავრცელებულ შეხედულებას იმის შესახებ, რომ ზოგადად მეორადი მეტაბოლიტების დაგროთება *in vitro* კულტურის უჯრედებში ზრდის შეფერხებას იწვევს.

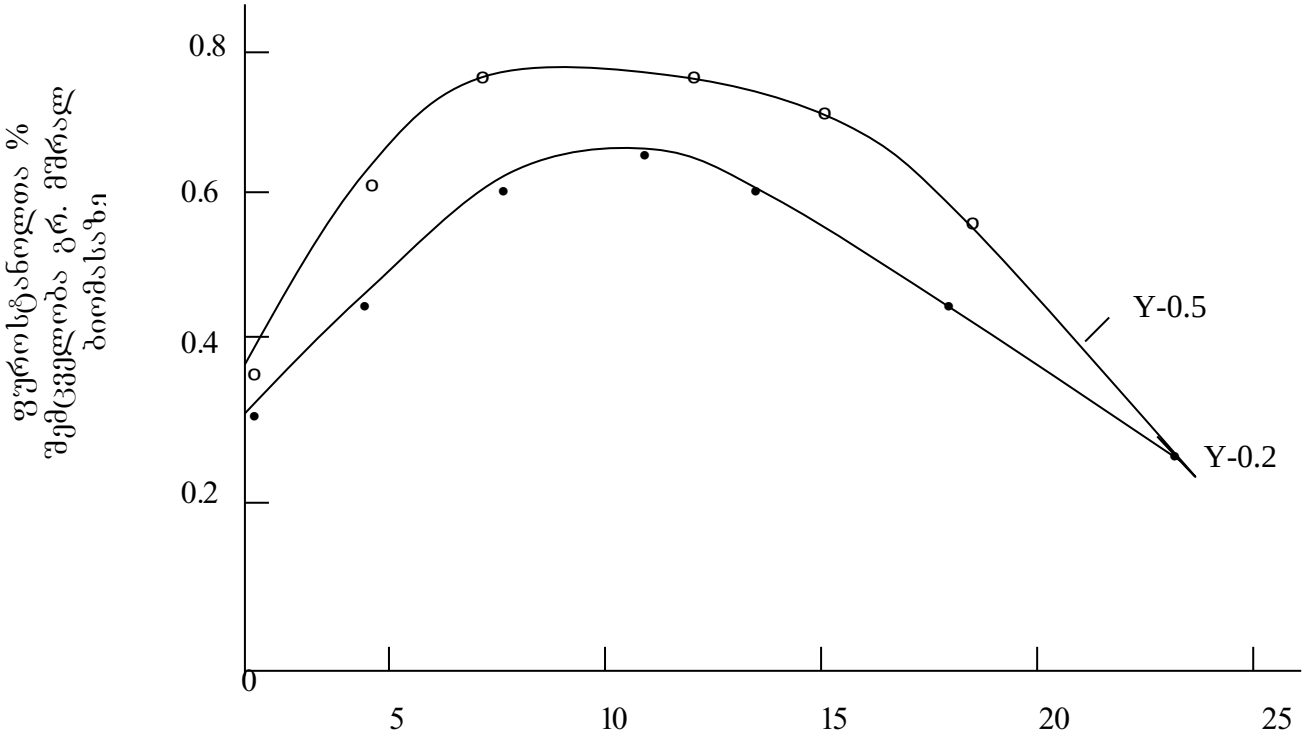
ანალოგიური შედეგები მიღებულ იქნა *Dioscorea deltoidea*-ს სესპენზიური კულტურის მუტატურ შტამებში, სადაც საწყისი პოპულაციისაგან განსხვავებით მუტაგენული ზემოქმედების შედეგად მხოლოდ ფუროსტანოლური გლიკოზიდები სინთეზირდება. არსებობს მონაცემები, რომ ფუროსტანოლური გლიკოზიდები ცილის სინთეზის ინტენსიფიკაციას ახდენს, ანტიოქსიდანტური მოქმედება გააჩნია და ზრდის პროცესებზე დადებითად რეაგირებს. მუტაგენური ფაქტორის გავლენით ზრდის პროცესთა გაძლიერების პარალელურად მატულობს სინთეზირებულ მეორად მეტაბოლიტთა რაოდენობა.

Y.gloriosa-ს სუსპენზიურ კულტურის შტამებში Y-0.5 და Y-2, ფუროსტანოლურ გლიკოზიდთა შემცველობა მომატებულია 0.65-0.72%-მდე (მშრალ ბიომასაზე). სუბკულტივირებისას შეირჩევა ის უჯრედები, რომლებიც აღნიშნულ ნაერთებს მნიშვნელოვანი ოდენობით ასინთეზირებს. პროლიფერაციულ პროცესებში უპირატესობა სწორედ ამ უჯრედებს ენიჭება.

ლიტერატურაში ციტირებულია მაგალითები, რომელთა მიხედვით სინთეზირებული მეორადი ნაერთები ყოველთვის როდი წარმოადგენს მეორადი მეტაბოლიზმის საბოლოო პროდუქტს. კულტურის ასაკის მატების პარალელურად მასში მიმდინარე სხვადასხვა ფერმენტულ რეაქციათა ხარჯზე ადგილი აქვს წარმოქმნილ მეტაბოლიტთა რაოდენობრივ კლებას.

მკვლევართა აზრით, ინტენსიური ზრდის ფაზაში სინთეზირებული ნაერთების მაკატალიზირებული ფერმენტული რეაქციები ბლოკირებულია მუტაგენური ინდუცირების გზით. ამ მოსაზრების თანახმად, მუტანტურ შტამებში საწყისი პოპულაციისგან განსხვავებით წარმოქმნილ ნაერთების დონე უცვლელი რჩება.

როგორც ჩატარებულმა კვლევის შედეგებმა ცხადყო, *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის შტამებში Y-0.5 და Y-2, ფუროსტანოლური გლიკოზიდების მაქსიმალური რაოდენობა, რაც კულტივირების მე-12 დღეს აღინიშნება, სტაციონალურ ფაზაშიც შენარჩუნებულია ე.ი. მუტაგენის გავლენით აღნიშნულ ნაერთთა დაგროვება იმავე ხარისხით არის უზრუნველყოფილი.



სურ. 14. სუსპენზიური კულტურის მუტანტურ შტამებში - Y-0.5 და Y-2 სტეროიდულ გლიკოზიდთა დაგროვების დინამიკა

ზრდის პროცესთა და მეორად ნაერთთა წარმოქმნას შორის კავშირის შესახებ ცნობები მოიპოვება სხვადასხვა მკვლევართა ნაშრომებში. ზოგ შემთხვევაში მეორად მეტაბოლიტთა წარმოქმნა იწყება მობერებულ კულტურაში, მაგ. ინდოლურ ალკალოიდთა სინთეზი; ზოგჯერ კი მეტაბოლური პროცესე-

ბი გაძლიერებული ინტენსივობით მიმდინარეობს კულტივირების ადრეულ საფეხურზე.

ამრიგად, ზრდის დინამიკაში შესწავლით ნაჩვენებია, რომ *Y. gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის მუტანტურ შტამებში ფუროსტანოლურ გლიკოზიდთა მაღალი გამოსავლიანობა მიიღწევა აქტიურად მზარდ სუსპენზიაში. *Y* -0.5 და *Y* -2, შტამები მიჩნეულია ყველაზე უფრო პროდუქტიულად, რამდენადაც მას ახასიათებს ბიომასის დაგროვების და სტეროიდულ კლიკოზიდთა სინთეზის გადიდებული უნარი. პროდუქტიულობის შეფასებისას ამ შტამთა უპირატესობა საკონტროლო პოპულაციასთან შედარებით იმაში გამოიხატება, რომ მათში ფუროსტანოლურ გლიკოზიდთა რაოდენობა ორჯერ არის მომატებული. ხანგრძილი პასირების პროცესში შემოწმებამ აჩვენა, რომ აღნიშნულ შტამთა ეს სპეციფიურობა მუდმივ ხასიათს ატარებს (სუსპენზიური კულტურის შტამები 5 წლის მანძილზეა შენარჩუნებული და ამ პერიოდში უჯრედებმა 212 გენერაცია გაიარეს).

V. უჯრედული სელექცია

V 1. უჯრედული სელექციის მეთოდები

უჯრედული ტექნოლოგიის ერთ-ერთი მიმართულებაა მათი გამოყენება სელექციაში, რაც აადვილებს და აჩქარებს ტრადიციულ სელექციურ პროცესებს მცენარეთა ახალი ფორმებისა და ჯიშების შექმნაში. იზოლირებული უჯრედებისა და ქსოვილების *in vitro* კულტივირების არსებული მეთოდები პირობითად შეიძლება ორ ჯგუფად დავყოთ. პირველი ჯგუფი არის დამხმარე ტექნოლოგიები, რომლებიც კი არ ცვლიან ჩვეულებრივ სელექციას, არამედ ემსახურებიან მას. მათ შეიძლება მივაკუთვნოთ: *in vitro* განაყოფიერება (პროგამურიშეუთავსებლობის გადალახვა), თესლკვირტებისა და მოუმწიფებელი ჰიბრიდული ჩანასახების კულტივირება (პოსტგამური შეუთავსებლობის გადალახვა), ჰაპლოიდების მიღება მტვრიანასა და მიკროსპორების კულტივირების გზით, იზოლირებული უჯრედების, ქსოვილებისა და ორგანოების კრიოშენახვა, დაშორებული ჰიბრიდების კლონური მიკროგამრავლება. მეთოდების მეორე ჯგუფი მცენარეთა ახალი ფორმებისა და ჯიშების მიღებამდე მიდის თავისთავადი, სელექციის ტრადიციული მეთოდებისგან დამოუკიდებელი გზით: უჯრედული სელექცია კალუსური ქსოვილის გამოყენების გზით, სომატური ჰიბრიდიზაცია (იზოლირებული პროტოპლასტების შერწყმა და უსქესო ჰიბრიდების მიღება) გენური ინჟინერიის გამოყენება.

დაშორებულ ჰიბრიდიზაციაში გამოყენებას პოულობს იზოლირებულ ქსოვილთა კულტურის ისეთი მეთოდები, როგორიცაა *in vitro* განაყოფიერება, ემბრიოკულტურა (იზოლირებული ჩანასახების გამრავლება ხელოვნურ საკვებ არეებზე), ძვირფასი ჰიბრიდების კლონური გამრავლება, აგრეთვე ჰაპლოიდების *in vitro* მიღება და კრიო -შენახვა.

In vitro განაყოფიერება პროგამული შეუთავსებლობის გადალახვა) ტარდება იმ შემთხვევაში, როდესაც შეუძლებელია შერჩეულ წყვილებს შორის განაყოფიერების განხორციელება ბუნებრივ პირობებში. ეს გამოწვეულია რამდენიმე მიზეზით:

1. ფიზიოლოგიური შეუსაბამობა (მტვრიანების მომწიფების სხვადასხვა დრო და ა.შ.);
2. მორფოლოგიური (მტვრიანას მოკლე მილი ან მისი ზრდის ბლოკირება განვითარების სხვადასხვა ეტაპებზე და სხვ.).

In vitro განაყოფიერება შეიძლება განხორციელდეს ორი ხერხით: ა) ნასკვის კულტივირება ხელოვნურ აგარიზებულ საკვებ არეზე მასზე დატანილი მზა მტვრიანათი; ბ) ნასკვი იხსნება და საკვებ არეზე გადაიტანება პლაცენტას ნაჭრები თესლკვირტებით, რომელთანაც ახლოს, ან უშუალოდ პლაცენტას ქსოვილზე გადაიტანება მზა მტვრიანა. ვიზუალურად იმის განსაზღვრა მოხდა თუ არა *in vitro* განაყოფიერება, შესაძლებელია თესლკვირტების ზომების ზრდის სიჩქარის მიხედვით. ჩამოყალიბებული ჩანასახი, როგორც წესი, არ გადადის მოსვენებით მდგომარეობაში, არამედ სწრაფად იზრდება და დასაბამს აძლევს ჰიბრიდულ თაობას. პლაცენტურმა in vitro განაყოფიერებამ საშუალება მისცა კულტურული ჯიშების თამბაქოს *N. tabakum*-ს გადაელახა შეჯვარებისას შეუთავსებლობა ველურ სახეობებთან *N. rosulata* და *N. Debney*-სთან და შესაძლებელი გახადა თამბაქოს სახეობათშორისი ჰიბრიდების მიღება. პოსტგამური შეუთავსებლობა დაშორებული ჰიბრიდიზაციისას აღიძვრება განაყოფიერების შემდეგ. ამ დროს ხშირად წარმოიშვება სუსტი, არა აღმოცენებადი თესლები. მიზეზი შეიძლება იყოს ჩანასახისა და ენდოსპერმის განვითარების დროში დაცილება. ენდოსპერმის სუსტი განვითარების გამო ჩანასახს არა აქვს ნორმალური განვითარების უნარი. ამ შემთხვევაში მომწიფებული სუსტი მარცვლებიდან გამოყოფენ ჩანასახს და ზრდიან საკვებ არეზე.

ხელოვნურ საკვებ არეზე გაზრდილ ჩანასახს ეწოდება *ემბრიოკულტურა.* მომწიფებული ჩანასახის გასაზრდელად საჭირო არე შეიძლება იყოს მარტივი, ფიზიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების დანამატის გარეშე, ან ნებისმიერი სხვა, რომელიც შეიცავს მინერალურ მარილებსა და საქაროზას. უფრო დაშორებულ შეჯვარებებში დარღვევები ჩანასახის განვითარებაში შეიძლება შევნიშნოთ ადრეულ ეტაპებზე, რაც გამოიხატება დიფერენცირების არ არსებობაში და შენელებულ ზრდაში. ამ შემთხვევაში ჩანასახის კულტურა შედგება ორი ეტაპისაგან – ჩანასახის ემბრიონალური ზრდა, რომლის დროსაც გრძელდება მისი დიფერენცირება, და თესლის აღმოცენება. პირველი ეტაპისათვის საჭიროა უფრო რთული შედგენილობის არე საქაროზის მაღალი შემცველობით, სხვადასხვა ამინომჟავის, ვიტამინებისა და ჰორმონების დანამატით.

უკანასკნელ ხანს, ემბრიოკულტურების გამოყენება სელექციაში დიდმნიშვნელობას იძენს მარცვლეული და სხვა სასოფლო-სამეურნეო კულტურების დაშორებული ჰიბრიდების მისაღებად. ნაჩვენებია ხორბალი-ჭვავის ჰიბრიდების გამოსავლის ზრდის შესაძლებლობა უმწიფარი ჩანასახების ბოლომდე გაზრდის გზით, აგრეთვე ემბრიოკულტურების გამოყენება პოსტგამური შეუთავსებლობის გადასალახად ელიმუსთან ხორბლის ჰიბრიდიზაციის დროს.

ემბრიოკულტურის მეთოდი სულ უფრო ფართოდ გამოიყენება ბოსტნეული მცენარეების სახეობათშორის ჰიბრიდიზაციაში. ხახვისათვის დამუშავებული იზოლირებული ჩანასახების კულტურა გამოიყენება პამიდვრის და სხვა ბოსტნეულის სელექციაში.

გამოკვლეულია პამიდვრის ჩანასახების ზრდისა და განვითარების ჰორმონალური რეგულაცია in vitro. განიხილება ემბრიოკულტურის გამოყენების შესაძლებლობა. მზესუმზირის დაშორებული ჰიბრიდების მისაღებად, შეისწავ-ლება დამტვერვის შემდეგ სხვადასხვა ვადაში გამოყოფილი მზესუმზირის ჩანასახების *in vitro* ზრდისა და განვითარების მაკონტროლებელი ფაქტორები.

იზოლირებული ჩანასახების კულტურა, როგორც დამხმარე მეთოდი დაშორებული ჰიბრიდიზაციისთვის, გამოიყენება არა მარტო პოსტგამური შეუთავსებლობის გადასალახად, არამედ აგრეთვე ძვირფასი ჰიბრიდების მიკროგამრავლებისათვის. ამ შემთხვევაში მიკროგამრავლება მიდის

კალუსოგენეზის გზით, მორფოგენეზის ინდუქციით და მცენარე-რეგენერანტების მიღებით კალუსური ქსოვილიდან. მოუმწიფებელი ჩანასახების კლონირების ტექნიკა იძლევა მცენარის ძვირფასი გენოტიპების გამრავლების საშუალებას სასიცოცხლო ციკლის ადრეულ სტადიებზე. ჩანასახების კულტურის კიდევ ერთი შესაძლებლობაა მისი გამოყენება უჯრედულ სელექციაში.

V.2. მცენარეთა უჯრედების კულტურის გამოყენების გენეტიკური საფუძვლები სელექციური მიზნებით

უჯრედები *in vitro* კულტურაში განსხვავდებიან მორფოლოგიით, ბიოქიმიური თვისებებით, ფიზიოლოგიური მდგომარეობით და გენეტიკურად. მრავალფეროვნებას (ვარიაბელობა) უჯრედულ ხაზებს შორის ან მცენარე-რეგენერანტებს შორის ეწოდება *სომაკლონური ვარიაბელობა.* სომაკლონური ცვალებადობის წარმოშობის გენეტიკური ბუნება და მექანიზმი ჯერ შესწავლილი არ არის. თუმცა, მკვეთრად შეგვიძლია გამოვყოთ სომაკლონური ვარიანტების წარმოშობის დამოკიდებულება, უწინარე ყოვლისა, საწყისი (გამოსავალი) ექსპლანტის სომატური უჯრედების გენეტიკურ ჰეტეროგენობაზე, გენეტიკურ და ეპიგენეტიკურ ცვალებადობაზე, *in vitro* კულტივირების მაინდუცირებელ პირობებზე, აგრეთვე გენოტიპზე და საწყის ექსპლანტზე. საკულტივაციო უჯრედების პოლიმორფიზმი შეიძლება აიხსნას სახეობრივი და ასაკობრივი თავისებურებებით, პლოიდურობის დონით, საკვები არის შედგენილობისა და კულტივირების პირობების გავლენით, კორელაციური კავშირების არარსებობით. უკანასკნელი ფაქტორი, რომელიც იწვევს მთლიან მცენარეში არსებული მკაცრი რეგულაციის დარღვევას, როგორც ჩანს, წარმოადგენს *in vitro* უჯრედების სპონტანური ცვალებადობის ძირითად მიზეზს. მცენარის ნებისმიერი ფრაგმენტი წარმოადგენს სხვადასხვა ქსოვილთა მოზაიკას და იმაზე დამოკიდებულებით, რომელი ქსოვილი მისცემს დასაბამს კალუსს, ერთნაირი ექსპლანტებიდან წარმოშობილი კალუსებიც კი ჰეტეროგენული და ერთმანეთისაგან განსხვავებული იქნება. ზუსტად ერთნაირი ექსპლანტების ბუნებაში არსებობა შეუძლებელია, მაშასადამე, საწყისი მასალის არაერთგვაროვნება (სახეობრივი, ასაკობრივი, ფიზიოლოგიური) განაპირობებს უჯრედების ნაირგვარობას კულტურაში. ფიზიოლოგიური ჰეტეროგენობა მდგომარეობს იმაში, რომ უჯრედები პოპულაციაში იმყოფებიან სხვადასხვა ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში, ე.ი. იყოფიან, იზრდებიან, ბერდებიან, კვდებიან. ასეთ კულტურას ასინქრონული ეწოდება. აიძულო უმაღლეს მცენარეთა ურედების პოპულაცია უჯრედული ციკლის ფაზები გაიაროს ერთდროულად, ე.ი. სინქრონულად, თითქმის შეუძლებელია. იმიტომ, რომ უჯრედების ის ნაწილი, რომელსაც შეუძლია მოცემულ მომენტში გაყოფა, შეადგენს 2-4%-ს. არასასურველი პირობები (დაბალი ტემპერატურა, მნიშვნელოვანი საკვები კომპონენტების გამორიცხვა), რომელიც აფერხებს გაყოფას, გარკვეული ხარისხით ხელს უწყობს გასაყოფად მომზადებული უჯრედების დაგროვებას. უფრო ეფექტურია ზოგიერთი ქიმიური ნივთიერება, რომელიც აბრკოლებს გაყოფისათვის მოსამზადებელ განსზღვრულ სტადიებს. უკეთეს შემთხვევაში, სინქრონიზაცია შესაძლოა მიღწეულ იქნას უჯრედების 10-30%-ში, მაგრამ შემდგომი დაყოფისას პოპულაცია ისევ ჩქარა კარგავს სინქრონულობას.

ხაზი უნდა გაესვას, რომ უჯრედების ფიზიოლოგიური ვარიაბელობა სუსპენზიურ კულტურაში უფრო ნაკლებია, ვიდრე აგარზე მზარდ ქსოვილთა

კალუსურ კულტურაში, რაც დაკავშირებულია კვების უფრო ერთგვაროვან პირობებთან, აერაციასთან და ტოქსიკური მეტაბოლიტების მოცილებასთან უჯრედის გარემოცვიდან თხევად მოძრავ არეში. საკულტივაციო უჯრედების ჰეტეროგენულობა განპირობებულია გენეტიკური, ეპიგენეტიკური და მოდიფიკაციური ცვალებადობით. გენეტიკური ანუ მუტაციური ცვლილებები მიდის გენოტიპის ცვლილებამდე, რომელიც შეიძლება მემკვიდრულად გადაეცეს. მუტაცია (დნმ-ის რაოდენობის ან სტრუქტურის ცვლილება) მიმდინარეობს გენურ, ქრომოსომულ და გენომის დონეებზე.

გენური ანუ წერტილოვანი მუტაცია ნიშნავს დნმ-ის ცვლილებას ერთ ლოკუსში. გენური მუტაციები იწვევენ უჯრედების მორფოლოგიური, ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური თვისებების ძლიერ ან სუსტ ცვლილებას. მუტაციას, რომელიც აღიძვრება ქრომოსომების მაკროსტრუქტურის ცვლილების შედეგად, ეწოდება ქრომოსომული მუტაციები ან ქრომოსომული აბერაციები. რომოსომების სტრუქტურული გარდაქმნები აღიძვრება ინვერსიის, დაყოფის, დუბლიკაციის, ტრანსლოკაციისა და ტრანსლიაციის შედეგად. გენომის მუტაციები დაკავშირებულია ქრომოსომების რიცხვის ცვლილებასთან ბირთვში, ე.ი. ცვლილებასთან კარიოტიპში.

დასახელებული გენეტიკური მუტაციის ყველა სახეს ადგილი აქვს *in vitro* უჯრედებში. უფრო დაწვრილებით არის გამოკვლეული *in vitro* უჯრედების ქრომოსომული ცვალებედობა. ერთი და იმავე ქსოვილის უჯრედებიც კი, გაზრდილი ერთ ჭურჭელში, შეიძლება მნიშვნელოვნად განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან ქრომოსომული ნაკრების მიხედვით (დილოიდური, პოლიპლოიდური, ანეუპლოიდური). გენეტიკური ცვალებადობის მიზეზი სხვადასხვაგვარია:

1. მცენარიდან პირველი ექსპლანტის გამოყოფისას კორელაციური კავშირის დარღვევა;
2. არის კომპონემტების მოქმედება;
3. არეში დაგროვილი მეტაბოლიზმის პროდუქტების გავლენა;
4. საწყისი მასალის ჰეტეროგენულობა და განსაზღვრული ტიპის უჯრედების სელექცია.

ქრომოსომული ცვალებადობა წარმოადგენს მიტოზის დარღვევის შედეგს, რომელსაც ენდომიტოზი და ენდორედუპლიკაცია ეწოდება. ენდომიტოზის დროს ხდება ქრომოსომების სპირალიზაცია და იწყება მიტოზი, მაგრამ ირღვევა დაყოფის თითისტარა, შენაჩუნდება ბირთვის გარსი, ქრომოსომები არ განცალ-კევდება და დესპირალიზდება ბირთვის გარსის შიგნით. ეს მიდის ქრომო-სომების რიცხვის ზრდამდე, ბირთვისა და უჯრედების ზომების გადიდებამდე. ენდორედუპლიკაციას არ ახლავს ქრომოსომების გაორმაგება და ბირთვის დაყოფა, თუმცა ბირთვში დნმ-ის შემცველობა იზრდება. პოლიპლოიდური და ანეუპლოიდური უჯრედების წარმოქმნას იწვევს აგრეთვე დარღვევები მიტოზში, რაც დაკავშირებულია ქრომოსომების არასწორ განაწილებასთან.

სხვადასხვა დონის პლოიდურობის უჯრედები განსხვავდებიან დაყოფისა და ზრდის სიჩქარის მიხედვით, არასასურველი ზემოქმედებისადმი გამძლეობის მიხედვით, იწყებენ კონკურენციას და ერთი მათგანი იწყებს მოჭარბებას. განსაზღვრული ტიპის უჯრედების პოპულაცია დომინირებს, ასეთ პროცესს უჯრედული სელექცია ეწოდება. დომინირება შეიძლება გამოწვეული იყოს ერთი სახის უჯრედების უპირატესი პროლიფერაციით ან სხვების ელიმინაციით (მოცილებით). უფრო ზუსტია ასეთ სელექციას ვუწოდოთ ავტოსელექცია, იმიტომ, რომ იგი სპონტანურად მიმდინარეობს, რაიმე სტრესული ფაქტორების სპეციალური ზემოქმედების გარეშე. ავტოსელექციის პროცესში ყალიბდება მოცემული პირობებისადმი უფრო შემგუებელი კარიოტიპი. სავარაუდოა, რომ

უჯრედები ახალ საარსებო პირობებს ეგუებიან უფრო სიცოცხლისუნარიანი პოლიპლოიდური უჯრედების შერჩევის გზით.

საინტერესოა, რომ გამრავლების პირობების ცვლილება ცვლის შერჩევის მიმართულებას. ნაჩვენებია, მაგალითად, რომ 2,4 -დ და კინეტინის მაღალი კონ-ცენტრაცია ზრდის პოლიპლოიდიზაციის შესაძლებლობას.

ის, რომ გამრავლების პირობები თამაშობენ მნიშვნელოვან როლს ციტოგენეტიკური ჰეტეროგენობის ჩამოყალიბებაში, კარგად ჩანს ჰაპლოპაპუსის ქსოვილზე ჩატარებული ცდებიდან. მოსკოვის ტიმირიაზევის სახელობის მცენარეთა ფიზიოლოგიის ინსტიტუტში რ. გ. ბუტენკოს ლაბორატორიაში ორი წლის მანძილზე კულტივირდებოდა ამ მცენარის მერისტემატული უჯრედები, გადარგვა ხდებოდა თვეში ერთხელ. საბოლოო ჯამში, საწყისი დიპლოიდური უჯრედების 95%-მა შეიძინა პლოიდურობის სხვა დონე. შვედი მეცნიერი ტ. ერიქსონი ამავე ქსოვილზე მუშაობისას ყოველი ორი დღის შემდეგ მას თესავდა ახალ საკვებ არეზე. შტამმა შეინარჩუნა სტაბილური დიპლოიდური ხასიათი. მაგრამ, გამრავლების ხერხს არ შეუძლია მოგვცეს გენეტიკური სტაბილურობის სრული გარანტია უჯრედების პოპულაციაში, რამდენადაც გენეტიკურ ჰეტეროგენობას შეიძლება ფლობდეს თვითონ საწყისი მასალა. მრავალი მცენარის დიფერენცირებულ ქსოვილებს აქვთ სხვადასხვა პლოიდურობის უჯრედები. მაგალითად, ფოთლის მწვანე ასიმილირებული პარენქიმის უჯრედე-ბი, რომლებიც ამარაგებენ სქელი ფესვების ბოლქვების ქსოვილებს, ნაწილობრივად წარმოადგენენ პოლიპლოიდებს.

სპონტანური, ან რაიმე ფაქტორებით ინდუცირებული მცენარის სხვადასხვა ვარიანტული ფორმების წარმოქმნა შეიძლება გამოვიყენოთ უკვე არსებული სა-სოფლო-სამეურნეო კულტურების ჯიშების გასაუმჯობესებლად.

როგორც უკვე ავღნიშნეთ, *in vitro* უჯრედები სხვადასხვა თვისებისანი ხდებიან აგრეთვე, ეპიგენეტიკური თვისებების ცვლილებითაც.

კულტურაში უჯრედების არამემკვიდრულ ცვლილებებს ეკუთვნის მოდიფიკაციური ცვლილებები, რომლებსაც უმრავლეს შემთხვევაში აქვთ ადაპტური, შემგუებლობითი ხასიათი. ეს ცვლილებები არ ეხება უჯრედების გენეტიკურ სტრუქტურას, ისინი შეესაბამება ფიზიოლოგიურ ადაპტაციას, რომლის დროსაც ცვლილებების საზღვრები არ აღემატება გენოტიპით განსაზ-ღვრული რეაქციების ნორმებს.

უჯრედების *in vitro* ჰეტეროგენულობა იზრდება მათი კულტივირების ხანგრძლივობის ზრდასთან ერთად. მორფოგენეზის სხვადასხვა ტიპები – სომატური ემბრიოგენეზი ან ორგანოგენეზი, ასევე შეიძლება სხვადასხვაგვარად აისახოს გენეტიკურ ცვლილებებზე, და შესაბამისად, მცენარის ფენოტიპზე. ექსპერიმენტულად დადგენილია, რომ სომატური ემბრიოგენეზის დროს ციკლის –უჯრედი-მცენარე გავლის დრო მნიშვნელოვნად ხანმოკლეა, ვიდრე ორგანოგენეზის დროს, ამიტომ მიღებული მასალისა და საწყისი მშობელი გენოტიპის მსგავსების ხარისხი შეიძლება მნიშვნელოვნად მაღალი იყოს. სომაკლონურ ვარიანტებს უეჭველად აქვთ პრაქტიკული გამოყენება სასოფლო-სამეურნეო პრაქტიკაში, ისეთი ფორმების წარმოშობის გამო, რომლებიც მშობლისაგან განსხვავდება ბიოქიმიური თვისებრივი და რაოდენობრივი ნიშნებით, აგრეთვე ციტოგენეტიკური მახასიათებლებით. მაგ, მიღებულია ზარევოს ჯიშის კარტოფილის სომაკლონები, რომლებიც გამოირჩევა მაღალი მოსავლიანობით, დაავადებისადმი გაძლიერებული მდგრადობით, ტუბერებში პროტეინისა და სახამებლის მაღალი შემცველობით. ამასთან ერთად, მნიშვნელოვანი ნიშან-თვისებების მემკვიდრულობა ბოლქვებით გამრავლებისას შენარჩუნებული იყო სამი წლის განმავლობაში საველე ცდების პირობებში (ვ. ვ. სიდოროვი და სხვ., 1984, 1985). თამბაქოს მცენარისათვის კალუსური კულტურის

გზით მიღებულია თამბაქოს მოზაიკის ვირუსისადმი მდგრადი სომაკლონები. ამჟამად დაიწყო ქსოვილთა კულტურის მეთოდის ფართო გამოყენება სელექციაში, არა მარტო საკვებ და ტექნიკურ კულტურებში, არამედ დეკორატიულ და სამკურნალო მცენარეებშიც. ამის მაგალითად გამოდგება კალუსური კულტურიდან მიღებული პელარგონიის *Velvet Rose* ახალი ჯიში.

ამრიგად, მიღებული დადებითი შედეგები მოწმობენ, რომ სომაკლონური ვარიანტების მიღების სხვადასხვა ხერხები უფრო ეფექტურად უნდა დაინერგოს სელექციური მუშაობის პრაქტიკაში. ყველაზე რეალურია სომაკლონური ცვალებადობის გამოყენება უკვე არსებული ჯიშების ან ხაზების ცალკეული ნაკლოვანი თვისების გასაუმჯობესებლად ან ბოლომდე მისაყვანად.

მიუხედავად იმისა, რომ არსებობს მცენარეთა იზოლირებული ქსოვილებისა და უჯრედების კულტურების გენეტიკური არამდგრადობა, მას არ შეუძლია უზრუნველყოს სელექციონერთა მოთხოვნილებები გენეტიკურ მრავალფეროვნებაზე. ამასთან დაკავშირებით, სელექციური პროცესის დასაჩქარებლად უჯრედთა კულტურებში გამოიყენება ქიმიური და ფიზიკური მუტაგენები. გველისებრი რაუოლფიის ქსოვილის დამუშავებამ აზოტოვანი იპრიტის 2,5 . 10^{-3} M ხსნარით, გამოიწვია ქრომოსომების აბერაციის დონის აწევა პირველ პასაჟში 32%-მდე და პოპულაციის გადანაცვლება ტრიპლოიდების მომატების მიმართულებით. ამის შედეგად მოხერხდა გამოსავალ ქსოვილთან შედარებით უფრო მაღალი ბიოსინთეზური აქტიურობის შტამის მიღება. სპონტანური და ინდუცირებული მუტაგენეზი უჯრედების, ქსოვილებისა და პროტოპლასტების კულტურაში, სელექციონერებისათვის პრაქტიკულად საინტერესო მცენარეების მიღების საშუალებას იძლევა. დიდი პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს მცენარეთა ისეთი ფორმების შექმნას, რომლებიც მდგრადია გარემო ფაქტორების არასასურველი მოქმედების მიმართ. ასეთი ფაქტორებია დაბალი ტემპერატურა, ნიადაგის გამომარილება, გარემოს დაბინძურება ტოქსიკური ნივთიერებებით, დაზიანება მავნებლებით ან დაავადებების გამომწვევებით. ეს ფაქტორები შეიძლება გამოყენებულ იქნას სელექციური ფონის სახით უჯრედული სელექციის პროცესში. უჯრედები, რომლებიც ამასთან ერთად ინარჩუნებენ სიცოცხლიუნარიანობას, შეიძლება რეგენერირდეს მთლიან მცენარედ.

სპონტანური და ინდუცირებული მუტაგენეზით უჯრედული სელექციის შედეგებს შორის პრინციპული განსხვავება არ არის. სომატურ უჯრედებში მუტაციის სიხშირის გასაზრდელად ჩვეულებრივად იყენებენ ისეთ მუტაგენებს, როგორიცაა ნიტროზოგუანიდინი, ნიტროზომეთილშარდოვანა, მეთილმეთანსულ-ფონატი. იშვიათად იყენებენ დასხივებას ულტრაიისფერით, ქვანტებით და ნეიტრონებით.

სელექციური აგენტების სახით იყენებენ ანტიბიოტოკებს, ნუკლეინის მჟავების სინთეზის ინჰიბიტორებს, პურინული და პირიმიდინული ფუძეების ანალოგებს, ფიტო- და პათოტოქსინებს, მარილოვანი სტრესების გამომწვევ აგენ-ტებს, ამინომჟავების ანალოგებს და ა.შ.

უჯრედული სელექციის ჩასატარებლად გამოიყენება შემდეგი ხერხები:

– პირდაპირი (პოზიტიური) სელექცია, რომლის დროსაც გადარჩება მხოლოდ განსაზღვრული საძიებელი მუტანტური უჯრედების ტიპი;

– არაპირდაპირი (ნეგატიური) სელექცია, რომელიც ემყარება ველური ტიპის გასაყოფი უჯრედების შერჩევით დაღუპვას და მეტაბოლურად არააქტიური უჯრედების გადარჩენას, მაგრამ მოითხოვს მათი მუტაციური ცვლილებების დამატებით იდენტიფიკაციას;

– ტოტალური სელექცია, რომლის დროსაც ინდივიდუალურად ტესტირდება ყველა უჯრედული კლონი;

– ვიზუალური სელექცია და არასელექციური შერჩევა, როდესაც ვარიანტული ხაზი შეიძლება იდენტიფიცირდეს უჯრედის მთელ პოპულაციაში ვიზუალურად ან ბიოქიმიური მეთოდების გამოყენებით (თხელფენოვანი ან თხევადი ქრომატოგრაფია, რადიოიმუნური ანალიზი, მიკროსპექტროფოტომეტრია და სხვ.).

უჯრედული სელექციის ზემოთ ჩამოთვლილი ხერხებიდან ყველაზე გავრცელებულ მეთოდს წარმოადგენს პირდაპირი სელექცია და გამოიყენება უმთავრესად მცენარე-რეგენერანტების გამოსაყოფად, რომლებიც მდგრადია მაგ. ჰერბიციდების, ანტიბიოტიკების, ტოქსინების, მძიმე მეტალების, მარილების და სხვა ანტიმეტაბოლიტების მიმართ.

V. 3 უჯრედულ სელექციაში გამოყენებული მცენარეული უჯრედების კულტურების სახეები

მცენარეთა უჯრედულ სელექციაში *in vitro* პირობებში სამუშაოთა ჩასატარებლად საკვლევი ობიექტის სახით შეიძლება გამოყენებულ იქნას კალუსური და სუსპენზიური კულტურები, ან იზოლირებული პროტოპლასტები. ობიექტის შერჩევა დამოკიდებულია მცენარეთა სხვადასხვა სახეობისათვის შემუშავებული ტექნოლოგიების არსებობაზე, აგრეთვე კვლევის საბოლოო მიზნებზე.

კალუსური ქსოვილი წარმოადგენს ადვილად მისაწვდომ მასალას, რომელსაც ყველაზე ხშირად გამოიყენებენ უჯრედული სელექციისათვის. როგორც წესი, სამუშაოს ატარებენ გადასანერგ კალუსურ ქსოვილზე, რომელიც არ კარგავს რეგენერაციის უნარს რიგი სუბკულტივირების მანძილზე. მაგრამ, კალუსურ კულტურებზე მუშაობისას მრავალი მკვლევარი აღნიშნავს მოცემული ობიექტის არსებით ნაკლოვანებებს: ქსოვილთა ნელი ზრდა, ყველა უჯრედზე არათანაბარფასოვანი მოქმედება ტოქსიკური ნივთიერებებისა, რომლებიც გამოიყენება როგორც სელექციური ფაქტორები, აგრეთვე რეგენერაციული უნარის დაკარგვა კალუსური უჯრედების კულტივირების პროცესში. ეჭვსგარეშეა, რომ სელექციის ჩატარება მიზანშეწონილია ერთეული უჯრედების დონეზე (სუსპენზიური კულტურა, პროტოპლასტები). მაგრამ მცენარეთა მრავალი სახეობისთვის შემუშავებული არ არის ერთეული უჯრედების კულტივირების ეფექტური ტექნოლოგიები და ხერხები. კალუსური კულტურის გამოყენების ზემოთ ჩამოთვლილ ნაკლოვანებათა მიუხედავად, სელექციის ეს ხერხი მცენარეთა ზოგიერთი სახეობისთვის ჯერჯერობით ერთადერთია.

სტაბილურად მდგრადი ხაზის მიღება ხანგრძლივი პროცესია. **რ**ოგორც წესი, სელექცია იწყება კალუსური მასის საკმაო რაოდენობის მიღებით იზო**ლი**რებული მცენარეული ექსპლანტებიდან, რომელიც შემდგომ გამოიყენება სელექციური ფაქტორის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის (დოზის მრუდის აგება), რომელზედაც შეინიშნება კალუსური ქსოვილის ზრდა და იმავდროულად იღუპება კალუსური კოლონიების ნაწილი. სელექციური ფაქტორის შერჩეული კონცენტრაცია აღიარებულია, როგორც ოპტიმალური და გამოიყენება შემდგომ ექსპერიმენტებში, რადგანაც სელექციურ ფაქტორებიან არეზე პირველად მიღებული უჯრედების კოლონიებს შეეძლოთ წარმოშობილიყვნენ ფიზიოლოგიური ადაპტაციის ან უჯრედის დიფერენცირების განსაზღვრული მდგომარეობის შედეგად, და არ ყოფილიყვნენ გენეტიკურად მდგრადნი, ამიტომ სელექციურ არეზე შემდგომი 4 – 6 სუბკულტივირების განმავლობაში მოწმდება მიღებული კლონების მდგრადობის სტაბილურობა. შემდეგ ისინი გადააქვთ სელექციური ფაქტორების არმქონე არეზე და ახდენენ კიდევ 2-3 პასაჟის სუბკულტივირებას. მხოლოდ სელექციურ პირობებში განმეორებითი დაბრუნების შემდეგ შეარჩევენ სტაბილურ კლონებს, რომლებისგანაც ცდილობენ

მიიღონ მცენარე-რეგენერანტები. მაგრამ, ჩატარებულმა სამუშაოებმა ისეთი მცენარეების მისაღებად, რომლებიც გამძლეა აწეული მარილიანობის მიმართ, აგრეთვე დაავადების გამომწვევი სოკოებიდან გამოყოფილი ტოქსინების მიმართ, აჩვენა, რომ შესწავლილი სელექციური ფაქტორისადმი უჯრედებისა და მცენარეების მდგრადობა შეიძლება ერთმანეთს დაემთხვეს ან არ დაემთხვეს. პირდაპირი კორელაცია მცენარისა და *in vitro* უჯრედების მდგრადობას შორის აღინიშნება მხოლოდ დაბალი ტემპერატურის მიმართ, ალუმინის მაღალი კონცენტრაციის მიმართ, ასევე ჰერბიციდებისადმი მდგრადობაში.

ახალი სელექციური მასალის მიღების მიზნით კალუსის კულტივირებაზე მრავალი სამუშაოა ჩატარებული ხორბალზე, ქერზე, ბრინჯზე, სორგოზე, კარტოფილზე, პამიდორზე, იონჯაზე და ძალიან იშვიათად მერქნოვანებზე. უკვე მიღებულია პირველი დადებითი შედეგები NaCl – ისა და Na_2SO_4 - სადმი მდგრადი მცენარეების – ხორბლის, ბრინჯის, კარტოფილის მისაღებად. მიღებულია უჯრედები, ხოლო იქიდან სტაფილოს მცენარე, რომელიც ასინთეზებს 20 – ჯერ მეტ მეთიონინს, 30 – ჯერ მეტ ტრიფტოფანს, 5 – ჯერ მეტ ლიზინს საკვებ არეზე ამინომჟავების ტოქსიკური ანალოგების დამატების გზით. კარტოფილისთვის მიღებულია წრიული სიდამპლის მიმართ მდგრადი მცენარე. რაც შეეხება მერქნიანებს, მათთვის ამ მიმართულებით სამუშაოები ძალიან იშვიათია და ხშირად საძიებო ხასიათი აქვს. ამრიგად, კალუსური კულტურების გამოყენება სელექციური მიზნებით ხსნის მცენარეთა ახალი ფორმების შექმნის ფართო შესაძლებლობებს, რომლებსაც ექნებათ კაცობრიობისათვის აუცილებელი ძვირფასი ნიშან-თვისებები. ზემოთ ჩამოთვლილ ობიექტებთან ერთად (კალუსური და სუსპენზიური კულტურები, იზოლირებული პროტოპლასტები), სელექციისათვის საწყის მასალად შეიძლება გამოყენებულ იქნას სომატური ან ანდროგენული ემბრიოიდების კულტურები, ისეთი ორგანოგენული ექსპლანტები, როგორიცაა ფოთლების სეგმენტები ან მცენარის სხვადასხვა მერისტემული და ღეროვანი ნაწილები, აგრეთვე იზოლირებული ჩანასახების კულტურა. მაგალითად, ჩანასახების *in vitro* კულტივირებითა და სელექციით თესლებიდან მიღებულია ქერის მცენარე, რომელიც მდგრადია ამინომჟავების ანალოგების მიმართ და აქვს გაუმჯობესებული ცილის შემცველობა. მიღებულია სომატური ჰიბრიდები, ხოლო შემდგომ მცენარე-რეგენერანტები, რომლებიც ავლენენ მარილისადმი გაზრდილ მდგრადობას.

ამრიგად, უჯრედის დონეზე სელექციის ჩატარება საშუალებას იძლევა მცენარეთა ახალი ფორმები შეიქმნას სელექციის ტრადიციულ ხერხებთან შედარებით 2 – 4-ჯერ უფრო სწრაფად.

V. 4. უჯრედული სელექციის *in vitro* მეთოდის უპირატესობა

მთლიანი მცენარის დონეზე ექსპერიმენტულ მუტაგენეზთან შედარებით, უჯრედის დონეზე მუტაგენეზის მეთოდს აქვს რიგი უპირატესობანი:

– იზოგება ფართი, რამდენადაც 10 სმ დიამეტრის ერთ პეტრის თასში შეიძლება 10^7 – 10^8 უჯრედის კულტივირება, ხოლო ასეთივე რაოდენობის მცენარისათვის აუცილებელია 1000 ჰექტარზე მეტი ფართი;

– მუტანტური ნიშნები ცალკეული უჯრედების დონეზე ვლინდება ძალიან სწრაფად;

– შესაძლებელია ახალი ტიპის მუტაციების მიღება, მათ შორის ბიოქიმიური ხასიათისა;

– ახალი სასურველი ნიშან-თვისების მიღებაზე იზოგება დრო და შრომის დანახარჯი.

უჯრედული მუტაგენეზის წარმატებით გამოყენებისათვის ძირითადი მოთხოვნაა მცენარის რეგენერაციის კარგად დამუშავებული სისტემა. მნიშვნელოვან პირობას წარმოადგენს აგრეთვე, ამა თუ იმ სახეობის მცენარის ჰაპლოიდების მიღების შესაძლებლობა. შემდგომ სელექციურ მუშაობაში ერთვება მხოლოდ ის გენოტიპები, რომლებშიც მუტაციები ვლინდება მთლიანი მცენარის დონეზე.

უჯრედის დონეზე მუტაგენეზის შედეგად მიღებული შეცვლილი ნიშნების მქონე მცენარეებს ეწოდება ვარიანტები (ტერმინი "მუტაგენი" გამოიყენება მაშინ, როდესაც მუტაცია დასტურდება გენეტიკური ან მოლეკულურ-გენეტიკური მეთოდებით). რეკომენდირებულია შემდეგი აღნიშვნები: R_0 – მცენარე-რეგენერანტები, მიღებული შესაბამისი უჯრედული კლონიდან, R_1, R_2 და სხვა – პირველი და მომდევნო თაობები თვითდამტვერვის შემდეგ.

V. 5. გენოფონდის შენახვის მეთოდები

სასარგებლო ნიშან-თვისებების მქონე ხაზების მიღებისას წამოიჭრება ამ ნიშან-თვისებების შენახვის პრობლემა. მცენარეებს გენეტიკური ინფორმაციის შენახვა შეუძლიათ თესლებში, მაგრამ ეს წყარო სავსებით საიმედო არ არის, ვინაიდან დროთა განმავლობაში მუტაციის გამო თესლების გაღივების უნარი ეცემა. გარდა ამისა, ზოგიერთი მცენარე მხოლოდ ვეგეტატიურად მრავლდება. ამით გაპირობებულია მასალის ნაწილის *in vitro* შენახვის აუცილებლობა. მეორე მხრივ, ზოგ შემთხვევაში შესაძლებელი ხდება ახალი უჯრედული ხაზების მიღება, რომლებიც ასინთეზირებენ მეორადი მეტაბოლიტების მეტ რაოდენობას, ე.ი. უფრო პროდუქტიულნი არიან და ისინიც საჭიროებენ დაცვას.

ქსოვილებში მიმდინარე ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური პროცესების გამოსაკვლევად, ასევე საჭიროა სტანდარტული საწყისი კულტურები, რითაც გამოწვეულია მასალის შენახვის აუცილებლობა განსაზღვრული დროის განმავლობაში, როდესაც მიდის სერიული ექსპერიმენტები. ეს ყველაფერი გენოფონდის შენახვის პრობლემას ხდის ფრიად აქტუალურს. რასაკვირველია, შეიძლება უჯრედის კალუსის პასირება და მაგრამ, ამ დროს წამოიჭრება სომაკლონური ცვალებადობის, მუტაციების დაგროვების, კონტამინაციების (უცხო გენეტიკური მასალით დასნებოვნება) საშიშროება. ესეც მოითხოვს გარკვეულ ფინანსურ და შრომით დანახარჯებს (ხშირი გადარგვების აუცილებლობა, საკვებ არესთან დაკავშირებული ხარჯები და სხვ.). მკვლევარების მიზანია გადარგვებს შორის ინტერვალების გაზრდა. კულტურის შენახვისადმი არსებობს სხვადასხვა მიდგომა:

– კრიოდაცვა;
– ზრდის შენელება;
–შრობა (გაფრქვევით, და ლიოფილური – მიკროორგანიზმების უჯრედებისათვის);

<u>კრიოშენახვა</u> – გაყინვა უმდაბლეს ტემპერატურაზე. ჩვეულებრივ ამას ატარებენ თხევად აზოტში –196^{0}C ტემპერატურაზე. დაბალტემპერატურული კონსერვაციის წარმატება დამოკიდებულია რიგ ფაქტორებზე:

– უჯრედების სახეობა და ტიპი;
– მათი კონცენტრაცია სუსპენზიაში;
– კონსერვირებისათვის საჭირო საკვები არის შედგენილობა;
– კრიოპროტექტორის სახეობა და კონცენტრაცია;
– გაციებისა და გათბობის რეჟიმი;

– უჯრედების რეაბილიტაციის ხერხი გათბობის შემდეგ.

უჯრედების წარმატებით გაყინვისათვის არსებით როლს თამაშობს მათი მორფოფიზიოლოგიური მდგომარეობა: ზრდის სტაციონალურ ფაზაში მყოფი უჯრედები უფრო ნაკლებ მდგრადნი არიან დაბალტემპერატურული კონსერვაციის დამაზიანებელი მოქმედებისადმი, ვიდრე ზრდის ექსპონენციალურ ფაზაში მყოფნი. გასაყინად უჯრედებს არჩევენ ზრდის მრუდზე ექსპონენციალური ფაზის შუაში.

არცთუ მცირე მნიშვნელობა აქვს გასაყინი სუსპენზიის სიმკვრივეს. უჯრედების აღდგენაში ოპტიმალური შედეგები მიღებული იყო ისეთი უჯრედული სუსპენზიის გაყინვისას, რომლის სიმკვრივე იყო $1 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^6$ უჯრედი 1 მლ-ში.

მცენარეული კულტურებისათვის ხშირად საჭიროა წინასწარი კულტივირება განსაკუთრებულ პირობებში. არეს უმატებენ სხვადასხვა ნივთიერებებს, მაგალითად:

– 2-6% მანიტს ან სორბიტს ვაკუოლების ზომების შესამცირებლად;

– ამინომჟავებს, პირველ რიგში პროლინს, რომელიც ემსახურება წყლის დაკავშირებას უჯრედში (კონცენტრაცია 1 მოლამდე ან 11,5%), ასპარაგინი, Y(გამა)-ამინოერბოს მჟავა;

– დიმეთილსულფოქსიდი, რომელსაც უმატებენ არეს წინასწარი კულტივირებისათვის, კონცენტრაცია 2,5 – 10% 48 საათზე ციტოპლაზმატური მემბრანების განვლადობისათვის.

– გარდა ამისა, იყენებენ ხელოვნურ წრთობას სიცივისადმი შესაგუებლად, რისთვისაც ამცირებენ კულტივირების ტემპერსტურას, ქმნიან ზამთრის მოსვენებით პერიოდზე გადასასვლელად მოსამზადებელ ბუნებრივი საშემოდგომო პროცესების იმიტაციას (გამოიყენება მხოლოდ ზომიერი კლიმატის მცენარეებისათვის). უჯრედული კულტურები ძლებენ რამდენიმე დღე-ღამე +8 +10^{0}C-ზე, ხოლო შემდეგ +2 +5^{0}C-ზე, 1 – 6 კვირის განმავლობაში.

მცენარეული უჯრედების გაყინვის პროცესი ცხოველურისაგან განირჩევა, ძირითადად, წინასწარი კულტივირების ეტაპის არსებობით.

კრიოპროტექტორები ნივთიერებებია, რომლებიც საშუალებას იძლევა შეამციროს ფიზიკო-ქიმიური ფაქტორების დამაზიანებელი მოქმედება კრიოკონსერვირების პროცესში. მათ მიეკუთვნება საქაროზა, დექსტრანი, ეთილენგლიკოლი, პოლივინილპიროლიდონი, დიმეთილსულფოქსოდი, გლიცერინი. კრიოპროტექტირის ტიქსიკურობის განსაზღვრისათვის უჯრედებს ათავსებენ მის სხვადასხვა კონცენტრაციაზე, ოთახის ტემპერატურაზე 30 – 40 წუთით, რის შემდეგაც ამოწმებენ მათ სიცოცხლის უნარიანობას. დამატებით, აფასებენ ნივთიერების პროტექტორულ თვისებას კულტურის საცდელი გაყინვისა და გალღობის გზით. კრიოპროტექტორად ყველაზე ხშირად იყენებენ გლიცერინსა და დიმეთილსულფოქსიდს. პროტექტორის დამატებამდე უჯრედების სუსპენზიას აკონცენტრირებენ ცენტრიფუგირებით, ნალექზედა სითხეს ღვრიან. კრიოპროტექტორი კულტურაში შეაქვთ გაყინვამდე 1 საათით ადრე, რაც ცვლის მემბრანის შეღწევადობას, და გაყინვისა და ლღობის წერტილებს.

გაციების პროგრამები შეიძლება სხვადასხვა იყოს, მაგრამ ყველასათვის დამახასიათებელია გაციების დაბალი სიჩქარე. გაყინვისას მიმდინარეობს ყინულის წარმოქმნა უჯრედებს შიგნით და გარეთ. ამ ცვლილებების ხასიათი დამოკიდებულია შესასწავლ ობიექტზე და კრიოპროტექტორით დამუშავებაზე, მაგრამ ძირითადად, გაციების სიჩქარეზე. ნელი გაციებისას წარმოიქმნება უჯრედგარე ყინული, რომელიც მიდის უჯრედის გაუწყლოებამდე მანამ, სანამ არ დადგება ციტოპლაზმის გაყინვის წერტილი. სწრაფი გაციებისას უჯრედები შიგნიდან უფრო ჩქარა იყინება, ნელა გაუწყლოვდება, რაც იწვევს ყინულის კრისტალების წარმოქმნას უჯრედის შიგნით. ამ შემთხვევაში უჯრედები

ზიანდება. ჩვეულებრივ, გაციებას ატარებენ ორ ეტაპად (სურ. 26): 1. 20-დან – 28^{0}C-მდე წუთში 1 გრადუსი სიჩქარით (მცენარეული უჯრედებისათვის გაყინვის სიჩქარეა 0,5 გრადუსი წუთში –35^{0}C-მდე), ამ ტემპერატურაზე აჩერებენ 15 წუთს;
2. თხევად აზოტში მოთავსება (მყისიერი გაციება –196^{0}C-მდე).

გაყინვას ატარებენ სპეციალურ სპეციალურ აპარატებში. მათ გარეშე სპირტის აბაზანაზე (0,5 – 1 ლიტრ სპირტს ასხავენ თერმოსში მეტალური კოლბით, ჩაუშვებენ მასში ამპულებს 15 წუთით და მორევით უმატებენ თხევად აზოტს ან მშრალ ყინულს; ტემპერატურა არ უნდა იყოს –28^{0}C-ზე მაღალი და –32^{0}C-ზე დაბალი). შემდეგ ამპულები გადააქვთ თხევად აზოტში. გაყინვისას ამპულები პინცეტით გადააქვთ წყლიან აბაზანაში +37 +40^{0}C ტემპერატურაზე, 1 მლ-იანი ამპულა იყინება 0,5 – 1 წუთის განმავლობაში.

გაყინვის შემდეგ უჯრედებს რეცხავენ ან გასაზრდელ არეში ან ზრდის შესანარჩუნებელ არეში . მცენარეული უჯრედები ასევე შეიძლება გაირეცხოს საქაროზის 3 – 10% ხსნარით.

შემდეგ უჯრედებს ამოწმებენ სიცოცხლისუნარიანობაზე ვიტალური საღებავების დახმარებით, რომლებიც ღებავენ მკვდარ უჯრედებს. საბოლოო კრიტერიუმია ზრდის მკაფიო (მკვეთრი) განახლება სტანდარტულ საკვებ არეებზე, რომლებიც გამოიყენება მოცემული კულტურებისათვის.

ცხოველური უჯრედების გადასათეს კულტურებს აქვთ აწეული მგრძნობელობა ვირუსების მიმართ, რომელიც ვლინდება პირველი ორი პასაჟის განმავლობაში. შემდეგ მგრძნობელობა უბრუნდება საწყის მდგომარეობას.

<u>ზრდის შენელება</u> შეიძლება მიღწეულ იქნას შემდეგი მეთოდებით:
1. შენახვა მინერალური ზეთის ფენის ქვეშ (ბაქტერიული და სოკოვანი კულტურებისათვის);
2. აირადი ნივთიერებების შედგენილობისა და ატმოსფერული წნევის ცვლილება კულტურალურ ჭურჭელში;
3. სინათლის რეჟიმის ცვლილება;
4. გაციება აქტიური ზრდის შეწყვეტის ტემპერატურამდე;
5. ჰორმონალური და ოსმოსური ინჰიბიტორების გამოყენება. ჰორმონალური ინჰიბიტორებიდან უფრო ხშირად იყენებენ ქლორქოლინქლორიდს (მცენარეული უჯრედებისათვის, ოსმოსურიდან – 3 – 6% მანიტს).
6. საკვებ არეში $CaCl_2$-ის შეცვლა $Ca(NO_3)_2$-ით.

კარტოფილის გენოფონდის დასაცავად რეკომენდირებულია ტუბერების წარმოქმნა სინჯარებში.

V. 6. *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედულ ხაზთა სელექცია

უჯრედულ კულტურებში პროდუქტიულობის გაზრდა, როგორც ცნობილია, ექმპერიმენტული მუტაგენეზის გარდა, კლონირების საშუალებითაც შეიძლება მოხდეს. *In vitro* პირობებში მყოფ პოპულაციათა ჰეტეროგენულობის გათვალისწინებით მრავალრიცხოვანი უჯრედული კლონები იქმნება კლონირების საფუძველზე.

საქართველოს ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში შემუშავებულია კლონთა მასობრივი მიღების მეთოდი *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის საწყისი პოპულაციისა და მისი პროდუქტიული მუტანტური შტამებისთვის.

ერთუჯრედიან კლონთა შესარჩევად უპირატესობა ნაკლებ აგრეგირებულ, აქტიური პროლიფერაციის მქონე სუსპენზიას ენიჭება. წინასწარ ხდება სესპენზიური კულტურის ფრაქციონირება მარლის ორმაგი შრის მეშვეობით მსხვილი აგრეგატების მოცილების მიზნით.

კვლევის პროცესში გამოიყენებოდა როგორც შვიდდღიანი, ასევე ორკვირიანი კულტურით. შედარებითი ანალიზით ნაჩვენებია, რომ აქტიურ ზრდის ფაზაში *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზია ყველაზე უფრო ნაკლებ აგრეგირებულია და ამდენად, კლონირებისთვის უფრო ხელმისაწვდომია. ამ ფაქტზე დაყრდნობით შემდგომი კვლევა აქტიურად მზარდ ერთკვირიან კულტურაზე წარმოებდა. *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედების კლონირება დამყარებული იყო ბერგმანის (Bergman, 1959) მეთოდზე. ეს ორეტაპიანი პროცესია: 1. ჯამზე განთესვა, ანუ პლატირება; 2. გამონაწევრება, ანუ ცალკეული კოლონიების გამონაწევრება. შხვადასხვა დიამეტრის მინის ან პლასტმასის ჯამებზე ითესება მსხვილი აგეგატებისაგან გამონთავისუფლებული სუსპენზიის უჯრედები.

კლონირების პირველი ეტაპის – პლატირების ჩატარებამდე აუცილებელია მოცემული სისტემის ანალიზი, რაც გულისხმობს სუსპენზიის სიმკვრივის, სიცოცხლისუნარიანობის და სუსპენზიის შედგენილობის დადგენას (ცხრ. 10ა, 10 ბ).

ცხრილი 10

Y. gloriosa-ს ერთკვირიანი სუსპენზიური კულტურის ანალიზი

ა) საწყისი და მუტანტური შტამების სუსპენზიის სიმკვრივე და სიცოცხლის უნარიანობა ფრაქციონირებამდე

ვარიან-ტი	სიცოცხლისუნარიანობა %		უჯრედთა რაოდენობა, მლ*10^5	
	ფრაქციონირე-ბამდე	ფრაქციონი-რების შემ - დეგ	ფრაქციონირე-ბამდე	ფრაქციონირების შემდეგ
K	70±1,3	70±1,3	70±1,3	70±1,3
Y --0,5	1,3 ±0,02	1,3 ±0,02	1,3 ±0,02	1,3 ±0,02
Y --2	1,2 ±0,01	1,2 ±0,01	1,2 ±0,01	1,2 ±0,01

ბ) საწყისი და მუტანტური შტამები ფრაქციონირებამდე და ფრაქციონირების შემდეგ

ვარიანტი	1 უჯრედი		2-5 უჯრედი		10 უჯრედი		10 ეჯრედი	
	ფრაქც.-მდე	ფრაქც. შემდეგ	ფრაქც.-მდე	ფრაქც. შემდეგ	ფრაქც.-მდე	ფრაქც. შემდეგ	ფრაქც.-მდე	ფრაქც. შემდეგ
K	7	21	18	36	22	26	54	17
Y --0,5	28	32	31	37	15	19	26	12
Y -2	16	32	20	32	34	16	30	10

აღმოჩნდა, რომ ფრაქციონირებამდე *Yucca gloriosa*-ს საწყისი და მუტანტური შტამების სუსპენზიის სიმკვრივის მაღალი მაჩვენებელი კლონთა ეფექტური ზრდისთვის არასასურველ შედეგს იძლეოდა, ვინაიდან

ინდივიდუალურ კოლონიათა განვითარება ფერხდებოდა. ფრაქციონირების შემდეგ სუსპენზიის სიმკვრივის საწყისი მნიშვნელობა შემცირდა და ამის საფუძველზე შერჩეულ იქნა ოპტიმალური ნორმა ჯამებზე დასათესად. იგი $1.1x10^5$ უჯრ/მლ-ს უტოლდება.

ცოცხალ უჯრედთა პროცენტული შემცველობაც გარკვეულწილად *gloriosa*-ს საკონტროლო პოპულაციაში სიცოცხლსუნარიანობის მაჩვენებელი მომატებულია, ხოლო მუტანტურ შტამებში ოდნავ შემცირებული. ამის მიზეზი საწყისი უჯრედული ჰეტეროგენულობა უნდა იყოს. *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის საკონტროლო შტამში ცოცხალ უჯრედთა მაღალი პროცენტი აიხსნება ფრაქციონირების შედეგად უჯრედების ინტენსიური ზრდისკენ ტენდენციით. ხოლო მუტანტურ შტამებში ამ პროცენტის დაკლება სტრესისადმი უჯრედთა შესაბამისი რეაქციასთან არის დაკავშირებული.

გარდა ამისა, დათვლილია ერთ და რამდენიმე უჯრედიან აგრეგატთა რაოდენობა, მიღებული სიდიდეები პროცენტულადაა გამოსახული (ცხრ.10) ამ მონაცემებიდან გამომდინარე, დადგენილ იქნა, რომ ინდივიდუალურ უჯრედთა რაოდენობა საკონტროლო პოპულაციაში ფრაქციონირების შედეგად 3-ჯერ მატულობს, ხოლო 10-ზე მეტ უჯრედიან აგრეგატთა რცხვი ამდენჯერვე მცირდება. მუტანტური შტამი Y - 0.5 ინდივიდუალურ უჯრედთა მაღალი შემცვლობით გამოირჩეოდა, ამდენად, ფრაქციონირება მათ რაოდენობას თითქმის უცვლელად ტოვებდა. 10-ზე მეტ უჯრედიან აგრეგატთა რიცხვი კი ორჯერ კლებულობდა. რაც შეეხება Y -2, შტამს, მასში მცირე აგრეგატებიან და ინდივიდუალურ უჯრედთა რიცხვი ფრაქციონირების შემდეგ ორჯერ მატულობს, ხოლო 10-ზე მეტ უჯრედიან აგრეგატთა რაოდენობა 3-ჯერ მცირდება.

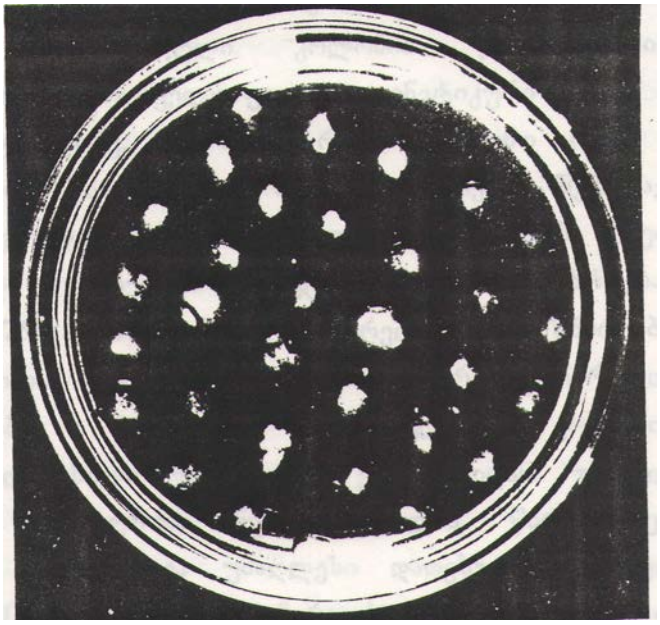
ჯამზე დათესვიდან 3-4 კვირის შემდეგ სხვადასხვა ზომის კოლონიები ჩამოყალიბდა. შერჩეულ იქნა 1-3 მმ დიამეტრიანი კოლონიები. ახალ საკვებ არეზე გადათესვისას პრაქტკულად ყველა მათგანი გაიზარდა. 1მმ-ზე უფრო მცირე დიამეტრის მქონე კოლონიებიდან შემდგომი გამრავლების უნარი მხოლოდ უმნიშვნელო ნაწილმა შეინარჩუნა (სურ.15).

უჯრედულ გენერაციათა რიცხვი – g განსაზღვრულია შემდეგი ფორმულიდან: Nt=Nox2g, სადაც No-კოლონიაში უჯრედთა საწყისი რიცხვია, Nt -კი საბოლოო რიცხვი.

აღმოჩნდა, რომ სიცოცხლისუნარიანი კლონის წარმოსაქმნელად უჯრედმა უნდა გაიაროს დაყოფათა 8-9 ციკლი მაინც. დათესვის ეფექტურობა, ანუ კულტურის რეპროდუქტიული გადარჩენადობა, განისაზღვრება ჯამზე გაზრდილ კოლონიათა რიცხვის ცოცხალ უჯრედთა რიცხვთან ფარდობის პროცენტული სიდიდით. იგი საკმაოდ დაბალია და საწყისი პოპულაციისთვის 0.3%-ს შეადგენს, მუტანტური შტამებისთვის კი-0.5%-ს. უნდა ითქვას, რომ დათესვის ეფექტურობის ასეთი დაბალი მაჩვენებელი სპეციფიურია ზოგადად სომატურ უჯრედთა *in vitro* პოპულაციებისათვის. შესაძლოა დათესვის დაბალი ეფექტურობა დაკავშირებული იყოს პოპულაციის ჰეტეროგენულობასთან, რის გამოც ამ პოპულაციის უჯრედები განვითარების ციკლის სხვადასხვა სტადიაზე იმყოფება და მათ გარკვეულ ნაწილს მრავალჯერადი დაყოფის უნარი აღარ შესწევს.

Y. gloriosa-ს საკონტროლო და მუტანტურ შტამებში დათესვის ეფექტურობის დაბალი მაჩვენებელი, ვფქრობთ, აიხსნება სწორედ იმ გარემოებით
რომ ყველა ცოცხალი უჯრებდი სიცოცხლსუნარიან კლონად ვერ ჩამოყალიბდება, თუკი მან მინიმუმ რვა გენერაცია არ გაიარა.
კალუსური და სუსპენზიური კულტურებიდან მიღებულ უჯრედულ ხაზებთან შედარებით ჯამზე გაზრდილ კოლონიებს სელექტური უპირატესობა აქვს იმ მხრივ, რომ ყოველი კოლონია წარმოქმნილია ცალკეული უჯრედისგან და ამით

უზრუნველყოფილია გენეტიკური და ფიზიოლოგიური ერთგვაროვნების მაღალი დონე. იმისთვის, რომ სარწმუნო იყოს ამ კოლონიათა ცალკეული უჯრედული წარმოშობა. სტრიტის მიერ შემოთავაზებულ იქნა ასეთი მიდგომა: უჯრედული სუსპენზიები უნდა განზავდეს ისეთ სიხშირემდე, რომელზეც მცენარეული უჯრედები პრაქტიკულად არ იზრდება სპეციალური ჩარევის გარეშე. სხვადასხვა უჯრედულ სიხშირეებზე დათესილ უჯრედებიდან კოლონიათა მიღების ალბათობა რაოდენობრივად ისაზღვრება დათესვის ეფექტურობის მიხედვით.



სურათი 15. *Y. gloriosa*-ს უჯრედული პოპულაციის ინდივიდუალური კოლონიები (პირველი პასაჟი)

თეორიულად, კოლონია შესაძლოა წარმოიქმნას ყოველი დათესილი უჯრედული ერთეულიდან. უჯრედული სიხშირე, რომელზეც დათესვის ეფექტურობა ნულის ტოლია, წარმოადგენს მინიმალურ ეფექტურ სიხშირეს – სასურველია უმაღლესი დათესვის ეფექტურობის მიღწევა დაბალ სიხშირეებზე. წინასწარი ჩარევის გარეშე (მაგ. ფრაქციონირება), როცა სიხშირეები 5000 უჯრედულ ერთეულ მლ-ზე უფრო დაბალია, დათესვის ეფექტურობა არანაყოფიერია. თუმცა ზოგჯერ ეს სიხშირე შეიძლება მაღალიც იყოს, რადგან მზარდი უჯრედული ერთეულები თვალნათლივ განცალკევებული არ არის. შესაბამისად საჭიროა ზრდის შენარჩუნება დაბალ სიხშირეებზე. ამ მიზნით იყენებენ ცალკეულ უჯრედთა მიკროკულტურას, ე.წ. „გამდიდრებულ“ პირობით საკვებ არეებს, ანდა პოპულაციების სინქრონიზაციას.

თავისთავად კლონირება გენეტიკური ვარიაბელობის შესაძლებლობას ქმნის, მაგრამ კლონების იზოლირებისას უკეთეს შედეგებს იძლევა გადარჩევის სისტემაში მუტაგენური დამუშავების ჩართვა. იგი, თავის მხრივ ამაღლებს მუტანტების სიხშირეს პოპულაციაში, ამასთან, აფართოებს სელექციის მასშტაბებს მაღალპროდუქტიული კლონების შესარჩევად.

მემკვიდრულ ცვლილებათა ინდუცირებისთვის გამოვიყენეთ ნმშ-ს მასტიმულირებელი (2 mM. სთ) და ინჰიბიტორული (8 mM.სთ) დოზები. ცოცხალ უჯრედთა წილი განსაზღვრულ იქნა ფაზურ-კონტრასტული მიკროსკოპის

მეთოდით. პეტრის ჯამებზე განთესვიდან ერთი კვირის შემდეგ დავითვალეთ გაყოფის ფაზაში მყოფი უჯრედები. ვიზუალურად განსხვავებული კოლონიების წარმოქმნის შემდეგ, კულტივირების მეოთხე კვირის ბოლოს, შეფასებულ იქნა დათესვის ეფექტურობა (ცხრ.11). როგორც მე-11 ცხრილის მონაცემებით ირკვევა, *Yucca gloriosa*-ს უჯრედების მუტაგენით დამუშავების შემდეგ ცოცხალ უჯრედთა პროცენტი და გაყოფის ფაზაში მყოფ უჯრედთა რიცხვი საკონტროლო შტამში არსებული სიდიდისგან დიდად არ განირჩევა. თუმცა დათესვის ეფექტურობა მუტაგენის დოზის გაზრდის შესაბამისად კონტროლის 34%-ს შეადგენს. დათესვის ეფექტურობის მაჩვენებელი გაცილებით ნაკლებია ცოცხალი უჯრედების რიცხვთან შედარებით. ამით ვრწმუნდებით, რომ ყველა ცოცხალ უჯრედს როდი შეუძლა კოლონიის წამოქმნა. ნმშ-ს დოზათა ლეტალური მოქმედების შესწავლით შერჩეულ იქნა ეფექტური დოზა - 8mM.სთ, რომლის გავლენითაც *Y. gloriosa*-ს სუსპენზიურ უჯრედთა გადარჩენადობა დაახლოებით 3-ჯერ არის შემცირებული. ეს უნად გავითვალისწინოთ მუტაგენის რაოდენობრივი დახასიათებისას, რამდენადაც ინდუქციის სიდიდე განისაზღვრება პოპულაციაში სიცოცხლისუნარიან უჯრედთა წილით.

ამრიგად, კლონირების მეოდით მიღებულია *Yucca gloriosa*-ს საწყისი და პროდუქტიული შტამების (Y--0.5 და Y--2) ერთუჯრედიანი კლონები, რომელთა ეფექტური ზრდისთვის ოპტიმალურ სიხშირეს 105 უჯრ/მლ წარმოადგენს. უჯრედულ გენერაციათა რიცხვის განსაზღვრით დაადგინეს, რომ სიცოცხლისუნარიანი კლონის წარმოსაქმნელად საჭიროა უჯრედულ დაყოფათა ცხრა ციკლი. დათესვის ეფექტურობის შეფასებისას გამოვთქვით აზრი, რომ მისი დაბალი სიდიდე (0.3-0.5%) საკონტროლო პოპულაციაში და მის პროდუქტიულ მუტანტურ შტამებში (Y-C-0,5 და Y--2) დაკავშირებულია განვითარების ციკლის სხვადასხვა სტადიაზე მყოფ უჯრედთა მრავალჯერადი დაყოფის უუნარობასთან. ამაზე მიგვანიშნებს სწორედ ის ფაქტი, რომ კლონების ფორმირება უჯრედთა ცხრა გენერაციის შემდეგ ხდება.

ცხრილი 11

ნმშ-ს განსხვავებული დოზების გავლენა
Y. gloriosa-სუსპენზიური კულტურის უჯრედთა გადარჩენილობაზე

ვარიანტი	ცოცხალ უჯრედთა რიცხვი %-ში დათესვამდე	გაყოფის ფაზაში მყოფ უჯრედთა რაოდენობა %	დათესვის ეფექტურობა %	კონტროლის მიმართ %
K	70±1,3	11±0,1	30.35±0,12	100
Y --0,5	63.4±1,5	20 ±0.01	30.31 ±0,09	88,6
Y --02	46.3 ±1,9	14±0.06	30.12 ±0,08	34.2

Yucca gloriosa-ს უჯრედთა გადარჩენადობაზე ნმშ-ს დოზათა გავლენის შესწავლით გამოვლინდა ეფექტური დოზა 8 mM-სთ, რომლის ინჰიბიტორული ზემოქმებედა გადარჩენადობის ხარისხს სამჯერ ამცირებს. უნდა აღინიშნოს,

რომ მუტაგენური ფაქტორის ლეტალური მოქმედების ანალიზი ინდუცირებული მუტაგენეზის რაოდენობრივი დახასიათების აუცილებელი პირობაა.

V. 7. აქტიურ ვარიანტთა გადარჩევა

პრაქტიკულ სელექციაში წარმატებით გამოიყენება უჯრედული ხაზებისა და კლონებიდან მიღებული სომაკლონალური ვარიანტები, რომლებიც საწყისი უჯრედული პოპულაციისგან გამოირჩევიან, როგორც ფენოტიპურად, ასევე გენეტიკური ნიშან-თვისებებით. მათი წარმოქმნა დაკავშირებულია *in vitro* კულტივირების პროცესში ჰეტეროგენული პოპულაციის უჯრედთა არაორგანიზებულ ზრდასთან. აღნიშნულ ვარიანტებს მნიშვნელობა ენიჭება არა მარტო აგრონომიულად სასურველი მუტანტური მცენარის გამოსაყოფად, არამედ ბუნებრივ ნაერთთა სინთეზისთვის მაღალპროდუქტიულ ხაზთა გამოსავლენად .

მიზანშეწონილია განვასხვავოთ ტერმინები „ვარიანი“ და მუტანტი“. ვარიანტით აღინიშნება ნებისმიერი უჯრედული ხაზი, რომელსაც გააჩნია ფენოტიპური ცვალებადობა, მაგრამ განსაზღვრული არ არის იგი გენური გამოხატულების შედეგია თუ ეპიგენეტიკური ცვლილების. ცნება „მუტანტი“ ადექვატურად აღნიშნავს იმ ხაზს, რომლისთვისაც დასაბუთებულია ცვალებადობის გენეტიკური საფუძველი.

მუტანტების სელექცია განსაკუთრებით ეფექტურია, როცა მუტაგენით დამუშავების შემდეგ უჯრედები რამდენიმე დაყოფის სტადიას გადიან. სუსპენზიური და კულუსური ქსოვილების უჯრედებისთვის, როგორც წესი, გადარჩენადობის პროცენტის შეფასება ბიომასის დაგროვების მიხედვით ხდება (ისაზღვრება მშრალ და ნედლი ბიომასა). გამოიყენება ცოცხალ და მკვდარ უჯრედთა შეღებვის მეთოდი და ვიზუალურად იდენტიფიცირდება უჯრედები, რომლებიც საწყისს აძლევს ახალ კოლონიებს.

Y. gloriosa-ს საკონტროლო და მუტანტური შტამებიდან კლონირების შედეგად მიღებული იყო 300-მდე კოლონია, რომელთა შემდგომი სუბკულტივირების შედეგად ბიომასის მატების მიხედვით 60-მდე შეცვლილი ვარიანტი იქნა გამოყოფილი. მათი გადარჩევა წარმოებს ფენოტიპურად გამოვლენილი ნიშნის მიხედვით. ვარიანტების სპეციფიური თავისებურება იყო განსხვავებული ზრდა (კულტივირების ერთდაიმავე პირობებში). როგორც საკონტროლო, ასევე მუტანტური კლონების გარკვეული ნაწილი კარგი ზრდის უნარით და თეთრი, ფხვიერი ქსოვილით გამოირჩეოდა, ხოლო ცუდად მზარდი კლონებისთვის დამახასიათებელი იყო მოყავისრო, გამკვრივებული ქსოვილი, რაც ნეკროზულ პროცესთა დაწყებით იყო გამოწვეული.

აღნიშნულ ვარიანტებს შორის შერჩეულ იქნა ისეთები, რომლებიც მაღალი ინტენსივობით იზრდებოდა. კულტურის განვითარების რამდენიმე ციკლში შევისწავლეთ მათი ზრდის ინდექსის მაჩვენებლები ნედლი და მშრალი ბიომასის მიხედვით. ზრდის ინდექსის სიდიდე შეესაბამება კულტივირების 30-ე დღეს. ამის შემდეგ, როგორც ცნობილია, კულტურა გადადის სტაციონალურ ფაზაში (ცხრ.12).

როგორც მე-12 ცხრილის მონაცემები გვიჩვენებს საკონტროლო შტამისთვის ზრდის ინდექსის მაჩვენებელი ვარირებს 7.5-10.1-ს შორის ნედლი ბიომასის მიხედვით, ხოლო მშრალ ბიომასის ცვლილებების მიხედვით – 1.3-5.2-ს შორის. მუტანტური შტამის Y-0.5-ის კლონები შედარებით მდგრადობით ხასიათდება, ნედლი ბიომასის ზრდის ინდექსი N_t/N_0 იცვლება 9.0-დან 10.6-მდე, მშრალი ბიომასისთვის -2.7-დან 3.2-მდე. კლონებში N_t/N_0 სიდიდის საზღვრები

გადიდებულია 7.1-დან 13.1-მდე (ნედლი ბიომასის მიხედვით) და 2.7-დან 4.1-მდე (მშრალი ბიომასის მიხედვით). რაც შეეხება აღნიშნულ ვარიანტებში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვების უნარს, ჩატარებული ბიოქიმიური ანალიზით ნაჩვენებია, რომ ისინი სტეროიდული გლიკოზიდების სინთეზის მხრივ პროდუქტიულობის მაღალი მაჩვენებლებით არ გამოირჩევა. თუმცა ადგილი აქვს ერთგვარ კანონზომერებას: ცუდად მზარდ კლონებში მეტაბოლური აქტივობაც დაბალია. მისი გაუმჯობესება ზრდის პროცესის კვალდაკვალ ხდება, შესაბამისად, უკეთ მზარდ ვარიანტებში ბიოსინთეზური პოტენციალიც გაუმჯობესებულია. ეს ფაქტი თავისთავად ბიოსინთეზის პროცესების ზრდის პროცესებზე დამოკიდებულების დამასაბუთებელია.

საკონტროლო შტამის კლონებში, რომელთა ზრდის ინტენსივობის სიდიდე არც თუ ისე მაღალია, ფუროსტანოლურ გლკოზიდთა მინიმალური შემცველობა შეინიშნება (დაახლ. 0.2%).

Y -0.5 და Y -2 მუტანტური შტამების კლონებში კი მათი რაოდენობა მომატებულია და გარკვეულწილად საწყის შტამში არსებულ სიდიდეს აღემატება (დაახლ. 0.4-0.5%). უნდა ითქვას, რომ ამ კლონებში მუტაგენის მასტიმულირებელი დოზის ეფექტურობა არსებითად ზრდის პროცესთა ინტენსიფიკაციაში გამოიხატება.

პროდუქტიულობის თვალსაზრისით, ოპტიმალურია როგორც ბიომასის, ასევე სინთეზირებულ ნაერთთა მაღალი გამოსავლიანობის მიღწევა. თუმცა პრაქტიკულ სელექციაში შესაძლებელია ან ერთი ან მეორე ნიშნის მიხედვით გადარჩევა.

აღნიშნულ ფაქტზე დაყრდნობით ყურადღება გამახვილდა *Y. gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის საწყისი და მუტანტური შტამების კლონებში ბიომასის დაგროვების უნარზე. დასახელებულ კლონებს შორის ვარიანტი შეირჩა ზრდის ინდექსის ნიშნით. კერძოდ, Nt/N0-ის მინიმალური, საშუალო და მაქსიმალური მნიშვნელობებით. დაკვირვება წარმოებდა მათ მიერ სინთეზირებულ ფუროსტანოლურ გლიკოზიდების რაოდენობრივ შემცველობაზე (ცხრ.13).

როგორც მე-13 ცხრილის მონაცემები გვიჩვენებს, უკეთესი შედეგები იქნა მიღებული ზრდის ინდექსის მაღალი მაჩვენებლის მქონე კლონებში. ამ მხრივ აღსანიშნავია საკონტროლო შტამის კლონი -16, მუტანტური შტამის Y -0.5-ის კლონი N-14 და Y -2 შტამის კლონი N -16, მაგრამ უნდა ითქვას, რომ მათში ფუროსტანოლების გამოსავლიანობა პრაქტკული დანიშნულებისთვის სახარბიელო შედეგს ვერ ამჟღავნებს. აღნიშნულ კლონებში საერთო პროდუქტიულობა გაუმჯობესებულია ძირითადად ბიომასის გადიდებული დაგროვების უნარის ხარჯზე. ამიტომ მიზანშეწონილად მიგვაჩნია, რომ მათი შემდგომი გადარჩევა სწორედ ამ ნიშნით წარიმართოს. როგორც ვხედავთ, ბიომასის მაღალი გამოსავლიანობა უზრუნველყოფს სტეროიდული ნაერთების შემცველობის გაზრდას. ეს ფაქტი გვაფიქრებინებს, რომ ზრდის პროცესთა რეგულაციით საფუძველი იქმნება მეტაბოლური აქტივაციისთვის.

მუტაგენეზით მიღებულ სომაკლონალურ ვარიანტებში ხდება სასურველი მორფოლოგიური და ციტოგენეტიკური ცვლილებების გაძლიერება. ხანგრძლივი მრავალჯერადი პასირება განამტკიცებს მოცემული ფენოტიპური გამოხატულების სიხშირის მატებას. ამას მოწმობს ლიტერატურაში ციტირებული მაგალითები, რომელთა თანახმად სხვადასხვა უჯრედულ ხაზებში მუტაგენით ზემოქმედების შედეგად შეირჩევა დადებითად შეცვლილი ვარიანტები. მათ უპირატესობას შეადეგს მეორად მეტაბოლიტთა სინთეზის გაძლიერება.

ის მექანიზმები, რომელთა მიზეზითაც კულტურა შეიცავს როგორც დაბალ, ასევე პაღალპროდუქტიულ უჯრედებს, ჯერჯერობით სრულყოფილად ახსნილი არ არის. შესაძლოა ეს იმით იყოს განპირობებული, რომ დედიფერენცირებულ

უჯრედებში ტოტალური გენეტიკური ინფორმაციის მხოლოდ ნაწილია გამოხატული. ამდენად, პროდუქტიულობის ასამაღლებლად უჯრედთა კლონირება როგორც საწყის, ასევე მუტაგენით დამუშავებულ პოპულაციაში მოითხოვს სელექციის და გადარჩევის რთული მექანიზმების ჩატარებას.

პირდაპირი ანალიტიკური გადარჩევის საფუძველზე მიმდინარეობს დაბალ და მაღალპროდუქტიულ უჯრედულ ხაზებად დახარისხება. რამდენიმე პასაჟის შემდეგ ისინი ხელახლა კლონირდება ჯამზე განთესვის საშუალებით. კვლავ ხდება მაღალპროდუქტიული კლონის დაყოფა დაბალ და მაღალპროდუქტიულ

ცხრილი 12

Y. gloriosa-ს საწყისი და პროდუქტიული შტამის ზოგიერთი კლონისთვის ზრდის ინდექსის ცვლილებები (N_t/N_0)

შტამი	კლონები	ნედლი ბიომასის მიხედვით	მშრალი ბიომასის მიხედვით
K	2	7.5	1.3
	4	7.9	1.5
	5	8.0	1.7
	13	9.6	2.9
	14	9.0	2.4
	16	10.1	3.2
Y-0.5	1	10.6	3.2
	2	10.9	3.3
	4	10.9	3.1
	5	10.8	3.3
	9	9.6	2.9
	10	9.2	2.7
	11	9.4	2.7
	14	9.0	2.4
	17	9.7	2.8
Y-2	2	7.9	2.7
	7	7.5	2.4
	9	10.1	3.1
	10	8.0	2.5
	11	7.1	2.3
	15	9.1	2.9
	16	13.1	4.1
	17	9.5	3.2

სუბკლონებად და ა.შ. ყოველი მომდევნო მაღალპროდუქტიული კლონი უფრო მეტი მდგრადობით გამოირჩევა.

არაპირდაპირი გადარჩევისას შერჩეული კლონი შეფასდება უჯრედული ექსტრაქტის ანალიზის შემდეგ და მისი მხოლოდ ნაწილი სუბკულტივირდება. ასეთი აუცილებლობა განპირობებულია კლონის თვისებათა გამოსავლენად.

ანალიტიკური გადარჩევა სასურველ შედეგებს იძლევა, როცა შეცვლილი ნიშანი საკმარისად არის გამოხატული საწყის პოპულაციაში. იშვიათი ვარიანტების დადგენა ხდება დადებითი, აქტიური სელექტური სისტემით, რომელიც უზრუნველყოფს ვარიანტის გადარჩენადობას დანარჩენ უჯრედთა დაღუპვის ხარჯზე. გასათვალისწინებელია მათი სტაბილურობა და რეზისტენ-ტობა. სირთულეებს ქმნის აგრეთვე, კულტივირებულ უჯრედთა პლოიდურობის არასასურველი დონე. ანეუპლოიდური, პოლიპლოიდური უჯრედებისთვის ბიოქიმიურ ვარიანტთა გადარჩევა ხდება მხოლოდ რეზისტენტობის გზით .

ცხრილი 13

Y. gloriosa-ს საკონტროლო და მუტანტური შტამების სხვადასხვა კლონის მიერ გლიკოზიდთა სინთეზის უნარი

ვარიანტები		სტეროიდული გლიკოზიდთა შემცველობა პასაჟებში, %		
		I	V	VII
K	2	0.17±0.06	0.18±0.04	0.22±0.03
	4	0.23±0.04	0.27±0.02	0.25±0.05
	16	0.32±0.08	0.35±0.03	0.37±0.04
Y-0.5	2	0.31±0.03	0.30±0.04	0.32±0.02
	9	0.38±0.02	0.37±0.04	0.38±0.03
	4	0.51±0.02	0.54±0.01	0.53±0.02
Y-2	9	0.29±0.05	0.31±0.05	0.30±0.07
	11	0.37±0.04	0.39±0.02	0.39±0.03
	16	0.470.05	0.490.04	0.490.05

მუტაგენით დამუშავების შემდეგ კი, როგორც ცნობილია, სელექციის მიმართულება იცვლება პლოიდურობის გარკვეულ დონეზე სტაბილიზაციისკენ. მეტაბოლიტთა პროდუცენტი გენეტიკური ვარიანტების სელექციაში პლოიდურობის სიდიდე დამოკიდებულია მეტაბოლურ პროცესთა რეგულაციაზე. პლოიდურობის ერთ დონეზე შენარჩუნებით იზრდება სასურველი ნიშნის მიხედვით ვარიანტთა გადარჩევის შანსი.

კლასიკური მიკრობული გენეტიკის თანახმად, ტრადიციულია მიღებულ მუტანტურ ზეპროდუქტიულ ხაზებს შორის სელექციის წარმართვა უჯრედულ დონეზე.

ჩვენს მიერ *Y. gloriosa*-ს საკონტროლო და მუტანტურ შტამებიდან გამოვლენილია ინტენსიური ზრდის მქონე კლონები. მათი გადარჩევა მიმდინარეობს ბიომასის დაგროვების ნიშნის მიხედვით. მუტანტური შტამებისთვის გამოყოფილია ყველაზე უფრო აქტიური ვარიანტები, რომელთა სტაბილურობა მუტაგენური ფაქტორით არის უზრუნველყოფილი. სასურველია აღნიშნულ ვარიანტებში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვების მაღალი შესაძლებლობის მიღწევა, რაც მოითხოვს მათ გადარჩევას ფუროსტანოლთა სინთეზის გაძლიერებული უნარის მიხედვით.

VI. მცენარეული უჯრედის ტოტიპოტენტურობა. მცენარეთა მორფოგენეზის ფიზიოლოგიური ასპექტები

მცენარეთა იზოლირებული ფრაგმენტების კულტივირების მეთოდები დაფუძნებულია მცენარეული უჯრედის მნიშვნელოვანი თვისების – ტოტიპოტენტურობის უნარზე.

ტოტიპოტენტურობა (ლათ. totus - მთლიანი , potential – უნარი, ძალა) - ეს არის უჯრედის თვისება მოახდინოს გენეტიკური ინფორმაციის რეალიზება, რაც უზრუნველყოფს მის დიფერენცირებას და განვითარებას მთლიან მცენარემდე.

ტოტიპოტენტურობის უნარი გააჩნია მცენარის განაყოფიერებულ კვერცხუჯრედს და ცხოველური ორგანიზმის კვერცხს. ცხოველებში დიფერენცირებულ უჯრედებში ტოტიპოტენტურობის უნარი მხოლოდ ნაწლავღრუიანების გარკვეულ უჯრედებს გააჩნია.. უმაღლეს ცხოველურ ორგანიზმებს ემბრიოგენეზის ადრეული ეტაპიდან, უჯრედთა სპეციალიზაციის დაწყების მერე ტოტიპოტენტურობა არ რეალიზდება. მაგრამ ცხოველთა ემბრიონებიდან იზოლირებულ უჯრედებს, კულტივირების პირობებში გააჩნიათ უნარი განიცადონ დიფერენცირება, როგორც საკუთრივ ჩანასახის ყველა ტიპის უჯრედად, ასევე ემბრიონალურ ქსოვილად. ასეთმა უჯრედებმა მიიღეს ემბრიონალური ღეროვანი უჯრედების სახელწოდება, მათ უკავშირებენ ქსოვილთა გადანერგვის პრობლემების გადაწყვეტას.

მცენარეებში ბუნებრივ პირობებში ტოტიპოტენტურობა შესაძლოა გამოავლინონ სპეციალიზირებულმა უჯრედებმაც, ანუ დიფერენცირებულმა სომატურმა უჯრედებმაც. ამის მაგალითია ვეგეტატიური გამრავლება. ბეგონიის და კალანხოეს ფოთლის უჯრედებიდან შესაძლებელია მთლიანი მცენარის განვითარება. ტოტიპოტენტურობა მცენარეებში რეალიზდება ჭრილობების შეხორცებისას. მცენარის ჭრილობის ზედაპირძე უჯრედების არაორგანიზებული პროლიფერაციის შედეგად ხდება კალუსის განვითარება (ლათ. Callus – კოური, სქელი კანი). კალუსი ხელს უწყობს ჭრილობის შეხორცებას. აღსანიშნავია, რომ მრავალმა ერთლებნიანმა მცენარემ დაკარგა კალუსის წარმოქმნის და ვეგეტატიური გამრავლების უნარი.

In vitro ექსპერიმენტულ პირობებში ხელოვნურ საკვებ არეზე მცენარეთა უჯრედების, ქსოვილთა ფრაგმენტების, ორგანოთა გაზრდისას შესაძლებელია *in vivo* სუპრესირებული (დათრგუნული) ტოტიპოტენტურობის რეალიზაცია. ეს ხორციელდება ზრდის რეგულატორების და ფიტოჰორმონების გავლენით. *In vivo* სუპრესირებული ტოტიპოტენტურობის რეალიზაცია ყველაზე ადვილად ხორციელდება ფესვის წვერიდან და კვირტიდან იზოლირებული მერისტემული უჯრედების ასევე კალუსების კულტივირებისას რთული საკვები არეების გამოყენ.ბით. ეს მიდგომა წარმატებულად იყო რეალიზებული მე-20 საუკუნის

30-იან წლებში ამერიკელი მკვლევარის ფილლიპ უაიტის და ფრანგი მეცნიერის როჟე გოტრეს მიერ, რომლებსაც იზოლირებული ქსოვილების და ორგანოების კულტივირების თანამედროვე მეთოდების მამამთავრებად თვლიან.

VI.1. მცენარეთა მიკროკლონური გამრავლება და ვირუსისგან თავისუფალი მასალის მიღება

მცენარეთა მიკროკლონური გამრავლების უპირატესობა გამრავლების ტრადიციულ ხერხებთან შედარებით. მეთოდის ისტორია

ბუნებაში არსებობს მცენარეთა გამრავლების ორი ხერხი: სქესობრივი (თესლით) და ვეგეტატიური. ორივე მეთოდს აქვს როგორც თავისი უპირატესობანი, ასევე ნაკლოვანებანი. თესლით გამრავლების ნაკლია თესლოვანი მასალის გენეტიკური სიჭრელე და იუვენილური (ახალგაზრდა) პერიოდის ხანგრძლივობა.

ვეგეტატიური გამრავლებისას დედამცენარის გენოტიპი ინახება, აგრეთვე მცირდება იუვენილური პერიოდის ხანგრძლივობა. მაგრამ სახეობათა უმრავლესობა ვეგეტატიური მეთოდით ცუდად მრავლდება, მათ მიეკუთვნება მრავალი მერქნიანი ჯიში. მაგალითად, მუხის, ფიჭვის, ნაძვის, კაკლის გამრავლების ეფექტურობა იუვენილურ სტადიაზეც კი არც ისე მაღალია. ამას გარდა, დაკალმებით შეუძლებელია მერქნიანი მცენარეების მრავალი სახეობის გამრვლება 10 – 15 წლის ასაკის ზევით. ძნელია სტანდარტული დასარგავი მასალის მიღება, რადგან არსებობს ინფექციის დაგროვებისა და გადაცემის შესაძლებლობა. მყნობით გამრავლების ოპერაციები ძნელი და შრომატევადია.

მიღწევებმა უჯრედებისა და ქსოვილთა კულტურების სფეროში მიგვიყვანა ვეგეტატიური გამრავლების პრინციპულად ახალი მეთოდის შექმნამდე– კლონურ მიკროგამრავლებამდე. ეს არის არასქესობრივი გზით საწყისი ეგზემპლარის გენეტიკურად იდენტური მცენარეების მიღება. *In vitro* მეთოდის საფუძველში დევს მცენარეული უჯრედის უნიკალური უნარი განახორციელოს მისთვის დამახასიათებელი ტოტიპოტენტურობა. ტერმინი "კლონი" მოწოდებული იყო 1903 წელს უებსტერის მიერ (ბერძნული Klon – კალამი ან ყლორტი, რომელიც ვარგისია მცენარეთა გამრავლებისათვის).

სამეცნიერო ტერმინოლოგიის შესაბამისად, კლონირება გულისხმობს იდენტური ორგანიზმის მიღებას ერთეული უჯრედებიდან. ამ მეთოდს აქვს რიგი უპირატესობანი გამრავლების არსებულ ტრადიციულ ხერხებთან შედარებით რაც შემდეგში მდგომარეობს:

– მიიღება გენეტიკურად ერთგვაროვანი გადასანერგი მასალა;
– ხდება მცენარის განთავისუფლება ვირუსებისაგან მერისტემული კულტურის გამოყენების ხარჯზე;
– დამახასიათებელია გამრავლების მაღალი კოეფიციენტი (10^5 - 10^6 – ბალახოვნებისთვის, 10^4 - 10^5 ბუჩქოვანი მერქნიანი მცენარეებისათვის და 10^4 – წიწვოვანებისათვის);
–ხდება სასელექციო პერიოდის ხანგრძლივობის შემოკლება;
–წარმოებს მცენარის გადასვლის დაჩქარება განვითარების იუვენილური ფაზიდან რეპროდუქციულ ფაზაში;
– შესაძლებელი ხდება გამრავლება მცენარეებისა, რომლებიც ძნელად მრავლდება ტრადიციული მეთოდებით;
– შესაძლებელია სამუშაოების ჩატარება მთელი წლის განმავლობაში და გამრავლების პროცესის ავტომატიზაცია.

კლონური მიკროგამრავლების პიონერად ითვლება ფრანგი მეცნიერი ჟან მორელი, რომელმაც XX საუკუნის 50-იან წლებში მიიღო ორქიდეას პირველი მცენარე-რეგენერანტი. ამ დროისათვის აპიკალური მერისტემის *in vitro*

კულტივირების ტექნიკა უკვე კარგად იყო დამუშავებული. **რ**ოგორც წესი, მკვლევარები პირველად ექსპლანტად იყენებდნენ ბალახოვანი მცენარეების: მიხაკის, ქრიზანტემას, მზესუმზირას, ბარდის, სიმინდისა და სხვათა წვერის მერისტემას.

თავდაპირველად შესწავლილი იყო კარტოფილის, შაქრის ჭარხლის, მიხაკის, ჰერბერას და სხვა მცემარეთა მიკროგამრავლების პირობები და მოწოდებული იყო საწარმოო ტექნოლოგიები. შემდგომში, კლონურ მიკროგამრავლებაში ჩატარებულმა კვლევებმა მოიცვა მერქნიანი მცენარეებიც. პირველი სამუშაოები მერქნიანი მცენარეების ქსოვილთა კულტურებზე გამოქვეყნდა XX საუკუნის 20-იან წლებში და დაკავშირებული იყო გოტრეს სახელთან, რომელმაც აჩვენა, რომ ზოგიერთი მცენარის კამბიალურ ქსოვილებს აქვთ კალუსოგენეზის უნარი *in vitro*. მაგრამ ვერხვის პირველი მცენარე-რეგენერანტები, რომლებიც დაყვანილ იქნა ნიადაგის კულტურამდე, მიღებულ იქნა 60-იან წლებში მატერის მიერ.

წიწვოვანი ჯიშების *in vitro* ქსოვილების კულტივირება დიდი ხნის განმავლობაში იშვიათად გამოიყენებოდა კვლევის ობიექტად. ეს დაკავშირებული იყო მცენარეებიდან იზოლირებული ქსოვილების კულტივირების სპეციფიკურ სიძნელეებთან. ცნობილია, რომ მერქნიანი, განსაკუთრებით წიწვიანი მცენარეები ხასიათდება ნელი ზრდით, ძნელად ფესვიანდება, შეიცავს დიდი რაოდენობით მეორად ნაერთებს (ფენოლები, ტერპენები და ა.შ.), რომლებიც იზოლირებულ ქსოვილებში აქტიურდებიან. დაჟანგული ფენოლები ჩვეულებრივად აინჰიბირებენ უჯრედის გაყოფასა და ზრდას, რაც იწვევს პირველადი ექსპლანტის დაღუპვას, ან მერქნიან მცენარეებში გვერდითი კვირტების რეგენერაციის უნარის შემცირებას, რომლებიც მცენარე-დონორის ზრდასთან ერთად პრაქტიკულად მთლიანად ქრება. ამჟამად, მიუხედავად ჩამოთვლილი სიძნელეებისა, 40 ოჯახის წარმომადგენელი 200-ზე მეტი მერქნიანი მცენარეა გამრავლებული *in vitro* კულტივირების მეთოდით (წაბლი, მუხა, არყის ხე, ნეკერჩხალი, ფიჭვი, ნაძვი, სექვოია და სხვ.).

VI. 2. ფაქტორები, რომლებიც გავლენას ახდენენ კლონური მიკროგამრავლების პროცესზე

მიკროკლონური გამრავლების ეფექტურობაზე გავლენას ახდენს მრავალი სხვადასხვა ფაქტორი. ეს არის კულტურაში შესაყვანი მცენარის ფიზიოლოგიური თავისებურებანი, კულტივირების ფიზიკური და ქიმიური პირობები. ერთერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი მომენტია დედამცენარისა და ექსპლანტის შერჩევა.

დედამცენარის შერჩევისას აუცილებლად მხედველობაშია მისაღები მისი ფიზიოლოგიური, ჯიშობრივი და სახეობრივი თავისებურებანი. საწყისი მცენარე უნდა იყოს ჯანსაღი, არ უნდა იყოს დაზიანებული სოკოვანი, ბაქტერ**ი**ული და ვირუსული დაავადებებით. ამას გარდა, იგი უნდა იმყოფებოდეს ინტენსიური ზრდის მდგომარეობაში (მოსვენებითი ფაზიდან გამოსვლა და აქტიურ ზრდაზე გადასვლა). ბოლქვები, ფესურები და ტუბერები მოსვენებით მდგომარეობაში უვარგისია. კულტურაში შეყვანამდე მათ წინასწარ ამუშავებენ მაღალი ან დაბალი ტემპერატურით. გამრავლების უნარი დეტერმინირებულია აგრეთვე გენეტიკურად. მაგალითად, მარწყვი მრავლდება ყველა ხერხით, ქაცვი – არცერთით, თუმცა ბუნებაში მათი დაკალმება ხდება. ორლებნიანებს აქვთ რეგენერაციის უფრო მაღალი უნარი, ვიდრე ერთლებნიანებს და მერქნიანებს.

ექსპლანტის შერჩევისას აუცილებლად მხედველობაშია მისაღები მისი ასა-

კი, აღნაგობა და წარმოშობა. კლონირებული მასალის მაქსიმალური სტაბილურობის უზრუნველსაყოფად, თავიდან რომ ავიცილოთ ანომალიური მცენარეების წარმოქმნა, სასურველია ექსპლანტის სახით გამოვიყენოთ ახალგაზრდა, სუსტად დიფერენცირებული ქსოვილები. ამას გარდა, ახალგაზრდა მცენარეებიდან მიღებული ექსპლანტები უკეთესად ფესვიანდება, ვიდრე ზრდასრულიდან მიღებული, ეს განსაკუთრებით ეხება მერქნიან ჯიშებს. ყველაზე უკეთესია გამოვიყენოთ ღეროს წვეროები, იღლიური კვირტები, ჩანასახები, ახალგაზრდა ფოთლები, კალმები, ბოლქვები, ქერცლები, ყვავილედები, ე.ი. მერისტემის შემცველი ექსპლანტები. გრინის და ფილიპსის მიერ 1975 წელს სიმინდის ემბრიონებზე ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, რომ ზრდასრული (მოწიფული) თესლებიდან ამოღებული ემბრიონები წარმოქმნიან კალუსს და ფესვებს. თუ დამტვერვიდან 2-3 კვირის შემდეგ ისინი იზოლირებული იქნებიან, მაშინ წარმოიქმნება კალუსიც და მცენარეც. როგორც ჩანს, ეს დაკავშირებულია მცენარის ონტოგენეზში გენეტიკური პროგრამის ამოქმედებასთან. უნდა აღინიშნოს, რომ ახალგაზრდა ქსოვილები ყოველთვის არ წარმოადგენს გამრავლებისთვის ხელსაყრელ ობიექტებს. ექვევრიას ახალგაზრდა ფოთლებიდან მიღებულ ექსპლანტებზე წარმოიქმნება მხოლოდ ფესვები, ხნიერიდან – მხოლოდ ყლორტები, საშუალო ასაკიდან – ფესვებიც და ყლორტებიც. რაც უფრო მცირეა ექსპლანტის ზომა, მით უფრო ნაკლებია მისი რეგენერაციის უნარი. მეორე მხრივ, მსხვილ ექსპლანტებში იზრდება შესაძლებლობა მის უჯრედებში გაჩნდეს ვირუსები და სხვა პათოგენები, რაც აბრკოლებს ქსოვილების გაჯანსაღებას.

კულტივირების ხანგრძლივობა გავლენას ახდენს აგრეთვე მიკროგამრავლების ეფექტურობაზე. ექსპლანტის ფიზიოგოგიური მდგომარეობა იცვლება პასაჟების მიმდინარეობისას, ხანგრძლივი კულტივირებისას ყლორტების დაფესვიანების სიხშირე იზრდება. ამასთან, შესაძლებელია, რომ ექსპლანტმა შეიძინოს ახალგაზრდული ნიშან-თვისებები, რაც მიდის მისი მორფოგენეტიკური პოტენციალის გაზრდამდე.

კულტურაში შეყვანის წარმატება ხშირად განისაზღვრება სტერილიზაციის ეფექტურობით. მასტერილიზირებელი უნარის მქონე ნაერთის შერჩევა ხშირად განისაზღვრება ექსპლანტის თავისებურებებით. ნაზი ქსოვილებისათვის ასეთი ნაერთის კონცენტრაცია უნდა შემცირდეს, რათა შევინარჩუნოთ ექსპლანტის სიცოცხლისუნარიანობა. ხშირად საწყისი ექსპლანტების შინაგანი დასნებოვნება გაცილებით ძლიერია, ვიდრე ზედაპირული, ამიტომ ექსპლანტებს წინასწარ ამუშავებენ ფუნგიციდებითა და ანტიბიოტიკებით სოკოვანი და ბაქტერიული ინფექციების წინააღმდეგ. კარგ შედეგებს იძლევა მცენარის დამუშავება ნატრიუმის ბენზოატით.

მცენარეთა სახეობის მიხედვით აუცილებელია გამოიცადოს როგორც მყარი, ასევე თხევადი საკვები არეები. ხანდახან თხევად არეებს აქვთ უპირატესობა, რადგანაც უზრუნველყოფენ ტროფიკული ელემენტების მოძრაობას. მაგალითად, ვარდების გამრავლების დროს უფრო წარმატებული იყო ყლორტების კულტივირება ორფაზიან საკვებ არეზე: ქვედა ფენა – აგარიზებული, ზედა – თხევადი. გამრავლების ეფექტურობაზე შეუძლია გავლენა მოახდინოს აგრეთვე ექსპლანტის განლაგებამ (ჰორიზონტალური ან ვერტიკალური), საცობის ტიპმა (ბამბის, პლასტმასის, მინის, ლითონის და ა.შ.), აგრეთვე თანაფარდობამ ექსპლანტის მოცულობასა და საკვები არის რაოდენობას შორის, ექსპლანტების ოპტიმალური განათებამ და გაზური ცვლის პირობებმა.

საკვები არის შედგენილობა აუცილებლად უნდა შეირჩეს თითოეული სახეობის მცენარისათვის. კლონურ მიკროგამრავლებაზე გავლენას ახდენენ ჰორმონები, მინერალური მარილები, ვიტამინები და ნახშირწყლები.

In vitro მიკროგამრავლების დროს ხშირად სარგებლობენ მურასიგეს და სკუგის, შენკის და ხილდებრანტის, ნიჩის, ჰამბორგის, ხელერისა და სხვათა საკვები არეებით. ჩვეულებრივად იყენებენ მურასიგე-სკუგის არეს, რომელიც შეიცავს ბევრ არაორგანულ აზოტს, რაც ასტიმულირებს ორგანოგენეზისა და სომატური ემბრიოგენეზის პროცესებს. ექსპლანტებში ხორბლის მარცვლების მორფოგენეზური კალუსების გამოსავალი მურასიგე-სკუგის არეზე უფრო მაღალია ჰამბორგის არესთან შედარებით, რომელიც შეიცავს აზოტის დაჟანგულ ფორმებს.

მურასიგე-სკუგის - მს არე ხელს უწყობს აგრეთვე ხორბლის მარცვლების უჯრედების ქრომოსომული ნაკრების სტაბილიზაციას აუქსინის მაღალი შემცველობისას არეში. საერთოდ, NH_4 : NO_3 ოპტიმალური თანაფარდობის საკითხი ღიად რჩება, რადგანაც ლიტერატურული მონაცემები უაღრესად ურთიერთ საპირისპიროა და არ არსებობს უნივერსალური რეცეპტი ყველა სახის მცენარისათვის. ნახშირბადოვანი კვების წყაროდ იყენებენ სხვადასხვა ნახშირწყლებს: საქაროზას, გლუკოზას, ფრუქტოზას, გალაქტოზას. სხვადასხვა კულტურები კლონური მიკროგამრავლების სხვადასხვა ეტაპებზე მოითხოვენ ნახშირწყლების სხვადასხვა კონცენტრაციას. გამრავლების ფიზიკურ ფაქტორებს მიეკუთვნება ტემპერატურა და განათების პირობები. პირველ ორ ეტაპზე განათება მერყეობს 1000 – 3000 ლუქსის ფარგლებში, ფოტოპერიოდი 14 – 16 სთ. მაგრამ ეს პარამეტრები დამოკიდებულია კულტურაზე. სინათლის მაღალ ინტენსივობას შეუძლია გამოიწვოს ქლოროზი და შეაფერხოს განვითარება. მაგრამ ნიადაგში გადატანისას ეს მცენარეები თავს უკეთ გრძობენ და აქტიურად იზრდებიან. სინათლის სპექტრული შედგენილობაც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს. ზოგიერთი მკვლევარი მუთითებენ ლურჯ სინათლეზე, როგორც მორფოგენეზის ძირითად კომპონენტზე. წითელი სინათლე ასტიმულირებს თამბაქოს კვირტების წარმოქმნას, არყის ხის დაფესვიანებას, სალათის ყლორტების წარმოქმნას.

ტ. ნ. კონსტანტინოვისა და თანაავტორების მიერ 1987 წ. ნაჩვემებია, რომ ლურჯი სინათლე აძლიერებს ვეგეტატიური კვირტების ჩამოყალიბებას თამბაქოს ყლორტებზე *in vitro* პირობებში, ხოლო წითელი ასტიმულირებს საყვავილე კვირტების განვითარებას. მაგრამ სხვადასხვა კონცენტრაციის ციტოკინინებისა და აუქსინების დამატებით, საყვავილე და ვეგეტატიური კვირტების დიფერენციაციის პროცესების თანაფარდობა იცვლება. ზოგ შემთხვევაში შეინიშნება საპირისპირო ეფექტიც კი. რ. ა. კარნაჩუკისა და ე. ს. გვოზდევის გამოკვლევების მიხედვით, უპირატესი გამოსავალი ხორბლის მორფოგენეზური კალუსებისა, საიდანაც ყალიბდება მცენარე და ყლორტები, აღინიშნება მწვანე სინათლეზე. დიდი მნიშვნელობა აქვს აგრეთვე სინათლის სპექტრული შედგენილობისა და საკვები არის ჰორმონალური ფაქტორების შეხამებას.

კულტივირების ტემპერატურა ჩვეულებრივ მერყეობს 22 – 26^{0}C ინტერვალში დღისით და 18 – 22^0 C ღამით. ზოგ შემთხვევაში ტემპერატურის დაწევა იწვევს გამრავლების ეფექტურობის აწევას. გამრავლების კოეფიციენტის ასაწევად აუცილებელია თითოეულ სახეობას თავისი აღმოცენების ბუნებრივი არეალის გათვალისწინებით შევურჩიოთ კულტივირების ინდივიდუალური პირობები. ჰაერის ფარდობითი ტენიანობა როგორც წესი – 65 – 70% შეადგენს.

V. 3. კლონური გამრავლების ეტაპები. არსებობს კლონური მიკროგამრავლების მრავალი მეთოდი, აგრეთვე ამ მეთოდების სხვადასხვა კლასიფიკაცია. ერთ-ერთი მათგანის მიხედვით, რომელიც მოწოდებულია მურასიგეს მიერ 1977 წელს, პროცესი შეიძლება განხორციელდეს შემდეგი გზებით:

1. იღლიური მერისტემის გააქტიურება;

2. გვერდითი ყლორტების წარმოქმნა ექაპლანტის ქსოვილებით;
3. გვერდითი ყლორტების წარმოქმნა კალუსში;
4. ექსპლანტის უჯრედებში სომატური ემბრიოგენეზის ინდუქცია;
5. სომატური ემბრიოგენეზი კალუსურ ქსოვილში;
6. დამატებითი ემბრიოიდების ფორმირება პირველადი სომატური ჩანასახების ქსოვილში (პირველადი ემბრიოიდების დაყოფა)

ნ. ვ. კატაევა და რ. გ. ბუტენკო გამოყოფენ კლონური მიკროგამრავლების ორ ძირითად, პრინციპულად სხვადასხვა ტიპს:

1. მცენარეში უკვე არსებული მერისტემის აქტივაცია (ღეროს აპექსი, ღეროს იღლიური და მძინარე კვირტები).

2. კვირტების ან ემბრიოიდების ინდუქცია de novo: ა) ადვენტური ყლორტების წარმოქმნა უშუალოდ ექსპლანტის ქსოვილთა მიერ; ბ) სომატური ემბრიოგენეზის ინდუქცია; გ) გვერდითი კვირტების დიფერენციაცია პირველად და გადასანერგ კალუსურ ქსოვილში.

ძირითადი მეთოდი, რომელიც გამოიყენება მცენარის კლონური მიკროგამრავლებისას, არის მცენარეში უკვე არსებული მერისტემის განვითარების გააქტიურება. ის დამყარებულია აპიკალური დომინირების მოხსნაზე. ამის მიღწევა შეიძლება ორი გზით: ა) ღეროს წვერის მერისტემის მოცილებით და ყლორტის შემდგომი *in vitro* დაკალმებით უჰორმონო არეზე;
ბ) საკვებ არეზე ციტოკინინების ტიპის მოქმედების ნივთიერებების დამატება, რომლებიც აინდუცირებენ მრავალრიცხოვანი იღლიური ყლორტების განვითარებას. როგორც წესი, ციტოკინინებად იყენებენ ბაპს ან კინეტინს (6-ფოსფოამინოპურინს) და ზეატინს. ამგვარად მიღებულ ყლორტებს აცილებენ პირველადი ექსპლანტიდან და ხელახლა დამოუკიდებლად აკულტივირებენ ახლად მომზადებულ საკვებ არეზე, რომელიც ასტიმულირებს იღლიური მერისტემის პროლიფერაციას და უფრო მაღალი რიგის ყლორტების აღმოცენებას.

ხშირად ექსპლანტად იყენებენ წვეროს ან იღლიურ კვირტებს, რომლებსაც აცილებენ ყლორტებიდან და ათავსებენ ციტოკინინების შემცველ საკვებ არეზე. წარმოქმნილ ყლორტების კვირტებს აცალკევებენ, აუცილებლობის შემთხვევაში აკალმებენ და გადააქვთ ახლად მომზადებულ საკვებ არეზე. რამდენიმე პასაჟის შემდეგ საკვებ არეს ამატებენ აუქსინებს და ყლორტებს აფესვიანებენ *in vitro*, ხოლო შემდეგ გადააქვთ ნიადაგში, სადაც ქმნიან მცენარის ადაპტაციისათვის ხელშემწყობ პირობებს.

ამჟამად ეს მეთოდი ფართოდ გამოიყენება სასოფლო-სამეურნეო კულტურების გადასანერგი მასალის წარმოებაში, როგორც ტექნიკური, ისე ბოსტნეულის, აგრეთვე საწარმოო მეყვავილეობის კულტივირებისათვის, ტროპიკული და სუბტროპიკული მცენარეების, ნაყოფიანი და კენკროვანი კულტურების, მერქნიანი მცენარეების გამრავლებისათვის. ზოგიერთი კულტურისათვის, როგორიცაა კარტოფილი, კლონური გამრავლების ტექნოლოგია დაყენებულია წარმოების საფუძველზე. არსებული მერისტემის განვითარების გააქტიურების მეთოდის გამოყენება კარტოფილის ერთი მერისტემიდან წელიწადში 100 000-ზე მეტი მცენარის მიღების საშუალებას იძლევა, ამასთან, ტექნოლოგია ითვალისწინებს სინჯარებში მიკროტუბერების – ძვირფასი უვირუსო სათესლე მასალის მიღებას.

მეორე მეთოდია გვერდითი კვირტების წარმოშობის ინდუქცია უშუალოდ ექსპლანტის ქსოვილებით. ის ემყარება მცენარის იზოლირებული ნაწილების უნარს, საკვები არის ხელსაყრელ პირობებში აღადგინოს ის ორგანოები, რომელიც აკლია და ამგვარად მოახდინოს მთლიანი მცენარის რეგენერირება. შეიძლება მივაღწიოთ გვერდითი კვირტების წარმოქმნას მცენარის თითქმის ნებისმიერ ორგანოსა და ქსოვილისაგან (იზოლირებული ჩანასახი, ფოთოლი, ღერო, ლებანი, ქერცლი, ბოლქვის ძირი, ფესვების სეგმენტები და

ყვავილედების ჩანასახები). ეს პროცესი მიდის საკვებ არეზე, რომელიც შეიცავს ციტოკინინების ნარევს აუქსინებთან 10:1 ან 100:1 თანაფარდობით. აუქსინებად იყენებენ იძმ-ს და ნძმ-ს. ასეთი ხერხით გამრავლებული იყო შროშანის, პამიდვრის, მერქნიანი მცენარეების (მომწიფებული და მოუმწიფებელი ჩანასახებიდან) ოჯახების მრავალი წარმომადგენელი. საკმაოდ კარგადაა დამუშავებული მარწყვის კლონური გამრავლების ტექნოლოგია, რომელიც დამყარებულია აპიკალური მერისტემის კულტივირებაზე. მერისტემულ წვერო-ებს აცილებენ ახალგაზრდა, ვირუსული დაავადებისაგან თავისუფალ მცენარეებს და ზრდიან მს საკვებ არეზე, რომელიც შეიცავს ბაპ-ს 0,1 – 0,5 მგ/ლ კონცენტრაციით. 3 – 4 კვირის შემდეგ კულტივირებული მერისტემა ყალიბდება ნაზარდად, რომლის საფუძველზეც ფორმირდება სწრაფად მზარდი გვერდითი კვირტები და ისინი დასაბამს აძლევენ ახალ კვირტებს. 6 – 8 კვირის განმავლობაში წარმოიქმნება ერთმანეთთან შემაერთებელი ქსოვილით დაკავ-შირებული და განვითარების სხვადასხვა სტადიაზე მყოფი კვირტების კონგლომერატი. გამოჩნდება ფოთლები მოკლე ყუნწებით, რომელთა ქვედა ნაწილში ფორმირდება ახალი გვერდითი კვირტები. ამ კვირტებს აცალკევებენ და გადარგავენ ახალ საკვებ არეზე. ზრდის რეგულატორების გარეშე 4 – 5 კვირის განავლობაში ფორმირდება ნორმალური მცენარე ფესვებითა და ფოთლებით. ასეთი წესით ერთი დედამცენარისაგან შეგვიძლია მივიღოთ წელი-წადში რამდენიმე მილიონი მცენარე-რეგენერანტი.

კლონური მიკროგამრავლების პრაქტიკაში გამოყენებული მესამე მეთოდი ემყარება ჩანასახის მსგავსი სტრუქტურების სომატური უჯრედების დიფერენციაციას, რომლებიც შესახედად მოგვაგონებენ ზიგოტურ ჩანასახებს. ამ მეთოდმა მიიღო სომატური ემბრიოგენეზის სახელწოდება. განსხვავებით *in vivo* ზრდისაგან, სომატური ჩანასახები ვითარდება ასექსუალურად – ჩანასახოვანი პარკის გარეშე და თავისი გარეგნული სახით მოგვაგონებენ ბიპოლარულ სტრუქტურებს, რომლებზეც ერთდროულად შეიმჩნევა ღეროსა და ფესვის აპიკალური მერისტემის განვითარება. სტევარდის მიხედვით, სომატური ჩანასახები გადიან განვითარების სამ სტადიას: გლობულარულს, გულისმაგვარს, ტორპედოსმაგვარს, და საბოლოო ჯამში, აქვთ განვითარების ტენდენცია აღმონაცენისაკენ (ნაზარდისაკენ).

სომატური ემბრიოგენეზის მეთოდმა ყველაზე შტამბეჭდავი გამოყენება ჰპოვა გვინეის ზეთისხილის პალმის (*Elaeis guineensis*) გამრავლებაში, რომლის ზეთი ფართოდ გამოიყენება მარგარინისა და საკვები ზეთის წარმოებაში. ზეთისხილის (ზეთოვანი) პალმა ბუნებაში არ წარმოქმნის ყლორტებს და გვერდით აღმონაცენებს (ნაზარდებს), რაც აძნელებს მის ვეგეტატიურ გამრავლებას. კალმების კულტივირება *in vitro* ასევე შეუძლებელია. გადაწყდა მიეღოთ არადიფერენცირებული ქსოვილის (კალუსის) უჯრედების გროვა სპეციფიკური ქსოვილების დედიფერენცირების გზით, ხოლო შემდგომ მოეხდინათ მათი კულტივირება მთლიან ნაზარდებად რეგენერაციამდე. პირველ კულტურალურ არეში ფოთლების ფრაგმენტებიდან მიღებული კალუსები ვითარდებოდა 90 დღე, მეორე და მესამე კულტურალურ არეზე გარდაიქმნებოდა "ემბრიოიდებად". ემბრიოიდები თავისთავად მრავლდებოდნენ, ერთ თვეში ემბრიოიდების რიცხვი გასამმაგდა, ხოლო ერთი წლის განმავლობაში 10 ემბრიოიდიდან შეიძლებოდა შთამომავლობის მიღება, რომელიც 500 000 მცენარეს ითვლიდა.

ქსოვილთა კულტურაში ემბრიოიდების ფორმირება ხორციელდება რამდენიმე ეტაპად. თავდაპირველად საკვებ არეზე დამატებული აუქსინების (2,4–დ) გავლენით მიმდინარეობს უჯრედების დიფერენციაცია და მათი გარდაქმნა ემბრიონალურ უჯრედებად. ამ უჯრედებიდან ემბრიოიდების მიღება შეიძლება აუქსინების კონცენტრაციის შემცირებით ან მათი გამორიცხვით

საკვები არედან. სომატური ჩანასახები წარმოადგენენ სრულად ფორმირებულ ჩანასახებს, საიდანაც შესაბამისი კაფსულირებით შეიძლება მივიღოთ ხელოვნური თესლი.

კლონური მიკროგამრავლების მეოთხე მეთოდია გვერდითი კვირტების დიფერენციაცია პირველად და გადასათეს კალუსურ ქსოვილში.

პრაქტიკულად ის ნაკლებად გამოიყენება გადასათესი მასალის *in vitro* მიღების მიზნით. ეს დაკავშირებულია იმასთან, რომ კალუსური ქსოვილის ხშირი პასირებისას შეიძლება შეიცვალოს რეგენერირებადი მცენარის პლოიდურობა, შეინიშნება ქრომოსომების სტრუქტურული გარდაქმნები და გენური მუტაციების დაგროვება. გენეტიკურ ცვლილებებთან ერთად აღინიშნება მორფოლოგიურიც: დაბალი ზრდადობა, ფოთლების არასწორი ძარღვიანობა, დამოკლებული მუხლთაშორისების წარმოქმნა, ავადმყოფობისადმი და მავნებლებისადმი გამძლეობის შესუსტება. იმავდროულად, ამ მეთოდის ზოგიერთი ნაკლი სელექციურ მუშაობაში შემობრუნდება უპირატესობად. ამას გარდა, ზოგ შემთხვევაში ის ითვლება ქსოვილთა კულტურაში მცენარის გამრავლების ერთადერთ მეთოდად.

VI. 4. აპიკალური მერისტემის განშტოება და მცენარის რეგენერაცია

ქსოვილთა კულტურაში შეიძლება გამრავლდეს მცენარე და მივიღოთ გაჯანსაღებული (უვირუსო) მასალა. მცენარის გასაჯანსაღებლად იყენებენ აპექსების კულტურას ან აპიკალური მერისტემის კულტურას, ვინაიდან ღეროს აპექსში ვირუსები აღწევენ უფრო ნელა, ვიდრე მცენარის სხვა ნაწილში. აპექსების კულტივირებისას ვირუსების გამრავლება ითრგუნება მცენარეული ორგანიზმის რეაქციით ტრავმაზე, რომელიც გამოწვეულია წვეროს მოკვეთით. ჩვეულებრივად საკვებ არეზე გამოითესება მერისტემის მცირე ნაწილი 0,5 მმ-მდე. მთლიანობაში ასეთი კანონზომიერებაა: რაც უფრო მცირეა მერისტემის სიდიდე, მით მეტია უვირუსო მცენარის მიღების ალბათობა. ბიოტექნოლოგია საშუალებას იძლევა მიღებულ იქნას პრაქტიკულად ყველა სასოფლო-სამეურნეო კულტურის უვირუსო გაჯანსაღებული დასარგავი მასალა. უფრო სრულადაა დამუშავებული უვირუსო კარტოფილის მიღების ტექნოლოგია. პირველადი მეთესლეობისა და კარტოფილის დასარგავი მასალის გაჯანსაღების სისტემა მოიცავს შემდეგ ეტაპებს: ტუბერების მომზადება აპიკალური მერისტემის ამოკვეთისათვის, აპიკალური მერისტემის განშტოება, მცენარის რეგენერაცია მერისტემიდან, მცენარე-რეგენერანტების ადაპტაცია დაცულ გრუნტში, უვირუსო მასალის პირველი პროდუქციის მიღება ღია გრუნტში, უვირუსო დასარგავი მასალის გამრავლება მეთესლეობის პირველ რგოლებში, ჯიშების კოლექციის შენახვა. ქსოვილთა კულტურაში გამოიყენება წვეროებისა და გვერდითი კვირტების აპექსები. იმისათვის, რომ გამოირიცხოს ტუბერის მეტაბოლიტების გავლენა ნაზარდებზე და ამაღლდეს გამოსავალი მასალის რეგენერაციული უნარი, ტუბერის შუა ნაწილიდან ჭრიან ნაჭდევებს პარენქიმის ნაწილთან ერთად (1,5 სმ). ნაჭდევებს აღმოაცენებენ წინასწარ მშრალი გაცხელებით დამუშავებულ ქვიშაზე. ეთიოლირებულ აღმონაცენებს ზრდიან სიბნელეში 25^{+}-2^{0}C ტემპერატურაზე, ჰაერში 70 – 80% ტენის შემცველობის პირობებში. ქვიშას დღეში ორჯერ ასველებენ, 7 – 8 დღის შემდეგ ამატებენ კნოპის საკვებ არეს.

აღმონაცენების აპიკალურ მერისტემას გამოყოფენ 12 – 13 პლასტოხრონზე. იზოლირებულ მერისტემას აკულტივირებენ ასეპტიკურ პირობებში მაკრო- და მიკრომარილებით მდიდარ საკვებ არეებზე, ციტოკინინების მაღალი კონცენტრაციით (6-ბაპ 2მგ/ლ). კონდიცირებულ ჰაერიან საკულტივაციო ოთახებში ამყარებენ 25^{+}- 2^{0}C ტემპერატურას, 70% ჰაერის სინესტეს, განათება 5 კილოლუქსი და ფოტოპერიოდი 16 სთ.საშუალოდ, საკვებ არეზე მერისტემის

დათესვიდან 5 – 6 ფოთლიანი ნაზარდების ჩამოყალიბებამდე გადის 30 – 40 დღე, ზოგჯერ 2 – 8 თვემდე. საკვებ არეებს გამოფიტვის მიხედვით აახლებენ და ნაზარდებს პერიოდულად გადარგავენ ახალ საკვებ არეებზე სტერილურ პირობებში.

VI. 5. ყლორტების პროლიფერაცია და სტერილური ნაზარდების მიკროდაკალმება

სინჯარის მცენარეების მიკროკლონურ გამრავლებას ახორციელებენ დაკალმებით. ასეთი გამრავლება ემყარება აპიკალური დომინირების დათრგუნვას და იღლიური მერისტემის გააქტიურებას ყლორტის წვერის მოცილების დროს. იღლიური კვირტებიდან საკვებ არეებზე წარმოიქმნება ყლორტები. მცენარეებს, რომლებსაც უყალიბდებათ 5 – 6 ფოთოლი, სტერილურ პირობებში იღებენ სინჯარიდან და ჭრიან ნაწილებად (ღეროს ნაჭერი ფოთლით და იღლიური კვირტით). კალმებს ათავსებენ მუხლთაშორის ტოლ სიღრმეზე უჰორმონო საკვებ არეზე ან აუქსინების შემცველზე დანამატით.

კალმებს აკულტივირებენ იმავე პირობებში, რომელშიც მერისტემას: 24 – 26^{0}C ტემპერატურაზე დღისით და 19 – 20^{0}C ღამით, განათება 5 – 6 კილოლუქსი, ფოტოპერიოდის ხანგრძლივობა 16 სთ.

ღეროსა და ფესვების ზრდა იწყება საკვებ არეზე დარგვიდან 3 – 4 დღეში, ხოლო მცენარე მთლიანად ყალიბდება 12 – 15 დღეში. ყოველი შემდეგი დაკალმება ტარდება 14 – 20 დღის შემდეგ. ერთი მცენარიდან შეიძლება მივიღოთ 5 – 8 კვირტი, ხოლო 2 – 3 თვის შემდეგ – 3 – 5 ათასი. ვირუსებით დასნებოვნებულ მცენარეებს იწუნებენ, ხოლო ჯანმრთელები დასაბამს აძლევენ მერიკლონებს (მერისტემულ კლონებს). თუ კვირტები ან კალმები გადაირგვება ციტოკინინების მაღალი შემცველობის საკვებ არეზე, წარმოიქმნება კვირტებისა და ყლორტების კონგლომერატი. მიღებული ყლორტები ადვილად სცილდებიან ერთმანეთს, ისინი შეიძლება დაფესვიანდეს და გამოყენებულ იქნას შემდგომი დაკალმებისთვის.

VI. 6. ფესვების წარმოქმნის ინდუქცია მცენარის მიკროკლონური გამრავლების დროს

მიკროდაკალმებით წარმოქმნილი მცენარის დასაფესვიანებლად ისინი აუცილებლად უნდა გადავრგათ ახალ საკვებ არეზე. კალმები და ყლორტები ადვილად ფესვიანდება მინერალური მარილებით ღარიბ საკვებ არეებზე (უაიტის, მურასიგე-სკუგის ორჯერ განზავებული) ან ისეთ საკვებ არეებზე, რომლებსაც დამატებული აქვთ აუქსინები: იძმ, ნძმ, იმკ.

სიმჯარებში საკვებ არეებზე ჩამოყალიბებული აღმონაცენები შეიძლება განვიხილოთ როგორც პატარა დაფესვიანებული მცენარეები, რომელთა ადაპტირება ზრდის ჩვეულებრივ პირობებთან აუცილებელია. ასეთი მცენარეები უმჯობესია გადაირგოს გრუნტში, როდესაც მთლიანად ჩამოყალიბდება 5 – 6 ფოთოლი და საკმაოდ გაიზრდება ფესვები. თუმცა, კულტურული მცენარეების სხვადასხვა სახეობები სხვადასხვაგვარად ეგუებიან გარემო პირობების ცვლილებას. თვითეული მცენარე მოითხოვს გრუნტში კულტივირების სპეციალურად შერჩეულ პირობებს, რომლებიც ექსპერიმენტულად დგინდება.

VI. 7. *Stevia rebaudiana-ს* მიკროკლონარული გამრავლების ტექნოლოგია.

მიუხედავად იმისა, რომ ***in vitro*** მორფოგენეზის შესწავლას მიძღვნილია უამრავი ექსპერიმენტალური კვლევა, კლონური გამრავლების ტექნოლოგიის

შემუშავება უმეტესი სასოფლო-სამეურნეო მნიშვნელობის მცენარეებისათვის რთულია, ამის მიზეზები კი შემდეგია:

1) ერთი და იგივე მეთოდი ყველა მცენარისთვის არ გამოდგება, საჭიროა მისი მოდიფიცირება; 2) მეთოდის შრომატევადობა და სირთულე.

მიუხედავად ამისა, უჯრედული ტექნოლოგიის უპირატესობა, მაინც ძალიან დიდია და აქტუალური განსაკუთრებით ისეთი მცენარის მორფოგენეზის შესწავლისათვის, როგორიცაა სტევია. სტევია შეიცავს ნივთიერება «სტევიო-ზიდს», რომელიც 300-ჯერ უფრო ტკბილია, ვიდრე საქაროზა. ამ ნივთიერებას შეიცავს მცენარის ყველა ორგანო, მაგრამ ყველაზე მეტი რაოდენობით გვხვდე-ბა ფოთლებში. მისი სიტკბო აღემატება საქარინის სიტკბოს, მაგრამ უკანასკნე-ლისაგან განსხვავებით სრულიად არაა მავნე ნებისმიერ დოზით და გაცილებით იაფია. შაქართან ერთად ნარევში მისი გამოყენებისას, საკვები პროდუქტების კონსერვირებისას, დადგენილ იქნა კონსერვანტებისთვის დამახასიათებელი ძვირფასი თვისება – შეაჩეროს ობის სოკოებისა და ბაქტერიების განვითარება.

სტევია ნაკლებად ცნობილი ტროპიკული ენდემური კულტურაა. იგი დიდი რაოდენობით გვხვდება სამხრეთ პარაგვაიში ველურ ბუჩქოვან ნაზარდებში. სტევია ძველი დროიდან ცნობილია გუარანის ტომის ინდიელებისათვის და ფართოდ გამოიყენება ჩაის და სხვა სასმელების დატკბობისათვის. ადგილობრივი მოსახლეობა იყენებს ძირითადად პირდაპირ წვრილად დაჭრილ (როგორც თამბაქო) ან ფხვნილისებრად დაფქვილ მშრალ ფოთოლს. კულტურა გამოჰყავთ მცირე ოდენობით მხოლოდ პარაგვაიში და წარმოადგენს მონოპოლიას რამდენიმე კერძო სას. სამ. დაწესებულებისათვის. წარმოების შეზღუდვასთან დაკავშირებით პროდუქციამ ვერ ნახა გამოყენება საკვებ მრეწველობაში 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 არახელსაყრელია. ამასთანავე ეს მცენარე მოითხოვს აგროტექნიკის ზუსტ დაცვას, გამორიცხულია რაიმე სახის ქიმიკატების და ჰერბიციდების გამოყენება.

ს.დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში, ჩაის სუბტროპიკულ კულტურათა და ჩაის მრეწველობის სამეცნიერო-საწარმოო გაერთიანების ჩაქვის ფილიალში, ბათუმის აგრარული ბიოტექნოლოგიებისა და ბიზნესის ინსტიტუტში ხათუნა გამყრელიძის ნ. ზარნაძის და მეცნიერთა ჯგუფის მიერ ჩატარდა სტევიის იზოლირებული ქსოვილური კულტურის მიღება, მორფოგენეზის თავისებურებათა შესწავლა *in vitro* სისტემაში და მიკროკლონარული გამრავლების ტექნოლოგიის შემუშავება.

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა სტევია (ორფოთოლა ტკბილი) - ***Stevia rebaudiana***. ექსპერიმენტისათვის პირველადი მასალის იზოლირება წარმოებდა მცენარეებიდან (სურ. 16). ექსპლანტის სახით გამოყენებული იქნა ვეგეტირებადი ყლორტების აპიკალური და იღლიური კვირტები. ხოლო მიკროგამრავლების შემდეგ ეტაპებზე კი ***in vitro*** კულტივირებადი მასალის კენწრული და ლატერალური კვირტები.

სურ. 16. სტევიის ზრდასრული მოყვავილე მცენარე

სტევიის პირველადი კულტურის ზრდა-განვითარებასა და მორფოგენეტიკურ პროცესებზე ***in vitro*** სისტემაში კულტივირებისას გავლენას ახდენს ექსპლანტის ტიპი და ხნოვანება ანუ ექსპლანტის ფიზიოლოგიური მდგომარეობა.

პირველადი მასალის იზოლირება ხდება ინტაქტური მცენარეებიდან როგორც იუვენილურ, ასევე ზრდასრულ ანუ გენერაციულ ფაზაში.

როგორც ექსპლანტების შედარებამ აჩვენა ზრდასრული მცენარის ახალი ვეგეტირებადი კვირტები ***in vitro*** კულტურაში უფრო სწრაფი ზრდა-განვითარებით ხასიათდებოდა, ვიდრე საშუალო ფიზიოლოგიური ასაკის მქონე კვირტები.

ექსპლანტები, რომელთა იზოლირება მოხდა განვითარების იუვენილურ ფაზაში მყოფი მცენარე-დონორიდან, ხასიათდებიან პროლიფერაციის და რეგენერაციის მაღალი ტემპით (ცხრილი 14). მიკროგამრავლების საწყის ეტაპზე, პირველადი ექსპლანტის მიერ მწვანე მასის რეგენერაცია კულტურაში გაცილებით სწრაფად და ენერგიულად მიმდინარეობს ვიდრე გენერაციულ, ფაზაში მყოფი მცენარიდან იზოლირებულ ექსპლანტების შემთხვევაში. შესაბამისად სუბკულტივირების ხანგრძლივობაც მოკლეა.

სტევიის სხვადასხვა ტიპის ექსპლანტების (კვირტი, ფოთოლი, ყვავილი, ფესვი) შეყვანამ კულტურაში აჩვენა, რომ ყველაზე საუკეთესოა კვირტის (როგორც აპიკალური, ასევე იღლიური) კულტურა. ეს ლოგიკურიცაა, რადგან კვირტები, ფოთოლებისა და ყვავილებისაგან განსხვავებით, დიდი რაოდენობით შეიცავენ მერისტემულ ქსოვილს, რომელსაც დედიფერენციაციის და პროლიფერაციის ფართო დიაპაზონი გააჩნია. ფესვის ფრაგმენტების შეყვანამ კულტურაში სასურველი შედეგი არ მოიტანა.

ექსპერიმენტის შედეგებმა აჩვენა, რომ სტევიის ექსპლანტების შეყვანა ***in vitro*** სისტემაში შესაძლებელია წლის ნებისმიერ დროს, მაგრამ პროლიფერაციის ტემპი რამდენადმე განსხვავდებულია. სწრაფი ტემპით ეს პროცესი აღინიშნება სათბურში გაზაფხულიდან, კერძოდ მარტის მესამე დეკადიდან ივნისის ბოლომდე.

მიკროგამრავლების საწყის ეტაპებზე ექსპლანტის სახით გამოყენება ***in vitro*** კულტივირებადი მცენარის კენწურული და იღლიური კვირტები.

მიკროგამრავლების მაქსიმალური კოეფიციენტის მიღწევის მიზნით წარმოებს საკვები არის კომპონენტების, ზრდის ჰორმონების და კულტივირების ფიზიკური პირობების ოპტიმიზირება.

სტევიის აპიკალურ და იღლიურ კვირტებს თავსდება სხვადასხვა მინერალური შედგენილობის საკვებ არეებზე. კერძოდ: გამბორგის (B_5), მურასიგე და სკუგის (მს) და ნიჩი-ნიჩის (ნნ) [*Nichi S., Nichi* T.1969). ზრდის რეგულატორებიდან საკვებ არეებს ემატებოდა ბენზილამინოპურინის (ბაპ) ერთი და იგივე (10 მკმ) კონცენტრაცია.

სხვადასხვა შედგენილობის საკვებ არეზე ექსპლანტთა კულტივირებამ აჩვენა, რომ გამოყენებული საკვები არეებიდან ყვლაზე ნაკლებ ეფექტური იყო ნიჩისა და ნიჩის (ნნ) საკვები არე. ნნ საკვებ არეზე განვითარდა სუსტი ყლორტები, რომელთა სიგრძე შეადგენდა საშუალოდ 20 მმ-ს, მაგრამ მუხლთაშორისების რაოდენობა (2-3) მცირეა და წარმოქმნილ ფოთლებს სხვადასხვა ფორმა აქვთ. ახალი ფოთლების წარმოქმნა ნელა და სუსტად მიმდინარეობს, ხოლო იღლიური კვირტების წარმოქმნა არ ხდება. ექსპლანტების უმეტესობა სიმაღლეში იზრდება ღეროს დაგრძელების ხარჯზე და არა მუხლთაშორისების წარმოქმნით. არაეფექტური აღმოჩნდა ნნ საკვებ არეში ჰორმონების კონცენტრაციის ცვლილებაც.

ცხრილი 14

ექსპლანტის ასაკის გავლენა ყლორტის ზრდა-განვითარებაზე

ექსპლანტის ასაკი	დათესილი ექსპლანტების რაოდენობა	0-პასაჟის ხანგრძლივობა (დღე)	ზრდის ტემპი	მწვანე მასის წარმოქმნის ინტენსიურობა	ყლორტების სიმაღლე მმ	მუხლთაშორისების საშუალო რაოდენობა
იუვენილური	20	25	მაღალი	მაღალი	59	14
გენერაციული	20	25	საშუალო	საშუალო	25	7
იუვენილური	20	25	მაღალი	მაღალი	50	12
გენერაციული	20	25	საშუალო	საშუალო	20	6

გამბორგის და მურასიგე და სკუგის საკვები არეების გამოყენებამ აჩვენა, რომ ორივე ტიპის საკვები ეფექტურად მოქმედებდა სტევიას როგორც კალუსოგენეზის, ასევე მიკროგამრავლებასა და რეგენერაციულ პროცესებზე. კვირტების განვითარების ფაზა შემცირდა. წარმოქმნილი ყლორტები ნორმალური ჰაბიტუსით ხასიათდება. ფოთლებს აქვთ მათთვის დამახასიათებელი ფორმა და მორფოლოგია. კალუსის წარმოქმნა ჩქარი ტემპით მიმდინარეობს ორივე შესწავლილ საკვებ არეზე. ადგილი აქვს კალუსის მერისტემატიზაციას და დიფუზიურად განლაგებული უხვი რაოდენობის მერისტემულ კვანძებიდან ნორმალური სიცოცხლისუნარიანი კვირტების განვითარებას. ხდება აპიკალურად

დომინირებადი ყლორტების დატოტიანება იღლური კვირტების წარმოქმნის ხარჯზე (სურ. 17 –ბ). ძირითადი ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში შეიმჩნევა ადვენტური კვირტწარმოქმნა. კვირტების საშუალო რაოდენობა შეადგენს გამბორგის შემცველ საკვებ არეზე 26,8, ხოლო მს საკვებ არეზე 25,1 (ცხრ. 15). მიუხედავად იმისა, რომ განსხვავება გამოყენებულ საკვები არეების ეფექტს შორის უმნიშვნელოა, აზოტოვანი კვების წყაროს და ვიტამინების სხვა-დასხვაობამ მაინც გამოიწვია რეგენერირებული მცენარეებში ზოგიერთი მორფოლოგიური ცვლილება. B_5 საკვებ არეზე განვითარებული მიკროყლორტები უფრო ლამაზი და განვითარებული არიან, აქვთ მსხვილი ღერო და ინტაქტური მცენარისათვის დამახასიათებელი მკვეთრი მწვანე ფოთლები. ყლორტების საშუალო სიმაღლე შეადგენს 126 მმ. ექსპლანტებს ბაზალურ ნაწილში ვითარდება მორფოგენური კალუსი, რომელზეც მრავალი კვირტი პროლიფერირდება, ხოლო მიკროყლორტების ფოთლის იღლიიდან ახალი აქსელარული მერისტემის განვითარება აღნიშნება. ეს მოვლენა მიკროგამრავლების კოეფიციენტის ზრდაზეც აისახება. რაც შეეხება მურასიგე და სკუგის საკვებ არეზე ფორმირებულ კვირტებს, ისინი ხასიათდებიან უფრო

სურ.17 ა-აპიკალური კვირტის ბაზალურ ნაწილში დამატებითი კვირტების განვითარება; ბ -აპიკალური დომინირებადი დატოტიანებული ყლორტი.

წვრილი ღეროთი, შედარებით ვიწრო საფოთლე კვირტებით და შემოკლებული მუხლთშორისებით.

კვირტების განვითარებისთვის აუცილებელ პირობას წარმოადგენდა საკვებ არეში ჰორმონის არსებობა. ამას ადასტურებს ის ფაქტი, რომ უჰორმონო საკვებ არეზე კვირტები ძალიან ცუდად ვითარდებოდა ან განვითარების ტემპი მნიშვნე-ლოვნად შენელებულია. გამოცდილი ციტოკინინებიდან ყველაზე ეფექტური აღმოჩნდა ბაპ. I სუბკულტივირების ბოლოს მთავარი ყლორტის სიმაღლე 5 მკმ ბაპ შემცველ საკვებ არეზე შეადგენს 118-138 მმ, ხოლო ზოგიერთი მიკრო-ყლორტი აპიკალურ ზრდასთან ერთად მის ბაზალურ ნაწილში ინვითარებს 1-3 დამატებით კვირტს (სურ.17 ა).

სტევიის მიკროგამრავლების პოტენციალის მაქსიმალური გამოვლენისათვის შესწავლილი იყო კულტივირების ფიზიკური პირობების გავლენა.

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

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°C .

სხვადასხვა ექსპერიმენტულ პირობებში ექსპლანტთა კულტივირებამ აჩვენა, რომ საუკეთესო შედეგი ახლდა განათების რეჟიმს ფოტოპერიოდით 16/8 საათი.

ინტენსიურ კვირტწარმოქმნას, როგორც ადვენტური, ასევე იღლიური მერისტემის გააქტივებით, ადგილი აქვს უწყვეტი განათების პირობებში. ადვენტური კვირტების ინდუქცია და კვირტების აპიკალური დომინირება კორელაციურად მიმდინარეობს 16/8 საათი ფოტოპერიოდის პირობებში (სურ.18) კვირტების საშუალო სიმაღლე შეადგენს 100 მმ-ს, აპიკალურად დომინირაბად კვირტებიდან განვითარებულ ყლორტებზე მიმდინარეობს იღლიური კვირტების

ცხრილი № 15

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

n=10

საკვები არეები	აპიკალური ყლორტების საშუალო რაოდენობა	ადვენტური კვირტების საშუალო რაოდენობა	გააქტიურებული მონაცემების საშუალო რაოდენობა	კვირტების საშუალო რაოდენობა მმ	მორფოლოგიური კალუსის განვითარება
ნიჩისა და ნიჩის (ნნ)	2,1	6,6	-	2,9	+
გამბორგის B_5	8,0	26,8	16,8	120,0	++
მურასიგე და სკუგის (მს)	8,2	25,1	12,0	115,0	++

\+ - ცუდი ზრდა,
++ - კარგი ზრდა

ინდუქცია. რეგენერანტებს აქვთ მკვეთრი მწვანე შეფერილობა, ლამაზი ლანცეტისებური ფოთლებით.

კულტივირების შემდეგი რეჟიმი: 12/12 საათი ფოტოპერიოდით აძლიერებს კვირტების აპიკალურ ზრდას და ზღუდავს კვირტწარმოქმნას (სურ. 19).

სურ.18. ყლორტების განვითარება 16/8 საათი ფიტოპერიოდის პირობებში

სურ. 19. ყლორტების განვითარება 12/12 საათი ფიტოპერიოდის პირობებში.

კარგად პროლიფერირებადი მასალის კულტივირება სიბნელეში იწვევს ადვენტური კვირტწარმოქმნის შეჩერებას. ყლორტები თანდათანობით ეთიოლირ-დებიან. სუბკულტივირების ბოლოს ხდება მათი ვიტრიფიცირება –იწელებიან სიგრძეში მუხლთაშორისების წარმოქმნის გარეშე. ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში ვითარდება გაურკვეველი ეტიმოლოგიის კალუსი. მისი მოთავსებისას ორგანოგენეზის მაინდუცირებელ საკვებ არეზე, მიმდინარეობს კვირტების მასიური რეგენერაცია.

ზემოაღნიშნულიდან შეიძლება დავასკვნათ, რომ 10-14 დღის განმავლობაში კულტურათა სიბნელეში მოთავსება დადებითად მოქმედებს მიკროყლორტების ბაზალურ ნაწილში წარმოქმნილ კალუსში კვირტების ჩასახვაზე. თუმცა, მათი უფრო ხანგრძლივად სიბნელეში მოთავსებისას (20 დღე) ადგილი აქვს ორგანო-თა ფორმირების შეჩერებას.

მიკროყლორტებისათვის განვითარებისთვის ოპტიმალურია 2-3 კილოლუქსი განათების ინტენსივობა.

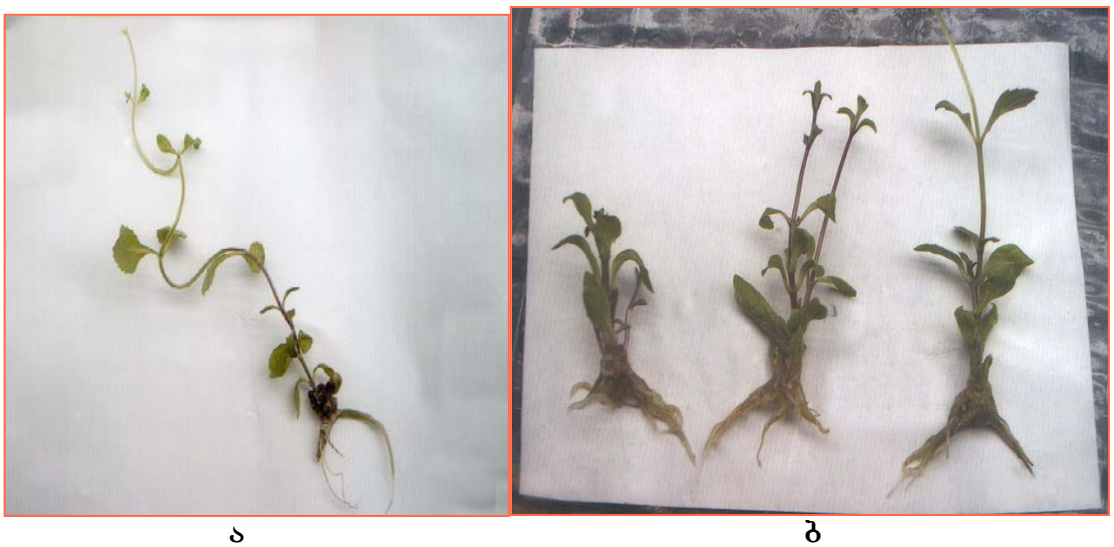
ექსპლანტთა ინკუბაციისათვის ოპტიმალურ ტემპერატურას წარმოადგენს 26±1°C. ფიტოტრონის ტემპერატურული ინტერვალი მერყეობს 24–26°C-ს შორის. ამ ინტერვალზე მაღალ ან დაბალ ტემპერატურაზე მცენარეების ზრდა-განვითარება იზღუდება.

სტევიის მიკროყლორტების დაფესვიანების თავისებურებათა შესწავლისათვის მცენარე-რეგენერანტების მიღების მიზნით, საწყის მასალად გამოიყენება სტევიის მცენარის მუხლთაშორისები, რომელიც შეიცავს 2 ლატერალურ და 1 აპიკალურ ზრდის წერტილს. დაფესვიანებისათვის საკვებ არეს ემატება ზრდის რეგულატორები შემდეგი კონცენტრაციებით: ინდოლილერბომჟავა (3, 5, 8 მკმ), α - ნაფტილძმარჟავა (3, 5, 8 მკმოლი), ინდოლილ ძმარმჟავა (3, 5, 8 მკმ). ძირითადი საკვები არე შედგება გამბორგის (B_5) მინერალური მარილებისაგან, როგორც სრული, ასევე განახევრებული შემადგენლობით. როგორც შედგებმა აჩვენა მინერალური მარილებისა და ვიტამინების სრული შემადგენლობა აუქსინების თანაობით იწვევს მასიურ კალუსოგენეზს ექსპლანტის (კვირტის) ბაზალურ ნაწილში. სუბკულტივირების ბოლოს ხშირ შემთხვევაში ექსპლანტი მთლიანად გარდაიქმნება კალუსად და მისი ზრდა სიმაღლეში აღარ ხდება. იშვიათად ადგილი აქვს კალუსის მიკროგენეზს, მაგრამ ასეთი ექსპლანტები აკლიმატიზაციისთვის გამოუსადეგარია.

დაფესვიანების პროცესის შესწავლისათვის გამოყენება სხვადასხვა პირობები:

1. ყლორტები თავსდება აუქსინებიან 0,5 B_5 საკვებ არეზე.
2. კვირტები თავსდება უჰორმონო 0,5 B_5 საკვებ არეზე
3. ყლორტები 5-8 საათის განმავლობაში ასეპტიკურ პირობებში მუშავდება აუქსინთა მაღალი კონცენტრაციის (80-100 მკმ) შემცველობის ხსნარით და შემდეგ დასაფესვიანებლად გადაიტანება უჰორმონო საკვებ არეზე.

დაფესვიანებისთვის ყველაზე ეფექტურია I ხერხი, რომელის დროს ხდება ყლორტების სიმაღლეში მაქსიმალური ზრდა-განვითარება, პარალელურად ძლიერი ფესვთა სისტემის წარმოქმნით. საკვებ არეზე ექსპლანტის დათესვიდან მე-3-4 დღეს შეინიშნება აპიკალური კვირტების ინიცირება, რომელიც გრძელდება 3-4 კვირის განმავლობაში და სუბკულტივირების ბოლოს მიიღება დაფესვიანებული მცენარე რეგენერანტები. თითოეულ ყლორტზე მუხლთაშორისების რაოდენობა შეადგენს საშუალოდ 12 ერთეულს. ყლორტზე ფოთოლგანლაგება პარალელურია, ე.ი. ერთი მცენარე-რეგენერანტი საშუალოდ შეიცავს 22-24 იღლიურ კვირტს. დაფესვიანებული მცენარის მიკროყლორტები



ა ბ

სურ.20. ა – დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტები; ბ – იღლიური კვირტიდან განვითარებული ყლორტები საერთო ფესვებით

შეიძლება გამოყენებული იქნას გამრავლების შემდეგი ციკლისათვის, როგორც საწყისი ექსპლანტი. გამრავლების მეორე ეტაპზე ერთი წყვილი ფოთლებისა და ერთი მუხლთაშორისის შემცველი მიკროკალმიდან წარმოიქმნება ორი თანაბრად მზარდი მცენარე-რეგენერანტი.

გამრავლების კოეფიციენტი ყველა შემდგომ სუბკულტივირებისას იზრდება არითმეტიკული პროგრესის შესაბამისად. დაფესვიანებულ მცენარე-რეგენერანტებს, რომელთა მუხლთაშორისების რაოდენობა შეადგენს 10-15 ერთეულს ეცვლება 8-10 მუხლთაშორის მქონე აპიკალური ნაწილი, იყოფა ერთ მუხლის შემცველ მიკროკალმებად და თავსდება ახალ საკვებ არეზე გამრავლების შემდეგი ციკლისათვის. ხოლო 3-5 მუხლთაშორისის შემცველი დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტი გადაიტანება არასტერილურ პირობებში აკლიმატიზაციისათვის.

ფესვწარმოქმნის ინტენსიურობა, მორფოლოგია და დატოტიანება დამოკიდებულია აუქსინების ბუნებასა და კონცენტრაციაზე. იმმ-ს გამოცდილი კონცენტრაციები (3-5 –8 მკმ) ნაკლებეფექტური აღმოჩნდა, ვიდრე ნმმ და იემ.

ნმმ-ს შეტანა საკვებ არეში იწვევს იმმ-სთან შედარებით უფრო ძლიერ ფესვთა სისტემის განვითარებას.

დაფესვიანებისთვის საუკეთესო შედეგს იძლვა საკვებ არეში ინდოლილ-ერბოჟავას შეტანა. ყველა გამოცდილი კონცენტრაცია უზრუნველყოფს მიკროკალმების დაფესვიანებას და ზრდა-განვითარებას. დაფესვიანების ხანგრძლივობა,შეადგენს 25-30 დღეს. მცენარე-რეგენერანტებს სუბკულტივიების ბოლოს კარგად განვითარებული დატოტვილი და ბუსუსებიანი ფესვთა სისტემა აქვთ. ფესვთწარმოქმნას თან ახლავს ფესვისზედა მწვანე ნაწილის ზრდა-განვითარება, ზოგიერთ შემთხვევაში იღლიური მძინარე კვირტების ზრდის ინიცირებაც (სურ. 20 ა, ბ). მცენარე-რეგენერანტთა ასეთი ხარისხის მორფო-გენეტიკური პოტენციალის გამოვლინება მოწმობს სტევიის მაღალ პლასტიკურობასა და ტოლერანტობას საკვები არის კონცენტრატების და ფიტოჰორმონების მიმართ.

მცენარე-რეგენერანტთა აკლიმატიზაციის პროცესის ოპტიმიზაციისათვის სტევიის დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტები, რომელთაც გააჩნიათ კარგად განვითერებული ფესვთა სისტემა, 4-6 გვერდითი ფოთოლი, იღლიური კვირტების ჩანასახით და კარგად მზარდი აპიკალური ნაწილით, გადაიტანება აკლიმატი ზაციისთვის სპეციალურ ოთახში მაღალი ტენიანობით, ან სათბურში.სტევიის

მცენარე-რეგენერანტების დარგვისათვის მზადდება ორგვარი სუბსტრატი: 1. მიწისა და ქვიშის ნარევი 1:1 თანაფარდობით; 2. ქვიშისა და პერლიტის ნარევი 1:3 თანაფარდობით.აკლიმატიზაციის შედეგებმა აჩვენა, რომ სუბსტრატის სახით უმჯობესია გამოვიყენოთ მიწისა და ქვიშის ნარევი 1:1 თანაფარდობით. სუბსტრატზე აკლიმატიზაციის კოეფიციენტი შეადგენს 80%, მაშინ როცა ქვიშისა და პერლიტის ნარევის გამოყენებისას ეს მაჩვენებელი 65-70% უტოლდება, ამასთანავე პირველ სუბსტრატზე მცენარეები უფრო ინტენსიურად იზრდება, ვიდრე მეორე სუბსტრატზე. დადებითი ეფექტი აქვს სასუქების სახით მინე-რალური მარილების და ვიტამინების წყალხსნარების გამოყენებას. კარგი შედეგი მიიღება , როგორც მს ასევე 5 არებიის შედგენილობის ხსნარების გამოყენებისას. საუკეთესოა ამ არეების მიხედვით 1/2 შედგენილობის მინერა-ლური მარილების ხსნარები. აკლიმატიზირებული მცენარეები ნორმალურად იზრდებიან, ინტენსიურად იძლევიან მწვანე მასას და თავისუფლად ყვავილობენ. მოკლე დღის მცენარეე-ბისთვის დამახასიათებელად შემოდგომაზე მიწის ზედა ნაწილები ხმება და მეორე წელს ფესურებიდან ვითარდება ახალი მცენარეები (სურ. 21).

სურ. 21. სტევიის აკლიმატიზირებული მცენარე-რეგენერანტები

VI. 8. გადასარგავი მასალის გაჯანსაღება ვირუსებისგან

კლონური მიკროგამრავლების ძირითადი უპირატესობაა გენეტიკურად ერთგვაროვანი, უვირუსო გადასარგავი მასალის მიღება. მოსაზრება, ავადმყოფი მცენარის მერისტემატულ ქსოვილებში ვირუსების არარსებობის შესაძლებლობების შესახებ, პირველად გამოთქვა ჩუნგმა 1936 წელს, ხოლო მოგვიანებით, 1943 წელს, უაიტმა. 1949 წელს ეს ფაქტი ექსპერიმენტულად იქნა დადასტურებული. 1952 წელს მორელმა და მარტენმა ნაციონალურ აგრონომიულ ინსტიტუტში (საფრანგეთი) შეძლეს უვირუსო გეორგინების მიღება დაავადებული მცენარიდან.

კლონური მიკროგამრავლების პროცესი შეიძლება დავყოთ ოთხ ეტაპად:

1. მცენარე-დონორის შერჩევა, ექსპლანტების იზოლირება და კარგად მზარდი სტერილური კულტურის მიღება.
2. საკუთრივ მიკროგამრავლება, როდესაც მიღწეულია მერისტემული კლონების მაქსიმალური რაოდენობის მიღება.

3. გამრავლებული ყლორტების დაფესვიანება და შემდგომ ნიადაგის პირობებთან ადაპტაცია, ხოლო საჭირო შემთხვევაში მცენარე-რეგენერანტის დეპონირება დაბალ ტემპერატურაზე (+2^{0}C + 10^{0}C).
4. მცენარის გამრავლება სასათბურე პირობებში და მათი მომზადება სარეალიზაციოდ ან მინდორში გადასარგავად.

ქსოვილთა კულტივირებისათვის ოთხიდან თითოეულ ეტაპზე გამოყენებულ უნდა იქნას განსაზღვრული შედგენილობის საკვები არე.

პირველ ეტაპზე აუცილებელია კარგად მზარდი სტერილური კულტურის მიღება. იმ შემთხვევაში, როდესაც ძნელია ექსპლანტის საწყისი სტერილური კულტურის მიღება, რეკომენდირებულია საკვები არის შედგენილობაში ანტიბიოტიკების (ტეტრაციკლინი, ბენზილპენიცილინი) შეტანა 100 – 200 მგ/ლ კონცენტრაციით. ეს პირველ რიგში ეხება მერქნიან მცენარეებს, რომლებშიც შეინიშნება შინაგანი ინფექციის დაგროვების ტენდენცია.

პირველ ეტაპზე, როგორც წესი, იყენებენ მინერალური მარილების შემცველ არეს მურასიგესა და სკუგის რეცეპტის მიხედვით, აგრეთვე სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებს და ზრდის სტიმულატირებს (აუქსინები, ციტოკინინები) სხვადასხვა შეხამებით ობიექტზე დამოკიდებულებით. იმ შემთხვევაში, როდესაც შეიმჩნევა პირველადი ექსპლანტის ზრდის ინჰიბირება, მის მიერ საკვებ არეში ტოქსიკური ნივთიერებების (ფენოლების, ტერპენების და სხვა მეორადი ნაერთების) გამოყოფის შედეგად, ინჰიბირების მოხსნა შეიძლება ანტიოქსიდანტების გამოყენებით. ეს შესაძლებელია ორი ხერხით: ან ექსპლანტის გარეცხვა ანტიოქსიდანტის სუსტი ხსნარით 4 – 24 სთ განმავლობაში, ან საკვებ არეზე მისი პირდაპირ დამატება. ანტიოქსიდანტებად გამოიყენება: ასკორბინის მჟავა (1 მგ/ლ), გლუტათიონი (4 – 5 მგ/ლ), დითიოტრიეთოლი (1 – 3 მგ/ლ), დიეთილდითიოკარბამატი (2 – 5 მგ/ლ), პოლივინილპიროლიდონი (5000 – 10000 მგ/ლ). ზოგ შემთხვევაში მიზანშეწონილია საკვებ არეს დაემატოს ადსორბენტი – გააქტივებული ხის ნახშირი 0,5 – 1%. პირველი ეტაპის ხანგრძლივობა შეიძლება მერყეობდეს 1 – 2 თვე. რის შედეგადაც შეიმჩნევა მერისტემული ქსოვილების ზრდა და პირველადი ყლორტების ფორმირება.

მეორე ეტაპი – საკუთრივ მიკროგამრავლება. ამ ეტაპზე აუცილებელია მიღწეულ იქნას მერიკლონების მაქსიმალური რაოდენობის მიღება. ამასთან ერთად, გათვალისწინებულ უნდა იქნას, რომ სუბკულტივირების გაზრდით იზრდება არანორმალური მორფოლოგიის მქონე მცენარე-რეგენერანტების რიცხვი და შესაძლოა შევნიშნოთ მცენარე მუტანტების წარმოქმნა. პირველი ეტაპის მსგავსად, აქაც იყენებენ საკვებ არეს მურასიგე და სკუგის რეცეპტის მიხედვით, რომელიც შეიცავს სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებს, აგრეთვე ზრდის რეგულატორებს. ექსპლანტის კულტივირების ოპტიმალური პირობების შერჩევაში ძირითად როლს თამაშობს საკვებ არეში შეტანილი ციტოკინინებისა და აუქსინების თანაფარდობა და კონცენტრაცია. ციტოკინინებიდან ყველაზე ხშირად გამოიყენება 6-ბენზილამინოპურინი (ბაპ) 1 – 10 მგ/ლ კონცენტრაციით, ხოლო აუქსინებიდან ინდოლილძმარმჟავა (იძმ) და ნაფტილძმარმჟავა (ნძმ) 0,5 მგ/ლ.

მცენარეული ქსოვილების ხანგრძლივი კულტივირებით ციტოკინინების მაღალი შემცველობის (5 – 10 მგ/ლ) საკვებ არეებზე, ხდება მათი თანდათანობითი დაგროვება ქსოვილებში აუცილებელ ფიზიოლოგიურ დონეზე მაღლა, რაც იწვევს ტოქსიკურ მოქმედებას და ყალიბდება შეცვლილი მორფოლოგიის მქონე მცენარეები. ამასთან ერთად, შესაძლოა შევამჩნიოთ კლონური მიკროგამრავლებისთვის ისეთი არასასურველი ეფექტები, როგორიცაა იღლიური მერისტემის პროლიფერაციის დათრგუნვა, ვიტრიფიცირებული - გაუწყლოვებული ყლორტების წარმოქმნა და მცენარის დაფესვიანების უნარის

შემცირება. ციტოკინინების უარყოფითი მოქმედების გადალახვა შესაძლებელია მინიმალური კონცენტრაციით ციტოკინინების შემცველი საკვები არეების გამოყენებით, რომელიც უზრუნველყოფს მიკროგამრავლების სტაბილურ კოეფიციენტს, ანკულტივირების ციკლების მონაცვლეობით ფიტოჰორმონების დაბალი და მაღალი დონის არეებზე.

მესამე და მეოთხე ეტაპები – მიკროყლორტების დაფესვიანება, მათი შემდგომი ადაპტაცია ნიადაგის პირობებთან და მინდორში გადარგვა, წარმოადგენს გაცილებით შრომატევად ეტაპებს, რომელზეც დამოკიდებულია წარმატებები კლონურ მიკროგამრავლებაში. მესამე ეტაპზე, როგორც წესი, ცვლიან არის ძირითად შედგენილობას: ამცირებენ ორჯერ, ზოგჯერ ოთხჯერაც, მინერალური მარილების კონცენტრაციას მურასიგე და სკუგის რეცეპტის მიხედვით, ან ცვლიან უაიტის არით, ამცირებენ შაქრის რაოდენობას 0,5 – 1%-მდე და მთლიანად გამორიცხავენ ციტოკინინებს, ტოვებენ მხოლოდ აუქსინს. დაფესვიანების სტიმულატორად იყენებენ **β** – ინდოლილ-3-ერბომჟავას (იემ), იძმ-ს და ნძმ-ს.

მიკროყლორტების დაფესვიანებას ატარებენ ორი ხერხით:

1. მიკროყლორტების დაყოვნება აუქსინის სტერილურ კონცენტრირებულ (20 – 50 მგ/ლ) ხსნარში 2 –24 სთ განმავლობაში და მათი შემდგომი კულტივირება აგარიზებულ ხსნარში ჰორმონების გარეშე, ან უშუალოდ შესაფერის ნიადაგიან სუბსტრატში (იმპულსური დამუშავება).
2. მიკროყლორტების უშუალო კულტივირება 3 – 4 კვირის განმავლობაში აუქსინის დაბალი კონცენტრაციის (1 – 5მგ/ლ საკვლევი ობიექტის მიხედვით) შემცველ საკვებ არეზე.

უკანასკნელ ხანს, მოწოდებულია სინჯარის მცენარეების დაფესვიანების მეთოდი ჰიდროპონიკის პირობებში. ეს მეთოდი საშუალებას იძლევა მნიშვნელოვნად გამარტივდეს დაფესვიანების ეტაპი და იმავდროულად მივიღოთ ბუნებრივ პირობებთან ადაპტირებული მცენარე. კარტოფილისთვის შესაძლებელია უსუბსტრატო ჰიდროპონიკის გამოყენება მინი-ტუბერების მისაღებად. კულტურალური ჭურჭლის ქვედა ნაწილის დაბნელება მკვრივი შავი ქაღალდით, ან საკვებ არეზე გააქტიურებული ნახშირის დამატება ხელს უწყობს მიკროყლორტების დაფესვიანებას.

მცენარე-რეგენერანტის გადარგვა სუბსტრატში წარმოადგენს საპასუხისმგებლო ეტაპს, რომელზედაც მთავრდება კლონური მიკროგამრავლების პროცესი. ყველაზე ხელსაყრელი დრო სინჯარის მცენარეების გადარგვისათვის, არის გაზაფხული ან ზაფხულის დასაწყისი.

ორ-სამ ფოთლიან მცენარეს კარგად განვითარებული ფესვური სისტემით, ფრთხილად იღებენ კოლბიდან ან სინჯარიდან გრძელი პინცეტით ან სპეციალური კავით. ფესვებს რეცხავენ აგარის ნარჩენების მოსაცილებლად და რგავენ ნიადაგიან სუბსტრატში, რომელიც წინასწარ გასტერილებულია 85 – 90^{0}C-ზე 1 - 2 სთ განმავლობაში. მცენარეთა უმრავლესობისათვის სუბსტრატად იყენებენ ტორფს, ქვიშას (3 : 1); ტორფს, კორდის ნიადაგს, პერლიტს (1 : 1 : 1). გამონაკლისს წარმოადგენს ორქიდეას ოჯახი, რომლისთვისაც მზადდება ასეთი შედგენილობის სუბსტრატი: სფანგუმის ხავსის, ტორფის, ფიჭვის ქერქის და წიფელის ან მუხის ფოთლების ნარევი (1 : 1 : 1). წინასწარ მომზადებული ნიადაგის სუბსტრატით ავსებენ საპიკირე (გადასარგავი) ყუთებს ან ტორფიან ქოთნებს, რომლებშიც ზრდიან მცენარე-რეგენერანტებს. მცენარეებიან ქოთნებს ათავსებენ სათბურში დარეგულირებული ტემპერატურული რეჟიმით (20 – 22^{0}C), განათებით არაუმეტეს 5000 ლუქსისა და 65 – 90% სინესტით. მცენარის უკეთ გასაზრდელად ქმნიან ხელოვნურ ნისლს. იმ შემთხვევაში, როდესაც არ არის საშუალება შეიქმნას ასეთი პირობები, მცენარეებიან ქოთნებს ახურავენ მინის

ქილებს ან პოლიეთილენის პარკებს, რომლებსაც თანდათან ხდიან მცენარის მთლიან ადაპტაციამდე.

გადარგვიდან 20 – 30 დღის შემდეგ კარგად დაფესვიანებულ მცენარეებს კნუდსონის, მურასიგე-სკუგის, ჩესნოკოვის, კნოპის მინერალური მარილების ხსნარებით (მცენარეთა სახეობის მიხედვით) ან კომპლექსური მინერალური სასუქით. მცენარის ზრდის კვალობაზე მათგადარგავენ დიდ მოცულობაში ახალი სუბსტრატით. აკლიმატიზირებული მცენარის შემდგომი გამრავლება შეესაბამება აგროტექნიკაში მიღებულ გამრავლებას მცენარის თითოეული ინდივიდუალური სახეობისათვის.

ნიადაგის პირობებთან სინჯარის მცენარეების ადაპტაციის პროცესი წარმოადგენს მეტად ძვირად ღირებულ და შრომატევად ოპერაციას. **არა** იშვიათად, მცენარის ნიადაგში გადარგვის შემდეგ, შეიმჩნევა ზრდის შეჩერება, **ფოთ**ლების ცვენა და მცენარის დაღუპვა. ეს მოვლენები, პირველ რიგში, **დაკავშირე**ბულია იმასთან, რომ სინჯარის მცენარეებს დარღვეული აქვთ ბაგეების აპარატის მოქმედება, რის შედეგადაც იკარგება დიდი რაოდენობით წყალი. მეორეც, ზოგიერთ მცენარეს in vitro პირობებში არ წარმოექმნება ფესვების ბუსუსები, რაც თავის მხრივ იწვევს ნიადაგიდან წყლისა და მინერალური მარილების შთანთქმის დარღვევას. ამიტომ, მიზანშეწონილია კლონური მიკროგამრავლების მესამე ან მეოთხე ეტაპზე გამოვიყენოთ მცენარეთა ხელოვნური მიკორიზაცია (მიკროტროფულებისთვის), გავითვალისწინოთ მათი დადებითი როლი მცენარის მომარაგებაში ორგანული და მინერალური საკვები ნივთიერებებით, წყლით, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებებით, აგრეთვე პათოგენებისაგან მცენარის დაცვაში.

ინდოელი მეცნიერების მიერ მოწოდებულია მარტივი მეთოდი in vitro პირობებში გაზრდილი მცენარის ფოთლების სწრაფი გაუწყლოების თავიდან ასაცილებლად. მეთოდი მდგომარეობს იმაში, რომ მთელი აკლიმატიზაციის პერიოდში ფოთლები უნდა მოირწყას გლიცერინის 50%-იანი წყალხსნარით, ან დიეთილის ეთერთან პარაფინის ან ცხიმის ნარევით (1 : 1). ეს მეთოდი გვეხმარება თავიდან ავიცილოთ სინჯარის მცენარის წრთობის ხანგრძლივი და ძნელი პროცესები და უზრუნველყოფს მათ 100%-იან შეგუებას.

VI. 9. იმუნოფერმენტული ანალიზი. მცენარეული მასალის ტესტირება ვირუსის შემცველობაზე

იფას (იმუნოფერმენტული ანალიზი) პრინციპი მდგომარეობს შემდეგში: ანტიგენი-ანტისხეულის ერთ-ერთ კომპონენტს უერთებენ ფერმენტს, ხოლო მეორე კომპონენტს აადსორბირებენ მყარ ფაზაზე. შემდეგ ატარებენ ნეიტრალიზაციის რეაქციას, უმატებენ სუბსტრატს და საზღვრავენ კომპლექსის აქტიურობას. ფერმენტის აქტიურობა ანუ წარმოქმნილი კომპლექსის – ანტიგენი-ანტისხეული რაოდენობა პროპორციულია ვირუსის შემცველობისა. ანალიზისათბის იყენებენ პოლისტიროლის პლატებს, რომელთა ფოსოებში ამატებენ შრატსა და ანტისხეულს, რომელიც მიღებულია ძუძუმწოვრების სისხლიდან გამოყოფილი ტესტირებადი ვირუსების საფუძველზე. ანტისხეულები ადსორბირდება პლატას უჯრედების ზედაპირზე 6 საათის განმავლობაში. შრატის ნარჩენებს აცილებენ სპეციალური ბუფერით. შემდეგ ფოსოებში შეაქვთ მცენარის გამოსაკვლევი გამონაწვლილები (ფოთლებისა და ფესვების წვენი). ვირუსული დასნებოვნების შემთხვევაში წარმოიქმნება კომპლექსი ვირუსი-ანტისხეული. აუცილებლად ამზადებენ საკონტროლო პლატას (დაუსნებოვანებელს). ბუფერით გარეცხვის შემდეგ უჯრედებში ამატებენ ანტისხეულებს ფერმენტებთან – ფოსფატაზასა და პეროქსიდაზასთან

კომპლექსში. პლატას ზედაპირზე ვირუსის არსებობის შემთხვევაში წარმოიქმნება კომპლექსი ანტიგენი-ანტისხეული-ფერმენტი. თუ მასალა სტერილურია, კომპლექსი არ წარმოიქმნება, ხოლო ფერმენტის ნარჩენი ირეცხება ბუფერით. ზემოაღწერილი მანიპულაციების შემდეგ პლატას ფოსოებში ამატებენ ფერმენტს, რომელზეც მუშაობს ფერმენტი (ფოსფატაზასათვის აუცილებელია სისხლის ერითროციტები, რომლებიც იშლება მისი თანამყოფობისას). ფერმენტსა და სუბსტრატს შორის რეაქციის შედეგად პლატას ფოსოებში ხსნარების შეფერილობა იცვლება ვირუსით დასნებოვნების ხარისხზე დამოკიდებულებით: არ არის შეფერვა – “ – “ – ვირუსი არ არსებობს, ღია ყავისფერი შეფერვა – “ + “ – ვირუსით საშუალო დასნებოვნების მაჩვენებელია, კაშკაშა ყავისფერი – “ ++ “ – ვირუსით დასნებოვნების მაღალი ხარისხისა. ვირუსების წარმატებით ტესტირებისათვის აუცილებელია შეიქმნას სტანდარტული პირობები, გამოყენებულ იქნას მაღალხარისხოვანი ანტისხეულები, ფერმენტები.

VI. 10. სანერგე მასალის მიღება აპიკალური მერისტემის კულტივირებასთან შეხამებული თერმოთერაპიის მეთოდით

დასარგავი მასალის ვირუსებით დასნებოვნების შემთხვევაში იყენებენ თერმოთერაპიას. ბაქტერიული და სოკოვანი ინფექციებისაგან დაუსნებოვნებელი ბოლქვები წინასწარ გადის იფა ტესტირებას. შემდეგ მათ ათავსებენ სტერილურ ქვიშიან კიუვეტებში და აღმოაცენებენ 1 – 2 კვირის განმავლობაში 28 – 30^{0}C ტემპერატურაზე, 4 კვირის განმავლობაში 37 – 38^{0}C -ზე და 70 – 80% ტენიანობის ჰაერზე. დღეში ორჯერ ქვიშას ასველებენ, 7 – 10 დღის შემდეგ აძლიერებენ კვებას კნოპისა და მურასიგე-სკუგის მიხედვით შედგენილ მიკროელემენტების ხსნარებით: 5 მლ დედა ხსნარი 1 ლ კნოპის არეზე. სიცხისამტანი ჯიშების ბოლქვები შეიძლება პირდაპირ აღმოვაცენოთ 37 – 38^{0}C – ზე და 70% ტენიანობის ჰაერზე. თვითეული ჯიშისათვის თბური დამუშავების რეჟიმს ექსპერიმენტულად არჩევენ. მოზაიკური, თითისტარისებური, ძაფისმაგვარი, ჯოხისმაგვარი ვირუსებით მცენარის დასნებობნების შემთხვევაში თერმული დამუშავება ნაკლებ ეფექტურია. ამიტომ დამატებით იყენებენ ბიოტექნოლოგიურ მეთოდებს, მაგ. აპიკალური მერისტემის მეთოდი. ამისათვის, თერმოდამუშავების წინ კარტოფილის მცენარის წვერებს ჭრიან და 5 სთ განმავლობაში ათავსებენ ჰეტეროაუქსინის ხსნარში (50 მგ/ლ). დამოკლებულ ნაზარდებს ათავსებენ კულტურალურ კამერებში ან ოთახში, სადაც ჰაერის ტემპერატურაა 37^{0}C, ნიადაგისა – 30 - 32^{0}C, ფოტოპერიოდი 16 სთ 4 - 6 კვირის განმავლობაში.

თერმოდამუშავებას ჩვეულებრივ ატარებენ შემოდგომასა და ზამთარში. გაზაფხულზე მცენარიდან ამოკვეთენ იღლიურ კვირტებს 0,3 - 1 მმ – მდე და რგავენ საკვებ არეზე (მს ჰორმონების გარეშე, PH 5,7).

VI. 11. უვირუსო დასარგავი მასალის მიღება აპიკალური მერისტემის მეთოდთან შეუღლებული ქიმიოთერაპიის მეთოდით

ქიმიოთერაპიისათვის იყენებენ სპეციალურ ნივთიერებებს – ვირუსების ინჰიბიტორებს, ფერმენტებს, რომლებიც გავლენას ახდენენ ნუკლეინის მჟავებზე (რნმ-აზები). ბოლქვების (ტუბერების) უშუალო დამუშავება ფერმენტებით შეიძლება ჩატარდეს ვაკუუმ-კამერაში ინფილტრაციის მეთოდით 20 წთ განმავლობაში, რაც იწვევს ნივთიერების დიდ დანახარჯს. ამიტომ უფრო ეფექტურია რნმ-აზას დამატება საკვებ არეზე, რომელიც განკუთვნილია აპექსების კულტივირებისათვის. რნმ-აზა ასტიმულირებს აპექსებიდან მცენარის

ზრდა-განვითარებას და აინჰიბირებს ვირუსების განვითარებას. გამრავლების ასეთი ტექნოლოგიის გამოყენების შედეგად 10 – 35% - ით იზრდება მერისტემის შემგუებლობა საკვებ არეებზე, მცენარე-რეგენერანტები წარმოიქმნება 30 – 40% - ით მეტი.

VII. მცენარეული უჯრედების პროტოპლასტები, როგორც ბიოლოგიური კონსტრუირების ობიექტები

VII. 1. პროტოპლასტების შერწყმა – პარასექსუალური ჰიბრიდიზაცია

იზოლირებულ პროტოპლასტებს, რომლებსაც ჯერ არ წარმოქმნიათ უჯრედული კედელი, შეუძლიათ ერთმანეთთან შერწყმა. პროტოპლასტების შერწყმა არის ჰიბრიდიზაციის თავისებური მეთოდი, ე. წ. პარასექსუალური ანუ სომატური ჰიბრიდიზაცია. ჩვეულებრივისაგან განსხვავებით, როდესაც ერთმანეთს ერწყმება სასქესო უჯრედები (გამეტები), პარასექსუალური ჰიბრიდიზაციის დროს მშობლიურ უჯრედებად გამოიყენება მცენარის დიპლოიდური უჯრედები.

პარასექსუალური ჰიბრიდიზაციის ტექნიკას შეუძლია მოახდინოს:

– მცენარის ფილოგენეტიკურად დაშორებული სახეობების შეჯვარება;

– ასიმეტრიული ჰიბრიდების მიღება, რომლებიც ერთ-ერთი მშობლის გენების ნაკრების მატარებელია, მეორე მშობლის რამდენიმე ქრომოსომის, ორგანოიდის ან ციტოპლაზმასთან ერთად;

– სამი ან რამდენიმე უჯრედის შერწყმა;

– ჰიბრიდების მიღება, რომლებიც წარმოადგენს მშობლის გენოტიპების ჯამს;

– მუტაციების გადაყვანა ჰეტეროზიგოტურ მდგომარეობაში, რაც საშუალებას იძლევა პროტოპლასტების შერწყმით მივიღოთ სიცოცხლისუნარიანი ფორმები, რამდენადაც მუტაგენეზი საკმაოდ ხშირად იძლევა მორფოგენეზულად დეფექტურ მცენარეს;

– მცენარეების მიღება, რომლებიც ჰეტეროზიგოტურია უბირთვოგენების მიხედვით და ა. შ.

პარასექსუალური ჰიბრიდიზაცია მნიშვნელოვანია როგორც ბირთვული გენების, ასევე უბირთვო გენომების ანალიზისათვის. ციტოპლაზმური გენომი კოდირებს რიგ ნიშან-თვისებებს – ფოტოსინთეზის სიჩქარეს, ჰალოგენების მიმართ მდგრადობას, აბიოტურ ფაქტორებს და სხვ. გენების კოსეგრეგსციის არსებობა (ნიშან-თვისებები, რომლებიც აკონტროლებენ ბირთვსგარეშე გენომს, სეგრეგირდება ერთობლივად) მოწმობს გენების ფიზიკურად გადაბმას.

შერწყმა არის სპონტანური და ინდუცირებული (ხშირად ახალგაზრდა ქსოვილების ან სუსპენზიური კულტურების პროტოპლასტების). როტოპლასტ-ების შერწყმის სტიმულირებისათვის შემოთავაზებულია რიგი მეთოებისა, რო-გორც ფიზიკური, ასევე ქიმიური.

პროტოპლასტების შერწყმის ფიზიკური მეთოდის მიხედვით, რომელიც დამუშავებულია გ. ციმერმანისა და მისი თანამშრომლების მიერ 1981 წელს, პროტოპლასტებს ათავსებენ არაერთგვაროვან ელექტრულ ველიან კამერაში. ელექტროდებზე 2-3 პროტოპლასტიდან წარმოიქმნება აგრეგატები, ან 5-6 პრტოპლასტიდან ჯაჭვები ელექტროდებს შორის. მუდმივი დენის დამატებითი ერთეული იმპულსი წარმოქმნის ფორებს ძლიერად შეკუმშულ მემბრანებში, მიმდინარეობს ციტოპლაზმის გადადინება, რამდენადაც ცვლადი დენი გარკვეუ-ლი დროით ერთად აკავებს პროტოპლასტებს და ასეთ აგრეგატებში პროტო-პლასტები ერთმანეთს ერწყმიან. მილევადი დენი შერწყმულ პროტოპლასტებს უბრუნებს სფერულ ფორმას.

შერწყმის საფუძველია მუდმივი და ცვლადი ელექტრული დენის სხვადასხვაგვარი მოქმედება პლაზმალემაზე. მუდმივი ელექტრული დენი კუმშავს მემბრანებს, მიჰყავს ისინი ლოკალურად დაშლისაკენ, ხოლო ცვლადი ელექტრული ველი იწვევს მემბრანის ცილების ლატერალურ დიფუზიას, წარმოიქმნება გლიკოპროტეიდებისაგან თავისუფალი ლიპიდური არეები, სადაც საპირისპირო მემბრანებს შეუძლიათ კონტაქტის დამყარება. ხშირად პროტოპლასტების შერწყმის ინდუქციისათვის იყენებენ მეთოდიკას "პეგ (პოლიეთილენგლიკოლი) – PH – ის მაღალი კონც., Ca^{2+} - ის მაღალი კონც.", რომელიც იძლევა 50% - მდე შერწყმულ პროტოპლასტებს (PH 9 – 11, Ca^{2+} - ის კონც. 100 – 300 მმოლი/ლ). პოლიეთილენგლიკოლის თანაარსებობისას შეიმჩნევა პროტოპლასტების ძლიერი ადგეზია, პოლიეთილენგლიკოლის მოცილებისა და კალციუმის დამატების შემდეგ – მათი შერწყმა. სხვადასხვა მცენარის პროტოპლასტების შერწყმისას, მაგ. ა და ბ, შეიძლება თანაბარი ალბათობით წარმოიქმნას კომბინაციები აა, ბბ და აბ. შერწყმის სასურველი პროდუქტია აბ, ამიტომ მუშავდება სახელდობრ ასეთი ტიპის შერწყმის სიხშირის გაზრდისა და მხოლოდ აბ პროდუქტის შერჩევითად გამოყოფის ხერხები. ერთ-ერთი ასეთი მეთოდი მდგომარეობს შემდეგში:
პროტოპლასტის ზედაპირი ჩვულებრივად უარყოფითი მუხტის მატარებელია. მისი დამუშავებით ფოსფოლიპიდით, რომელიც დადებითადაა დამუხტული, შესაძლოა პროტოპლასტის ზედაპირს დროებით მივანიჭოთ დადებითი მუხტი. ახლა თუ ა პროტოპლასტებს, რომლებსაც აქვთ დადებითი მუხტი, შეურევთ დაუმუშავებელ ბ პროტოპლასტებს, რომლებსაც აქვთ უარყოფითი მუხტი, სხვადასხვა სახელიანი მუხტების მიზიდვის შედეგად წარმოიქმნება ძირითადად აბ კომბინაცია.

სხვადასხვა ფლუორესცენციული საღებავის დახმარებით შემუშავებულია, აგრეთვე ამა თუ იმ მცენარის პროტოპლასტების მარკირების მეთოდები. თუ ერთი მცენარის პროტოპლასტებს დავამუშავებთ ფლუორესცეინიზოთიოციანატით (FITC), ხოლო სხვა მცენარის პროტოპლასტებს როდამინიზოთიოციანატით (RITC), შესაძლებელი იქნება უჯრედების აქტიურობის შეუცვლელად მოვნიშნოთ ისინი ყვითელ-მწვანე (FITC) ან წითელი (RITC) ფლუორესცეინით. ჰიბრიდებს, რომლებიც წარმოქმნილია სხვადასხვა ტიპის უჯრედების შერწყმით, ექნებათ ორივე ფერის ფლუორესცენცია – წითელი და ყვითელ-მწვანე.

პროტოპლასტებს შეუძლიათ შერწყმა როგორც წყვილ-წყვილად, ასევე დიდი რაოდენობით. შერწყმის მრავალბირთვიანი პროდუქტები, როგორც წესი, იშლება. პირველი ცნობა მცენარის დონეზე სომატური ჰიბრიდების მიღების შესახებ, გამოქვეყნდა 1972 წელს. საბჭოთა კავშირში ასეთი რამ განხორციელდა რ. გ. ბუტენკოს ლაბორატორიაში 1975 წელს.

გენომის (ბირთვული და ციტოპლაზმური) ბედი პროტოპლასტების შერწყმის შემდეგ შეიძლება სხვადასხვა იყოს:

1. ბირთვული გენეტიკური დეტერმინანტები მემკვიდრეობით გადაეცემა როგორც ორივე, ასევე ერთი მშობლისაგან. უკანასკნელ შემთხვევაში ბირთვები არ ერწყმიან ერთმანეთს და შემდგომ სეგრეგირებენ გაყოფის პროცესში.
2. უბირთვო გენეტიკური დეტერმინანტები მემკვიდრეობენ ორივე მშობლის ხაზით. ამასთან ერთად, სახეობათშორის კომბინაციებში შეინიშნება ტენდენცია ერთ-ერთი მშობლის ციტოპლაზმური გენომის ელიმინაციისაკენ.
3. ჰიბრიდული უჯრედებისა და მცენარეების წარმოშობა ორზე მეტი მშობელი უჯრედების შერწყმის შედეგად.

ამრიგად, პროტოპლასტების შერწყმა მიღის ან ჰიბრიდის, ან ციბრიდის წარმოქმნისაკენ. სომატური ჰიბრიდი არის ორივე პროტოპლასტის როგორც ციტოპლაზმის, ასევე ბირთვის შერწყმის პროდუქტი. ციბრიდი (ციტოპლაზმური

ჰიბრიდი) – მცენარე რეგენერანტია, რომელიც შეიცავს ორივე მშობლის ციტოპლაზმას და ერთი მათგანის ბირთვს. ციბრიდის მისაღებად, ბირთვის დანგრევის მიზნით ერთ-ერთ პროტოპლასტს ასხივებენ უი სხივებით. ასეთი უჯრედების სკრინინგი ხდება ბირთვული და ციტოპლაზმატური (მიტოქონდრიალური და ქლოროპლასტური) გენომების მარკერული გენების მიხედვით. არის მითითება მიტოქონდრიებისა და ქლოროპასტების დნმ-ის რეკომბინაციის შესახებ ჰიბრიდულ უჯრედებში.

შერწყმისას შეიძლება წარმოიქმნას ე. წ. ასიმეტრიული ჰიბრიდები – შერწყმის პროდუქტები, რომლებსაც აქვთ ერთ-ერთი პარტნიორის სრული ქრომოსომული ნაკრები მეორე პარტნიორის ქრომოსომების ნაწილი. ასეთი ჰიბრიდები ხშირად წარმოიქმნება ფილოგენეზურად დაშორებული ორგანიზმების უჯრედების შერწყმით. ამ შემთხვევაში უჯრედების არასწორი გაყოფის შედეგად, რომელიც გამოწვეულია ქრომოსომების სხვადასხვაგვარი ნაკრების არაკოორდინირებული ქცევით, რიგ თაობებში მთლიანად ან ნაწილობრივ იკარგება ერთ-ერთი მშობლის ქრომოსომები. ასიმეტრიული ჰიბრიდები არის უფრო მდგრადი, ვიდრე სიმეტრიული, რომლებსაც აქვთ მშობლიური უჯრედების გენების სრული ნაკრები. ასიმეტრიული ჰიბრიდიზაციის მიზნით ერთ-ერთი მშობლის შერჩევითი დამუშავება მისი ქრომოსომების ნაწილის დაშლის გზით. შესაძლებელია საჭირო ქრომოსომების დამიზნებითი გადატანა უჯრედში. ჰიბრიდები შეიძლება მიღებულ იქნას სამი ან მეტი მშობელი უჯრედების შერწყმით. ასეთი ჰიბრიდული უჯრედებიდან შეიძლება გაიზარდოს მცენარე რეგენერატები.

VII. 2. სომატური ჰიბრიდების სახეობები

მომწიფებული სახეობათშორისი ჰიბრიდი, მიღებული თამბაქოს ორი ჯიშის (*Nikotiana glauca* 24 ქრომოსომით და *N. Langsdorfii* 18 ქრომოსომით) პროტოპლასტების პარასექსუალური ჰიბრიდიზაციის შედეგად, პირველად აღწერა კარლსონმა 1972 წელს. ამფიპლოიდური ჰიბრიდის კალუსს შეეძლო ზრდა უჰორმონო არეში. ჰიბრიდული მცენარე ყვავილობდა. მას შემდეგ მიღებულ იქნა სიცოცხლისუნარიანი შიდასახეობრივი, სახეობათშორისი და გვართაშორისი ჰიბრიდები.

განხორციელებულია პრიეკულსკის საადრეო ჯიშის (*Salanum tuberosum*) კულტურული კარტოფილის პროტოპლასტების შერწყმა ველური კარტოფილის (*S. Chacoense*) პროტოპლასტებთან. ცნობილია, რომ ველური კარტოფილის ტუბერები ძალიან წვრილია. ამასთან ერთად, მცენარე გამძლეა მრავალი **დაავადე**ბისადმი. პრიეკულსკის საადრეო ჯიშის კარტოფილი წარმოქმნის მსხვილ ბოლქვებს, მაგრამ ამ ჯიშის მცენარე დაავადებების ამთვისებელია. ამ მცენარეების პროტოპლასტების ზომები სხვადასხვაა. სომატურმა ჰიბრიდებმა ფოთლებისა და ბუჩქების ფორმის, აგრეთვე ტუბერების ზომის მიხედვით დაიკავეს შუალედური მდგომარეობა კულტურულ და ველურ მცენარეებს შორის. ამასთან ერთად, სომატური ჰიბრიდიზაციის შედეგად მიღებული ჰიბრიდი გამძლე აღმოჩნდა “Y”-ვირუსის მიმართ, რითაც განსხვავდებოდა სასქესო **ჰიბრი**დისაგან.

გვართაშორისი ჰიბრიდების შექმნის პირველი მცდელობა ეკუთვნის მელხერსს, რომელმაც 1978 წელს შექმნა ჰიბრიდი კარტოფილი + პამიდორი, ე. წ. ტომატოფელი. ჰიბრიდი სტერილური იყო, მორფოლოგიურად ანომალიური: სქელი ფესვები, ტიპიური სტოლონები, ბუსუსიანი ფოთლები. ასეთი ჰიბრიდე-

ბის მიღების კიდევ რამდენიმე მცდელობა იყო, მაგრამ ყველა მცენარე სტერილური აღმოჩნდა. ამ ექსპერიმენტებმა აჩვენა პარასექსუალური ჰიბრიდიზაციის შესაძლებლობების შეზღუდულობა გამოყენებით სელექციაში. იაპონელი მკვლევარების (ხ. კისაკა და თანაავტორები, 1977) მიერ ქერისა და ბრინჯის პროტოპლასტების ელექტროშერწყმით მიღებულ იქნა გვართაშორისი სომატური ჰიბრიდი. ბრინჯის პროტოპლასტებს ღებულობდნენ სუსპენზიური კულტურებიდან, ხოლო ქერის პროტოპლასტები იზოლირებული იყო ნორჩი ფოთლებიდან. მიღებული კალუსების ნაწილს ჩამოუყალიბდა მწვანე უბნები და ყლორტები. მხოლოდ ერთ ყლორტს ჩამოუყალიბდა ფესვები და ეს მცენარე წარმატებით იქნა გადატანილი ნიადაგში. იგი მორფოლოგიურად ახლოს იყო ბრინჯის მცენარესთან. ციტოლოგიურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ მცენარეს ჰქონდა ბრინჯის პატარა და ქერის დიდი ქრომოსომები. გაანალიზებული იყო აგრეთვე მიტოქონდრიული და ქლოროპლასტური დნმ. მცენარე შეიცავდა ახალ თანამიმდევრობებს როგორც მიტოქონდრიულის, ასევე ქლოროპლასტურ დნმ-ში, რომლებიც არ შეინიშნებოდა არც ერთ მშობელში.

ი. ი. გლებამ და მისმა თანამშრომლებმა ჩაატარეს მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტები ტრიბებს შორისი ჰიბრიდების შესაქმნელად. ტრიბა ტაქსონომიური ერთეულია ოჯახებსა და გვარებს შორის. მიღებულია წარმატებული ჰიბრიდები *Arabidopsis* და *Brassica* – ს შორის – *Arabidobrassica.*

განხორციელდა ორი გვარის ძაღლყურძენას *Datura innoxia* + *Astora belladonna*-ს ჰიბრიდიზაცია. მოხერხდა მცენარის რეგენერირება. ყველა შემთხვევაში გამოვლინდა ორივე გვარის მშობლების ქრომოსომები. ამფიპლოიდებს არ აღმოაჩნდათ ღეროს მორფოგენეზის უნარი. ხაზებში, რომლებსაც ჰქონდა ქრომოსომების პოლიპლოიდური და ანეუპლოიდური ნაკრებები, ღებულობდნენ ანომალიურ ღეროებს. რეგენერირებული მცენარეები სტერილური იყო, ჰგავდა ლემას, მაგრამ შეიცავდა მცირე რაოდენობით ბელადონას ქრომოსომებს.

სხვა ექსპერიმენტებში ბელადონას პროტოპლასტები შერწყმულ იქნა ჩინური თამბაქოს კალუსურ ქსოვილებთან. მიიღეს 12 კლონი. ყველა კლონის უჯრედებში აღმოაჩინეს ორივე მშობლის ქრომოსომების ტიპი. ერთი წლის შემდეგ მხოლოდ ორ კლონში მოხდა ბელადონას ქრომოსომების სრული ელიმინაცია.

სტაფილო + მარიამსხალა: წარმოქმნილი კალუსური ქსოვილიდან ნახევარი წლის შემდეგ რეგენერირებულ იქნა ანომალიური მცენარეები. ერთი მათგანი აყვავილდა, მაგრამ ყვავილებს არ ჰქონდათ მტვრიანა და ბუტკო.

იმავე ლაბორატორიაში საინტერესო ექსპერიმენტები ჩატარდა ქლოროფილდეფექტური თამბაქოს ბელადონასთან ჰიბრიდიზაციაზე. შერწყმის შემდეგ მიიღეს 40 ფოტომასინთეზირებელი კოლონია, მათგან ოთხმა უჯრედულმა ხაზმა წარმოშვა ბელადონას ნორმალური მცენარე, ოთხმა მორფოლოგიურად ანომალიური ფიბრიდები თამბაქო + ბელადონა. დანარჩენმა მწვანე, ხანდახან ჭრელფოთლებიანი მცენარე, თამბაქოს იდენტური, რომლებიც ყვავილობდნენ, იძლეოდნენ თესლს. ისინი შეიცავდნენ თამბაქოს ქრომოსომებს და ბელადონას პლასტიდებს. ეს იყო პირველი ფერტილური ტრიბებსშორისი ჰიბრიდები.

პირველი სამუშაოები ოჯახთშორისი ჰიბრიდების მისაღებად ჩატარებულია კ. კაოს და ვ. ვეტერის მიერ 1976 – 1977 წწ. (სოია + თამბაქო). მოგვიანებით ი. ი. გლების ლაბორატორიაში ჩაატარეს ანალოგიური ექსპერიმენტები ბარდა + თამბაქო და ხახვი + თამბაქო. ი. ფ. კანევსკიმ შეძლო ღეროსმაგვარი ტერატომის მორფოგენეზის ინდუცირება *N. tabacum* + *Vicia faba* – ს ოჯახთშორისი ჰიბრიდების კულტურებში.

პრაქტიკულად ყველა შემთხვევაში შეიმჩნეოდა ერთ-ერთი მშობლის ქრომოსომების სახეობრივად სპეციფიკური ელიმინაცია. ოჯახთშორისი ჰიბრიდების კულტურებში შეინიშნება მრავალი მრავალბირთვიანი უჯრედი, უჯრდები მინი

ბირთვებით, დაყოფის მეტაფაზებში გვხვდებოდა გიგანტური ქრომოსომები. აღნიშნულია ასინქრონულობა მშობლების ქრომოსომების დაცილებაში (დაშორებაში) ანაფაზაში. ასეთ მასალას მორფოგენეზი არ აღენიშნებოდა.

დაშორებულ ჰიბრიდებს ახასიათებს:

1.ჰიბრიდული მდგომარეობის შედარებითი სტაბილურობა, რომლის დროსაც არ შეინიშნება ერთ-ერთი მშობლის გენეტიკური მასალის სრული ელიმინაცია.

2. გენეტიკური გარდაქმნები (ქრომოსომების რეკონსტრუქცია და ნაწილობრივი ელიმინაცია).

3. ჰიბრიდული უჯრედების კლონების გენეტიკურად განსხვავებული თვისობრიობა.

4. შეზღუდული მორფოგენეტიკური უნარი.

უჯრედების "ცხოველი + მცენარე" სამეფოთაშორისი ჰიბრიდების შესწავლამ აჩვენა, რომ შერწყმის ეტაპზე სახეობრივი სპეციფიკურობა არ ვლინდება, ამიტომ შეიძლება ერთმანეთს შეერწყას მცენარეული და ცხოველური უჯრედებიც კი. ონთოგენეზის უფრო გვიანდელ ეტაპებზე ეს განსხვავებები აისახება, რაც ექსპერიმენტითაა დადგენილი ადამიანის ლიმფოციტებთან არაბიდოპსისის და თამბაქოს პროტოპლასტების შერწყმისას. ამასთან, ხდებოდა ციტოპლაზმის შერწყმა, ბირთვებისა არა. ედვარდ კოკინგი პარალელურად სწავლობდა ასეთი ჰიბრიდების ულტრასტრუქტურას ამფიბიების უჯრედებზე და სტაფილოს პროტოპლასტებზე მუშაობისას. უჯრედების გაერთიანების შემდეგ ამფიბიების ბირთვები გარშემორტყმული იყო საკუთარი ციტოპლაზმის თხელი ფენით, მაგრამ 48საათის შემდეგ უკვე აღინიშნებოდა ციტოპლაზმის მთლიანი შერევა და უჯრედის კედლის რეგენერაცია ჰეტეროკარიონის ირგვლივ.

VII. 3. ციტრუსოვანთა წინაპრის *Poncirus trifoliate-ს* (სამყურა ლიმონი) და "ქართული" ლიმონის სომატური ჰიბრიიზაცია

საქართველოს ს. დურმიშიძის ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტში ნ. ჭელიძის და მ. ღოღობერიძის მიერ ჩატარებულია ციტრუსოვანთა წინაპრის *Poncirus trifoliate*-ს (სამყურა ლიმონი) და "ქართული" ლიმონის სომატური ჰიბრიდიზაცია.

ციტრუსოვანთა ნაყოფები თავიანთი კვებითი და სამკურნალო-დიეტური ღირებულებით ყოველთვის იპყრობდნენ ადამიანთა ყურადღებას. მაგრამ სამწუხაროდ, ციტრუსოვნები ძნელად იტანენ ყინვებს და დაავადებებისადმი მცირე გამძლეობით ხასიათდებიან. დღეისათვის არსებული აგროტექნიკური ღონისძიებები ციტრუსოვანთა ყინვებისაგან დასაცავად, საკმარისი არ არის ამ პრობლემის წარმატების გადასაჭრელად.

ამიტომ ამ საკითხის გადაწყვეტა უნდა მოხდეს არა მარტო მცენარეთა გარემომცველი პირობების შეცვლით, არამედ თვით მცენარის გარდაქმნით, რაც შეიძლება მიღწეულ იქნას ჰიბრიდიზაციისა და სელექციის გზით.

მრავალწლიანი სელექციური მუშაობით დადგენილია, რომ ციტრუსოვანთა ყინვაგამძლეობის საკითხის გადაწყვეტა არ შეიძლება შიდა სახეობრივი ჰიბრიდიზაციის გზით, იმდენად რამდენადაც მათი გენეტიკური სისტემები თითქმის ერთნაირია და გენეტიკური ბალანსები მცირედ, უმნიშვნელოდ განსხვავდებიან. დღეისათვის ცნობილია, რომ ციტრუსოვანთა ყინვაგამძლე ჰიბრიდული ფორმების მიღება შეიძლება მხოლოდ შორეული ჰიბრიდიზაციის გზით. ე.ი. ციტრუსოვანთა კულტურული ფორმები აუცილებელია შევაჯვაროთ მათ ველურ ყინვაგამძლე ფორმებთან, ისეთებთან როგორებიცაა: *Poncirus trifoliata, Ichangensis* და სხვა. ამ გზით შეიძლება მივიღოთ ახალი ჯიშები, სახეობები, რომლებიც ადრე ბუნებაში არ არსებობდნენ.

იმდენად, რამდენადაც ციტოპლაზმის გენები აკოდირებენ ისეთ თვისებებს, როგორიცაა: ყინვაგამძლეობა, ანტიბიოტიკებისა და პათოგენების მიმართ გამძლეობა და სხვა. „ქართული“ ლიმონისა და სამყურა ლიმონის პროტო-პლასტების შერწყმის გზით, ე.ი. პარასექსუალური ჰიბრიდიზაციის მეთოდის გამოყენებით, შეიძლება მიღწეულ იქნას მცენარის ყინვაგამძლეობის საკითხის გადაწყვეტა.

“ქართული” ლიმონი მიეკუთვნება *Citrus*-ის გვარს, *Rutaceae* ოჯახს. იგი ადგილობრივი წარმოშობისაა. ხე ძლიერ მზარდია, წარმოქმნის ბევრ ყლორტს, ყლორტები ეკლიანია. ყვავილები მსხვილია, ლილისფერი ელფერით. ნაყოფები მსხვილია, ერთი ნაყოფის საშუალო წონა 120-გ-ია, ზედაპირი გლუვია, ქერქის საშუალო სისქეა 5 მმ, რბილობი წვნიანია, მჟავე, თესლების რაოდენობა 1-7-მდეა. რბილობის ბიოქიმიური შემადგენლობა: შაქრები 1-7%, მჟავიანობა – 6%-მდე, ვიტამინი C – 70მგ/%-მდე. მცენარის ყინვაგამძლეობა –7^{0}C-მდე. მალსეკოსამდმი იმუნიტეტი დაბალი აქვს.

სამყურა ლიმონი ითვლება ციტრუსოვანთა ველურ წინაპრად. იგი მიეკუთ-ვნება *Poncirus* -ის გვარს. მცენარეს ახასიათებს ეკლების არსებობა. ფოთოლი სამი ფოთოლაკისაგან შედგება, ფოთოლმცვენია. ყვავილები თეთრია ან ვარდისფერი ელფერი დაკრავს. ნაყოფი წვრილია, საჭმელად უვარგისი. ერთი ნაყოფი შეიცავს 13-დან 49 ცალამდე თესლს. უნდა აღინიშნოს, რომ სამყურა ლიმონის ყვავილობის დრო, არ ემთხვევა ციტრუსოვანთა კულტურული ფორმების ყვავილობის დროს, რაც გარკვეულ წილად ართულებს სელექციური მუშაობის წარმართვას.

ვინაიდან „ქართული“ ლიმონის ფოთლის კალუსურ ქსოვილში ვერ იქნა სტიმულირებული სათანადო დონით მორფოგენეზი, ამიტომ მიღებულ იქნა „ქართული“ ლიმონის ღეროს და ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილი და მასში ინდუცირებულ იქნა მორფოგენეზი და მთლიანი მცენარის რეგენერაცია. ექსპერიმენტში გამოიყენებოდა ”ქართული“ ლიმონის თესლებიდან მიღებულ სტერილური აღმონაცენების ღეროსა და ეპიკოტილეს ქსოვილების *in vitro* კულტურები. მურასიგესა და ტუკერის მოდიფიცირებულ ძირითად საკვებ არეს ემატებოდა ბაპ და ნძმ სხვადასხვა რაოდენობით. აღნიშნულ არეზე გადატანილი კალუსური ქსოვილები იზრდებოდნენ ფიტოტრონში 8 სთ სიბნელე, 16 სთ დღე ფოტოპერიოდის პირობებში. ეპიკოტილეს კალუსურ ქსოვილში, ისევე როგორც ფოთლის კალუსურ ქსოვილში I პასაჟიდან აღინიშნება აქტიური ციტოდიფერენცირება, რაც ქლოროფილის დაგროვებასა და ქსოვილის მკვეთრ გამწვანებაში გამოიხატება. ქსოვილების შემდგომი სუბკულტივირებისას იწყება მერისტემული კერების აქტიური წარმოქმნა, რომლებიც შემდგომ აღმონაცენებად ვითარდებიან.

საუკეთესო შედეგი მიიღება, როდესაც საკვებ არეში ნაფტილძმარმჟავას რაოდეგნობა შეესაბამება 1 მგ.ლ$^{-1}$, ხოლო ბენმზილამინოპურინის – 2.5 მგ.ლ$^{-1}$ (ცხრილი 11). ამ დროს ქსოვილი მკვეთრ მწვანე ფერს იღებს და მასში მრავალი მერისტემული კერები შეინიშნება. შემდგომი სუბკულტივირებისას საშუალოდ კალუსების 75%-ში ვითარდება 3 - 4 აღმონაცენი. აღმონაცენს კარგად განვითარებული ღერო, ფოთლები და სუსტად განვითარებული ფესვები აქვთ (სურათი 8). საკვებ არეში, რომელშიდაც მხოლოდ ნძმ შეიტანება, აღმონა-ცენები საერთოდ არ ვითარდებიან, თუმცა კალუსების 75%-ში ადგილი აქვს მერისტემული კერების წარმოშობას (ცხრილი 11).

საკვებ არეში ბაპ-ის მგ.ლ$^{-1}$ და ნძმ-ას 2 მგ.ლ$^{-1}$ რაოდენობით შეტანისას, „ქართული“ ლიმონის ეპიკოტილეს კალუსურ ქსოვილში მორფოგენეზის პროცესი შედარებით სუსტდება, ემბრიონალური კვირტებიც ნაკლებად

ცხრილი11

“ქართული“ ლიმონის ეპიკოტილესა და ღეროს კალუსურ ქსოვილებში რეგენერაციულ პროცესზე ბაპ-ის და ნძმ-ს გავლა

ქსოვილის ტიპი	კონცენტრაცია მგ.ლ$^{-1}$		კალუსების რაოდენობა		
	ბაპ	ნძმ	საერთო რაოდენობა	მერისტემული კერებით	აღმონაცენის წარმოშობით
ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილი	- 1 2.5 5	0.2 0.5 1.0 2.0	20 20 20 20	50.0 75.0 80.0 73.0	- - 75 66
ღეროს კალუსური ქსოვილი	- 1 2.5 5	0.2 0.5 1.0 2.0	15 15 15 15	46.6 60.0. 80.0 66.6	- - 66.6 53.6

ფორმირდებიან და აღმონაცენთა რიცხვიც თითოეულ კოლბაში 1 - 2 არ აღემატება.

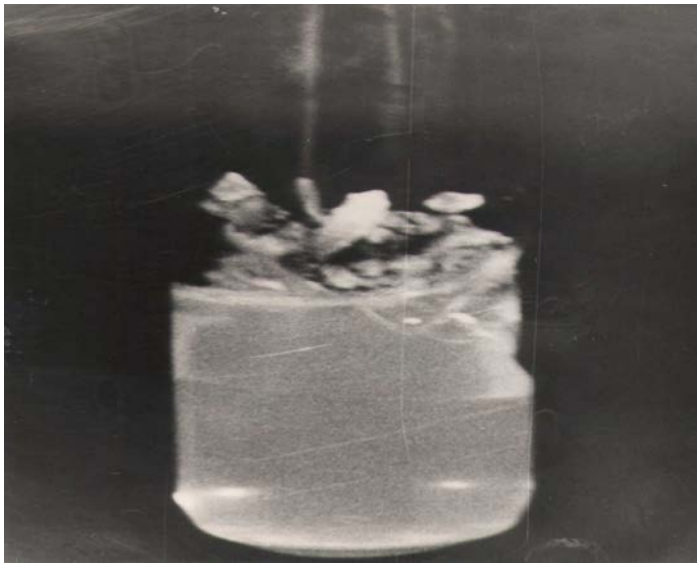
თითქმის იგივე სურათი მიიღება “ქართული“ ლიმონის ღეროს კალუსურ ქსოვილში მორფოგენეზის სტიმულირებისას (სურ. 22). განსხვავება მხოლოდ იმაში გამოიხატება, რომ ვეგეტატიური კვირტები და შემდგომ აღმონაცენები შედარებით ნაკლები რაოდენობით წარმოიქმნება. მათი რიცხვი თითოეულ კალუსურ ქსოვილზე 1-2 არ აღემატება საკვები არის ყველაზე ოპტიმალურ პირობებშიც კი (2.5 მგ.ლ$^{-1}$ ბაპ და 1მგ.ლ$^{-1}$ ნძმ).

„ქართული“ ლიმონის როგორც ეპიკოტილეს ასევე ღეროს კალუსური ქსოვილის უჯრედებიდან რეგენერირებული მცენარეები ხასიათდებიან ღეროსა და ფოთლების კარგი განვითარებით, მაგრამ ორივე შემთხვევაში მცენარეებს სუსტად განვითარებული ფესვები აქვთ. ამასთანავე მათი შემდგომი სუბკულტივირებისას ახალ საკვებ არეზე, შეინიშნება აღმონაცენთა ფუძესთან და ფესვებზე კალუსის წარმოქმნა და მისი მასის მკვეთრი ზრდა (სურათი 23). აღნიშნული მოვლენა უფრო მეტად ღეროს კალუსური ქსოვილის უჯრედებიდან რეგენერირებულ მცენარეებზე ვლინდება. წარმოშობილი კალუსური ქსოვილი, როგორც ჩანს, საკმაოდ ნელა იზრდება.

აღნიშნული მოვლენის აღმოფხვრა შესაძლებელია შემდეგნაირად: აღმონაცენები ფესვზე წარმოშობილი კალუსებით გადაიტანება საკვებ არეზე, რომლიდანაც ნძმ გამოირიცხება, ხოლო ბაპ-ი 2,5 მგ. ლ$^{-1}$ რაოდენობით შეიტანება.

2-3 სუბკულტივირების შემდეგ აღმონაცენი გადაიტანება ბაპ-ის და ნძმ-ს ოპტი-

სურ.22. მორფოგენეზი „ქართული“ ლიმონის ეპიკოტილეს კალუსურ ქსოვილში



სურ.23. მორფოგენეზი „ქართული“ ლიმონის ღეროს კალუსურ ქსოვილში

მალური რაოდენობის შემცველ არეზე (ბაპ -2.5 მგ.ლ-1, ნძმ - 1 მგ.ლ-1). უკვე 2 თვის შემდეგ, აღნიშნული ციკლით საკვები არეების შეცვლით კულტივირებისას რეგენერირებული მცენარეების ფესვებსა და აღმონაცენის ფუძესთან კალუსური მასა აღარ წარმოიშობა.

ფესვთა სისტემის გასაძლიერებლად საკვებ არეში ემატება ნძმ სამი სხვადასხვა კონცენტრაციით: 0.5 მგ.ლ-1, 1 მგ.ლ-1 და მგ.ლ-1. აღნიშნული ვარიანტებიდან საუკეთესო შედეგი მიღებულ იქნა საკვებ არეზე, რომელშიც ნძმ 0.5 მგ.ლ$^{-1}$ და 1 მგ.ლ$^{-1}$ რაოდენობით შედიოდა. განსაკუთრებით მძლავრი ფესვი „ქართული“ ლიმონის ეპიკოტილეს კალუსის უჯრედიდან *in vitro* პირობებში განვითარებულ მცენარეს ჰქონდა (სურ. 24).

სურ.24. “ქართული” ლიმონის ეპიკოტილეს კალუსურ ქსოვილიდან განვითარებული მცენარე

VII 4. “ქართული“ ლიმონის ეპიკოტილეს და ღეროს კალუსურ ქსოვილში მორფოგენეზზე კულტივირების პირობების გავლენა

იზოლირებული ქსოვილების ზრდის და მათში მორფოგენეტიკური პოტენციალის შესანარჩუნებლად ზრდის რეგულატორების თვისობრივი და რაოდენობრივი შერჩევის გარდა, დიდი მნიშვნელობა აქვს ფიზიკური პირობების შერჩევას.

როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული, ექსპერიმენტალური მცენარეების ვეგეტატიური ორგანოების *in vitro* ქსოვილური კულტრები მიიღება სიბნელეში, მათში მორფოგენეზის სტიმულირებისათვის ისინი გადაიტანება შესაბამის საკ-

ვებ არეებზე და თავსდებიან ფიტოტრონში, ანუ სავეგეტაციო ოთახში, 16 სთ სინათლე 8 სთ სიბნელე ფოტოპერიოდის პირობებში (26^{0}C).

ფიზიკური პირობების გავლენის შესასწავლად უნდა ჩატარდეს შემდეგი ექსპერიმენტი: ნაწილი „ქართული“ ლიმონის ღეროს და ეპიკოტილეს კალუსებისა ბაპ-ის, ნძმ-ას შემცველ საკვებ არეზე სუბკულტივირების შემდეგ, პირდაპირ თავსდებიან ზემოდაღწერილი ფოტოპერიოდის პირობებში, ნაწილი კი პირველი ორი კვირა იმყოფებიან სიბნელეში, თერმოსტატში და შემდგომ კულტივირება გრძელდება ფიტოტრონში. იმ შემთხვევაში, როდესაც კალუსური ქსოვილი პირდაპირ ფიტოტრონში თავსდება, მასში შეიმჩნევა ქლოროფილის დაგროვება და შემდგომ ხდება მერისტემული კერების გაჩენა, რომლებიც ემბრიონალურ კვირტებად ყალიბდება. ფიზიკური პირობების მონაცვლეობისას ანუ ქსოვილების ჯერ სიბნელეში განზრდისას და შემდგომ ფოტოპერიოდის

პირობებში გადატანისას, შეიმჩნევა ემბრიონული კვირტების რიცხობრივი მატება (ცხრილი 12).

ამ ცხრილის მონაცემებიდან ჩანს, რომ ფიზიკური პირობების მონაცვლეობა კულტივირებისას უკეთეს შედეგს იძლეოდა არა მარტო მერისტემული კერების და მათგან განვითარებული ემბრიონული კვირტების რაოდენობრივი ზრდისათვის, არამედ აღმონაცენთა რიცხვის მომატებისთვისაც.

ცხრილი 12

კულტივირების პირობების გავლენა "ქართული" ლიმონის ღეროსა და ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილის მორფოგენეზულ პოტენციალზე

ულტივირების პირობები	ქსოვილის ტიპი	ემბრიონალური კვირტების საშუალო რაოდენობა	განვითარებული აღმონაცენების საშუალო რაოდენობა
კულტივირება	ღეროს კალუსური ქსოვილი	6 – 0.34	2 – 0.32
ფიტოტრონში	ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილი	9 – 0.41	4 - 0.61
წინასწარი კულტივირება სიბნელეში	ღეროს კალუსური ქსოვილი	10 – 0.78	4 – 0.21
	ეპიკოლიტეს კალუსური ქსოვილი	15 – 0.63	6 – 0.98

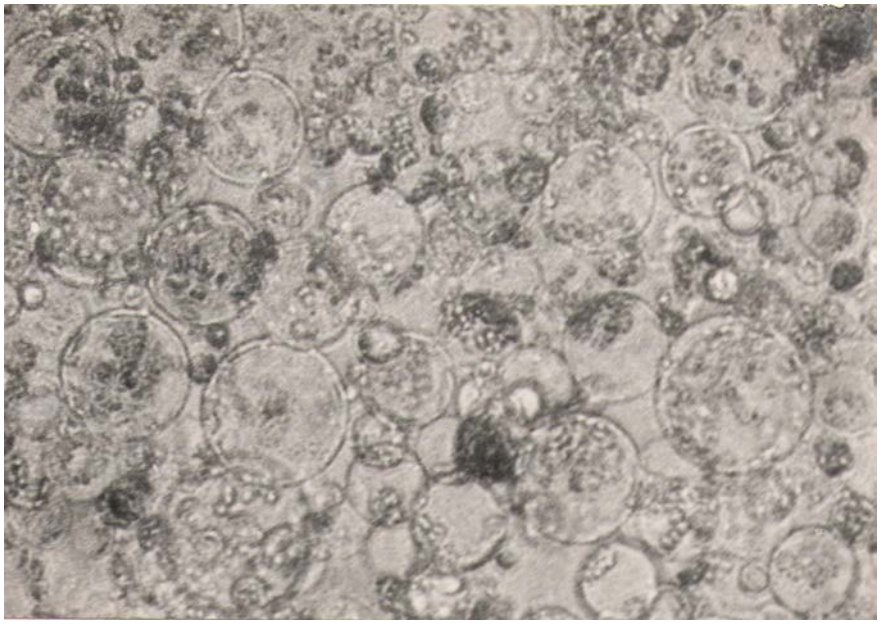
VII. 5. "ქართული" ლიმონის და სამყურა ლიმონის მეზოფილური და კალუსური ქსოვილების პროტოპლასტების გამოყოფა

კვლევის ამ ეტაპზე ცხადი გახდა, რომ „ქართული" ლიმონის და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბროდიზაციის ჩასატარებლად გამოყენებულ უნდა იქნას „ქართული" ლიმონის ღეროს ან ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილი (რომელშიც მაქსიმალურად იყო მიღწეული ტოტიპოტენტურობის ინდუცირება) და სამყურა ლიმონის მეზოფილური უჯრედები. პირველ რიგში გამოყოფილ იყო ზემო ხსენებული ობიექტების პროტოპლასტები. იმ შემთხვევის გათვალისწინებით, რომ შესაძლოა სომატური ჰიბრიდიზაცია უკეთ ჩატარებულიყო „ქართული" ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების გამოყენებით, დამუშავებულ იქნა მათი გამოყოფის ოპტიმალური პირობაც.

„ქართული" ლიმონის ღეროს და ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილების პროტოპლასტების გამოყოფისათვის ოპტიმალური აღმოჩნდა ის ფერმენტული ხსნარები, რომელთა შემადგენლობა შემდეგი იყო: ცელულაზა – ონოზუკა R-10 („სერვა" გერმ.) – 0.3% და დრისელაზა („სიგმა" აშშ) – 0.4%, პექტინაზა – მაცეროზინი R-10 („სერვა" გერმ.) – 0.2%, მანიტოლი – 0.45 , გლუკოზა – 0.1%, საქაროზა – 0.1%, $CaCl_2$– 55 მგ/100 მლ. ეს ფერმენტული ხსნარი ორჯერ ზავდება W – 5 (Medgyesetal., 1980) საკვები არით. საფერმენტაციო ხსნარში ინკუბირებისათვის ოპტიმალური დროა 15-16 სთ და 27-28^{0}C ტემპერატურა.

მე-25 სურათზე ნაჩვენებია „ქართული“ ლიმონის ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილის პროტოპლასტები.

ჩატარებული ცდების შედეგად დადგინდა, რომ „ქართული“ ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების მიღებისას აუცილებლად გათვალისწინებული უნდა იყოს ის გარემოება, თუ როგორ პირობებში გაზრდილი მცენარის ფოთლებიდან ხდება მათი გამოყოფა. ასეპტიკურ პირობებში აღმოცენებულ მცენარის ფოთლის მეზოფილური პროტოპლასტების გამოყოფისათვის (სურ.26) საუკეთესო გამოდგა შემდეგი შედგენილობის საფერმენტაციო ხსნარი:

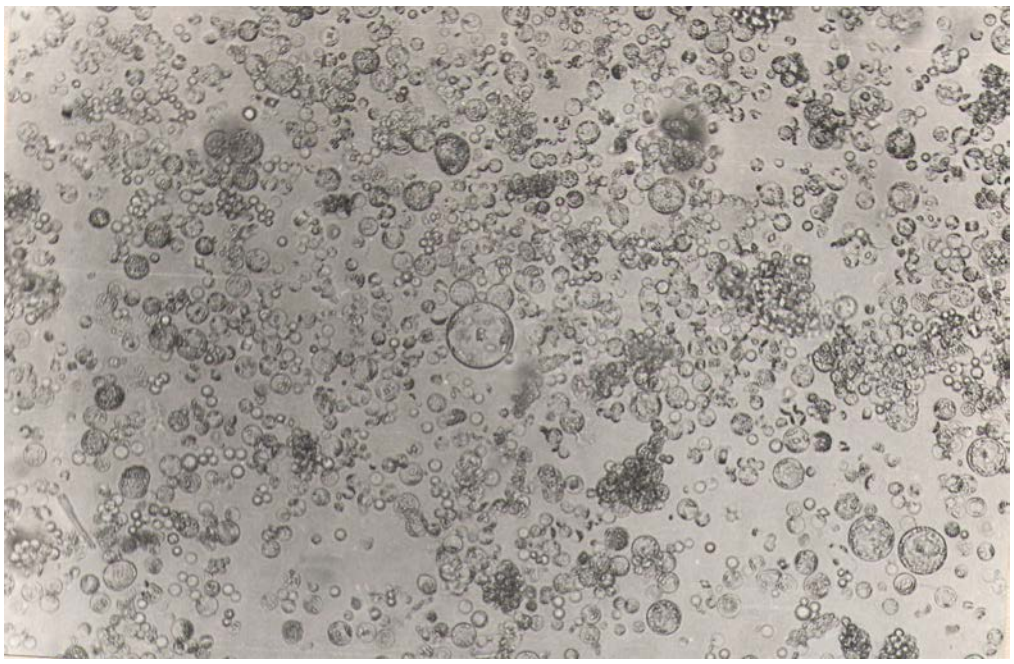


სურ. 25. „ქართული“ ლიმონის კალუსური პროტოპლასტები
/გადიდება 1000-2000/

ცელულაზა – ონოზუკა R-10 („სერვა“ გფრ) – 3%, პექტინაზა - მაცეროზინი R-10 („სერვა“ გფრ) – 0.3%, მანიტოლი 0.7 M, საქაროზა – 5%, $CaCl_2$ – 55 მგ/100 მლ, ხოლო ქოთანში, ანუ გრუნტში გაზრდილი მცენარის ფოთლის მეზოფილური პროტოპლასტების მისაღებად უკეთესი აღმოჩნდა უკვე სხვა შემადგენლობის ფერმენტაციული ხსნარი: ცელულაზა – ონოზუკა R-10 („სერვა“ გერმ.) – 0.3%, დრისელაზა („სერვა“ - გერმ.) – 0.4%, პექტინაზა – მაცეროზინი R-10 („სერვა“ გერმ.) – 0.2%, მანიტოლი – 0.45 M, გლუკოზა – 1%, საქაროზა – 1%, $CaCl_2$ – 55 მგ/100 მლ.

მეზოფოლური პროტოპლასტების მიღებისათვის საჭიროა ფერმენტულ ხსნარში ინკუბაციის დროის 18-20 სთ-მდე გაზრდა.

კალუსური ქსოვილების პროტოპლასტები (სურ. 24) ინვერსიულ მიკროსკოპში კარგად ჩანან, აქვთ მკვეთრი სფეროსებრი ფორმა და ბირთვს, ვაკუოლებს და სხვა ორგანელებს შეიცავენ. მათგან განსხვავებით მეზოფილური პროტოპლასტები მწვანე შეფერილობის არიან, დაუზიანებელი ქლოროპლასტების შემცველობის გამო.

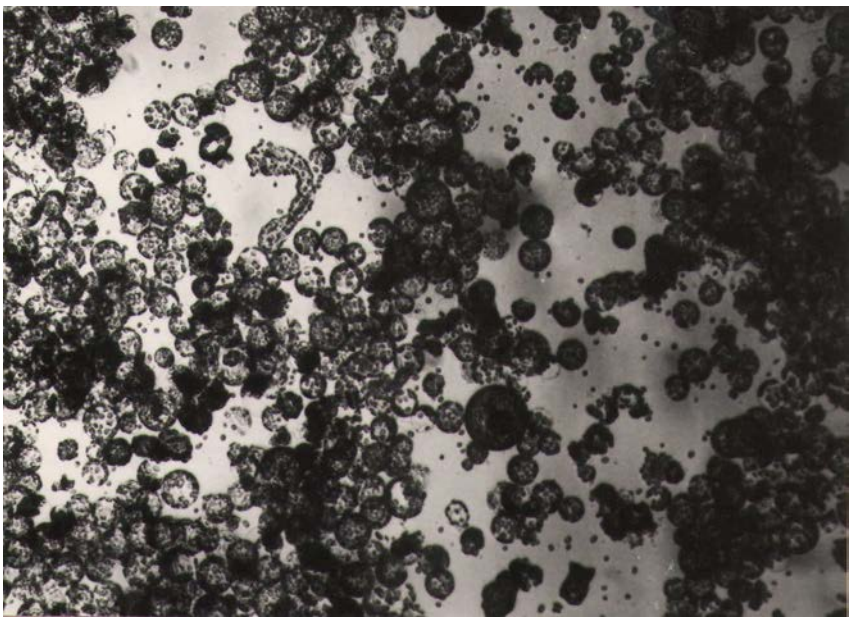


სურ. 26. „ქართული“ ლიმონის ფოთლის მეზოფილური
პროტოპლასტები /გადიდება 1000-2000/

სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების (სურ..27) მისაღებად გამოყენება შემდეგი შედგენილობის საფერმენტაციო ხსნარი: ონუზუკა R-10 („სერვა“ გფრ) – 3%, მაცეროზინი R-10 („სერვა“ გფრ) – 0.3%, მანიტოლი – 0.7M, საქაროზა – 5%, $CaCl_2$ – 55 მგ/100 მლ. სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტები ”ქართული” ლიმონის მეზოფილურ პროტოპლასტებთან შედარებით, მიკროსკოპში ერთი და იგივე გადიდებით დათვალიერებისას უფრო-წვრილებია.

სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების გამოყოფა შეიძლება შემდეგი ფერმენტაციული ხსნარით: მემ (2-მორპჰოლინო ეთანოლსულფონის მჟავა) -1мM, მანიტოლი – 0.6M, ონოზუკა R-10 („სერვა“ გერმ.) – 3%, მაცეროზინი R-10 („სერვა“ გერმ.) – 3%, მს (*Murashige, Tucker*, 1969) საკვები არის მაკროელემენტები. ფოთლები ამ საფერმენტაციო ხსნარში მოთავსებამდე 1სთ თავსდება შემდეგი შედგენილობის ხსნარში: მემ – 1 мM, მანიტოლი – 0.6M, MT საკვები არის მაკროელემენტები (Ohgawara et al., 1985).

საფერმენტაციო ხსნარების შემადგენლობის ასეთი მონაცვლეობა შესაძლებელს ხდის სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების გამოყოფის დრო 19-20 სთ-დან 14-15 სთ-მდე შემცირდეს.



სურ. 27. სამყურა ლიმონის მეზოფილური
პროტოპლასტები /გადიდება 1200-2000/

VII. 6. გამოყოფილი პროტოპლასტების კულტივირების პირობების დადგენა

პროტოპლასტების კულტივირებისათვის აუცილებელია საკვები არის შერჩევა. ამისათვის არჩეულ იქნა 5 სხვადასხვა არე. თითოეული მათგანი 6-10 მლ რაოდენობით ისხმევა 6-10 სმ დიამეტრის პეტრის თასებზე და მათში ფრთხილად პიპეტით შეიტანება 0.5 მლ შესაბამის არეში რესუსპენდირებული პროტოპლასტები. ამ დროს პროტოპლასტების ოპტიმალური სიმკვრივე შეესაბამება 10^3 პროტოპლასტი 1 მლ-ში. მე-13 ცხრილში მოცემულია "ქართული" ლიმონის ღეროს და ეპიკოტილეს კალუსური ქსოვილებიდან იზოლირებული პროტოპლასტების კულტივირებისათვის გამოცდილი საკვები არეების შემადგენლობა.

CL - შეპარდის მიერ გამოყენებული საკვები არე კარტოფილის მეზოფილური პროტოპლასტების კულტივირებისათვის *(Shepard, Yolten*, 1977).

K - კობაიაშისა და მისი თანამშრომლების მიერ ფორთოხლის კალუსური პროტოპლასტების კულტივირებისათვის შემოთავაზებული საკვები არე (*Kobauashi s., et al.,* 1985).

T -ტომასის საკვები არე კარტოფილის კალუსური ქსოვილის პროტოპლასტების კულტივირებისათვის (Сидоров В.А.. 1981).

ცხრილი 13

"ქართული" ლიმონის ღეროს და ეპიკოტილეს კალუსური პროტოპლასტების
კულტივირებისათვის გამოყენებული საკვები არეები მგ/ლ

კომპონენტები	CL	K	T	W-S-s	KM
მაკროელემენტები;					
NH_4Cl	-		268		
NH_4No_3		33.000		1280	600
KCL				300	300
KNO_3	7600	38.000	1900		1900
$CaCl_2*2H_2O$	1760	8800	440	600	600
$MgSO_4*7H_2O$	1480	7400	370	300	300
KH_2PO_4	680	3400	170	170	170
mikroelementebi;					
H_3BO_3	3.1	6200	3.1	3.0	3.0
$MnCl_2*4H_2O$	9.9	2.2300	9.9		
$MnSO_4*H_2O$				10.0	10.0
$ZnSO_4*7H_2O$	4.6	6800	4.6	2.0	2.0
KI	0.42	830	0.42	0.75	0.75
$Na_2MoO_4*2H_2O$	0.13	250	0.13	0.25	0.25
$CuSO_4*5H_2O$	0.013	25	0.013	0.025	0.025
$CaSO_4*7H_2O$	0.015	25	0.015		
$CoCl_2*6H_2O$				0.025	0.025
Fe – helati;					
$FeSO_4*7H_2O$	278.5	5570	278.5	28.0	5570
Na_2EDTA	372.5	74.50	372.5		7450
ვიტამინები, ჰორმონები და სხვა					
მეზოინოზიტი	4500	100	100	100	100
ნიკოტინის მჟავა (PP)	5	5	5	1	1
გლუტამინი				100	
გლიცინი	2		2		
კაზეინის ჰიდროლიზატი	50			500	
საფუარის ექსტრატი				100	
ბიოტინი	0.05		0.05		0.01
ასკორბინის მჟავა (C)			40		2
A					0.01
D_3					0.01
B_1	0.5	10	1	10	10
B_6	0.5	10	0.5	1	1
რიბოფლავინი (B_2)					0.2
2,4-დ				0.2	0.2

მე-13 ცხრილის გაგრძელება

კომპონენტები	CL	K	T	W-S-s	KM
ზეატინი					0.5
ნძმ	1			2	1

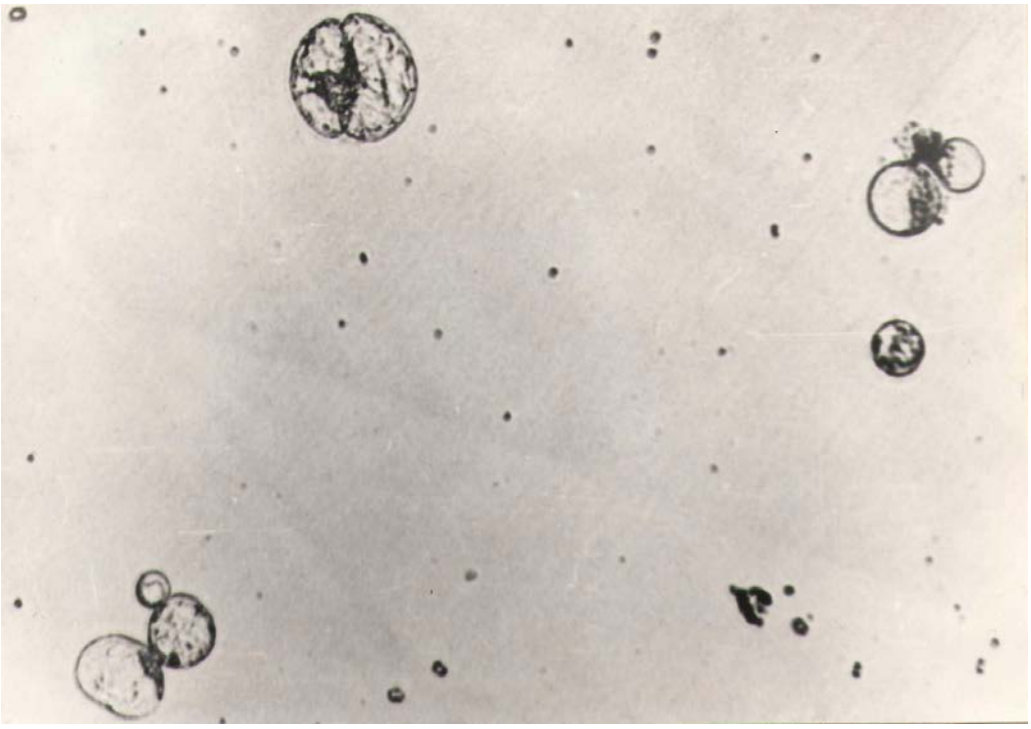
ბაპ	0.4			0.5	
მეს 2- (N-მორფოლინ) ეთალონსულფონის მჟავა			975		
ნატრიუმის პირუვატი					20
ლიმონის მჟავა					40
მალონის მჟავა					40
ფუმარინის მჟავა					40
ფოლის მჟავა	0.5		0.5		0.4
n-ამონობენზონის მჟავა					
საქაროზა	68400	0.15	58140	72000	250
გლუკოზა					68400
ფრუქტოზა					250
რიბოზა					250
ქსილოზა	3750			250	250
მანოზა					250
რამნოზა					250
ცელობიოზა					250
სორბიტოლი	4550				250
მანიტოლი	1550	0.25			250
კოზამინის მჟავა					250
ქოქოსის რძე					20 მლ
აგარი	0.4%		0.5%		
PH-5.6-5.7					

W-S-s - სიდოროვისა და მისი თანამშრომლების მიერ გამოყენებული საკვები არე კარტოფილის მეზოფილური და კალუსური პროტოპლასტების კულტივირებისათვის (Thomas, 1985).

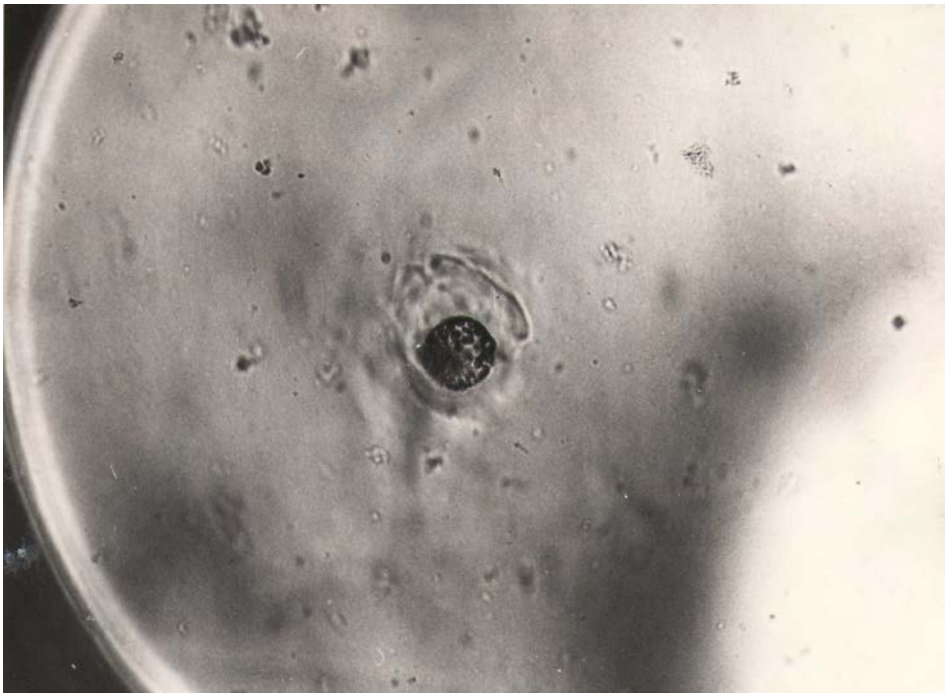
KM - კაოსა და მიხაილუკის მიერ გამოყენებული საკვები არე თამბაქოს მეზოფილური პროტოპლასტების კულტივირებისათვის (Kao, Michayluk, 1975).

ექსპერიმენტებში სასურველი შედეგი მიღწეულ იქნა კაო-მიხაილუკის საკვები არის მოდიფიცირებით. პროტოპლასტების დაყოფა შეიმჩნევა მე-3 დღეს (სურ. 28). კაო-მიხაილუკის არის მოდიფიცირება მდგომარეობს შემდეგში: ორგანული მჟავებიდან დამატებით შეტანება Na-ის მალატი 400 მგ/50 მლ, ქარვა მჟავა – 400 მგ/50 მლ, ასევე იძმ – 0.1 მგ/100 მლ, საფუარი – 10 მგ/100 მლ, ალბუმინი – 100 მგ/100მლ, გლუკოზა 250/100მლ.

სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების კულტივირება ვერ მოხერხდა ვერცერთ ნაცად საკვებ არეზე, მათ შორის კაო-მიხაილუკის მოდიფიცირებულ არეზედაც. აღნიშნული პროტოპლასტები არ იყოფოდნენ, ისინი ინვითარებდნენ უჯრედულ გარსს და დროთა განმავლობაში იღუპებოდნენ (სურ. 29).



სურ. 28. „ქართული“ ლიმონის ეპიკოტილეს კალუსიური პროტოპრლასტის პირველადი დაყოფა /გადიდება 3200-4000/



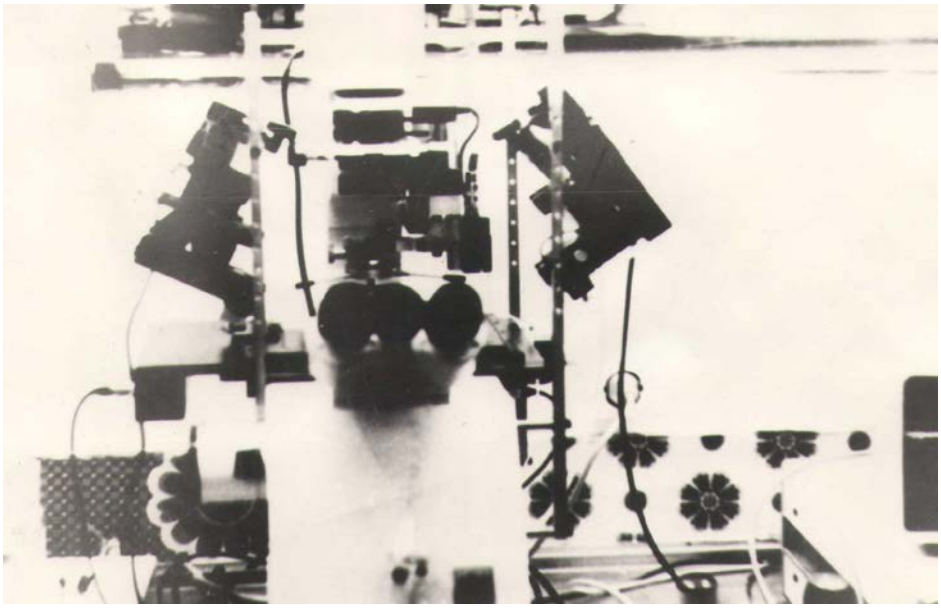
სურ.29. სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტი კუპრაკის თასის უჯრედში /გადიდება 3200-4000/

VII.7. „ქართული“ ლიმონის კალუსური და სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების შერწყმა

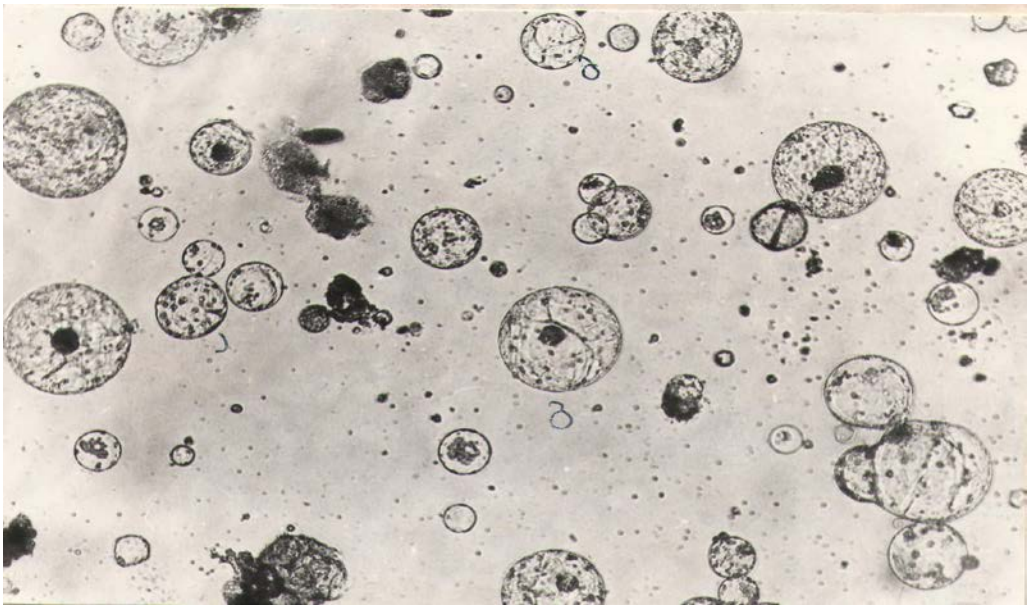
„ქართული“ ლიმონის ღეროს, ეპიკოტილეს კალუსური და სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების შერწყმისათვის გამოიყენება მენცელის მეთოდი (*Menzel et al.*, 1981). პარტნიორი მცენარეების პროტოპლასტები, 10^6 უჯრედი/მლ სიმკვრივის სუსპენზიით, ერთმანეთს ერევა 1 :1 ან 1 :2 (სამყურა ლიმონის მეზოფილური და “ქართული“ ლიმონის კალუსური პროტოპლასტები) შეფარდებით, რის შედეგადაც მიიღება 1-2 მლ W -5 საკვებ არეში პროტოპლასტების სუსპენზია, რომელიც პასტერის პიპეტით გადაიტანება 4 სმ დიამეტრის მქონე პეტრის თასზე. წვეთის დიამეტრი შეესაბამება 1 სმ. 20წთ-ის შემდეგ პროტოპლასტები ეკვრიან თასის ფსკერს. მათ ფრთხილად მიკროპიპეტით ემატებათ 1-3 წვეთი პოლიეთილენგლიკოლის ხსნარი. პეგ-ის ხსნარში პრტოპლასტები იმყოფებიან 5-15 წთ. ამის შედეგად ხდება პეტრის თასის ფსკერთან შეჭიდული პროტოპლასტების შერწყმა და აგრეგაცია ისინი იცვლიან თავიანთ სფერულ ფორმას, აღინიშნება პლაზმოლიზი. ხდება პროტოპლასტების 2-3 ფენოვანი შრეების გარდაქმნა ერთშრიან ბადედ. პროტოპლასტების შესასწავლად გამოიყენებული იყო „ოპტონ“ (გფრ) ტიპის ელექტრონული მიკროსკოპი (სურათი 30). მისივე გამოყენებით ხდებოდა სურათების გადაღება როგორც პარტნიორი მცენარეების პროტოპლასტებისათვის, ასევე ჰიბრიდული უჯრედებისათვის.

5-15 წთ-ის შემდეგ პროტოპლასტები მუშავდება ბუფერული ხსნარით (მაღალი pH და Ca^{2+} იონებით) და 30 წთ-ის შემდეგ კი ხდება მათი გარეცხვა რამოდენიმეჯერ W–5 საკვები არით. გარეცხვის შემდეგ, პროტოპლასტები გადაიტანებიან კაო-მიხაილუკის (*Kao, Michayluk*, 1975) საკვებ არეზე. პეტრის თასი პროტოპლასტებით თავსდება ინვენტირებული მიკროსკოპის ქვეშ და ხდება ჰიბრიდული უჯრედების იდენტიფიკაცია. 31-ე სურათზე წარმოდგენილია ჰიბრიდიზაციის პროცედურის ჩატარების შემდეგ მიღებული პროტოპლასტების ნარევი. კალუსურ პროტორპლასტებს აქვთ უფერული პლასტიდები, ჭარბად შეიცავენ ციტოპლაზმურ გადასაჭერებს. მათგან ადვილად გამოირჩევიან მეზოფილური პროტოპლასტები, რომლებიც ქლოროფილსს შეიცავდნენ. ჰეტეროკარიოციტებს, ელექტრონულ მიკროსკოპში – „*Opton*“ 3200-4000 გადიდებით დათვალიერებისას მორფოლოგიურად კალუსური პროტორლასტების აგებულება აქვთ, ამასთანავე შეიცავენ ქლოროპლასტებს, რაც ჰიბრიდიზაციის უტყუარი საბუთია.

რამოდენიმე თასი პროტოპლასტების ნარევით (მშობელი და ჰიბრიდული პროტოპლასტებით) თავსდება თერმოსტატში 26 ± 1^0C ტემპერატურაზე. კაო-მიხაილუკის მოდიფიცირებული საკვები არე შეირჩა იმ მიზეზით, რომ მასზე კარგად წარიმართება ერთ-ერთი პარტნიორის, კერძოდ ”ქართული” ლიმონის კალუსური პროტოპლასტების კულტივირება. უკვე სამი ოთხი დღის შემდეგ შეიმჩნევა „ქართული“ ლიმონის კალუსური პროტოპლასტების და ზოგიერთი ჰიბრიდული უჯრედის დაყოფა.

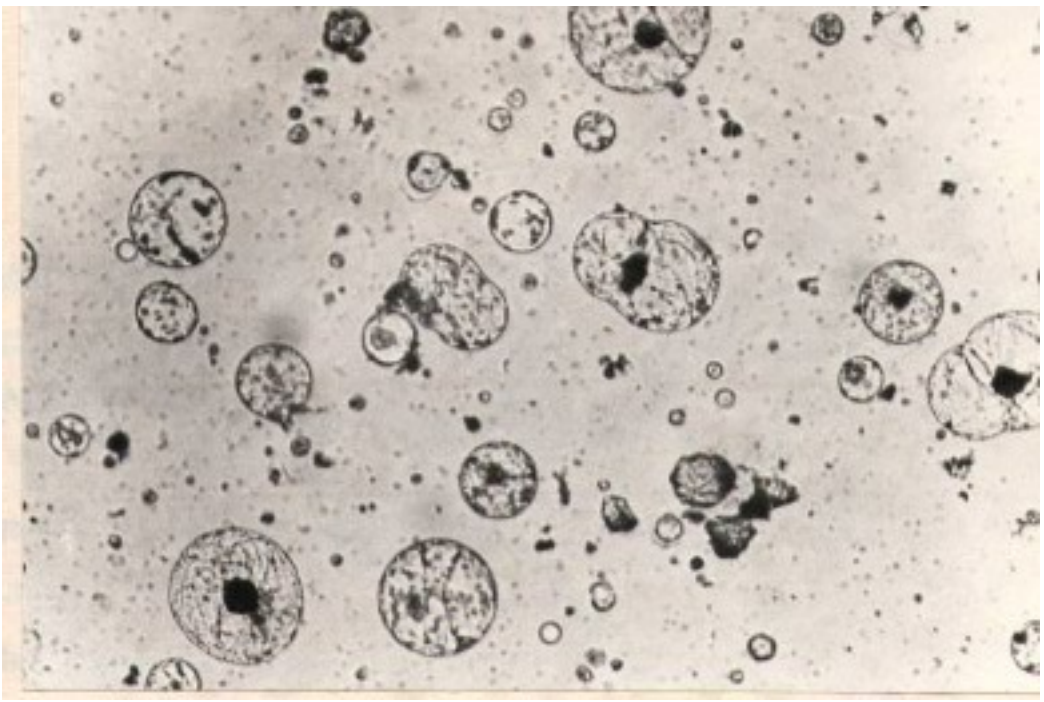


სურ. 30 „*Opton*~ ტიპის ელექტრონული მიკროსკოპი
პროტოპლასტებზე მიკრომანიპულაციების
ჩასატარებლად და სურათების გადასაღებად

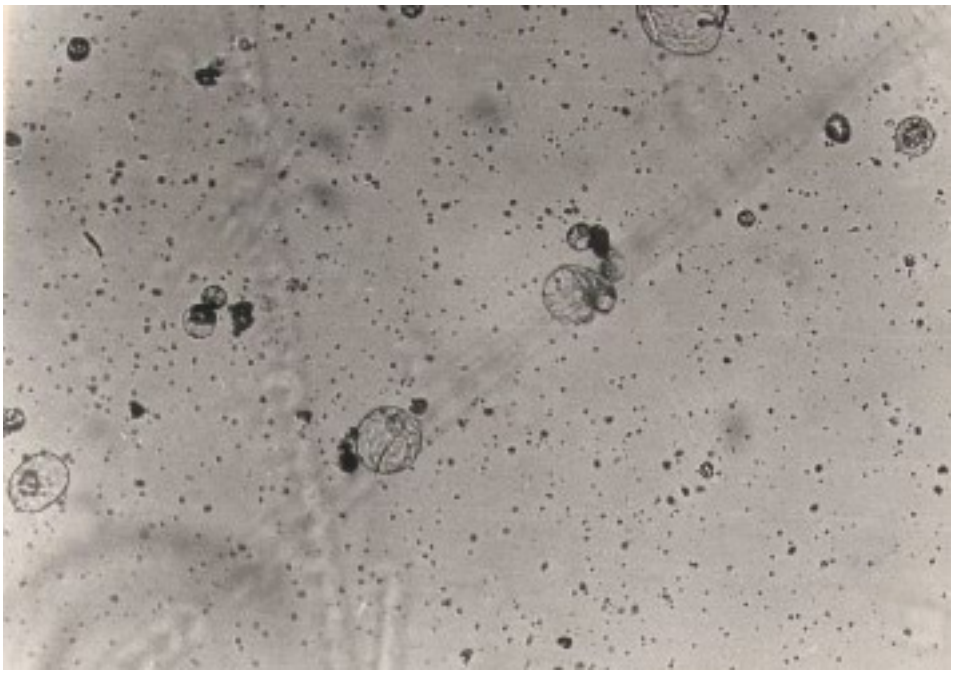


სურ. 31. ა-სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტები; ბ-„ქართული“ ლიმონის კალუსური პროტოპლასტები; გ- ჰიბრიდული უჯრედები

32-ე სურათზე წარმოდგენილია პარტნიორი პროტოპლასტების და ჰიბრიდული უჯრედების ნარევის სურათი. ქვემოთ მარჯვენა კუთხეში ჩანს ჰეტეროკარიოციტის 1 დაყოფის ტელოფაზა, ხოლო 33-ე სურათზე ჰიბრიდული უჯრედის I დაყოფა.



სურ. 32. პარტნიორთა პროტოპლასტების და სომატური ჰიბრიდების ნარევი. ჰეტეროკარიონის I დაყოფის ტელოფაზა /გადიდება 3210-4000/



სურ. 33. „ქართული“ ლიმონის და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბრიდის დაყოფა /გადიდება 3200-4000/

VI.7.„ქართული“ ლიმონის კალუსური პროტოპლასტების და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბრიდების მექანიკური გამოცალკევება და კულტივირება

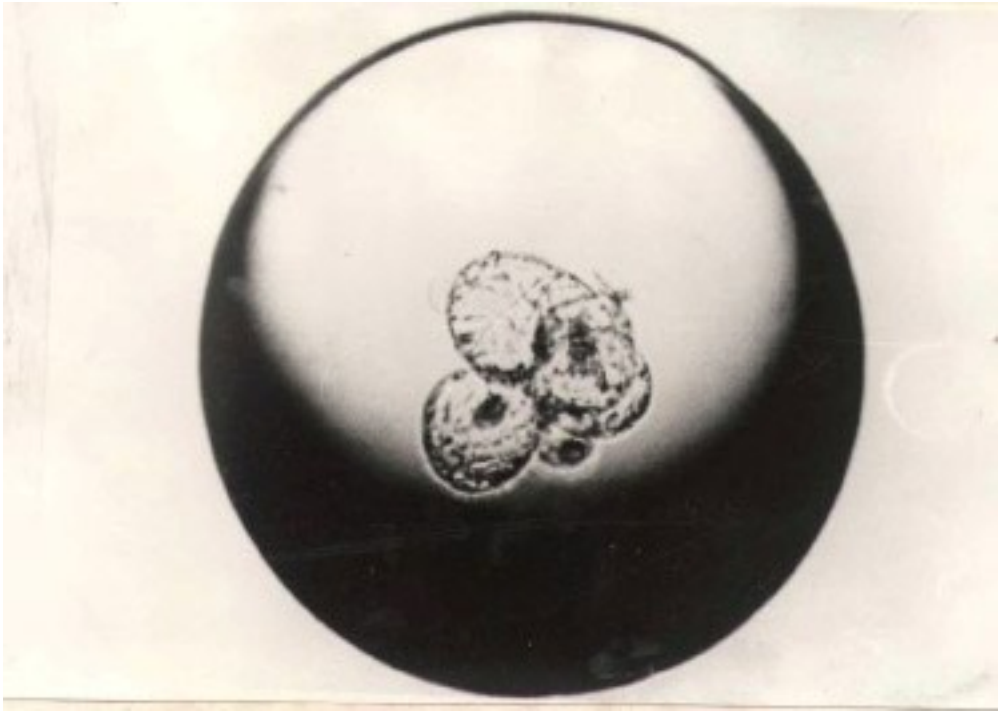
სომატური ჰიბრიდების ციტოლოგიური იდენტიფიკაციის შემდგომ ხდება მათი მექანიკური გამოცალკევება. პარასექსუალური ჰიბრიდიზაციის სტიმული-

რება საკმაოდ ეფექტურად იქნა ჩატარებული, რამდენადაც ყოველი მე-4, მე-5 უჯრედი ჰიბრიდული აღმოჩნდა.

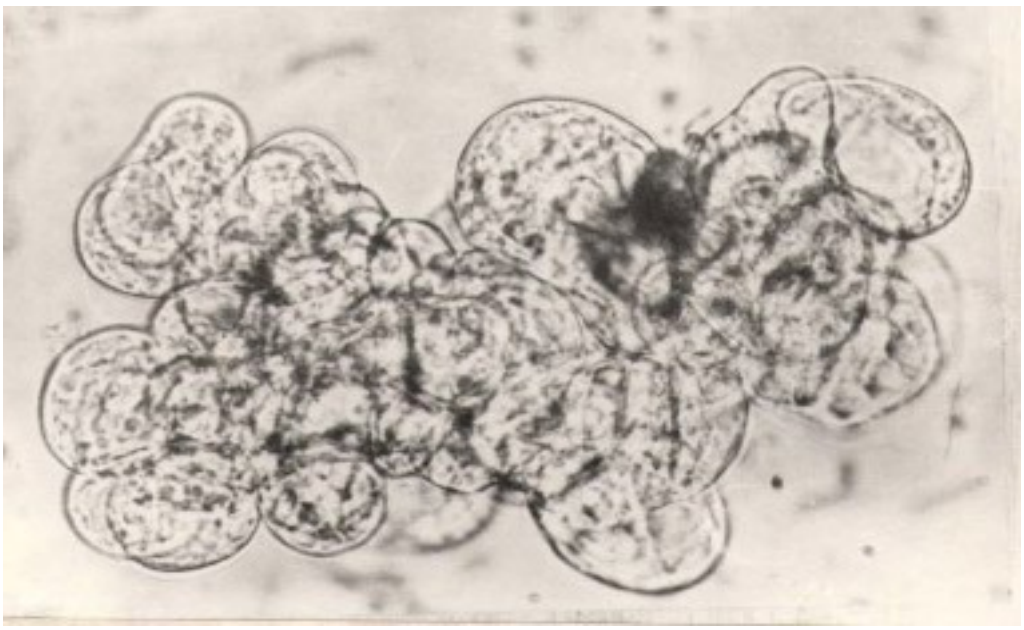
მიკროპიპეტით ხდება შეგროვება იმ ჰიბრიდული უჯრედების, რომლებმაც 2-3 დაყოფა განიცადეს და თავსდებოდნენ კუპრაკის შიდა საკნის უჯრებში (სურათი 34). სომატური ჰიბრიდების კულტივირება წარმოებს კაო-მიხაილუკის მოდიფიცირებულ საკვებ არეზე. როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული, ამ საკვებზე წარმატებით მიმდინარეობდა ქართული "ლიმონის" კალუსური პროტოპლასტების კულტივირება. 6-8 დღის შემდეგ ყოველ უჯრას ემატება ახალი საკვები არე თითო მლ-ის ოდენობით. კაო-მიხაილუკის მოდიფიცირებულ არეზე სომატური ჰიბრიდების პროლიფერაციის პროცესი ნორმალურად წარიმართება. უკვე 14-20 დღის შემდეგ შეინიშნება აქტიური დაყოფის შედეგად უჯრედთა კოლონიის წარმოქმნა (სურ.35). ელექტრონულ მიკროსკოპით დაკვირვებამ ცხადყო, რომ აღნიშნული კოლონიის შემადგენლობაში შემავალ უჯრედებმა განიცადეს სრულყოფილი ციტოდიფერენცირება. აქვთ ვიზუალურად ნორმალურად ჩამოყალიბებული ორგანოიდები: ბირთვი, მიტოქონდრიები, ვაკუოლები და ქლოროპლასტები.

VII. 8. „ქართული“ ლიმონის და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბრიდიდან კალუსური ქსოვილის ჩამოყალიბება და მასში ემბრიოგენეზის პროცესის სტიმულირება

კაო-მიხაილუკის მოდიფიცირებულ საკვებ არეზე 14-20 დღის სომატური ჰიბრიდების უჯრედული კოლონიის მიღების შემდგომ ხდება მათი გადატანა კო-



სურ. 34 „ქართული“ ლიმონის და სამყურა ლიმონის ჰიბრიდული უჯრედის 3-ჯერადი დაყოფა კუპრაკის თასის უჯრაში /გადიდება 3200-4000/



სურ. 35 „ქართული“ ლიმონის და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბრიდის დაყოფის შედეგად განვითარებული უჯრედთა კოლონია /გადიდება 3200-4000/

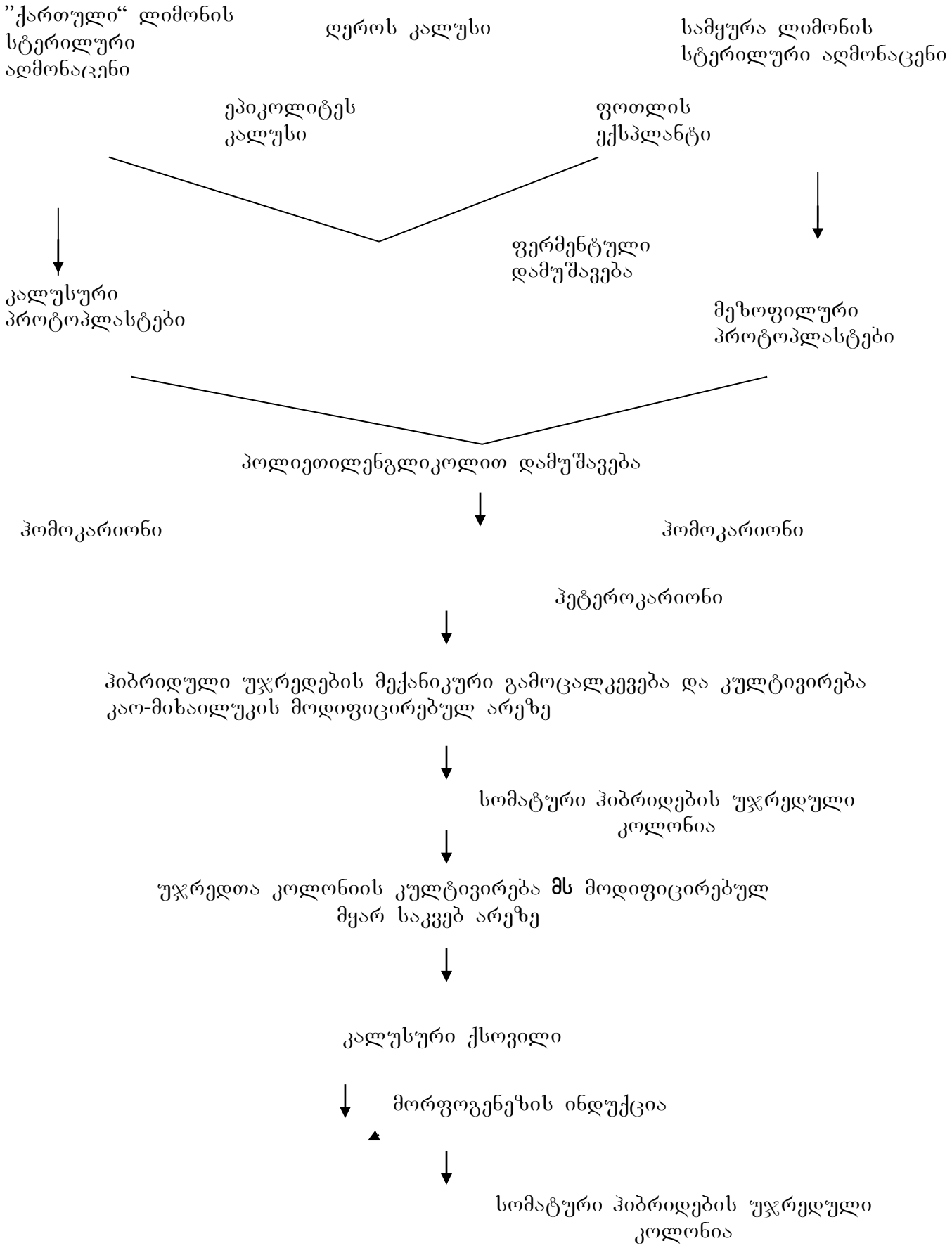
ნცეტრაცია დაკლებული ოსმოტიკის (0.2M –0.3 M) შემცველ საკვებ არეზე. 6-8 ჯერადი გენერაციის შემდგომ უჯრედულ კოლონიათა მასა გადაიტანება მურასიგესა და ტუკერის ნ. ჭელიძის მიერ მოდიფიცირებულ საკვებ არეზე. აგარის შემცველობა იყო შეადგენს 0,.2%. კალუსის უკეთ ფორმირებისათვის საკვებ არეში ზრდის სტიმულატორად ემატება ნძმ 2მგ.ლ-1 და კინეტინი 0.3მგ. ლ-1 რაოდენობით. უჯრედთა პროლიფერაციის ინდუცირებისათვის პეტრის თასები თავსდება სიბნელეში 26 ± 1^{0}C პირობებში. კულტივირება ახალ საკვებ არეზე წარმოებს ყოველ ორ კვირაში ერთხელ. ერთი თვის შედეგ მიღებული კალუსური ქსოვილების მასა გადაიტანება მოდიფიცირებულ საკვებ არეზე, რომელშიდაც ბაპ-ის და ნძმ-ს რაოდენობა შეესაბამება იმ სიდიდეს, რომელიც ოპტიმალური იყო ერთ - ერთი პარტნიორი მცენარის (''ქართული'' ლიმონის ეპიკოტილე) კალუსურ ქსოვილში ემბრიოგენეზის პროცესის სტიმულირებისათვის. ისინი თავსდებიან ფიტოტრონში 16 სთ სინათლე/8სთ სიბნელე ფოტოპერიოდის პირობებში. კულტივირება ახალ საკვებ არეზე წარმოებს ყოველ 2-3 კვირაში ერთხელ. სინათლეზე მოთავსებისას ჰიბრიდული უჯრედებიდან ფორმირებული კალუსური ქსოვილის უჯრედებში იწყება ქლოროფილის დაგროვება, რაც ქსოვილის გამწვანებით გამოიხატება.

3000 ლუქსის ინტენსივობის განათებისას უკვე ერთი თვის თავზე წარმოიქმნება მერისტემული კერები, რომლებიც მომრგვალო ფორმის ემბრიონალურ კვირტებად გადაიქცევიან. 2-3 თვის კულტივირების შემდგომ ემბრიონულ კვირტებიდან ხდება, მორფოგენეზის გზით, ჰიბრიდული მცენარის ჩამოყალიბება. მას კარგად განვითარებული ღერო, ფოთლები და სუსტად განვითარებული ფესვები აქვს (სურ. 36).

ამგვარად, შემუშავებულ იქნა ''ქართული“ ლიმონის და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბრიდის *in vitro* პირობებში მიღების მეთოდიკა (სქემა № 1).

სქემა №1

”ქართული“ ლიმონის და სამყურა ლიმონს შორის სომატური ჰიბრიდიზაციის სქემა



↓

უჯრედთა კოლონიის კულტივირება MS მოდიფიცირებულ
მყარ საკვებ არეზე

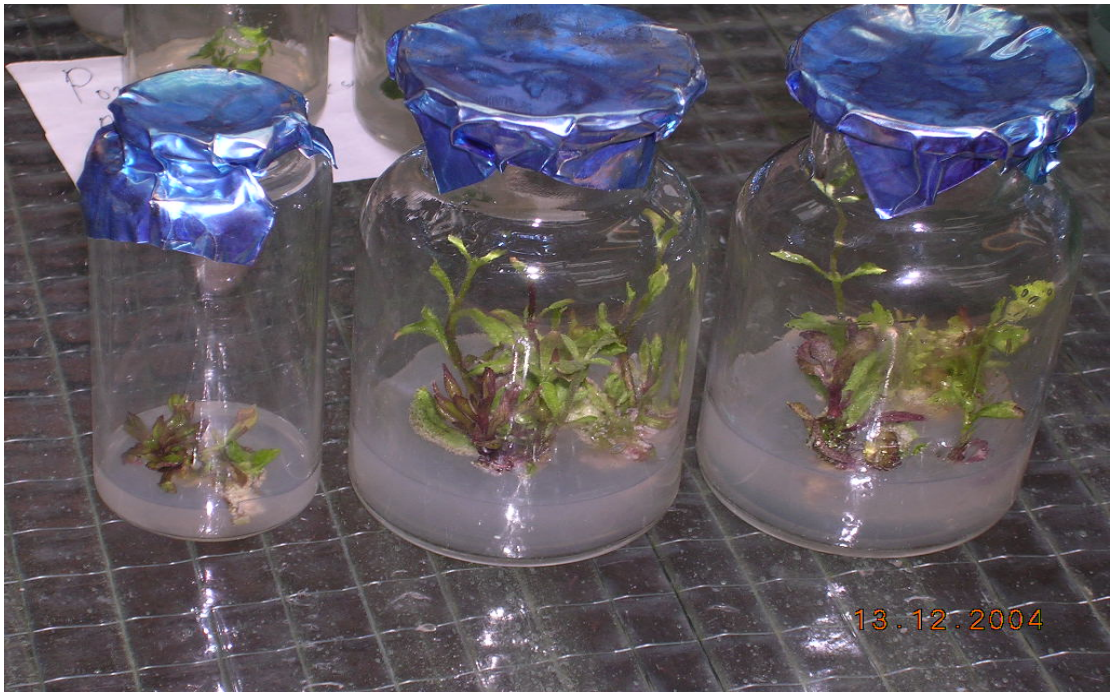
↓

კალუსური ქსოვილი

↓ მორფოგენეზის ინდუქცია

▲

ჰიბრიდული მცენარე



სურ. 36. ”ქართული“ ლიმონის და სამყურა ლიმონის
სომატური ჰიბრიდი

VIII. უუჯრედო სისტემები

VIII.1. ქლოროპლასტების მემბრანები

ამერიკელმა მეცნიერმა მ. კალვინმა, რომლის გამოკვლევებს ფოტოსინთეზის მექანიზმის შესწავლის სფეროში მიენიჭა ნობელის პრემია, 1972 წელს წამოაყენა ფოტოელემენტის შექმნის იდეა, რომელშიც ელექტრული დენის წყაროს წარმოადგენდა ქლოროპლასტების მემბრანები. ასეთი მემბრანების ძირითადი კომპონენტი იყო ქლოროფილი, რომელსაც შეუძლია განათების პირობებში გასცეს და მიიღოს ელექტრონები. გამტარის როლში, რომელიც კონტაქტს ამყარებს ქლოროფილთან, კალვინმა გამოიყენა ცინკის ოქსიდი. ქლოროფილის შემცველ მემბრანებს ათავსებენ ფერმენტების ხსნარში, რომლებიც მოქმედებდნენ როგორც კატალიზატორები. სინათლეზე ხდება წყლის ფოტოლიზი:

H_2O - H_2 + ½ O_2 . ამ სისტემის განათებისას მასში აღიძვრება აგრეთვე ელექტრული დენი სიმკვრივით 0,1 მკამპ სმ^2 – ზე. ასეთი ფოტოელემენტი ფუნქციონირებს ცოტა ხანს, რადგანაც ქლოროფილი მალე კარგავს ელექტრონების გაცემის უნარს. იმისათვის, რომ გაეხანგრძლივებინათ ფოტოელემენტის მოქმედება, გამოიყენეს ელექტრონების დამატებითი წყარო– ჰიდროქინონი. ასეთ სისტემაში ქლოროფილი გასცემს არა მარტო თავის ელექტრონებს, არამედ ჰიდროქინონის ელექტრონებსაც. ასეთი გზით მიღებული 10 მ^2 ფართობის ფოტოელემენტი შეიძლება ფლობდეს 1 კვტ სიმძლავრეს.

იაპონელმა მეცნიერმა ფუძიო ტაკახასიმ ელექტროენერგიის მისაღებად გამოიყენა სალათის ფოთლების ქლოროპლასტები. ტრანზისტორული მიმღები, რომელთანაც მიერთებული იყო ასეთი მზის ბატარეა, წარმატებით მუშაობდა.

თუ სისტემიდან მოსცილდება გამტარი და ინდუცირდება წყალბადისა და ჟანგბადის წარმოქმნა, მაშინ სისტემამ შეიძლება იმუშაოს აგრეთვე როგორც ფოტორეაქტორის პროტოტიპმა, რომლის დახმარებით მზის ენერგია ინახება ძვირფას საწვავში – წყალბადში.

სისტემის უპირატესობანი:

– ჭარბი სუბსტრატის – წყლის არსებობა;

– ენერგიის არალიმიტირებული წყარო – მზე;

– პროდუქტის (წყალბადი) შენახვა შეიძლება ისე, რომ არ გაჭუჭყიანდეს ატმოსფერო;

– პროდუქტს აქვს მაღალი სითბოსწარმოქმნის უნარი (29 კკალ/გ) ნახშირწყალბადებთან შედარებით (3,5 კკალ/გ).

– პროცესი მიმდინარეობს ნორმალურ ტემპერატურაზე შუალედური ტოქსიკური ნივთიერებების წარმოქმნის გარეშე;

– პროცესი ციკლურია, რადგანაც პროდუქტის დაჟანგვის შედეგად წარმოიქმნება სუბსტრატი – წყალი.

ქლოროპლასტების მემბრანების იმობილიზება შეიძლება გელში ჩამაგრებით.

VIII. 2. უუჯრედო ცილამასინთეზებელი სისტემები (უცმს)

უცმს გამოიყენება ინფორმაციული რიბონუკლეინის მჟავის (ირნმ-ის) მატრიცული აქტიურობის შესასწავლად და მისგან ტრანსლირებული პოლიპეპტიდის ანალიზისათვის. მათ შედგენილობაში შედის: რიბოსომები, მატრიცა (ხელოვნური ან ბუნებრივი რნმ), ტრანსლიაციის ცილოვანი ფაქტორები, ამინოაცილ ტ-რნმ, ატფ, ერთვალენტიანი და ორვალენტიანი კათიონები (K^+, Ca^{2+}), ბუფერული ხსნარი ჰომეოსტაზის შესანარჩუნებლად, ამინომჟავები. გენურ ინჟინერიაში უუჯრედო ცილამასინთეზებელი სისტემები გამოიყენება კლონირებული გენების *in vitro* მაკოდირებელი პოტენციალისა და ექსპრესიის მექანიზმების გამოკვლევისათვის, აგრეთვე რეკომბინანტული გენების კონსტრუირების შუალედურ ეტაპებზე მატრიცული რნმ-ის ან დნმ-ის ფრაგმენტების იდენტიფიკაციისათვის კოდირებული ცილების მიხედვით.

კომპონენტების წარმოშობის მიხედვით უცმს შეიძლება კლასიფიცირდეს როგორც პროკარიოტული და ეუკარიოტული. ყველაზე გავრცელებული პროკა-რიოტული ცილამასინთეზებელი სისტემებია ნაწლავის ჩხირის (E. coli) ექსტრაქტების საფუძველზე მიღებული. ეუკარიოტული ცილამასინთეზებელი სისტემებიდან ეუკარიოტების მატრიცის ტრანსლიაციისათვის იყენებენ ორ ძირითად სისტემას: ბოცვერის რეტიკულოციტებიდან და ხორბლის ჩანასახებიდან. ეს სისტემები უნივერსალურია, მათზე ნებისმიერი მატრიცის ტრანსლირება შეიძლება.

ანალიზის ჩასატარებლად ამზადებენ სარეაქციო ნარევს, რომელიც შედგება რეტიკულოციტების ლიზატის ან ჩანასახების ექსტრაქტისა და ამინომჟავების ნარევისგან, ნიშანდებული ამინომჟავების, ატფ-ის, ბუფერის, მატრიცული რნმ-ისა და სხვა კომპონენტებისაგან. ნარევს აინკუბირებენ, რის შემდეგაც ამოწმებენ რადიოაქტიური ნიშნის ჩართვას ახლად სინთეზირებულ ცილაში და აკეთებენ ცილების ტესტირებას ელექტროფორეზის დახმარებით.

ტრანსლიაცია *in vitro* სასარგებლოა ცილის სინთეზის სისტემის ცალკეული კომპონენტების როლის დასაზუსტებლად, რადგანაც შესაძლებელია მათი მოცილება და დამატება საჭიროების მიხედვით. მისი გამოყენება გვეხმარება გენეტიკური კოდის გაშიფრაში. ზოგიერთ უუჯრედო სისტემაში ტრანსლირებენ წინასწარ გაწმენდილ მ-რნმ-ს ან იყენებენ პოლისომებში არსებულ ენდოგენურ მ-რნმ. სხვა ცილამასინთეზებელ სისტემებში – შეუღლებული ტრანსკრიპციისა და ტრანსლიაციის სისტემებში მ-რნმ-ის სინთეზი და მისი ტრანსლიაცია რიბოსომებით, მიდის ერთდროულად. მატრიცულ რნმ-ად გამოიყენება აგრეთვე ცნობილი შედგენილობის ხელოვნური პოლინუკლეოტიდები. ამჟამად, ტრანსლიაციის *in vitro* მექანიზმები გამოიყენება აგრეთვე ცილების განაწილების მექანიზმების განსაზღვრისათვის სხვადასხვა შინაგანი კომპარტმენტების მიხედვით.

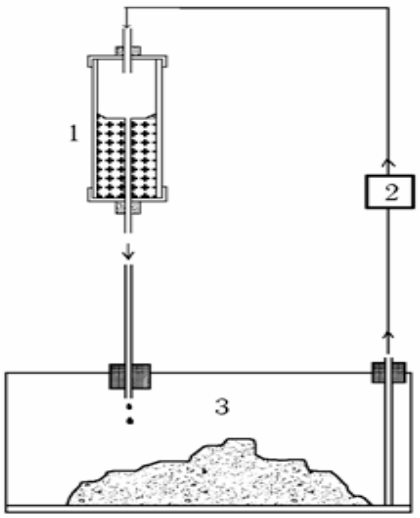
IX. მეორადი მეტაბოლიტების სინთეზის შესასწავლად მცენარის ქსოვილთა კულტურების გამოყენებით შექმნილი ახალი ექსპერიმენტული სისტემები

IX. 1. იმობილიზებული უჯრედების კულტივირების სისტემები

არსებობს იმობილიზებული უჯრედების კულტივირების ორი ტიპის სისტემა:

1. კულტურის სისტემა ბრტყელი ძირით, უჯრედები მრავლდება ჰორიზონტალურად განთავსებულ ჭურჭელში;
2. სვეტის კულტურის სისტემა, სადაც უჯრედები მრავლდება ვერტიკალურ ჭურჭელში.

ორივე სისტემაში თხევადი არე ცირკულირებს ფიზიკურად უძრავი უჯრედების გარშემო (სურ. 37).



სურ. 37. კულტურის სისტემა ბრტყელი ძირით

საკვები არე წვეთავს სიმძიმის ძალის მოქმედებით 70 მლ მოცულობის ცილინდრული ჭურჭლიდან (1) კულტივირებისათვის განკუთვნილ 350 მლ მოცულობის მინის ჭურჭელში (3), სადაც მოთავსებულია უჯრედები (40-50 გ ნედლი მასა), დათესილი არატოქსიკური პოლიპროპილენის ქსოვილის სუბსტრატ-საფენზე. საკვები არე აღწევს ქსოვილის შიგნით კაპილარული ძალების მოქმედებით და ამარაგებს უჯრედებს. ამის შემდეგ გამოყენებული საკვები არე პერისტალტიკური ტუმბოს (2) დახმარებით გადაიქაჩება ისევ რეზერვუარში და გამოიყენება განმეორებით. ამ სისტემით ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ბრტყელ ძირზე (საყრდენზე) კულტივირებულ (მურასიგე-სკუგის არე, რომელსაც დამატებული აქვს 2 ,4 – D და კინეტინი) Solanum niger-ის უჯრედებს შეუძლიათ საკვები არის მოხმარება და სწრაფად რეაგირებენ ორთოფოსფატის უკმარისობაზე. ნედლი მასის მატება მიდის უფრო ნელა, ვიდრე სუსპენზიურ კულტურებში. სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობა ასეთივეა და აღწევს 70-80%. ალკალოიდების რაოდენობა 7 დღე-ღამე კულტივირების შემდეგ აღწევს 12 მგ/გ მშრალ მასაზე, ხოლო სუსპენზიაში, 18 დღე-ღამე კულტივირების შემდეგ იგი შეადგენს 10 მგ/გ მშრალ მასაზე. ადგილებში, სადაც საკვები არე წვეთავს პირდაპირ უჯრედებზე, 3 - 4 დღის შემდეგ კულტივირებული ქსოვილი მუქდება და განირჩევა დანარჩენისაგან, რომელიც S. noger-ს შეფერილი აქვს ღია ჩალისფრად. ჩამოწვეთვის ზონაში უჯრედები ხშირად უფრო კომპაქტურია, შეიცავენ მეტ ალკალოიდებს. თუ უჯრედებს მოვაცილებთ წვეთვის ზონიდან და მოვათავსებთ აგარიან პეტრის თასებში, ალკალოიდების შემცველობა ეცემა, ხოლო კულტივირების ძველ პირობებში დაბრუნებისას ხელახლა აკუმულირდება მეტაბოლიტების დიდი რაოდენობა.

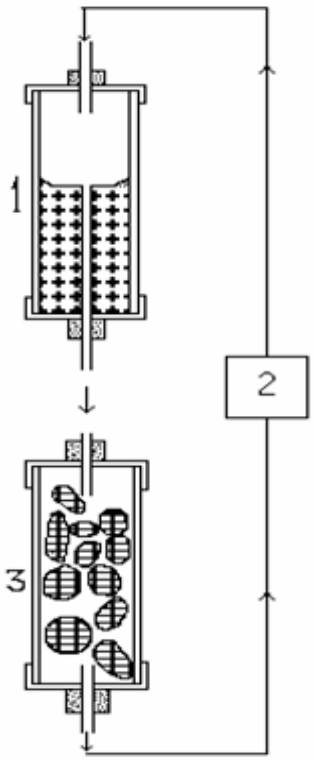
ამას გარდა, უჯრედებში შეაქვთ მეორადი მეტაბოლიტების წინამორბედები. აღნიშნულია, რომ კაპსაცინის სინთეზი *Capsicum frutencens*-ის უჯრედებით, ათასჯერ იზრდება არეზე 5 მლ იზოკაპსაცინის მჟავის დამატებით. ამასთან ერთად, კაპსაცინი არ გროვდება უჯრედების შიგნით, არამედ სეკრეტირდება საკვებ არეში. დადგენილია, რომ ბრტყელ ძირზე იმმობილიზებულ უჯრედებს, რომლებსაც შეუძლიათ საკვებ არედან მოიხმარონ საკვები ნივთიერებები და ჟანგბადი, აქვთ ზრდის დაბალი სიჩქარე, კალუსისმაგვარი განლაგება, და უჯრედებს შორის მჭიდრო კონტაქტის უნარი. მთლიანობაში, მათ აქვთ მეორეული ნაერთების სინთეზის გაცილებით მაღალი უნარი.

მიუხედავად ამ უპირატესობისა, საწარმოო კულტივირებას აქვს არსებითი ნაკლი: აპარატის ჰორიზონტალური კონსტრუქცია უხერხულობას ქმნის მუშაობაში და მოითხოვს დიდ ფართობს. ეს ნაკლი თავიდანაა აცილებულის ხვა სისტემაში. ეს არის სვეტის კულტურის სისტემა (სურ. 38).

ასეთ სისტემაში იზრდება უჯრედების რიცხვი, რომელზეც წვეთავს არე, რაც ზრდის "წვეთვის ზონას", სადაც ხდება დიდი რაოდენობით მეორადი მეტაბოლიტების დაგროვება.

კულტივირებისათის განკუთვნილი ჭურჭელი ჰორიზონტალურიდან გარდაიქმნება ვერტიკალურში. საკვებ არეან ჭურჭელში (1) 50 მლ თხევადი არე სიმძიმის ძალის მოქმედებით წვეთავს იმმობილიზებული უჯრედების შემცველ ვერტიკალურ მინის სვეტში (3). არეს აგროვებენ სვეტის ფსკერიდან და ხელახლა იყენებენ ციკლში საკვებ არეან რეზერვუარებში პერისტალტიკური ტუმბოთი გადაქაჩვის გზით. როგორ მოვათავსოთ უჯრედები სვეტში ისე, რომ მწვეთავმა არემ ისინი მკვრივ მასად არ დაწნეხოს სვეტის ფსკერზე. ნეილონის ბადეში ჩავამაგროთ კალათები, ამისათვის გამოვიყენოთ ინერტული, გამტარი და სტაბილური გელი. კალათებს შორის წარმოიქმნება საჰაერო სივრცე, ბადე

აყალიბებს გელს, ხოლო უჯრედებს შეუძლიათ ზრდა კალათების საშუალებით და უკავშირდებიან ერთმანეთს.



სურ. 38. კულტურის სისტემა სვეტში

უჯრედების მოსათავსებლად შესაფერისი მასალა აღმოჩნდა ნეილონის ღრუბელი. მასალა არატოქსიკურია, ადვილად იჭრება, უძლებს ავტოკლავირებას. უჯრედების ჩატვირთვისათვის სუბსტრატად იყენებენ აგარს და კალციუმის ალგინატს.

ტრადიციულად, აგარი გამოიყენება უჯრედებისა და ქსოვილების კულტურებთან სამუშაოდ. 2%-იან (მასა მოცულობასთან) ხსნარს დისტილირებულ წყალში აავტოკლავირებენ 1 ატმ. წნევაზე 20 წუთით და აციებენ წყლის აბაზანაზე 35 – 40^{0}C-მდე. სუსპენზიური კულტურის უჯრედებს ზრდის სტაციონალურ ფაზაში ატარებენ 1 მმ დიამეტრის ფორებიან საცერში და ურევენ გაუმყარებელ აგარს 1 : 1 (v : v) პროპორციით. 2 – 3 x 1 x 1 სმ ღრუბლის სტერილურ რაჭრებს სტერილური პინცეტით უშვებენ უჯრედებისა და აგარის ნარევში, ხოლო როდესაც აგარი დაიწყებს გამაგრებას, ათავსებენ სტერილურ სვეტებში, რომელთა შიდა დიამეტრია 1,5 – 2,5 სმ. თითოეულ სვეტში ათავსებენ დაახლოებით 10 ბადეს, ამრიგად, თითოეულ სვეტზე მოდის 5 -7 გ უჯრედების ნედლი მასა.

ანალოგიურად აკეთებენ უჯრედების იმმობილიზაციას კალციუმის ალგინატის გამოყენებით. ამ ინერტულ სუბსტრატში ა. ალფერმანისა და თანამშრომლების მიერ წარმატებით იყო იმმობილიზებული ხაოიანი ფუტკარას (*Digitalis lanata*) უჯრედები. კალციუმის ალგინატის 2% ხსნარს ავტოკლავში ასტერილებენ, აციებენ ოთახის ტემპერატურამდე, ურევენ უჯრედებს და

გადააქვთ 0,05 M $CaCl_2$-ის სტერილურ ხსნარში 10 წუთით, რომ წარმოქმნილი კალციუმის ალგინატი გამყარდეს ღრუბლის ნაჭრების შიგნით და ირგვლივ, თან გადაეკრას უჯრედებს. ალგინატის მოლეკულები კალციუმის კათიონებით გარდიგარდმო იკერება, ამასთანავე ხდება მისი სტაბილიზაცია. გამყარებულ მასალას სამჯერ რეცხავენ სტერილურ დისტილირებულ წყალში და შეაქვთ მინის სვეტებში. როგორც შემდგომმა გამოკვლევებმა აჩვენა, უჯრედების ზრდა ალგინატში უკეთესი იყო, ვიდრე აგარში, რაც ალბათ დაკავშირებულია იმმობილიზაციის პროცესში უჯრედებზე გამლღვალი აგარის ნეგატიურ მოქმედებასთან, რადგან აგარის ტემპერატურა შეადგენს 40^0 C. ამიტომ, ექსპერიმენტები გარემო პირობების ცვლილების თაობაზე, ტარდებოდა სვეტებში, სადაც *Datura innoxia* და *Capsicum frutences*-ის უჯრედები იმმობილიზებული იყვნენ კალციუმის ალგინატზე.

ორთოფოსფატის, ნიტრატების, ამონიუმის და საქაროზის მოხმარების სიჩქარე უჯრედებში სვეტის კულტურებში უფრო ნაკლებია, ვიდრე ჰორიზონტალურ სისტემაში. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა სუსპენზიურ კულტურებთან შედარებით, შესამჩნევად არ მცირდება (60 – 65%), ალკალოიდების შემცველობა 8 – 10 დღე-ღამის შემდეგ შეადგენს უჯრედების მშრალი მასის 12 -13 მგ/გ-ს, ალკალოიდები საკვებ არეში არ გამოიყოფა, ხოლო არის PH 8 დღე-ღამე კულტივირების შემდეგ ეცემა 0,4 ერთეულით, 5,4-მდე. ჟანგბადის მოხმარების სიჩქარის განსაზღვრამ აჩვენა სავარაუდოდ მისი ნაკლებობა კულტივირების 4 – 8 დღე-ღამეს.

ლუმინესცენციური ნათურებით განათებული კულტურები საკვებ ნივთიერებებს მოიხმარენ უფრო ინტენსიურად, უჯრედების ზრდაც განათებულ კულტურებში უკეთესია. სინათლის კულტურებში იზრდება უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა და ალკალოიდების შემცველობა. რადგანაც უჯრედები არ მწვანდება, ნორმალური უჯრედული მეტაბოლიზმის შესანარჩუნებლად აუცილებელია სინათლის სხვა ეფექტებიც.

წინამორბედების დამატება ყოველთვის ერთმნიშვნელოვნად არ მოქმედებს ზრდაზე, საკვები ნივთიერებების მოხმარებასა და მეტაბოლიტების სინთეზზე. მაგალითად, ორნიტინის მოქმედება *Datura innoxia*-ს უჯრედებზე უარყოფითი უფროა, ხოლო იზოკაპრინის მჟავის მოქმედება *Capsicum frutence*-ს უჯრედებზე უფრო დადებითია, რადგან ნედლი მასა იზრდება, მაგრამ კაპრომიცინის გამოსავლიანობა უცვლელი რჩება. ორივე შემთხვევაში მეტაბოლიტების სინთეზი არ ინჰიბირდება ალგინატიური გელით.

მიღებული შედეგები მოწმობს, რომ მრავალი სახეობის მცენარის უჯრედები ინარჩუნებენ სიცოცხლისუნარიანობას იმმობილიზაციის დროს. ფაშარი, სწრაფად მზარდი სუსპენზიური კულტურებიდან მიღებული იმმობილიზებული უჯრედები ანელებენ ზრდას და ემსგავსებიან კალუსური კულტურების უჯრედებს. ეს უჯრედები უფრო მეტადაა ერთმანეთთან დაკავშირებული, ვიდრე თხევად კულტურებში, რაც იწვევს გარკვეული ფიზიკური და ქიმიური გრადიენტების აღძვრას.

იმმობილიზებული უჯრედები აგროვებენ მეტ ალკალოიდებს, ვიდრე თხევად კულტურებში, რაც იწვევს განსაზღვრული ფიზიკური და ქიმიური გრადიენტების აღძვრას. ეს ხელს უწყობს უჯრედების გადასვლას სტაციონალურ ფაზაში, რაც იწვევს ალკალოიდებისა და სხვა მეორადი წარმოშობის ნაერთების წარმოქმნის დაჩქარებას.

ზოგადი რეკომენდაციები უჯრედების კულტივირებისათვის მიღებული შედეგების საფუძველზე:

1. უჯრედები უნდა გაიზარდოს ფიზიკურად სტაციონალურად, ერთმანეთთან მჭიდრო კავშირში, რომ სტიმულირდეს ფიზიკური და ქიმიური გრადიენტ-ტების განვითარება და უზრუნველყოფილ იქნას კულტურის ნაწილობრივი

დიფერენციაცია. მცენარის ზოგიერთი სახეობა აუცილებლად უნდა კულტივირდეს განათების პირობებში და ინდუცირდეს ქლოროპლასტების წარმოქმნა, რათა უზრუნველყოფილ იქნას მეტაბოლიზმის ისეთი დონე, რომელიც ახლოსაა ინტაქტური მცენარის უჯრედებში მიმდინარე პროცესებთან;

2. საკვები არის შედგენილობა და ჟანგბადის დონე აუცილებლად უნდა დარეგულირდეს კულტურის ზრდის შენელებისათვის. რეკომენდირებულია ზრდის რეგულატორების გამოყენება დიფერენციაციის პროცესების იმიტაციისათვის, რომელიც მიმდინარეობს *in vivo*;
3. უჯრედები უნდა მომარაგდეს წინამორბედებით, მაგრამ დაბალი კონცენტრაციით. წინამორბედები გარდაქმნის ჯაჭვში მაქსიმალურად ახლოს უნდა იყვნენ გამოსავალ პროდუქტთან;
4. სასრუველია ისეთი უჯრედების გამოყენება, რომლებიც საკვებ არეში ასეკრეტირებენ საჭირო მეტაბოლიტებს, ან რომლებშიც ასეთი სეკრეცია შეიძლება ინდუცირდეს.

ტ ე რ მ ი ნ ო ლ ო გ ი ა

1. **ადვენტური კვირტები** – მცენარის ქსოვილებიდან და უჯრედებიდან აღმოცენებული ისეთი კვირტები, რომლებიც ჩვეულებრივად არ წარმოიქმნებიან.
2. **ანეუპლოიდური** – ბირთვი, უჯრედები, ორგანიზმი, ქრომოსომების ისეთი რიცხვით, რომელიც გადახრილია X-დან ან X-ის ჯერადი რიცხვიდან.
3. **აპექსი** – ღეროს ან ფესვის წვეროს ნაწილი.
4. **აპიკალური დომინირება** – ყლორტის გვერდითი კვირტების ზრდის დათრგუნვა.
5. **აუქსინები** – ფიტოჰორმონები (იძმ, ნძმ, 2,4 – D), რომლებიც ააქტიურებენ ღეროებისა და ფესვების ზრდას, ასტიმულირებენ ფესვების ზრდას აღმონაცენებში.
6. **6-ბაპ** – 6 – ბენზილამინოპურინი.
7. **ბირთვის ომნიპოტენტურობა** – მცენარის სომატური უჯრედების ბირთვების მიერ ზიგოტის მთელი პოტენციის შენარჩუნება, ანუ მთელი გენეტიკური ინფორმაციის შენახვა (შენარჩუნება).
8. **დედიფერენციაცია** – სპეციალიზებული უჯრედების გადახრა (გადასვლა) პროლიფერაციისა და არაორგანიზებული კალუსური ზრდის მიმართულებით (უჯრედების სპეციალიზაციის დაკარგვა).
9. **გამრავლების ციკლი** – პერიოდი უჯრედული ინოკულიუმის ან კალუსური ტრანსპლანტის საკვებ არეზე მოთავსებიდან შემდგომ სუბკულტივიდებამდე.
10. **დიპლოიდი** – ბირთვი, უჯრედები, ორგანიზმი, რომელიც ხასიათდება ჰომოლოგიური ქრომოსომების ორმაგი ნაკრებით, რომელთაგან თითოეული წარმოდგენილია მოცემული სახეობისთვის დამახასიათებელი რიცხვით (სიმბოლო 2n).
11. **დიფერენციაცია** – პროცესების კომპლექსი, რომელიც მიდის უჯრედებს შორის განსხვავებამდე.
12. **დიფერენცირება** – უჯრედის სპეციალიზაციის მდგომარეობა, რომელიც განასხვავებს მათ სხვა უჯრედებისაგან.
13. **2,4–დ** – 2,4 – დიქლორფენოქსიძმარმჟავა.
14. **დომინანტი** – გენი, რომელიც ვლინდება როგორც ნიშანი, ისეთ პირობებში, როდესაც ჰომოლოგიურ ნაკრებებს აქვთ სხვადასხვა გენები.
15. **ექსპლანტი** – ქსოვილის ან ორგანოს ფრაგმენტი, რომელიც ინკუბირებულია საკვებ არეზე დამოუკიდებლად, ან გამოიყენება პირველი კალუსის მისაღებად.
16. **ემბრიოიდოგენეზი** – ჩანასახისმაგვარი სტრუქტურის (ემბრიოიდების) წარმოქმნის პროცესი არასქესობრივი გზით ქსოვილებისა და *in vitro* კულტურებში.
17. **ეპიგენეტიკური ვარიაციები** – გენების დიფერენციალური აქტიურობის ფენოტიპური გამოხატვა. მუტაციისა და სომაკლონური ვარიაციებისაგან განსხვავდება იმით, რომ არ ინახება ციკლში უჯრედი –მცენარე-უჯრედი.
18. **ეუპლოიდი** – ბირთვი, უჯრედები, ორგანიზმი X-ის ჯერადი ქრომოსომების რიცხვით.
19. **ზიგოტური ჩანასახების *in vitro* კულტურა** – მოუმწიფებელი ან მომწიფებული იზოლირებული ჩანასახების ასეპტიკური გამრავლება ხელოვნურ საკვებ არეზე.
20. **ზრდის ციკლი** – უჯრედების პოპულაციის ზრდა პერიოდული გამრავლების ციკლში, რომლის ფაზები ხასიათდება სიგმოიდური (S-მაგვარი) მრუდით.

21. **იზოლირებული პროტოპლასტების კულტურა** – უკედლებო უჯრედების გამრავლება თხევად ან აგარიზებულ არეზე, რომელიც დამატებითი კომპონენტის სახით შეიცავს ოსმოსურად აქტიურ ნივთიერებას (სტაბილი ზატორს) მოცემული სახეობისთვის ოპტიმალური კონცენტრაციით. კედლების რეგენერაციის შემთხვევაში იზოლირებული პროტოპლასტები გარდაიქმნება კულტურად.
22. **იზოლირებული პროტოპლასტი** – მცენარეული უჯრედი, რომელსაც დაკარგული აქვს უჯრედული კედელი ფერმენტული ან მექანიკური დაშლის შედეგად.
23. **იზოლირებული პროტოპლასტების შერწყმა** – ერთი უჯრედის ფორმირება ერთი ან რამდენიმე უჯრედიდან მათი ზედაპირული მემბრანების შეერთებით.
24. ***In vitro*** – ცოცხალი ობიექტის გაზრდა "შუშაში" (სინჯარაში, კოლბა ში, ბიორეაქტორში) ხელოვნურ საკვებ არეზე, ასეპტიკურ პირობებში.
. 25. **ინოკულუმი** – უჯრედული სუსპენზიის ნაწილი, რომელიც გამოიყენება ახალ საკვებ არეზე გადასატანად.
26. **იძმ** – β -ინდოლილძმარმჟავა.
27. **კალუსი** – დედიფერენცირებული უჯრედების ჯგუფი, რომელიც წარმოიქმნება in vitro ან in vivo არაორგანიზებული პროლიფერაციის შედეგად.
28. **კარიოტინი** – მოცემული სახეობისთვის დამახასიათებელი ქრომოსომების ნა კრები.
29. **კლონი** – ერთი უჯრედიდან აღმოცენებული კულტურა.
30. **კლონალური მიკროგამრავლება ანუ მიკროკლონური გამრავლება** – არასქე სობრივი გზით მცენარის *in vitro* მიღება, რომელიც გენეტიკურად საწყისი მცენარის იდენტურია (მცენარის ვეგეტატიური გამრავლების მეთოდი in vitro კულტურაში).
31. **კალუსური კულტურა *in vitro*** –დედიფერენცირებული ქსოვილის *in vitro* (შუშაში) მზარდი კულტურა.
32. **მერისტემა** – ქსოვილი, წარმოქმნის (ჩამოყალიბების) პროცესში წვრილი, აქტიურად გაყოფადი უჯრედებით.
33. **მორფოგენეზი** – უჯრედების (ცისტოგენეზი), ქსოვილების (ჰისტოგენეზი) და ორგანოების (ორგანოგენეზი) სტრუქტურების წარმოქმნა ანუ ზრდისა და განვითარების პროცესის დაწყება.
34. **მუტაცია** – ცვლილება უჯრედების გენეტიკურ მასალაში ბირთვისა და ორ განელების დნმ-ის გარდაქმნის გზით, ცვლილებები ქრომოსომების სტრუქტუ რაში ანუ ორგანიზმის პლოიდურობის დონეზე.
35. **მერისტემის *in vitro* კულტურა** – იზოლირებული აპექსის ან ყლორტის იღლი- ური კვირტების ასეპტიკური გამრავლება ხელოვმურ საკვებ არეზე.
. 36. **ორგანოთა *in vitro* კულტურა** – იზოლირებული ფესვების, ღეროთა აპექსე ბის, ყვავილების მოუმწიფებელი ნაწილების, მკვახე ნაყოფების ასეპტიკური ზრდა-გამრავლება ხელოვნურ საკვებ არეზე გადარგვის რეჟიმში.
37. **პოლიპლოიდი** – ბირთვი, უჯრედები, ორგანიზმი, რომელიც ხასიათდება ქრომოსომების ძირითადი რიცხვის გამრავლებით (სიმბოლოები 3X, 4X და ა.შ.).
38. **პროლიფერაცია** – უჯრედებისა და ქსოვილების წარმოქმნა უკვე არსებუ ლის გამრავლების გზით.
39. **რეგენერაცია** – მთლიანი ორგანიზმის აღდგენა უჯრედებიდან, ქსოვილიდან, ორგანოდან.
40. **რედიფერენციაცია** – სპეციალიზებული უჯრედების გადასვლა დიფერენცი

რების ერთი მდგომარეობიდან მეორეში წინასწარი დაყოფით ან უშუალოდ.

41. **რეცესივი** – გენი ან გენეტიკურად განპირობებული ნიშანი, რომელიც ვლინდება დიპლოიდურ უჯრედში ან ორგანიზმში იმ პირობებში, როდესაც ქრომოსომის ორივე ნაკრები ფლობს მოცემულ გენებს.

42. **რიზოგენეზი** – დაფესვიანების, ზრდისა და განვითარების პროცესი.

43. **სომაკლონური ვარიაციები და ვარიანტები** – კულტივირებული უჯრედების ბირთვული და ორგანელური ციტოპლაზმატური გენომების ცვალებადობის ფენიტიპური გამოხატვა.

44. **სომატური ჰიბრიდი** – იზოლირებული პროტოპლასტების ჰიბრიდიზაციის გზით მიღებული მცენარე.

45. **სომატური (პარასექსუალური) ჰიბრიდი** – მცენარის ჰიბრიდული უჯრედული ხაზისა და სომატური ჰიბრიდების შექმნის ხერხი ბირთვისა და ორგანელების ქრომოსომებისა და გენების რეკომბინაციის გზით სექსუალური ციკლის გარეშე, მაგალითად, იზოლირებული პროტოპლასტების სერწყმის გზით.

46. **სუბკულტივირება** – ტრანსპლანტის ან ინოკულიუმის გადატანის პროცესი კულტურალურ ჭურჭელში ახალ საკვებ არეზე.

47. **სუბპროტოპლასტი** – იზოლირებული პროტოპლასტი, რომელმაც დაკარგა ციტოპლაზმის ნაწილი და შეინარჩუნა ბირთვი.

48. **სუსპენზიური კულტურა ანუ უჯრედების *in vitro* კულტურა** – ცალკეული უჯრედების ან მათი მცირე ჯგუფების ასეპტიკური გამრავლება შეწონილ მდგომარეობაში თხევად საკვებ არეზე.

49 **ტოტიპოტენტურობა** – მცენარის სომატურ უჯრედთა უნარი მოახდინონ რეალიზება თავისი განვითარების პოტენციალის და კულტივირების განსაზღვრულ პირობებში დასაბამი მიცენ მთლიანი მცენარის განვითარებას.

50. **ტრანსპლანტი** – კალუსური ქსოვილის ნაწილი, რომელიც გამოიყენება ახალ საკვებ არეზე გადასატანად.

51. **უჯრედული სელექცია *in vitro*** – მუტანტური უჯრედების გამოყოფის და სომაკლონური ვარიაციების მეთოდი სელექციური პირობების გამოყენებით.

52. **ფესვების *in vitro* კულტურა** – იზოლირებული ფესვების ასეპტიკური გამრავლება ხელოვნურ საკვებ არეზე გადარგვის რეჟიმში.

53. **ფიტოჰორმონები (მცენარის ჰორმონები)** – ბიოლოგიურსდ აქტიური ნაერთები, რომლებიც მცენარეში წარმოიქმნება მცირე რაოდენობით, იწვევენ სპეციფიკურ ზრდის ან სტრუქტურისწარმომქმნელ ეფექტს.

54. **ფსევდოდიპლოიდი** – ბირთვი, უჯრედები, ორგანიზმი, რომლებიც ხასიათდება ქრომოსომების დიპლოიდური რიცხვით და მოცემული სახეობის ზიგოტისაგან განსხვავდება კარიოტიპის მიხედვით.

55. **ქსოვილთა *in vitro* კულტურა** – ხანგრძლივ გადასარგავ კულტურაში გამრავლება ქსოვილებისა, რომლებიც წარმოქმნილია მცენარის სხვადასხვა ორგანოების იზოლირებული სეგმენტების უჯრედების, ან თვითონ ორგანოების უჯრედების პროლიფერაციით.

56. **ციბრიდი** – მცენარე, რომელიც მიღებულია იზოლირებული პროტოპლასტის შერწყმით ციტოპლასტთან, ინაქტივირებული ბირთვის მქონე პროტოპლასტთან.

57. **ციტოკინინები** – ფიტოჰორმონები (კინეტინი, 6 – ბაპ), რომლებიც ააქტიურებენ მერისტემის განვითარებას, ასტიმულირებენ კვირტების წარმოქმნას.

58. **ციტოპლასტი** – მემბრანით შემოსაზღვრული ციტოპლაზმის ნაწილი, რომელიც წარმოქმნილია იზოლირებული პროტოპლასტის ფრაგმენტირებისას.

60. **"შეჩვეულ" ქსოვილთა კულტურა** – ქსოვილების გაზრდა, რომლებიც წარმოქმნილია ნორმალური კალუსური ქსოვილის უჯრედების რედი ფერენციით ან მუტაციით და შეუძლიათ ზრდა უჰორმონო საკვებ არეებზე.

61. **შტამი** – კულტურა, რომელიც წარმოშობილია პირველი სუბკულტივირების შემდეგ და შედგება პირველადი კალუსის უჯრედებიდან წარმოქმნილი მრავალი უჯრედული ხაზისაგან.
62. **ხაზი** – კულტურა, რომელიც წარმოქმნილია შტამიდან სელექციის ან კლონირების გზით და აქვს მარკერული ნიშნები.
63. **ჰაპლოიდი** – ბირთვი, უჯრედები, ორგანიზმი ქრომოსომების ისეთი ნაკრე ბით, რომელიც წარმოადგენს მოცემული სახეობისთვის დამახასიათებელი ნაკრების ნახევარს (სიმბოლო n).
64. **ჰიბერელინები** – ფიტოჰორმონებია (ჰიბერელინის მჟავა და სხვ.), რომლებიც აქტიურებენ ღეროების ზრდას, იწვევენ თესლის გაღივებას.
65. **ჰმ** – ჰიბერელინის მჟავა.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Chelidze N., Ghogoberidze M. Isolation of cell Protoplasts of Lemon varieties “Kartuli” and *Poncirus trifoliate* and optimization of cultivation conditions. *Proceedings of the Georgian Academy of Sciences, Ser.B,* Vol.5, No.2,2007, p. 17-20.
2. Eriksson T. – studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of Haplppappus gracilis. – Physiol, plant, 1965, 18, # 4, P.976-993.
3. Erikson T. Cell cultures of Haplopappus graclis as testing material for radiometric compounds Hereditas, 1967, 57, P. 127-148.
4. Brodelius P. - /mmobilised plant cells./ in: mmobilised cells and organells, Matt; ason B. (ed) Boca Raton, GRC Press. 1983, p. 27-55.
5. Brodelius P. –utilization of plant cell cultures for production of biochemicals. – Herreditas Duppl, 1985, v.3, p.73-81.
6. Gamkrelidze Kh..,Zarnadze N., Gogoberidze M. Receipt of *in vitro* Cultures of *Stevia raboudiana* and its Microclonal Propagation. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences, 160, N3, p. 528-530, 1999.
7. Gamkrelidze Kh., Zarnadze N., Gogoberidze M. Auxines Influence on Shoot Regeneration and Rooting during *Stevia raboudiana* Microclonal Propagation. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences, 161, N1, 2000.
8. Gamkrelidze Kh., Zarnadze N., Gogoberidze M., Chelidze N. Induction of Callusogenesis and Organogenesis in *Stevia raboudiana* Leaf and Shoot. Bulletin of the Georgian Academy of Sciences, 164, N1, p. 147-150. 2001.
9. Gogoberidze M.K., Mamaladze M.N., Zambakhidze N.E., Steroid Substances in the Yucca gloriosa Cell and Tissue Culture And Their Formation During Morphogenesis. Plant Science, 84. p. 201, 1992.
10. Gogoberidze M.K., Jaoshvili M.R., Gogava M.A., Chkhiedze E.G., Regulation of Biosynthesis Pathways of Steroid Compounds in Cell Cultures from Yucca gloriosa L. J.Plantlet, V. 2, N3, p.13-16,1995.
11. Gogoberidze M., Gogava M., Varsimashvili Kh., Ramishvili M., Buadze O. Correlation between Ultrastructure and Steroid Glycosides Content in Differentiated and Callus Tissue Cell of *Yucca gloriosa*. Bulletin of the Georgian academy of Sciences. 168, №1, 105-107, 2003.
12. Gogava M., Gogoberidze M., Zambakhidze N., Miminoshvili T. Study of the effect of light on the accumulation of sterols and steroid glycosides *in vitro* heterotrophic and photomixotrophic cultures of *Yucca Gloriosa L.* Proceedings of the Georgian Academy of Scienses, Biological series B, Vol.2. No.1-2, P.6-11, 2004.
13. Herren Ray V. Introduction to Biotechnology: An Agricultural Revolution..Thomson Delmar Learning. 413 p. 2007.
14. Jaoshvili M., Gogoberidze M., Varsimashvili Ch., Cheidze E. Study of Cell Clones Isolated from Tissue Culture of *Yucca Gloriosa L.* Bulletin of the Georgian Academy of Sciences, 158, N2, p. 325-328,1998.
15. Maliga P., Breznovits S.A. Marton L. – Streptomycin – resistant plants from callus culture of haploid tobacoo. /Nature, 1973, 244. p. 29-30.
16. Medgyesy P., Menzel L., Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance: chloroplast transfer from Nicotina tabacum into Nicotiana Sylvertris and isolation of their somatic hybrids.-med. and Gen. Genet., 1980, 179, p. 693-698.

17. Menzel L., Nagy F., Kiss Z.R., Maliga p. Streptomycin resistant and sensitive somatic hybrids of Nicotiana tabacum Nicotina Knightiana: Correlation of resistence to N. tabacum plastids. – Theor. and Appl. Genet., 1981, 59, P. 191-195.
18. Murashige T., Skoog F. – A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. – physiol. Plant., 1962, N15, P. 473-497.
19. Murashige T., Tucker DPH Growth factor requirements of citrus tissue culture. /n; chapman HD (ed) Proc. Ist Int. Citrus Symp., vol. “University of Califormis, Reversid Calif., 1969, 1151-1161.
20. Kao K.M., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of Vicia hojastana cells and protoplasts at a very low population denaity in Piquid media – I bid., 1975, 126, P. 105-110.
21. Kobayashi S., I., uchimiya H., Conditions for high frequency embryogenesis from orange protoplasts. Plamt Cell Tissue Organ Culture, 1985, 4, 249-259.
22. Ohgawara T., Kobayashi S., ohgawara E., Uchimiya H., Iahii S., Somatic hybrid plants obtained by protoplasts fusion betwean citrus sinensis and Poncirus trifoliata-Theor. Appl. Genet., 1985, 71, 1-4.
23. Shepard J.F., Totten R.E. Mesophyll cell protoplasts of potato. – Plant phyaiol., 1977, 60, p. 313-316.
24. Sidorov V., Menzel L., Maliga P. Isoleucinerequiring Nicotiana plant deficient in threonine eleamiose. – Nature, 1981a, 294, p. 87-88.
25. Sidorow V., Maliga P. – Fusion – complementation analysis of autotrophic and chlorophyll – deficient lines isolated in haploid Nivotiana plumbaginifolia protoplast cultures. /Mol. and gen. Genet. 1982, 186, p. 328-332.
26. Tromas B.R. Pratt D. Efficient hybrization between Lycopersicon esculentum and L. Peruvianum via embryo callus. – Theor. and Appl. Genet., 1981, 59, p. 215-219
27. Бекер М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П. Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990. 334 с.
28. Биотехнология. / Под ред. А.А. Баева. М.: Наука, 1984. 309 с.
29. Бутенко Р.Г. – Выращивание клеток высших растении в суспензионной культурею – Извю АНССРб сер. биол. 1977, №5, с. 697-709.
30. Бутенко Р.Г. – перспективы использования культивируеших клеток растений в биотехнологии. – В. кн.: Биотехнология. . „Наука“ , 1984, с. 239-247. Бутенко Р.Г. – перспективы использования культивируеших клеток растений в биотехнологии. – В. кн.: Биотехнология. . „Наука“ , 1985, с. 239-247.
31. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 3 - 20.
32. Бутенко Р.Г. и др. Клеточная инженерия. - М.: Высшая школа, 1987.
33. Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. С.241 – 244.
34. Глеба Ю.Ю. Гибридизация соматических клеток растений. // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 85 - 91.
35. Глеба Ю.Ю., Зубко М.К. Теоретические и прикладные аспекты клеточной инженерии растений // Биотехнология. Итоги науки и техники ВИНИТИ АН СССР. М., 1988. Т. 9. С. 3 - 72.
36. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. Киев: Наук. думка, 1982. 104с.
37. Гогоберидзе М.К., Мамаладзе М.Н., Джаошвили М.Р., Каранова С.Л., Пхеидзе Т.А., Сулаквелидзе Ц.П. Характеристика суспензионной культуры юкки славной - Yucca gloriosa L. Физиология растений, т. 35, вып. 2, с. 378-382, 1988;
38. Гогоберидзе М.К., Гогава М.А., Варсимашвили Х.И., Мамаладзе М.Н. Влияние некоторых компонентов среды и света на образование стероидных гликозидов в культуре клеток Yucca gloriosa L. Растительные ресурсы, №3, 1992.

39. Сидоров В. – биотехнология растений и клеточная селекция, Киев, 1990, Наука Думко,- стр. 15-16.
40. Дмитриева Н.Н. Проблема регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток и тканей растений. // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С.113-123.
41. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. Киев: Науковадумка, 1980. 488 с.
42. Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани. // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С.137-149.
43. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
44. Кефели В.И., Дмитриева Г.А. Биотехнология: курс лекций. Пущино, 1989. 96 с.
45. Корженевская Т.Г., Бутенко Р.Г., Гусев М.В. Ассоциации цианобактерий с культивируемыми клетками и тканями высших растений. // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 225 - 242.
46. Мамаева С.Е. Хромосомный анализ культивируемых клеток. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 78 98.
47. Методы клеточной биотехнологии растений. Киев, 1987. 53 с.
48. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений. // Биология кульивируемых клеток и биотехнология. М.: Наука, 1991. С. 5 - 19.
49. Попов А.С. Криоконсервация клеток растений. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 70 - 77.
50. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.: Под ред. В. С. Шевелухи. М.: Высш. школа, 1998. 416 с.
51. Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей. М.: Иностранная литература. 1949. 160 с.
52. Урманцева В.В. Культивирование каллусных тканей на твердых средах. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 232 - 241.
53. Цуцаева А.А., Петренко Т.Ф. Криоконсервация культивируемых клеток животных. // Методы культивирования клеток. Л.: Наука, 1988. С. 63 - 69.
54. Эмбриология растений: использование в генетике, селекции, биотехнологии. М.: Агропромиздат, 1990. Т.2. 463 с.
55. კვესიტაძე გ., კვესიტაძე ე. ბოოტექნოლოგია. თბილისი, 1999, 432 გვ.
56. ღოღობერიძე მ., კვესიტაძე გ. მცენარეულ უჯრედთა და ქსოვილთა იზოლირებული კულტურა. ბიოტექნოლოგიის საფუძვლები. მეცნიერება, თბილისი, 1986, გ.151-172.

სარჩევი

შესავალი 3

I.ხელოვნურ საკვებ არეებზე მცენარეული მასალის კულტივირების ტექნიკა

I. 1. ბიოტექნოლოგიური ლაბორატორიის ორგანიზაცია..... 5
I. 2. საკვები არეების მომზადება უჯრედებისა და ქსოვილების *in vitro* კულტივირებისათვის.....6
I. 3. სტერილიზაციის ხერხები მცენარეთა ბიოტექნოლოგიაში.....8
I. 4. მცენარეული ექსპლანტების სტერილიზაციის ხერხები.....9
I. 5. ლამინარულ ბოქსში მუშაობის ტექნიკა სტერილური ნაზარდების კულ-ტივირებისას.....10

II. დედიფერენციაცია და კალუსოგენეზი მცენარეული უჯრედებისა და ქსოვილების კულტურაში
II. 1. კალუსების მიღება.....10
II. 2. კალუსების სუბკულტივირება.....17
III. სუსპენზიური კულტურები
III. 1. . მცენარეთა უჯრედების სუსპენზიური კულტურის მიღება და კულ-ტივირება.....18
III. 2.სუსპენზიის სიმკვრივის გამოთვლა..... 18
III. 3. სუსპენზიის აგრეგაციის და სიცოცხლისუნარიანობის ხარისხის გან-საზღვრა.....19
III. 4. უჯრედების კლონების მიღება აგარიზებულ არეებზე.....21

IV. მცენარეთა კალუსური და უჯრედული კულტურების გამოყენება ბიოლო-გიურად აქტიურ მეტაბოლიზმის მეორეულ ნაერთთა მისაღებად
IV.1. *In vitro* კულტურები ბუნებრივი ქიმიური ნაერთების ალტერნატიული წყარო.....21
IV. 2. საკვები არის კომპონენტების გავლენა *Yucca gloriora*-ს სუსპენზიური კულტურის ზრდაზე და მასში ფუროსტანოლური გლიკოზიდების დაგროვებაზე.....27
IV. 3. მცენარეული მაღალპროდუქტიური შტამების მიღების საშუალებები ქიმიური მუტაგენეზის და უჯრედთა სელექციის გზით.....34
IV. 4. *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის საკონტროლო და მუტანტური შტამების მიერ სტეროიდულ გლიკოზიდთა დაგროვების უნარის შესწა-ვლა.....38

V. უჯრედული სელექცია
V 1. უჯრედული სელექციის მეთოდები.....42
V.2. მცენარეთა უჯრედების კულტურის გამოყენების გენეტიკური საფუძვლები სელექციური მიზნებით 44

V.3. უჯრედულ სელექციაში გამოყენებული მცენარეული უჯრედების კულტურების სახეები....48
V. 4. უჯრედული სელექციის *in vitro* მეთოდის უპირატესობა....49
V. 5. გენოფონდის შენახვის მეთოდები....50
V. 6. *Yucca gloriosa*-ს სუსპენზიური კულტურის უჯრედულ ხაზთა სელექცია....52
V. 7. აქტიურ ვარიანტთა გადარჩევა....56
VI. მცენარეული უჯრედის ტოტიპოტენტურობა. მცენარეთა მორფოგენეზის ფიზიოლოგიური ასპექტები....61

VI.1. მცენარეთა მიკროკლონური გამრავლება და ვირუსისგან თავისუფალი მასალის მიღება

მცენარეთა მიკროკლონური გამრავლების უპირატესობა გამრავლების ტრადიციულ ხერხებთან შედარებით მეთოდის ისტორია....61
VI.2. ფაქტორები, რომლებიც გავლენას ახდენენ კლონური მიკროგამრავლების პროცესზე....63
V. 3. კლონური გამრავლების ეტაპები....65
VI. 4. აპიკალური მერისტემის განშტოება და მცენარის რეგენერაცია....68
VI.5.ყლორტების პროლიფერაცია და სტერილური ნაზარდების მიკროდაკალება....68
VI.6. ფესვების წარმოქმნის ინდუქცია მცენარის მიკროკლონური გამრავლების დროს....69
VI. 7. *Stevia rebaudiana-ს* მიკროკლონარული გამრავლების ტექნოლოგია....69
VI. 8. გადასარგავი მასალის გაჯანსაღება ვირუსებისგან....78
VI. 9. იმუნოფერმენტული ანალიზი. მცენარეული მასალის ტესტირება ვირუსის შემცველობაზე....81
VI.10. სანერგე მასალის მიღება აპიკალური მერისტემის კულტივირებასთან შეხამებული თერმოთერაპიის მეთოდით....81
VI.11. უვირუსო დასარგავი მასალის მიღება აპიკალური მერისტემის მეთოდთან შეუღლებული ქიმიოთერაპიის მეთოდით....82

VII. მცენარეული უჯრედების პროტოპლასტები, როგორც ბიოლოგიური კონსტრუირების ობიექტები
VII. 1. პროტოპლასტების შერწყმა – პარასექსუალური ჰიბრიდიზაცია....82
VII. 2. სომატური ჰიბრიდების სახეობები....84
VII.3. ციტრუსოვანთა წინაპრის *Poncirus trifoliata-ს* (სამყურა ლიმონი) და "ქართული" ლიმონის სომატური ჰიიბრიიზაცია....86
VII 4. "ქართული" ლიმონის ეპიკოტილეს და ღეროს კალუსურ ქსოვილში მორფოგენეზზე კულტივირების პირობების გავლენა....90
VII. 5. "ქართული" ლიმონის და სამყურა ლიმონის მეზოფილური და კალუსური ქსოვილების პროტოპლასტების გამოყოფა....91
VII. 6. გამოყოფილი პროტოპლასტების კულტივირების პირობების დადგენა....94
VII.7. „ქართული" ლიმონის კალუსური და სამყურა ლიმონის მეზოფილური პროტოპლასტების შერწყმა....98
VI.7.„ქართული" ლიმონის კალუსური პროტოპლასტების და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბრიდების მექანიკური გამოცალკევება და კულტივირება....100
VII.8. „ქართული" ლიმონის და სამყურა ლიმონის სომატური ჰიბრიდიდან კალუსური ქსოვილის ჩამოყალიბება და მასში ემბრიოგენეზის პროცესის სტიმულირება....101

VIII. უუჯრედო სისტემები

VIII.1. ქლოროპლასტების მემბრანები....104
VIII. 2. უუჯრედო ცილამასინთეზებელი სისტემები (უცმს)....105

IX. მეორადი მეტაბოლიტების სინთეზის შესასწავლად მცენარის ქსოვილთა კულტურების გამოყენებით შექმნილი ახალი ექსპერიმენტული სისტემები
IX. 1. იმობილიზებული უჯრედების კულტივირების სისტემები....106

ტერმინოლოგია....111
გამოყენებული ლიტერატურა....115