კენკროვანი კულტურების *In vitro* გამრავლების ტექნოლოგიები

დინარა დევაძე, თამარ კაჭარავა
(საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი)

რეზიუმე: მცენარეთა მიკროკლონური, ანუ *in vitro* კულტურაში ქსოვილური კულტურის მეთოდით, გამრავლება თანამედროვე ტექნოლოგიაა, რომელიც სანერგე მასალის წარმოების ტრადიციულ მეთოდებთან შედარებით მთელი რიგი უპირატესობებით გამოირჩევა. იგი წარმატებით გამოიყენება კენკროვანი კულტურების ნერგების მასობრივი წარმოებისათვის. მცენარეთა მიკროკლონურ გამრავლებას დიდი პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს, რადგან აღნიშნული ტექნოლოგია უზრუნველყოფს ვირუსებისა და სოკოებისაგან გაჯანსაღებული სარგავი მასალის წარმოებას გამრავლების მაღალი კოეფიციენტით. ცნობილია, რომ ვირუსებით დაავადებული მცენარე მცირე მოსავლიანობით ხასიათდება.

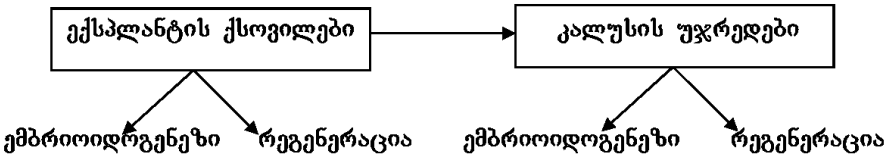
საკვანძო სიტყვები: *in vitro* გამრავლება; კენკროვანი კულტურები; მიკროკლონური გამრავლება.

შესავალი

In vitro კულტურაში კენკროვნების გამრავლებისას უპირატესობა ენიჭება ვეგეტატიურ და გენერაციულ გამრავლებას. გამრავლების გენერატიული მეთოდი გამოიყენება ვირუსებისაგან გასუფთავებული სარგავი მასალის წარმოებისა და მცენარეთა სელექციისათვის როგორც ძირითად, ისე დამხმარე საშუალებად.

კენკროვანი კულტურების ვეგეტატიური გამრავლება როგორც ტრადიციული მეთოდებით, ისე *In vitro* სისტემაში შეიძლება განხორციელდეს ორი გზით, ერთია ცალკეულ ორგანოთა და მთელი ორგანიზმის უშუალო რეგენერაცია, მეორე კი სომატური ჩანასახების წარმოქმნა და შემდეგ მათგან ახალი ორგანიზმის განვითარება (ემბრიოიდოგენეზი).

აღსანიშნავია, რომ რეგენერაცია და ემბრიოიდოგენეზი შეიძლება წარიმართოს როგორც უშუალოდ ექსპლანტის ქსოვილებში, ისე რეალურ უჯრედებში.



In vitro სისტემაში გამრავლებისათვის ყველაზე პერსპექტიული გზაა დედა მცენარის ქსოვილებიდან პირდაპირი ორგანოგენეზის ინდუქცია, ხოლო ყველაზე მოხერხებული ობიექტი პირდაპირი ორგანოგენეზისათვის მცენარის ვეგეტატიური კვირტებია, რომლებიც

ნაკლებსპეციალიზებული მერისტემული ქსოვილებისაგან შედგება. *In vitro* კულტურისათვის ექსპლანტი შეიძლება იყოს ნორჩი ან გამერქნებული ყლორტებისაგან დამზადებული კალმები, ვეგეტაციური კვირტები და იზოლირებული მერისტემები [1].

ძირითადი ნაწილი

In vitro სისტემაში მცენარის ორგანოგენეზი ისევე მიმდინარეობს, როგორც *in vivo*-ში, ოღონდ იმ განსხვავებით, რომ *in vitro*-ში ციტოკინინური ბუნების მქონე ნაერთების სიჭარბის გამო ხდება არა მარტო წვერული მერისტემის განვითარება, არამედ ინიცირდება მიკროყლორტების კონგლომერატის განვითარებაც. ამ დროს ერთდროულად მიმდინარეობს რამდენიმე პროცესი: აპიკალური დომინირების მოხსნა, მუხლთშორისების დამოკლება, ნამხრის კვირტებისა და მერისტემული ბორცვების ინიციაცია, მათგან ახალი ყლორტების განვითარება. პირდაპირი ორგანოგენეზის ეს მოდელი უნივერსალურია და გამოიყენება სახეობათა დიდი რაოდენობისათვის. ამავე დროს *in vitro* სისტემაში ხილისა და კენკროვნების სანერგე მასალის წარმოებისათვის იგი ყველაზე სანდო მეთოდია, მაგრამ თითოეული კულტურის ორგანოგენეზი მთელი რიგი თავისებურებებით ხასიათდება, რადგან საჭიროებს განსაკუთრებულ მიდგომას, აქვს თავისი მოთხოვნები საკვები არის მინერალური კომპონენტების, ნახშირწყლების, ფიტოჰორმონების თვისებრივი თუ რაოდენობრივი შემცველობისადმი გამრავლების სხვადასხვა ეტაპზე კულტივირების ფიზიკური პირობების მიმართ.

მექანიკური თვალსაზრისით, *in vitro* სისტემაში გამრავლება შეიძლება რამდენიმე ეტაპად დაიყოს:

1. ექსპლანტის იზოლაცია და სტერილიზაცია, საკვებ არეზე მისი ზრდისათვის საჭირო პირობების შექმნა (ინიციაცია);
2. მიკრომცენარეთა რაოდენობის მაქსიმალური გაზრდა (საკუთრივ მიკროგამრავლება);
3. გამრავლებული ყლორტების დაფესვიანება (რიზოგენეზი);
4. *In vitro* პირობებიდან *ex vitro* პირობებში დაბრუნება (რეგენერანტთა-აკლიმატიზაცია-ადაპტაცია).

კენკროვანი კულტურების ინიციაცია *in vitro* სისტემაში. ყველაზე შრომატევადი ეტაპები *in vitro* ტექნოლოგიით მცენარეთა კულტივირებისას არის გარდამავალი სტადიები – *in vivo* → *in vitro* → *ex vitro*.

In vitro სისტემაში მცენარის გადაყვანისას ძირითად პრობლემას წარმოადგენს პათოგენური მიკროორგანიზმებისაგან მისი ექსპლანტის ქსოვილების დაუზიანებლად გათავისუფლება, რათა არ მოხდეს მცენარის იზოლირებული ნაწილის კვებისა და განვითარების სისტემების დარღვევა. ჯიშების მასშტაბური გამრავლებისას უპირატესობას ანიჭებენ ექსპლანტების ყოველწლიურ განახლებას პასაჟების რაოდენობის შესამცირებლად, რათა თავიდან იქნეს აცილებული მუტაგენეზი და სხვა ანომალიები, რომლებიც შეიძლება წარმოიქმნას ხელოვნურ საკვებ არეზე ხანგრძლივი კულტივირებისას [2].

In vitro სისტემაში კულტურის ინიციაციის ეფექტიანობაზე მოქმედი ძირითადი ფაქტორებიდან შეიძლება გამოვყოთ: საწყისი ექსპლანტის ზომა, იზოლირების პერიოდი, ექსპლანტის მდებარეობა დედა მცენარეზე, საკვები არის შედგენილობა. თუმცა, როგორც გამოკვლევებმა ცხადყო, საკმაოდ მნიშვნელოვანია ირიბი ფაქტორებიც, რომლებიც დამოკიდებული არაა ექსპლანტის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაზე, მათ შორის სტერილიზაციის სისტემაზე, ექსპლანტის გამოყოფის სიჩქარესა და ხარისხზე. საწარმოო ბიოტექ-

ნოლოგიაში მიკროგამრავლების მეთოდების გამოყენებისას სტერილიზაციის ეფექტური სისტემების შემუშავება პირველი რიგის ამოცანაა.

მასტერილებელმა აგენტმა მთლიანად უნდა მოსპოს პათოგენური მიკროფლორა მცენარის ქსოვილთა ზედაპირიდან და ამავე დროს არ დააზიანოს უჯრედები, რომლებიც აგებულებით ჰგავს პათოგენურ უჯრედებს. მცენარეთა ყველა ორგანოს გარე ქსოვილები ინფიცირებულია პათოგენური მიკროორგანიზმების სხვადასხვა ჯგუფით, ხოლო შიგა ქსოვილები, როგორც წესი, სტერილურია. იდეალური მასტერილებელი ნივთიერება როგორც კი დახოცავს პათოგენებს, იოლად უნდა მოშორდეს მათ, რათა ტოქსიკურად არ იმოქმედოს მცენარის ქსოვილებზე არც პირდაპირ და არც ირიბად საკვები არის საშუალებით. ყველა მასტერილებელი ნივთიერებისათვის ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი პირობაა ზედაპირის კარგად დასველება და ადვილად ჩამორეცხვა გამოხდილი წყლით, წინააღმდეგ შემთხვევაში მოხდება მცენარეული ქსოვილების დაწვა და ნეკროზი.

მცენარეული ქსოვილების ზედაპირული სტერილიზაციისათვის არსებობს ქიმიურ ნაერთთა დიდი ჯგუფი: აქტიური ქლორის შემცველი ნაერთები (ქლორამინი, ნატრიუმისა და კალციუმის ჰიპოქლორიდები, ქლორიანი კირი); ვერცხლისწყლის შემცველი ნაერთები (ორქლორიანი ვერცხლისწყალი – სულემა, მერტიოლატი, დიოციდი); ასევე ვერცხლის ნიტრატი, წყალბადის ზეჟანგი, ბრომი.

მცენარეული ექსპლანტების ზედაპირული სტერილიზაციისათვის ერთი მასტერილებელი ნივთიერება სოკოვანი და ბაქტერიული პათოგენებისაგან გასაწმენდად არასაკმარისია, რის გამოც საჭიროა კომპლექსური მრავალსაფეხურიანი სტერილიზაცია, რაც რამდენიმე მასტერილებელი აგენტის მოქმედებასა და მათ ჩამორეცხვას ითვალისწინებს.

კენკროვანი კულტურების მერისტემების *in vitro* სისტემაში შეყვანისას ოპტიმალურია სასტერილიზაციო პროცედურების შემდეგი თანმიმდევრობის დაცვა:

- ვეგეტატიური კვირტების გარეცხვა გამდინარე წყლით;
- კანის (ქერქის) ქერცლების მოცილება ჯერ ბაქტერიციდული ან ფუნგიციდური ხსნარით და შემდეგ გამდინარე წყლით გარეცხვა;
- 70 %-იანი ეთილის სპირტით დამუშავება;
- ძირითადი სტერილიზაცია;
- მასტერილებელი აგენტის მოშორება სტერილურ წყალში სამჯერადი გარეცხვით;
- მერისტემების გამოყოფა სტერილურ პირობებში.

სხვადასხვა კულტურის წინასწარი სტერილიზაციისათვის ბაქტერიციდულ და ფუნგიციდურ ხსნარებად წარმატებით გამოიყენება 70 %-იანი ეთანოლი, ხოლო ძირითადი სტერილიზაციისათვის საჭიროა ექსპლანტების დამუშავება 30 %-იანი წყალბადის ზეჟანგით, 0,1 %-იანი ვერცხლისწყლის (II) ქლორიდით, 0,1 %-იანი ვერცხლის ნიტრატითა და 0,01 %-იანი მერტიოლატით.

სტერილიზაციის ოპტიმალური რეჟიმის გამოყენების შემთხვევაში *in vitro* სისტემაში შეყვანილი მერისტემების სტერილობის ხარისხი საკმაოდ მაღალია (75 %), რაც კენკროვანი კულტურების მასობრივი მიკროგამრავლების კარგ შედეგებს იძლევა.

In vitro კულტურაში შესაყვანი ექსპლანტის ზომის შემცირებასთან ერთად მცირდება ინფიცირებული დანეკროზებული ექსპლანტების რაოდენობაც. მერისტემისათვის ინფიცირებული ექსპლანტების რაოდენობაა 10,3, ანუ 17 %-ია, დანეკროზებულისა – 1,8 (0,5 %). როცა კულტურაში შეგვყავს წვერის მერისტემა, სიცოცხლისუნარიან ექსპლანტთა გამოსავალი მაქსიმალურია – 74,7 (5,9 %), რაც კვირტის შემთხვევაში 22,9-ს (3,9 %), ხოლო კალმის შემთხვევაში 18,0-ს (1,4 %) შეადგენს.

პრაქტიკაში უფრო ხშირად მიმართავენ კვირტით გამრავლებას, ეს იმ შემთხვევაში, თუ საქმე არ ეხება კულტურის ვირუსებისაგან ან მიკოპლაზმებისაგან გაწმენდას.

უეკლო მაყვლის ინიციაცია *in vitro* სისტემაში. უეკლო მაყვალი მრავალწლოვანი, ხვიარა ბუჩქის ფორმის კენკროვანი კულტურაა. მისი ნაყოფი მოტკბო-მომჟავოა, გამოიყენება როგორც ნედლი, ისე მშრალი სახით. ხდება მისი სამრეწველო გადამუშავებაც. გამოკვლევების ჩატარებისას ექსპლანტები აღებულ იქნა ბათუმის ბოტანიკური ბაღის ტერიტორიაზე ზრდასრული მცენარეებისაგან. ექსპლანტთა აღება მოხდა დეკემბერში, თებერვალში, მარტში, აპრილში, მაისში, ივნისსა და ივლისში. ექსპლანტებად გამოყენებულ იქნა ვეგეტაციური კვირტები და მერისტემა.

უეკლო მაყვლის რტოებს მოჭრის შემდეგ საფეხურებივად უტარდება ზედაპირული სტერილიზაცია, ირეცხება ჯერ გამდინარე წყლით, შემდეგ დეტერგენტით და ბოლოს ისევ გამდინარე დისტილირებული წყლით. მორიგი ოპერაციები უკვე ლამინარ-ბოქსში ტარდებოდა. გარეცხილი ექსპლანტების სტერილიზაცია ხდებოდა 70 %-იანი ეთანოლითა და 0,1 %-იანი ვერცხლისწყლის ქლორიდით, შემდეგ კვლავ ირეცხებოდა სტერილური დისტილირებული წყლით და შეყვანილი იყო მურასიგესა და სკუგის (MS) ძირითად არეში, რომელსაც დამატებული ჰქონდა ვიტამინები, ბენზილამინოპურინი (1 მგ/ლ), ასკორბინის მჟავა (0,5 მგ/ლ, როგორც ანტიოქსიდანტი), 0,3 % საქაროზა და აგარ-აგარი (7 გ/ლ).

1-ლ ცხრილში მოყვანილია *in vitro* კულტურაში მაყვლის სხვადასხვა ტიპის ექსპლანტის ინიციაციის შედეგები. ექსპერიმენტის დროს გამოყენებული იყო ერთწლიანი ნაყარის კალმები, ვეგეტატიური კვირტები და აპიკალური მერისტემა. სამეცნიერო მონაცემების მიხედვით [3, 4], ხილ-კენკროვანთა კულტურაში შეყვანისას საუკეთესო შედეგებია მიღებული ექსპლანტებად მერისტემის გამოყენების შემთხვევაში. დიდი ზომის ექსპლანტების გამოყენება განპირობებულია იმით, რომ მათი ჩარგვა სინჯარებში გაცილებით ადვილია. ამასთან, ბევრად უფრო ნაკლები რაოდენობის ძვირად ღირებული ფიტოჰორმონია საჭირო; კვირტები სწრაფად იღვიძებს და იწყებს პროლიფერაციას შემდეგ პასაჟებში. ამ მონაცემების საწინააღმდეგოდ, ცხრილიდან ჩანს, საუკეთესო შედეგები მიიღება ექსპლანტებად ვეგეტატიური კვირტების გამოყენებისას.

ცხრილი 1

მაყვლის სხვადასხვა ტიპის ექსპლანტების *in vitro* სისტემაში ინიცირების შედეგები

კულტურა	ექსპლანტის ტიპი	ექსპლანტები		
		დარგულია, ცალი	ინფიცირებული ან დანეკროზებული, %	ვითარდება, %
მაყვალი	ერთწლიანი ნაყარი	120	33,3	66,7
	ვეგეტატიური კვირტები	33	30,3	69,7
	მერისტემა	40	75,0	25

უნდა აღინიშნოს, რომ დიდი ზომის ექსპლანტების გამოყენების დროს საკვებ არეში ყოველთვის იწყება პირდაპირი ორგანოგენეზი, არ ხდება ქსოვილთა განვითარება, რაც ძალზე მნიშვნელოვანია დიდი რაოდენობით სარგავი მასალის მოსამზადებლად. როცა *in vitro* კულტურაში შესაყვანად კალმის და ვეგეტატიურ კვირტებს ვიყენებთ, ექსპლანტები სწრაფად იწყებს ზრდას. კალმებზე არსებული და გამოყოფილი კვირტები 7–9 დღის

შემდეგ იბერება, 14–17 დღის შემდეგ კი ჩნდება მიკროყლორტები, რომლებიც უკვე მზადაა გადასარგავად და კონგლომერატების მისაღებად, ხოლო პირველი გადარგვიდან 21–25 დღის შემდეგ წარმოიქმნება დაკალმებისათვის ვარგისი 10–30 მიკროყლორტისაგან შემდგარი კონგლომერატები.

მაყვლის კალმების *in vitro* სისტემაში შეყვანისას, კალმის თხევად არეში გადატანიდან 25–40 დღის შემდეგ გამრავლების კოეფიციენტი იყო 3–10, ხოლო, როცა აპიკალურ მერისტემას ვიყენებდით, 35–40 დღის შემდეგ ექსპლანტზე მხოლოდ მიკროკვირტების წარმოქმნა იწყებოდა. მიკრომცენარის ფორმირება მერისტემული კულტურიდან ხდება მომდევნო პასაჟის განმავლობაში; ამასთან, საწყის ეტაპზე გამრავლების კოეფიციენტი საკმაოდ დაბალია. მიუხედავად იმისა, რომ სიცოცხლის უნარის მქონე ექსპლანტების მაქსიმალური რაოდენობა აღინიშნება მერისტემული წვერების კულტურაში შეყვანისას (დროის გათვალისწინებით), კულტურაში ინიციაციის შედეგები კიდევ უფრო მაღალია კალმების გამოყენების შემთხვევაში.

ხილ-კენკროვანთა ექსპლანტების *in vitro* კულტურაში შესაყვანად გამოიყენება საკვები არეები მაკრო- და მიკროელემენტების სხვადასხვა შემცველობით. საკვებ არეებს ემატება ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები, რომელთა სახე და რაოდენობა დამოკიდებულია მცენარის სახეობაზე, ექსპლანტის ტიპსა და შეყვანის მიზანზე.

დიდი ზომის ექსპლანტების გამოყენების შემთხვევაში საკვები არის შედგენილობა არ არის გადამწყვეტი ფაქტორი ზრდის ინიციაციისათვის. როგორც წესი, ასეთ შემთხვევაში იყენებენ თხევად საკვებ არეებს (აგარ-აგარის დამატების გარეშე) მურასიგესა და სკუგის მაკრომარილების საფუძველზე დამზადებული ვიტამინებისა და გიბერელინის მჟავას დამატებით.

მცირე ზომის ექსპლანტებს (მათ შორის მერისტემებს) სჭირდება საკვები არის კომპონენტების გულდასმით შერჩევა, რადგან ამ შემთხვევაში ექსპლანტს სამარაგო ნივთიერებები არ გააჩნია და მისი ენდოგენური კვება შეზღუდულია.

როგორც ექსპერიმენტმა დაადასტურა, მაყვლის ექსპლანტების გახარებისათვის საკვები არის მინერალურ შედგენილობას არსებითი მნიშვნელობა არ ჰქონია, ამიტომ სამუშაოები გაგრძელდა მურასიგესა და სკუგის საკვებ არეზე, რომელსაც დამატებული ჰქონდა ვიტამინები და საქაროზა, როგორც ნახშირწყლოვანი კვების წყარო [3, 4].

ცხრილი 2

მაყვლის ექსპლანტებისათვის შერჩეული საკვები არის შედგენილობა

№	ნივთიერება	რაოდენობა, მგ/ლ
1	ვიტამინი B_6 (პირიდოქსინი)	0,5
2	ვიტამინი B_1 (თიამინის ჰიდროქლორიდი)	0,5
3	ვიტამინი PP (ნიკოტინის მჟავა)	0,5
4	ვიტამინი C (ასკორბინის მჟავა)	1,0

ზრდის ინიცირებისათვის საკვებ არეს ვუმატებდით ფიტოჰორმონს, ციტოკინინური ბუნების სინთეზურ პრეპარატ 6-ბენზილამინოპურინს.

მაყვლის ყლორტები საკმაოდ დიდი რაოდენობით შეიცავს ფენოლურ ნაერთებს. ექსპლანტის საკვებ არეში გადატანის წინ ხდება ანათლის განახლება. დაზიანებული ადგილიდან საკვებ არეში გადადის ფენოლები, იჟანგება და წამლავს საკვებ არეს, რაც ვი-

ზუალურად საკვები არის გამუქებით გამოიხატება. ამ პროცესის საწინააღმდეგოდ ვსარგებ-ლობდით ჩაის ექსპლანტებისათვის განკუთვნილი მეთოდით: ყოველ 16 სთ-ში ექსპლანტი ახალ საკვებ არეში გადაგვქონდა, რის შედეგადაც სასურველი შედეგი დაფიქსირდა.

დასკვნა

ამრიგად, სასურველია საქართველოში შეიქმნას კენკროვანი კულტურების, კერძოდ რემონტანტური მაყვლის გამრავლების თანამედროვე სისტემა. დღეისათვის საწყის ეტაპზეა კვლევით ლაბორატორიაში სინჯარის მცენარეების არსებობა (გამრავლება, განახლება). საქართველოში გამოყვანილი ნერგი ბევრად უფრო იაფი ჯდება შემოტანილთან შედარებით. თანამედროვე ბიოტექნოლოგიური მეთოდის გამოყენებით ასევე უნდა შეიქმნას *in vitro* რემონტანტური მაყვლის სინჯარის მცენარეების კოლექცია. მიღებული შედეგები ადგილობრივი ფორმების გენეტიკური რესურსის შენარჩუნების საშუალებას იძლევა.

ლიტერატურა – REFERENCES – ЛИТЕРАТУРА

1. მ. ღოღობერიძე, ნ. ჭელიძე. მცენარეთა ბიოტექნოლოგიის საფუძვლები. მცენარეთა *in vitro* კულტივირების მეთოდები. თბ., 2009, გვ. 3-4.
2. ნ. ლომთათიძე, ნ. ალასანია, ნ. ზარნაძე, რ. ზარნაძე. იაპონური მუშმალის (*Eriobotria Japonica L.*) მორფოგენეზი *in vitro* არეში//საქართველოს მეცნიერებათა ეროვნული აკადემიის მოამბე. ტ 1, N3, 2009, გვ. 123-125.
3. Бутенко Р. Г. Клеточные культуры: Новый взгляд, Новые технологии, Будущее науки // Международный Ежегодник. М.: Наука, Вып. 16. 1983, с. 136-146.
4. W. C. Anderson. Tissue culture propagation of Rhododendrons. In Vitro. 1978, pp. 14-334.

BIOTECHNOLOGY

BERRY CROPS *In Vitro* PROPAGATION TECHNOLOGIES

D. Devadze, T. Kacharava

(Georgian Technikal University)

Resume: The microclonic propagation of plants in vitro culture, i.e. propagation of plant by the method of tissue culture is the modern technology, that has a number of advantages in comparison with the traditional methods of growing of planting material. This technology will be used in the mass production of berry crop seedlings. Practical importance of microclonic propagation lies in the fact, that this technology provides viruses and fungi refreshed planting materials production multiply odds. It is known, that diseased plants are characterized by low yielding.

Key words: berry crop; *in vitro* propagation; microclonic propagation.

БИОТЕХНОЛОГИЯ

In Vitro ТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР

Девадзе Д. Е., Качарава Т. О.

(Грузинский технический университет)

Резюме. Метод клонального микроразмножения растений in vitro является современной технологией, в том числе ягодных культур. Она имеет ряд преимуществ: освобождение растений от вирусов, бактериальных, грибных болезней и вредителей, повышение урожайности, так как зараженные растения характеризуются низкой урожайностью, получение в сжатые сроки достаточного количества посадочного материала. Новая инновационная технология будет использована для размножения ягодных культур.

Ключевые слова: in vitro размножение; клональное микроразмножение; ягодные культуры.