აუქსინების გავლენა ლურჯი მოცვის მიკროკლონალურ გამრავლებაზე in vitro კულტურაში

ნ. ალასანია- სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა კანდიდატი,
ნ.ლომთათიძე - ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი,
დ.ჯაში - სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა კანდიდატი

რეფერატი

in vitro კულტურის მეთოდი საშუალებას იძლევა საწყისი მასალის შექმნისათვის, რაც აუცილებელია სელექციისათვის. იგი წარმოადგენს არსებული სასოფლო-სამეურნეო კულტურების გაუმჯობესებისა და ახლის შექმნის საშულებას. იგი, ასევე, საშუალებას იძლევა სომატური ჰიბრიდიზაციის გზით შეიქმნას პრაქტიკული მნიშვნელობის მქონე სხვადასხვა სახეობის მცენარეთა „გენოფონდი“.

შესწავლილი იქნა ზრდის რეგულატორებისა და კულტივირების ფიზიკური პირობების გავლენა საკუთრივ მიკროკლონალური გამრავლების ეტაპებზე. შემუშავდა მოცვის in vitro კულტურაში შეყვანის პირობები. შერჩეული იქნა საკვები არის მოდიფიცირებული შემადგენლობა და ჰორმონალურ ნივთიერებათა კონცენტრაციები. მიღწეულ იქნა მოცვის ორგანოგენეზი ხელოვნურ საკვებ არეზე და მიღებული მიკროკლონები. დადგენილია აუქსინების ბუნება.

საკვანძო სიტყვები: მიკროგამრავლება, ექსპლანტი, სტერილიზაცია, ფიტოჰორმონი, ბენზინამინოპურინი, ციტოკინინი

საქართველოში ლურჯი მოცვის ნერგები პირველად 2006 წელს ჩამოიტანეს აშშ–დან და საცდელი მიზნით დარგეს იმერეთში, სოფელ სიმონეთში, სადაც 2009 წელს მიიღეს პირველი მოსავალი. დღეისათვის, მსოფლიოში კულტივირებული და გავრცელებულია ლურჯი მოცვის 150–მდე ისეთი ჯიშები, როგორიცაა: ბლუკროპი, ჩენდლერი, ლეგასი, ბერკლი, პატრიოტი, ბრიჯიდა, დიუკი, მისტი, სანრაისი, სპარტანი, ტორო, ონეალი, ელიზაბეტი, ბლუგოლდი და სხვა. მათგან 9-ზე მეტი ჯიში ინტროდუცირებულია საქართველოში.

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა ლურჯი მოცვი. იგი მანანასებრთა (Ericaceae) ოჯახის წარმომადგენელია. მოცვი დაბალი 15-40 სმ სიმაღლის ფოთოლმცვენი ბუჩქია, ნიადაგში ჰორი–ზონტალურად განლაგებული ფესვურებითა და წიბოებიანი მწვანე ყლორტებით. ფოთოლი- ნა–თელი, მწვანე ფერის, მოკლეყუნწიანი, პრიალა, მოხაზულობით, კვერცხისებრი ან კვერცხი–სებრელიფსიური, ნაპირებში წვრილ ხერხკბილა, 15-25 მმ სიგრძის, ტოტებზე მორიგეობითა განლაგებული.

თანამედროვე სისტემატიკით გვარი მოცვი-Vaccinium წარმოდგენილია 200-მდე სახეობით. საქართველოში გავრცელებულია აღნიშნული გვარის ოთხი სახეობა, მათგან სამი სახეობა: მთის მოცვი (Vaccinium Myrtillus), ლურჯი მოცვი (Vaccinium Corymbosum), წითელი მოცვი (Vaccinium Vitis-ideaea) მიეკუთვნება ბორეალურ კულტურას და გავრცელებულია ალპურ და სუბალპურ სარტყელში.

კავკასიური ანუ მაღალი მოცვი (Vaccinium Arctostaphylos) გავრცელებულია მთის შუა და ქვე–და სარტყლების კოლხური ტიპის ტყეებში და ჩრდილო-აღმოსავლეთ ანატოლიაში. მოცვი გავრცელებულია საქართველოს თითქმის ყველა რეგიონში: აჭარა-გურიის მთებში, აფხაზეთში, რაჭა-ლეჩხუმში, იმერეთში, ქართლში, თიანეთში, სვანეთში, თუშ-ფშავ-ხევსურეთში. ყვავის მაის-ივნისში, ნაყოფი მწიფდება ივლის-აგვისტოში.

მოცვის ველური ფორმა ნაკლებად მომთხოვნია გარემო პირობებისადმი, ხარობს ყველა ტიპის მწირ, ქვაღორღიან და ქვიშნარ ნიადაგებზე, მაგრამ, მაქსიმალურ მოსავალს იძლევა მჟავე

ნიადაგებზე. ნაკლებ მომთხოვნია სინათლისა და ტენის მიმართ, გამოირჩევა ზედაპირული ფესვთა სისტემით და ყინვაგამძლეობით, იტანს 20-25°C ყინვას.

სურათი 1 კულტივირებული ლურჯი მოცვი

დღეისათვის, მსოფლიოში გაკულტივირებული ჯიშებიდან ყველაზე მეტი გავრცელება ჰპოვა ლურჯი მოცვის სახეობამ. მისი ნერგების გამოყვანა-გამრავლება ხდება უჯრედის კულტურის in vitro მეთოდით (სინჯარაში ან კოლბაში) ლაბორატორიულ პირობებში. საკმაოდ მომთხოვნია გარემო პირობების მიმართ. მცენარის ნორმალური ზრდა-განვითარებისათვის და მაღალი მოსა–ვლის მისაღებად ნიადაგის მჟავიანობა (pH) უნდა იყოს 4.0-5.0, ნაკვეთი კარგად დრენაჟირებუ–ლი, გაფხვიერებული, განათებული და ტენით უზრუნველყოფილი. მისი კულტივირება წარმა–ტებით ხდება დასავლეთ საქართველოს შავი ზღვისპირეთის რეგიონებში ადრე არსებული ჩაის პლანტაციების ნამყოფ ფართობებზე (სურ.1) [2].

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ლურჯი მოცვის შეყვანა in vitro კულტურაში და ფიტოჰო–რმონების გავლენის შესწავლა მიკროკლონალური გამრავლების დროს. მიზნის მისაღწევად განხორციელდა შემდეგი ამოცანები: შერჩეული იქნა ლურჯი მოცვის in vitro კულტურაში შე–ყვანის პირობები და მიკროკლონალური გამრავლების პროცესები. შესწავლილი იქნა ზრდის რე–გულატორებისა და კულტივირების ფიზიკური პირობების გავლენა საკუთრივ მიკროკლო–ნალური გამრავლების ეტაპებზე.

კვლევის მეთოდიკა. In vitro მეთოდის განხორციელების ძირითადი ამოცანებია: მცენარის in vitro კულტურაში შეყვანის პირობების შემუშავება, მიკროკლონალური გამრავლებისათვის პრო–ცესების შერჩევა და ოპტიმიზაცია, ზრდის რეგულატორებისა და კულტივირების ფიზიკური პირობების გავლენის შესწავლა საკუთრივ მიკროკლონალური გამრავლების ეტაპებზე, დაფესვიანებული მცენარე-რეგენერანტების აკლიმატიზაციის პროცესის შესწავლა.

ექსპლანტის in vitro კულტურაში შეყვანის პირველ ეტაპზე, ერთ-ერთი რთული და შრო–მატევადი პროცესია სტერილიზაციის ოპტიმალური პირობების შემუშავება და მასტელირებელი აგენტების სწორად შერჩევა. მასტელირებელი ნივთიერებების სახით გამოიყენება შემდეგი წყალხსნარების მოქმედება: ა) კომერციული ქლორიანი ხსნარი. შემადგენლობით-ნატრიუმის ჰიპოქლორიდი: წყალი 50/50 და 25/75 თანაფარდობით; ბ)პრეპარატი დიოციდი შემადგენლობით: ეთანოლმერკუ-რქლორიდი, ცეტილპირიდოქლორიდი ½ თანაფარდობით 0.1/0.2 და 0.5% წყალ–ხსნარები; გ) ქლორამინ Б-ს 10-15 %-იანი წყალხსნარი, რომელსაც ზედაპირული სტერილიზაციის გამააქტი-ურებელი აგენტის სახით ემატება ,,ტვინ-80“-ის რამდენიმე წვეთი [1,3].

მასტელირებელი ნივთიერებების სახით ჩვენს მიერ შესწავლილი და გამოცდილი იქნა შემდეგი წყალხსნარების მოქმედება:

ა) კომერციული ქლორიანი ხსნარი შემდეგი შემადგენლობით: ნატრიუმის ჰიპოქლორიდი წყალი 50/50 და 25/75 თანაფარდობით;

ბ)პრეპარატი დიოციდი. შემადგენლობით-ეთანოლმერკურქლორიდი, ცეტილპირიდოქლორიდი ½ თანაფარდობით 0.1/0.2 და 0,5 წყალხსნარები.

გ) ქლორამინ Б-ს 10-15-იანი წყალხსნარი, რომელსაც ზედაპირული სტერილიზაციის გამააქტიურებელი აგენტის სახით დამატებული გვქონდა ,,ტვინ-80"-ის რამდენიმე წვეთი.

მასტერილებელი ნივთიერებები

ცხრილი 1.

მასტერილებელი ხსნარი	კონცენტრაცია %	ექსპოზიცია (წთ)	არაინფიცირებულთა %	სიცოცხლის-უნარიანობა
ქლორამინ Б	10	20	20	82
	15	20	32.0	78
კომერციული ქლორიანი წყალხსნარი	25	20	35.0	100
	50	20	49.0	100
დიოციდი	0.1	15	34.0	93.0
	0.2	15	58.0	92.0
	0.5	15	86.0	69.0

როგორც 1-ლი ცხრილიდან ჩანს არაინფიცირებული მასალის გამოსავალი დაბალი იყო და შეადგენდა 20 და 32% კონცენტრაციათა შესაბამისად. შედარებით უკეთესი ეფექტი აჩვენა კომერციულმა ქლორიანმა წყალხსნარმა-არაინფიცირებულთა რაოდენობა პროცენტულად შეადგენდა 35-49%-ს. ზედაპირული სტერილიზაციის დადებითი ეფექტი მიღწეული იქნა პრეპარატ ,,დიოციდის'' გამოყენების შედეგად. ინფიცირების დაბალი ხარისხი გამოწვეული იყო 0.5%-იანი ხსნარის მეშვეობით, რომლის გავლენითაც არაინფიცირებულთა რაოდენობა 86%-ს შეადგენდა. მაგრამ ასეპტიკურ კულტურათა სიცოცხლისუნარიანობა ყველა გამოცდილ მასტერილებელ აგენტებთან შედარებით დაბალი აღმოჩნდა, რაც გამოწვეული იყო იმით, რომ დიოციდი ძლიერ ტოქსიკურია და მაღალი კონცენტრაციით იწვევდა ქსოვილის ინტოქსიკაციას. ზედაპირული სტერილიზაციის პროცედურის შედეგებმა ცხადყო, რომ სიცოცხლისუნარიანი ასეპტიკური მასალის გამოსავალზე გავლენას ახდენდა მასტერილებელი ნივთიერების კონცენტრაცია, ხსნარში ექსპლანტთა დაყოვნების ხანგრძლივობა და ექსპლანტთა ტიპი.

ექსპერიმენტისათვის პირველად მასალას ვიღებდით მოცვის დედა მცენარიდან, როგორც დახურული ასევე, ღია გრუნტის პირობებში. ზრდასრული მცენარეებიდან ვიღებდით:

ა) სანაშენე პლანტაციებში მზარდი მცენარიდან იღლიურ და აპიკალურ კვირტებს, ახალგაზრდა ყლორტების ფოთლებსა და ღეროებს;

ბ) სათბურებში ვეგეტირებადი მცენარეებიდან - იღლიურ და აპიკალურ კვირტებს;

იუვენილურ ფაზაში მყოფი მცენარეებიდან ვიღებდით:

ა) სათბურში გამოყვანილი 3-4 თვიანი ნარგავებიდან - მძინარე და აპიკალურ კვირტებს, ღეროს ქსოვილსა და ფოთლებს;

ბ) ნათესარიდან მიღებულ in vitro თესლის კულტივირებით - მთლიანად ყლორტს ფესვის გარეშე;

გ) რეიუვენილიზირებული მასალას, რომელიც მიღებული იქნა ზრდასრული მცენარის in vitro კულტივირების შედეგად - ყლორტები, კვირტები და ფოთლები;

ექსპერიმენტის დროს გამოვიყენეთ ორი საკვები არე: მურასიგე-სკუგის მოდიფიცირებული და ანდერსონის საკვები არე. ლურჯი მოცვის აპიკალურ და იღლიურ კვირტებს ვათავსებდით ზემოთ აღნიშულ მინერალური შედგენილობის საკვებ არეებზე.

მურასიგე-სკუგის მოდიფიცირებული საკვები არე - შედგენილობით:

ვიტამინი C – 1,0 მგ/ლ; B1 – 1,0 მგ/ლ, B6 – 0,5 მგ/ლ, ნიკოტინის მჟავა – 0,5 მგ/ლ; ინოზიტოლი – 100 მგ/ლ, რკინის ხელატი ორმაგი შემცველობით, საქაროზა 20 გ/ლ, აგარ-აგარი – 8 გ/ლ.

ანდერსონის საკვები არე - შემადგენლობით: მაკროელემენტები -NH_4NO_3 – 400მგ/ლ; KNO_3 – 480მგ/ლ; $MgSO_4 \cdot 7H2O$ – 180მგ/ლ; $Na_2PO_4 \cdot H_2O$ – 330,6მგ/ლ; $CaCl_2$ – 322,2მგ/ლ ; NH_4NO_3 ; მიკროელემენტები - M_3BO_3 – 6,2მგ/ლ ; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 16,9მგ/ლ; $ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$ – 8,6მგ/ლ; KJ- 0,3მგ/ლ; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,25მგ/ლ; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,0025მგ/ლ; $CoCl2 \cdot 5H_2O$ – 0,025მგ/ლ; ფექსელატი - $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 55,7 მგ/ლ; Na_2 – ЭДТА – 74,5მგ/ლ; ვიტამინები - B1, B6, PP – 0,5 მგ/ლ; C – 1,5 მგ/ლ; მენოინოზიტი– 100; ფიტოჰორმონები - 6-БАП – 0,5 მგ/ლ; შაქარი - საქაროზა 20 გ/ლ [4].

ლურჯი მოცვის de novo ყლორტების წარმოქმნა განსხვავებულ საკვებ არეებზე

ცხრილი 2.

კვლევის ობიექტის დასახელება	მურასიგე-სკუგის (მოდიფიცირებული) საკვები არე			ანდერსონის საკვები არე		
	ექსპლანტის რაობა	de novo ყლორტების წარმოქმნის უნარიანი რაობა	%	ექსპლანტის რაობა	de novo ყლორტების წარმოქმნის უნარიანი რაობა	%
ლურჯი მოცვი	150	127	85	150	58	39

მცენარე-რეგენერანტების საერთო რაოდენობიდან (150 ცალი) აკლიმატიზაციის პერიოდში დაიღუპა 23 მცენარე, ხოლო de novo ყლორტების წარმოქმნის უნარიანი აღმოჩნდა 127 მურასიგე-სკუგის (მოდიფიცირებული) საკვებ არეზე. ანდერსონის საკვებ არეზე 150 მცენარე-რეგენერა-ნტებიდან აკლიმატიზაციის პერიოდში დაიღუპა 92 მცენარე, de novo ყლორტების წარმოქმნის უნარიანი აღმოჩნდა 58 (ცხრილი 2).

ექსპერიმენტის შედეგების მიხედვით სხვადასხვა საკვებ არეზე ექსპლანტების კულტივირებას თან ახლდა განსხვავებული ეფექტი. ანდერსონის მინერალური მარილების შემცველ საკვებ არეზე განვითარდა სუსტი კვირტები, რომელთა საშუალო სიმაღლე არ აღემატებოდა 2-5 მმ-ს. ახალი ფოთლების განვითარება ძალიან ნელა და სუსტად მიმდინარეობდა, რომელთა პასაჟის ბოლოს ყვითლდებოდა და ცვიოდა კოლბაში, ყლორტის ძირითადი ღერძი კი შიშვლდებოდა.

ორივე საკვებ არეზე ადგილი ჰქონდა ექსპლანტის ბაზალურ ნაწილში მორფოგენური კალუსის განვითარებას. მასზე ჩნდებოდა მეწამული ფერის მორფოგენეტიკური კვანძები, რომლიდანაც ფორმირდებოდა პრომორდიალური კვირტები, მაგრამ ეს კვირტები ღეროსული მორფოგენეზით არ ხასიათდებოდნენ. რის გამოც, ანდერსონის საკვები არე ექსპერიმენტიდან სრულიად უგუ–ლვებელყავით, ხოლო მურასიგე-სკუგის მოდიფიცირებული საკვებ არეზე კარგად მიმდინარე-ობდა de novo კვირტების ჩასახვა, ადვენტური კვირტების წარმოქმნა და იღლიური კვირტების ინდუქცია. პასაჟის ბოლოს განვითარდა ნორმალური სიცოცხლისუნარიანი ყლორტები.

შედეგები და განხილვა

როგორც ექსპერიმენტის შედეგებმა გვიჩვენა მორცვი არც თუ ისე ადვილი და პლასტიკური ობიექტი აღმოჩნდა უჯრედული ტექნოლოგიისათვის, რადგანაც საკვები არეების და ფიტო–ფორმონთა კომბინაციების რამდენიმე ვარიანტი გადაისინჯა ოპტიმალური ფორმულის მიღებამდე.

მიკროგამრავლების მაღალი კოეფიციენტის უზრუნველსაყოფად საჭირო იყო:

ა) საკვები არის ოპტიმიზაცია სხვადასხვა ბუნებისა და კონცენტრაციის ფიტოჰორმონებით (ძირითადად გამოიყენებოდა ციტოკინინები და აუქსინები);

ბ) სუბკულტურების განახლება ახალ საკვებ არეზე ყოველ 20-25 დღეში, კულტივირების ფიზიკური პირობების ოპტიმიზაციით;

ფიტოფორმონების გავლენის შესწავლამ გვიჩვენა, რომ აღნიშნული ნივთიერებები მთავარი და აუცილებელი ფაქტორია ორგანოგენური პროცესების ინდუქციისათვის. ვინაიდან უჰორმონო საკვებ არეზე კვირტების ზრდის პროცესი შეჩერებული იყო და ხდებოდა ნორმალური ფიზიოლოგიური პროცესების ბლოკირება. ექსპლანტი 0-ოვან და I პაჟში ინარჩუნებდა საწყის ფენოტიპს, ხოლო შემდეგ პასაჟში მსხვილდებოდა, უხეშდებოდა და საბოლოოდ იღუპებოდა.

ყველა გამოცდილ საკვებ არეზე ექსპლანტები ხასიათდებოდნენ მერისტემული ყლორტების რეგენერირების პოტენციალით, მაგრამ სხვადასხვანაირად პასუხობდნენ საკვებ არეში ფიტოჰორმონების განსხვავებულ კონცენტრაციას.

ციტოკინონების დაბალი შემცველობის (5 მკმ) შემთხვევაში შეიმჩნეოდა აპიკალური მორფო–გენეზის სტიმულაცია. ყლორტების სიმაღლე და მუხლთშორისების საშუალო რაოდენობა შეადგენდა 63.1 მმ და 5.7 ერთეულს. აპიკალური კვირტები საშუალო რიცხვი ტოლი იყო - 5.0, ხოლო ადვენტური კვირტებისა 2.6 (ცხრილი 3). ბენზილამინოპურინის (ბაპ) შემცველობის გაზრდა იწვევდა ადვენტურ კვირტთა რაოდენობის მომატებას და აპიკალურად მზარდი კვირტების შემცირებას. ამ პროცესს აძლიერებდა საკვებ არეში ნაფტილძმარმჟავას (ნძმ) დამატება.

ბენზილამინოპურინის გავლენა მიკროგამრავლების განვითარების ზოგიერთ მახასიათებელზე

ცხრილი 3

ანდერსონს+ბაპ კონცენტრაცია	განვითარებული ყლორტების რაობა	ყლორტის სიგრძე მმ	ადვენტურ კვირტთა რაობა	აპიკალურ კვირტთა რაობა
-	-	8.1	-	1
5	50.1	63.1	5.7	2.6
10	60.0	54.3	11.2	4.2
15	65.6	47.2	15.4	3.5
20	70.1	21.2	22.1	3.0

ამრიგად, უჯრედის, ქსოვილისა და ორგანოს კულტივირების in vitro მეთოდი უთუოდ დიდ ეფექტს იძლევა კულტივირებული, ლურჯი მოცვის დაჩქარებული მასიური გამრავლების უზრუნველყოფისათვის.

ლიტერატურა

1. ნ.ალასანია „პასიფლორას (Passiflora incarnatae L.) მორფოგენეზის თავისებურებანი in vitro სისტემაში „ .დისერტაცია. თბილისი 2000., გვ.135
2. ქართული საბჭოთა ენციკლოპედია. ტომი 7. თბილისი 1984., გვ.152
3. С.Н.Тимофеева, Ю.В.Смолькина. Н.В.Ананасова, О.И.Юдакова. Технологии Микроразмножения in vitro. Саратов. 2026 ст.38
4. С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Д.Г. Шорников [и др.]. Особенности введения в культуру in vitro плодовых и ягодных растений // Плодоводство. ИП НАН Беларуси. Самохваловичи, 2005. Т. 17, Ч. 2. С. 102-104.

The Impact of the Auxins on the Blueberry Micro clonal Reproduction in In Vitro Culture

N. Alasania- Candidate of Agricultural Sciences,
N. Lomtatidze- Candidate of Biological Sciences,
D.Jashi- Candidate of Agricultural Sciences

Key words: Microwave, Explants, Sterilization, Phytohormone, Petrolaminopurin, Cytokinin

Abstract

Method of in vitro culture makes it possible to create an initial material which is essential for selection. It represents an opportunity for improving the existing agriculture and creating a new one. It also makes it possible to form various kinds of plant gene pool of a practical importance through somatic hybridization.

The aim of our research was to encompass blueberry in in vitro culture and study the impact of the phyto hormones during the micro clonal reproduction.

In order to achieve our goals, the following objectives have been implemented: the conditions of encompassing blueberry in in vitro culture and the processes of micro clonal reproduction have been selected.

The impact of the growth regulators and the influence of the physical conditions of cultivation on micro clonal reproduction stages have been studied. Modified consistency of nutrition area and the concentrations of the hormonal substances have been selected. Blueberry organogenesis on the artificial nutrition area has been reached and micro clones have been received. The nature of auxins has been determined.