

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის
სახელმწიფო უნივერსიტეტი

თამარი კუჭავა

ევროპული წაბლის (*Castanea sativa*) ზიგოტური
ემბრიონის კრიოპრეზერვაცია დეჰიდრატაციის და
ვიტრიფიკაციის გამოყენებით

სამაგისტრო პროგრამა: ბიოლოგია
ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური
ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელი: ას. პროფ. მარიამ გაიდამაშვილი

თბილისი 2019

სარჩევი

სარჩევი.....	2
ანოტაცია.....	4
Annotation.....	6
შესავალი.....	7
1. ლიტერატურული მიმოხილვა.....	8
1.1 საქართველოს ტყის კონდის მიმოხილვა.....	8
1.2 ევროპული წაბლის (<i>Castanea sativa</i> Mill.) ბოტანიკური დახასიათება.....	9
1.4 წაბლის ტყეების მდგომარეობა საქართველოში.....	10
1.5 გადაშენების საფრთხის წინაშე მყოფი მცენარეთა კონსერვაციის გზები.....	13
1.6 წაბლის ტყეების კონსერვაციის მიდგომები და გამრავლების გზები.....	15
1.7 მცენარეთა გრძელვადიანი კონსერვაცია კრიოპრეზერვაციის გზით.....	19
2. მეთოდები.....	26
2.1 კვლევის ობიექტი.....	26
2.2 ექსპლანტის იზოლირება და სტერილიზაცია.....	26
2.3 ექსპლანტების დეჰიდრატაცია.....	26
2.4 ემბრიონების დამუშავება PVS-2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით.....	27
2.5 ემბრიონების კრიოპრეზერვაცია და გამოლღობა.....	28
2.6 ემბრიონების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა.....	28
2.7 ემბრიონების აღმოცენების უნარის განსაზღვრა.....	29
2.8 მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავება.....	29
3. კვლევის შედეგები და ანალიზი.....	30

3.1 დეჰიდრატაციით დამუშავებული წაბლის ზიგოტური ემბრიონების სხვადასხვა პარამეტრის შესწავლა.....	30
3.1.1 ზიგოტურ ემბრიონებში ტენის შემცველობა დროის სხვადასხვა პერიოდში გამოშრობის შემდეგ, თხევად აზოტში მოთავსებამდე.....	30
3.1.2 დეჰიდრირებულ, გაუყინავ ზიგოტურ ემბრიონებში ტენის შემცველობის დამოკიდებულება სიცოცხლისუნარიანობასა და გაღვივების ხარისხთან	31
3.1.3 დეჰიდრირებულ ზიგოტურ ემბრიონებში ტენის შემცველობის დამოკიდებულება, თხევადი აზოტიდან გამოლღობის შემდგომ სიცოცხლისუნარიანობასა და გაღვივების ხარისხთან.....	32
3.1.4 დროის სხვადასხვა პერიოდში გამომშრალი, თხევად აზოტში გაუყინავი, ზიგოტური ემბრიონების <i>in vitro</i> აღმონაცენების შეფასება.....	33
3.1.5 დროის სხვადასხვა პერიოდში გამომშრალი, თხევადი აზოტიდან გამომღვალი, ზიგოტური ემბრიონების <i>in vitro</i> აღმონაცენების შეფასება.....	35
3.2 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული წაბლის ზიგოტური ემბრიონების სხვადასხვა პარამეტრის შესწავლა	37
3.2.1 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების სიცოცხლისუნარიანობა თხევად აზოტში გაყინვამდე და გამოლღობის შემდეგ	37
3.1.4 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენების ღეროსა და ფესვის სტატუსის შეფასება თხევად აზოტში გაყინვამდე.....	38
3.1.5 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენების ღეროსა და ფესვის სტატუსის შეფასება თხევადი აზოტიდან გამოლღობის შემდეგ	40
დასკვნები	42
გამოყენებული ლიტერატურა.....	43
დანართები	48

ანოტაცია

მცენარეთა ბიომრავალფეროვნების კონსერვაცია წარმოადგენს თანამედროვეობის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან პრობლემას მსოფლიოში მოსახლეობის პროგრესული ზრდის გათვალისწინებით. კონსერვაცია თამაშობს ფუნდამენტურ როლს ეკოლოგიური და ეკონომიკური მნიშვნელობის მცენარეული სახეობების შენარჩუნებაში. ევროპული წაბლი (*Castanea sativa* Mill.) წარმოადგენს ერთ-ერთ დომინანტურ მერქნიან მცენარეს დასავლეთ საქართველოში. საქართველოს წითელ ნუსხაში მერქნიანი ხემცენარეების წარმომადგენლებს შორის ჩვეულებრივი წაბლი IUCN კატეგორიის მიხედვით წარმოდგენილია მოწყვლადი სტატუსით. უკვე მრავალი ათეული წელია მწვავედ დგას წაბლნარების ხმობის პრობლემა მსოფლიოს იმ ქვეყნებში, სადაც წაბლის სახეობებია გავრცელებული. ინტენსიურად მიმდინარეობს ამ სახეობის სწრაფი გამრავლების საშუალებების და კონსერვაციის გზების ძიება წაბლნარი ტყეების შენარჩუნებისა და აღდგენის მიზნით. ამ თვალსაზრისით, მოცემული სამუშაოს მიზანი იყო ევროპული წაბლის (*Castanea sativa* Mill.) გრძელვადიანი კონსერვაციის ეფექტური პროცედურების შემუშავება *in vitro* ტექნოლოგიის გამოყენებით.

წაბლის გამრავლების ტრადიციული მეთოდები დაკავშირებულია ბევრ სირთულესთან და ამ თვალსაზრისით, ერთ-ერთ უპირატეს გზას წარმოადგენს მისი ხანგრძლივადიანი კონსერვაცია ულტრა დაბალ ტემპერატურაზე (-196°C) თხევად აზოტში. გაყინვით პრეზერვაცია წარმოადგენს ერთადერთ ტექნიკას, რომელიც გარანტირებულად იძლევა პრობლემური სახეობების, როგორცაა არა-ორთოდოქსი ანუ ურჩი თესლის მქონე, ასევე ვეგეტატიურად გამრავლებადი მცენარეების უსაფრთხო და დაბალხარჯიანი ხანგრძლივი კონსერვაციის შესაძლებლობას. აღნიშნულ პირობებში ბიოქიმიური და უმეტესი ფიზიოლოგიური პროცესები შეჩერებულია. ამრიგად, მცენარეული მასალა შეიძლება შენახული იქნას ყოველგვარი ცვლილების გარეშე თეორიულად ულიმიტო დროის განმავლობაში.

მოცემულ ნაშრომში წარმოდგენილია ევროპული წაბლის (*Castanea sativa* Mill.) კრიოპრეზერვაციისათვის შემუშავებული ოპტიმალური მეთოდოლოგია. დადგენილია კრიოპრეზერვაციის შემდგომი მცენარის რეგენერაციის და განვითარების პირობები. ნანახია, რომ თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ საუკეთესო (100 %) სიცოცხლისუნარიანობას და განვითარებას (66.7 %) იძლევა ემბრიონები 21 % ტენის შემცველობით. ვიტრიფიკაციის

ტექნოლოგიით კი ემბრიონების კრიოპრეზერვაციის საუკეთესო მაჩვენებლები აჩვენა ემბრიონების PVS2 ხსნარით 30 წუთიანმა დამუშავებამ.

ამრიგად, დადგენილია, რომ კრიოპრეზერვაციული შენახვისათვის წაბლის ზიგოტური ემბრიონების დამუშავება ორივე, დეჰიდრატაციის და ვიტრიფიკაციის ტექნოლოგიებით იძლევა მცენარის ექსპლანტის გაყინვის შემდგომი სრული რეგენერაციის შესაძლებლობას. ამასთან, მწიფე ემბრიონების დეჰიდრატაცია იძლევა უკეთეს შედეგებს ვიტრიფიკაციის ტექნოლოგიასთან შედარებით გამოლღობის შემდგომ მცენარის განითარების ვადების და მორფოლოგიური მაჩვენებლების მიხედვით.

აღნიშნული კვლევის შედეგები სავარაუდოდ, ხელს შეუწყობს იშვიათი და გადაშენების საფრთხის წინაშე მყოფი სახეობების *ex situ* დაცვის ახალ სტრატეგიას და უზრუნველყოფს გენეტიკური რეზერვების დაჩქარებულ და ეფექტურ კონსერვაციას.

Annotation

The conservation of plant biodiversity is an important issue concerning the human population world wide. Conservation plays a fundamental role in maintaining plant species of ecological and economic importance. Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) is the dominant of mountainous forests of Western Georgia. Chestnut in the Red List of Georgia IUCN category is represented by vulnerable status (VU). Traditional ways of chestnut reproductions are complex and full of drawbacks and one of the most important ways is its long-term conservation at ultra low temperature (-196 °C) in liquid nitrogen. Freeze-preservation is the only technique, which guarantees the possibility of the problematic species, such as non-orthodox seed, also vegetatively plants, of safe and lowest long-term conservation. Under these conditions, biochemical and most physical processes are completely arrested. As such, plant material can be stored for unlimited periods.

In this study, presented the optimal methodology for European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) cryopreservation. It is established, of plant regeneration and development conditions after cryopreservation. The results showed, after thawing the best (100%) viability and plant recovery (66,7 %) have embryos with 21% moisture content. The best for cryopreservation via vitrification, was of embryos with PVS2 solution 30 minutes processing.

It is established, that for cryopreservation-storage, treatment of chestnut zygotic embryos in both, with dehydration and vitrification technologies allow the complete regeneration of the plant after freezing. In addition, dehydration of mature embryos gives better results than vitrification, according to the timing and morphological indicators of the plant, after cryopreservation.

We suppose that the above study will contribute to the protection of rare and endangered plant species and provides of plant genetic resources accelerated and effective conservation.

შესავალი

ტყის ეკოსისტემებს განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვთ საქართველოში ბიომრავალფეროვნების კონსერვაციისთვის. საქართველოს უნიკალური ფიტოგენოფონდი ქვეყნის ბუნებრივ-კულტურული მემკვიდრეობის შემადგენელი ნაწილია, რომლის შესწავლა, დაცვა და აღდგენა მნიშვნელოვანია როგორც ბიომრავალფეროვნების შენარჩუნების, ასევე სოციალურ-ეკონომიკური თვალსაზრისით.

ევროპული წაბლი (*Castanea sativa* Mill.) წარმოადგენს ერთ-ერთ დომინანტურ მერქნიან მცენარეს დასავლეთ საქართველოში. საქართველოს წითელ ნუსხაში მერქნიანი ხემცენარეების წარმომადგენლებს შორის ჩვეულებრივი წაბლი IUCN კატეგორიის მიხედვით წარმოდგენილია მოწყვლადი სტატუსით (IUCN Red List Categories and Criteria version 3.1 2001). ჩვეულებრივ წაბლს დიდი მნიშვნელობა აქვს როგორც ნაყოფის მომცემს, მთრიმლავი ნივთიერებების წყაროს, აგრეთვე დეკორატიულ მცენარეს. უკვე მრავალი ათეული წელია მწვავედ დგას წაბლნარების ხმობის პრობლემა მსოფლიოს იმ ქვეყნებში სადაც კი წაბლის სახეობებია გავრცელებული და ყველგან იკვლევენ და სწავლობენ ხმობის მთავარ მიზეზს, წაბლის კიბოს გამომწვევ სოკოს-*Cryphomectria (Endothia) parasitica*-ს. წაბლის(*Castanea sativa* Mill.) ფიტოსანიტარული მდგომარეობა ამჟამად არ არის დამაკმაყოფილებელი. მის ტრადიციულ გამრავლებასთან დაკავშირებით არსებობს გარკვეული პრობლემები და მუდმივად მიმდინარეობს ალტერნატიული გზების ძებნა.

ქსოვილთა კულტურების ტექნოლოგია გვთავაზობს ორ ძირითად მიდგომას მცენარეთა გენეტიკური რესურსების *ex situ* კონსერვაციისათვის, ნელი ზრდით შენახვა (საშუალოვადიანი კონსერვაცია) და კრიოპრეზერვაცია. კრიოპრეზერვაცია, ანუ გაყინვით პრეზერვაცია წარმოადგენს ერთადერთ ტექნიკას, რომელიც გარანტირებულად იძლევა პრობლემური სახეობების, როგორცაა არა-ორთოდოქსი ანუ ურჩი თესლის მქონე, ასევე ვეგეტატიურად გამრავლებადი მცენარეების უსაფრთხო და დაბალხარჯიანი ხანგრძლივი კონსერვაციის შესაძლებლობას. აღნიშნულ პირობებში ბიოქიმიური და უმეტესი ფიზიოლოგიური პროცესები შეჩერებულია. ამრიგად, მცენარეული მასალა შეიძლება შენახული იქნას ყოველგვარი ცვლილების გარეშე თეორიულად ულიმიტო დროის განმავლობაში.

ჩვენი კვლევის მიზანია ევროპული წაბლის (*Castanea sativa* Mill.) მწიფე ზიგოტური ემბრიონების კრიოპრეზერვაციისათვის ოპტიმალური მეთოდების შემუშავება.

დასახული მიზნის მისაღწევად დავისახეთ შემდეგი ამოცანები:

1. მონაცემთა შეგროვება სამიზნე მცენარის - ევროპული წაბლის (*Castanea sativa* Mill.) საქართველოში გავრცელების და არსებული სახეობის მდგომარეობის შესახებ. წაბლის *in situ* და *ex situ* კოლექციების (ბოტანიკური ბაღები, თესლის ბანკი) გამოკვლევა და შეფასება.
2. მცენარეული მასალის (მწიფე ნაყოფების და თესლის) მოპოვება და ქსოვილთა კულტურების ინიცირებისთვის ექსპლანტის შერჩევა.
3. *In vitro* ყლორტის კულტურების ინიცირება ქსოვილთა კულტურებზე დაფუძნებული კრიოპრეზერვაციის პროცედურებისთვის. *In vitro* კულტურების გაზრდა და სტაბილიზაცია.
4. დეჰიდრატაცია/კრიოპრეზერვაციის ტექნოლოგიის შემუშავება. ემბრიონებში ტენის შემცველობის დამოკიდებულების განსაზღვრა გაყინვისშემდგომი მცენარის სრული განვითარების საფუძველზე. დეჰიდრატაციის საუკეთესო დროის გამოვლენა.
5. PVS2-დამოკიდებული ვიტრიფიკაციის ტექნოლოგიის შემუშავება. PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავების საუკეთესო მეთოდის და სარეგენერაციო პირობების შერჩევა.
6. მიღებული შედეგების ანალიზი და დასკვნების გამოტანა კრიოპრეზერვაციის ოპტიმალური მეთოდების შესახებ.

1. ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 საქართველოს ტყის კონდის მიმოხილვა

საქართველოში ტყეს 3007,6 ათასი ჰექტარი ანუ ქვეყნის ტერიტორიის 40,6 % უკავია. ტყის დიდი ნაწილი (98 %) განლაგებულია მთის ფერდობებზე. მთიანი რეგიონებისთვის ამას განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება რადგან ტყეების უმეტესობა წყალდაცვით, ნიადაგდაცვით, სანიტარულ-ჰიგიენურ, საკურორტო, სანაკრძალო, საპარკო და სხვა სასარგებლო ფუნქციებს ასრულებს (ჩერქეზიშვილი ტ., 2009). საქართველოში დაახლოებით

60 000 ჰექტარი ფართობი დაფარულია ხელოვნურად გაშენებული ტყეებით. ეს ტყეები ნაწილობრივ მოიცავს უცხო და გარემოსთან არადაპტირებულ სახეობებს (მაგ. შავი ფიჭვი), რომლებიც ერთგვაროვან კორომებს ქმნიან. ეს მონოკულტურები გაცილებით ღარიბია ბიომრავალფეროვნების მხრივ, ვიდრე ბუნებრივი ტყეები, რომლებიც ადგილობრივი სახეობებისგან შედგება (გარემოს დაცვის სამინისტრო).

საქართველოს ტყეების 97-98 % ბუნებრივი წარმოშობისაა. მათი შედგენილობა, აღნაგობა, ზრდა-განვითარების პირობები და სხვა მახასიათებლები განაპირობებენ მდიდარ ბიოლოგიურ მრავალფეროვნებას. საქართველოს ტყეებში დაახლოებით 400-მდე სახეობის ხე და ბუჩქი იზრდება. დენდროფლორის მრავალფეროვნების მაჩვენებელია ენდემურ მერქნიან მცენარეთა სიმრავლე. კერძოდ, საქართველოს ტყეებში 61 ადგილობრივი და 43 კავკასიის რეგიონისათვის დამახასიათებელი ენდემური სახეობებია გავრცელებული (ეროვნული სატყეო სააგენტო).

ძირითადი ტყის შემქმნელი მერქნიანი სახეობების ფართობების პროცენტული განაწილება შემდეგნაირია: წიფელი (42,6 %), მუხა (10,3 %), რცხილა (10,3 %), თხმელა (10,3 %), სოჭი (7,2 %), ნაძვი (5,0 %), ფიჭვი (4,2 %), წაბლი (3,8 %) (ჩერქეზიშვილი ტ., 2009)

1.2 ევროპული წაბლის (*Castanea sativa* Mill.) ბოტანიკური დახასიათება

ევროპული წაბლი (*Castanea sativa* Mill.) დაახლოებით 30 მ სიმაღლის და დიამეტრით 2 მ-მდე ხეა, არის შემთხვევები, როდესაც დიამეტრი უფრო მეტია. იგი გავრცელებულია ძირითადად მთის ტყეების ქვედა სარტყელში და აღის 1 500 მ სიმაღლემდე ზღვის დონიდან. ტიპური სითბოსა და სინესტის მომთხოვნი სახეობაა. მშრალ ადგილებში ბუნებრივად წაბლი არსად არ არის გავრცელებული. ტიპური მეზოფიტია, მისი ნორმალური ზრდისათვის საჭიროა ისეთი ადგილები, სადაც წლიური ნალექები აღემატება 800-900 მმ-ს. წაბლი ნიადაგის მიმართ საკმარისად მომთხოვნია. მისთვის საჭიროა, ღრმა, უმეტეს ალუვიური, ჰუმუსით მდიდარი ნიადაგი. იგი ვერ იტანს ნიადაგში კირის არსებობას - ტიპური კალკოფობია. წაბლი ჩრდილის ამტანი სახეობაა და კარგად აღმოცენდება

საბურველის ქვეშ. ქმნის როგორც სუფთა, ისე შერეულ კორომებს: წიფელთან, თელასთან, ნეკერჩხალთან, ნაძვთან, სოჭთან და სხვა (ეროვნული სატყეო სააგენტო, 2015).

ევროპული წაბლისათვის (*Castanea sativa* Mill.) დამახასიათებელი ნიშნებია: წაგრძელებული ცილინდრული, სწორმდგომი მჭადა ყვავილები. ფიალა (ნაყოფის ბუდე), რომელიც გარედან მოფენილია ეკლიანი ნემსისბრი გამონაზარდებით, 1-3 მობრტყო-ამოზნექილი დიდი ზომის ნაყოფს შეიცავს (საქართველოს მცენარეების სარკვევი, 1964; საქართველოს ფლორა, 1975). ყვავილები ერთსქესიანი, იშვიათად ორსქესიანი. ყვავილედ აღმამდგომი ცილინდრული მჭადაა. სამ-სამად ან მეტად შეჯგუფებული მტვრიანი ყვავილები ყვავილედის ღერძზეა გაწყობილი; ყვავილსაფარი 5-6 ნაკვთიანია, ზარისებრი; მტვრიანა 10-20, გრძელი ძაფებით. 1-3 ან მეტი ბუტკოიანი ყვავილი ყვავილედის ქვედა ნაწილშია მოთავსებული, ოთხად დაყოფილი საბურველით შემოხვეული; ყვავილსაფარი წვერში 5-8 ნაწილადაა დაყოფილი და ქვედა ნაწილით შეზრდილია ნასკვთან. ნასკვი ქვედა, 6 ბუდიანი, თითოეულ ბუდეში 2 თესლკვირტით. ბუტკოიან ყვავილებში ზოგჯერ განუვითარებელი მტვრიანებიც გვხვდება. ნაყოფი თავისებური პერიკარპიუმით დაფარული 1 თესლიანი კაკალია. მტვრის მარცვალი სამფორიანია და სამლარიანი, თხელი ეგზენით (საქართველოს ფლორა, 1975).

1.4 წაბლის ტყეების მდგომარეობა საქართველოში

წაბლი გავრცელებულია ევროპის დასავლეთი საზღვრებიდან ხმელთა შუა ზღვის სანაპიროებამდე, მცირე აზიაში, კავკასიაში, ჩრდილოეთ კავკასიის დასავლეთ ნაწილში - მცირე რაოდენობით, ხოლო ამიერკავკასიაში ტუაფსიდან სურამ-ქვიშეთსა და ყორნისამდე. აქ წყდება მისი გავრცელების არეალი და იწყება შიდა კახეთში, ძირითადად ალაზნის მარცხენა ნაპირზე-ახმეტიდან კუტკაშენამდე (აზერბაიჯანი) (ჩერქეზიშვილი ტ., 2012).

ჩვეულებრივი წაბლი (*Castanea sativa* Mill.) საქართველოს ტყეების ერთ-ერთი ძირითადი და მნიშვნელოვანი სახეობაა. განსაკუთრებით დასავლეთ საქართველოში, სადაც ზღვის დონიდან 500-დან 1 100 მ-მდე ქმნის წაბლის ტყის სარტყელს (ბ. თავაძე და სხვა, 2011).

ბოლო სააღრიცხვო მონაცემებით საქართველოში წაბლის ტყეების საერთო ფართობი დაახლოებით 106 000 ჰა-ს შეადგენს (გიგაური გ., 2000).

საქართველოს ტყის ფონდის 2003 წლის ერთიანი აღრიცხვის მაჩვენებლის მიხედვით წაბლნარებით დაკავებული ფართობების მონაცემები რეგიონების მიხედვით შემდეგნაირად გამოიყურება: სამეგრელო ზემო სვანეთი (1 4228 ჰა); რაჭა-ლეჩხუმი ქვემო სვანეთი (3 600 ჰა); გურია (466 ჰა); კახეთი (312 ჰა); სამცხე-ჯავახეთი (4 ჰა) (ეროვნული სატყეო სააგენტო).

განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი მასივებია გავრცელებული ქედის (აჭარა) რაიონში, რომელთა ფართობია 12 122 ჰექტარი. ქედის რაიონში გარდა წაბლნარებისა, ჩამოყალიბებულია წიფლნარ-წაბლნარი შერეული კორომები, სადაც გვხვდება აგრეთვე ისეთი სახეობანი, როგორცაა - რცხილა, ცაცხვი, ნეკერჩხლები, თელა და სხვა. შერეულ ტყეებში თანდათან მატულობს წიფელი და შემდეგ მოდიან წიწვიანებიც - ნაძვი და სოჭი. მაღალ ზონაში წაბლი იშვიათია. ქედის რაიონის ტყეების სახეობრივი შემადგენლობა ძალიან მრავალფეროვანი და მდიდარია, მათ შორის წაბლნარი ეკოსისტემებიც, რომელთაც აღდგენითი ღონისძიებების გატარება ესაჭიროებათ, რადგან წიფელთან, რცხილასთან, მურყანთან, მუხასთან და სხვა სახეობებთან შერეული კორომები უფრო ხშირია, ვიდრე წმინდა წაბლნარები (თავაძე ბ. და სხვა, 2011). წაბლის მასივები ასევე გავრცელებულია ტყიბულის რაიონში, რომელთა ფართობი შეადგენს 8 635 ჰექტარს (გიგაური გ., 2000). ტყიბულში წაბლნარები წარმოდგენილია როგორც წმინდა, ისე შერეული კორომების სახით. დიდი რაოდენობით გვხვდება ამონაყრითი ხეები. წაბლთან ერთად გვხვდება აღმოსავლეთის წიფელი (*Fagus orientalis*), კავკასიის რცხილა (*Carpinus caucasica*), შავი მურყანი (*Alnus barbata*), იფანი (*Fraxinus excellior*) და კოლხური ტყისათვის დამახასიათებლო სხვა სახეობები-იმერეთის მუხა(*Quercus imeretina*), ხურმა (*Diospiros lotus*) და სხვა.

ჩვეულებრივ წაბლს დიდი მნიშვნელოვნა აქვს როგორც ნაყოფის მომცემს, მთრიმლავი ნივთიერებების წყაროს, აგრეთვე დეკორატიულ მცენარეს (თავაძე ბ. და სხვა, 2011). მისი ქერქი შეიცავს დიდი რაოდენობით მთრიმლავ ნივთიერებებს. წაბლი (*Castanea sativa*) არის ფენოლური ნაერთების წყარო, კერძოდ ტანინების. ტანინები კლასიფიცირებულია ორ ჯგუფად: ჰიდროლიზდაქვემდებარებული და კონდენსირებულ ტანინებად. ჰიდროლიზ დაქვემდებარებული ტანინები იყოფა ორ ქვეჯგუფად: გალოტანინები და ელაგოტანინები (A. Chiarini et al . 2013).

უკვე მრავალი ათეული წელია მწვავედ დგას წაბლნარების ხმობის პრობლემა მსოფლიოს იმ ქვეყნებში სადაც კი წაბლის სახეობებია გავრცელებული და ყველგან იკვლევენ და სწავლობენ ხმობის მთავარ მიზეზს, წაბლის კიბოს გამომწვევ სოკოს *Cryphonectria (Endothia) parasitica*-ს (თავაძე ბ. და სხვა, 2011). *C. parasitica* წაბლის „ჭრილობის“ პარაზიტია, საიდანაც ძალზედ სწრაფად ვრცელდება მცენარეში და აინფიცირებს მის ღეროსა და ტოტებს. მცენარის ქერქსა და კამბიუმში ჩაზრდის შემდეგ, ფიტოპათოგენი წარმოქმნის მოყვითალო-მოყავისფერო მიცელიუმის „მარაოებს“. ხის ინფიცირებიდან რამოდენიმე კვირაში უკვე შეინიშნება დაავადებისთვის დამახასიათებელი დაზიანებები. იმ შემთხვევაში, თუ კამბიუმი უცბად ნადგურდება, ინვაზიის ადგილზე წარმოიქმნება მუქი ლაქა. კალუსის წარმოქმნა დროებით აჩერებს პარაზიტის გავრცელებას, ისე რომ ხის დაზიანებული უბნის ქვეშ წარმოიქმნება ქერქის ახალი ფენები და შეინიშნება შემუპება, რასაც თან სდევს მკვდარი, ზედაპირული ქერქის დახეთქვა. ძალიან მალე, დაზიანებული ქერქის ნახეთქებიდან გამოაღწევს 3-5 მმ-ის ზომის მოყვითალო-მოფორთოხლისფერო ან/და მოწითალო-მოყავისფერო სოკოს ნაყოფსხეულები. წაბლის ხის ინფიცირებისა და *C.parasitica*-ს არსებობის ძირითად ნიშანს წარმოადგენს ყავისფერი, გამხმარი, დაკიდებული ფოთლები ზამთარში (რომლებიც არ ცვივა ფოთოლცვენის შემდგომ) და ხეზე მოყვითალო-მოყავისფრო ლოკაციების გაჩენა (Bissegger M. and Heiniger U., 1991; Freinkel S., 2009).

საქართველოში წაბლნარების ხმობას ხელი შეუწყო ერთის მხრივ წაბლის ქერქის კიბომ (*Criphonectria parasitica*) და ფოთლების მურა ლაქიანობამ (*Cylindrosporium castanicolum*) და მეორეს მხრივ იმან, რომ საქართველოს წაბლნარებში დიდი ხნის განმავლობაში მიმდინარეობდა უნებურ-ამორჩევითი ჭრები, რომლის დროსაც იჭრებოდა საღი ხეები, ასევე წაბლნარების დეგრადაციაში მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს კლიმატური ანომალიები გვალვების სახით, რომელნიც ასტიმულირებს პათოგენის გააქტიურებას (თავაძე ბ. და სხვა, 2011).

2010 წელს ტყიბულის რეგიონის წაბლნარებში ჩატარებული სატყეო-პათოლოგიური გამოკვლევების შედეგად დადგინდა, რომ წაბლნარების ფიტოსანიტარიული მდგომარეობა უაღრესად არადაამაკმაყოფილებელია. აღრიცხული 3 479 ხიდან კატეგორიას „საღი,, მიეკუთვნება 2 068 ხე ანუ 59,44 %, ზეხმელი და ხმობადი 1 411 ანუ 40,56 % (თავაძე ბ., 2012).

ქედის რაიონში 2010 წელს ჩატარებული სატყეო-პათოლოგიური გამოკვლევების საფუძველზე დადგინდა, რომ 2 523 ხიდან პირობითად კატეგორიას „სალი“ მიეკუთვნება 807 ძირი ანუ 32%, „ხმობადი“ - 1 228 ხე ანუ 48,7 %, ხოლო „გამხმარი“ - 488 ანუ 19,3 % (თავაძე ბ. და სხვა, 2011).

1.5 გადაშენების საფრთხის წინაშე მყოფი მცენარეთა კონსერვაციის გზები

დღეისათვის სატყეო სექტორში შემდეგი ძირითადი პრობლემები იკვეთება: ტყის რესურსების არამდგრადი მართვა და ხშირად უკანონო მოპოვება, ჭარბი მოვება, ხანძრები, მავნებლები, დაავადებები, მოუწესრიგებელი ნადირობა და კლიმატის ცვლილება; ასევე სერიოზულ საფრთხეს უქმნის ტყეებს არასწორად დაგეგმილი ინფრასტრუქტურა. ყველა ეს ფაქტორი უარყოფით ზეგავლენას ახდენს ტყის ბიომრავალფეროვნებაზე. ბოლო წლების განმავლობაში, გარემოზე მზარდმა უარყოფითმა ფაქტორებმა უნიკალური სახეობის მცენარეთა გენეტიკური ეროზია გამოიწვია (გარემოს დაცვის სამინისტრო, 2014). ბიომრავალფეროვნების დაცვა ძალიან აქტუალურია მთელს მსოფლიოში. ამ მიზნით მოქმედებს სხვადასხვა შინაარსის კონვენციები, როგორცაა: ბიოლოგიური მრავალფეროვნების კონვენცია, კონვენცია ფლორის სახეობებით საერთაშორისო ვაჭრობის შესახებ და სხვა.

ბუნების დაცვის საერთაშორისო კავშირი (IUCN) არის გაერთიანება, რომელიც მოიცავს ცალკეულ სახელმწიფოებსა და ორგანიზაციებს. ის უზრუნველყოფს საჯარო, კერძო და არასამთავრობო ორგანიზაციებს ინფორმაციისა და სხვა საშუალებების მიწოდებით, რაც ხელს უწყობს ადამიანთა განვითარებას, ეკონომიკურ წინსვლას და ბუნების შენარჩუნება-დაცვას. IUCN შეიქმნა 1948 წელს, ის წარმოადგენს მსოფლიოში ყველაზე მსხვილ და დიდ გარემოსდაცვით ქსელს, აერთიანებს 1 300 ორგანიზაციას და 14 500 ექსპერტს. ბუნების დაცვის საერთაშორისო კავშირი უზრუნველყოფს მსოფლიოში ბუნების კონსერვაციის სხვადასხვა პროექტების განხორციელებას. 1964 წელს შეიქმნა ბუნების დაცვის

საერთაშორისო კავშირის, საფრთხის ქვეშ მყოფი სახეობების წითელი ნუსხა. ეს გახდა მსოფლიოში ყველაზე სრულყოფილი საინფორმაციო წყარო ცხოველების, სოკოებისა და მცენარეთა სახეობების გლობალური კონსერვაციის სტატუსის შესახებ. წითელი ნუსხა უფრო მეტია, ვიდრე სახეობების სია და მისი სტატუსი წარმოადგენს ინფორმირებისა და მოქმედების ძლიერ ინსტრუმენტს ბიომრავალფეროვნების კონსერვაციისა და პოლიტიკის ცვლილებისათვის, რომელიც აუცილებელია ბუნებრივი რესურსების დასაცავად. ევროპული წაბლი (*Castanea sativa* Mill.) ბუნების დაცვის საერთაშორისო კავშირის წითელ ნუსხაში წარმოდგენილია სახეობად, რომელიც საჭიროებს ზრუნვას (LC-Least Concern)(IUCN 2019).

კონსერვაციული ბიოლოგია არის მულტიდისციპლინური მეცნიერება, რომელიც განვითარდა 1980-იანი წლებიდან, ბიოლოგიური მრავალფეროვნების წინაშე მდგარი კრიზისის აღმოსაფხვრელად. გადაშენების საფრთხის წინაშე მყოფი მცენარეთა კონსერვაციის ორი მთავარი გზა გვაქვს : *ex situ* და *in situ* კონსერვაცია. *In situ* ("ადგილზე") კონსერვაცია არის კონსერვაციის მეთოდების კომპლექტი, რომელიც მოიცავს ბიომრავალფეროვნების აღნიშვნას, მართვასა და მონიტორინგს იმავე სივრცეში, სადაც იგი გვხვდება. *In situ* მენეჯმენტის მიდგომები მიზანშეწონილია შერჩეული სახეობების პოპულაციებში (სახეობებზე ორიენტირებული მიდგომები), ან მთელი ეკოსისტემებისათვის (ეკოსისტემაზე დაფუძნებული მიდგომები). ორივე მიდგომას საერთო აქვს მიზანი: იმისათვის, რომ ბიომრავალფეროვნება იქნას შენარჩუნებული ეკოსისტემის კონტექსტში, რომელშიც ის იპოვეს, ანუ მოხდეს სახეობის თვითადგენა, და შენარჩუნდეს მისი პოტენციური მომავალი ევოლუციისთვის (Vernon H. Et al., 2003).

In situ კონსერვაციის შემთხვევაში კონსერვაციონისტების მცდელობების რეალიზება ხდება დაცული ტერიტორიების შექმნის გზით. დაცული ტერიტორია ნიშნავს გეოგრაფიულად განსაზღვრულ ტერიტორიას, რომელიც იმართება, სამართლებრივი ან სხვა მექანიზმით და უზრუნველყოფს ბიომრავალფეროვნების შენარჩუნებასა და დაცვას. დაცული ტერიტორიების კატეგორიები ბუნების დაცვის მსოფლიო კავშირის მიხედვით შემდეგნაირია: ნაკრძალი, ეროვნული პარკი, ბუნების ძეგლი, ადკვეთილი, ზღვის აკვატორია, მრავალმხრივი გამოყენების ტერიტორია. გარდა ველური ბუნების შენარჩუნებისა, *in situ* კონსერვაცია მოიცავს, აგრეთვე, ტრადიციული სასოფლო-სამეურნეო კულტურებისა და ჯიშების შენარჩუნებას (გეგჰკორი ა. და სხვა, 2011) .

Ex situ ნიშნავს სახეობის დაცვას მისი ბუნებრივი ჰაბიტატის გარეთ, როგორცაა ბოტანიკურ ბაღები. სავარაუდოდ 100 000 მცენარეს, რომელიც წარმოადგენს მსოფლიოს მცენარეთა სახეობების ერთ მესამედზე მეტს, ემუქრებათ საფრთხე ან გადაშენების პირასაა (BGCI, 2005). მცენარეთა ბიომრავალფეროვნების დაცვა აუცილებელია კლასიკური და თანამედროვე (გენეტიკური ინჟინერიის) მცენარეთა გამრავლების პროგრამებისთვის. უფრო მეტიც, ეს ბიომრავალფეროვნება უზრუნველყოფს ნაერთების წყაროს ფარმაცევტული, საკვები და მცენარეთა დაცვის ინდუსტრიაში. 1970-იანი წლებიდან დიდი რაოდენობით ადგილობრივი, ლოკალური ჯიშები და კულტურული თესლების ველური წინაპრები შეგროვდა და შენახული იქნა *ex situ* გენის ბანკებში. სავარაუდოდ, მცენარეთა გენეტიკური რესურსების 6 მილიონი ნიმუში ინახება ეროვნული, რეგიონული, საერთაშორისო და კერძო გენ ბანკების კოლექციებში მთელს მსოფლიოში (IPGRI 2004). *ex situ* კონსერვაციას აქვს თავისი უარყოფითი მხარეებიც, როგორცაა მაღალი დანახარჯები და სახეობის ევოლუციის შეფერხება, სახეობა დამოკიდებული ხდება მოვლაზე. ბიუჯეტსა და პოლიტიკაზე. დღეს *ex situ* კონსერვაცია განიხილება გადაშენების საფრთხის წინაშე მყოფი მცენარეთა დაცვის ეფექტურ საშუალებად (გეგჰკორი ა. და სხვა, 2011).

1.6 წაბლის ტყეების კონსერვაციის მიდგომები და გამრავლების გზები

ევროპულ წაბლს (*Castanea sativa* Mill.) აქვს მნიშვნელოვანი როლი ეკოსისტემაში და ამის გამო ის მნიშვნელოვანი რესურსია მსოფლიოს მრავალ ნაწილში ეკონომიკური და სამეურნეო თვალსაზრისით. გარდა ამისა წაბლი ევროპაში ფასობს თავისი შეშის, ნაყოფის წარმოებისა და ლანდშაფტზე დიდი მოქმედების გამო (Bounous G., 2005).

საქართველოში წაბლის ტყეები, წარსულში უდიდესი ექსპლუატაციისა და პარაზიტული სოკო-ენდოტეას წყალობით, დიდ ფართობებზეა განადგურებული და მათი ხელოვნური აღდგენა-განახლება ერთ-ერთ გადაუდებელ ამოცანად უნდა ჩაითვალოს. წაბლი მრავლდება თესლითა და დედისეული მცენარის ორგანოების საშუალებით, რომელსაც

ვეგეტატიურ გამრავლებას უწოდებენ და მისი გამოყენებით მიღებული ახალი მცენარე დედისეული ორგანიზმის იდენტურია მემკვიდრული ნიშნებით. წაბლის კულტურის გასაშენებლად დიდი მნიშვნელობა ენიჭება სათესი მასალის წარმომავლობასა და ხარისხს. მსხვილი თესლიდან ამოსული ნერგი ერთნახევარჯერ მეტია ზომით და უკეთესი ზრდით ხასიათდება წვრილი თესლიდან აღმოცენებულთან შედარებით. განსაკუთრებით მნიშვნელობა ენიჭება სათესი ნიადაგის შერჩევას. საუკეთესოდ ითვლება: მცირე მჟავა რეაქციის, სუსტი თიხნარი, კარგად დრენირებული და ჰაერგამტარი, საკვები ნივთიერებებითა და ტენით მდიდარი ნიადაგები. გრუნტის წალი არ უნდა იყოს 1,5 მ-ზე ახლოს. სანერგესათვის უვარგისია მძიმე თიხნარი და ძლიერ ტენიანი ალუვიური მიწა (Bauer R., 2015; ჩერქეზიშვილი ტ., 2012).

წაბლის მცნობას აწარმოებენ სხვადასხვა მეთოდებით, ესენია: ზამთრის ე.წ. „ვაზისებრი“ მცნობა, ე.წ. „ფანჯრით“, მცნობა, მცნობა „გახლეჩვით“, „უნაგირით“, „ტესებური“. იმის გამო, რომ წაბლის ღეროზე ჭრილობა სწრაფად იჯანგება და გართულებულია შეხორცება, წაბლის მცნობა და ნამყენის მიღება ჯერ-ჯერობით სამეურნეო მნიშვნელობის არაა და სამეცნიერო კვლების ობიექტს წარმოადგენს (ჩერქეზიშვილი ტ., 2012).

წაბლის გამრავლების ტრადიციულ მეთოდებთან დაკავშირებით არსებობს გარკვეული პრობლემები და ამის ფონზე ძალიან კარგ ალტერნატივას წარმოადგენს მცენარის *in vitro* კულტივირება. წაბლის *In vitro* გამრავლებისთვის შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას მცენარის, როგორც მწიფე ასევე მოუმწიფებელი ნაყოფები, საიდანაც ხდება ექსპლანტის იზოლირება. ექსპლანტად გამოიყენება: კოტილედონური კვანძი, კვირტი, ფოთოლი, ემბრიონი.

სომატური ემბრიოგენეზი, როგორც მცენარეთ ბიოტექნოლოგიის ერთ-ერთი გზა, გვთავაზობს ელიტარული წაბლის გენოტიპების და ჰიბრიდების გენეტიკური გადაცემის და მასობრივი კლონირების უპირატეს გზას. ჩატარებულმა ცდებმა აჩვენა, სომატური ემბრიოგენეზით, წაბლის კლონური გამრავლების წარმატებული შედეგი. რეგენერირებული მცენარის წარმოება არაპირდაპირი ორგანოგენეზის მეშვეობით არის გენეტიკური გაუმჯობესების ხელშემწყობი ერთ-ერთი საშუალება, რადგან არსებობს ზოგიერთი

უპირატესობა კალუსიდან რეგენერაციის პირდაპირ რეგენერაციასთან შედარებით. (Tafazoli M. et al., 2013)

სომატური ემბრიოგენეზის ინდუცირებისათვის გამოიყენება სხვადასხვა საკვები არეები: MS (Murashige and Skoog, 1962), WPM (Lloyd and McCown, 1981), SH (Schenk, R.V. and Hildebrandt, A.C., 1972) და სხვა. წაბლის სომატური ემბრიოგენეზისათვის გამოიყენება სხვადასხვა ექვლანტები: ემბრიონული ღერძი, ლეზნები, ფოთოლი. ევროპული წაბლის მიკროგამრვლების პროცესში აპიკალური ნეკროზის და ქლოროზის თავიდან ასაცილებლად და ზოგადად შედეგის გასაუმჯობესებლად საუკეთესოა GD (Gresshoff and Doy, 1972) ან MS (Murashige and Skoog, 1962) საკვები არეები (Vieitez A.M., et al., 2007).

სომატური ემბრიოგენეზი არის რთული პროცესი და მოითხოვს რამდენიმე ეტაპის სწორად შესრულებას. სომატური უჯრედები წყვეტენ ნორმალურ განვითარებას და გადაიქცევიან ემბრიონებად. ამ პროცესში მნიშვნელოვანია აუქსინის და სხვა ჰორმონების როლი. სომატური უჯრედები დედიფერენცირდებიან და მათგან ვითარდება მომწიფებული ემბრიონი. ემბრიონის განვითარება ორ ფაზად მიმდინარეობს: მორფოგენეზის ფაზა, რომელშიც ემბრიონის ძირითადი გეგმა იქმნება და მომწიფების ფაზა, რომელშიც ემბრიონი ხდება ტოლერანტული და აგროვებს სამარაგო მაკრომოლეკულებს, როგორცაა ლიპიდები, ცილები, ნახშირწყლები. განვითარების პროცესში ემბრიონი დაიყოფა ცალკეულ დომენებში აპიკალურ-ბაზალური და რადიალური ღერძის გასწვრივ. *In vitro* კულტურების ინიციაციისთვის ზიგოტური ემბრიოგენეზი ერთ-ერთი საუკეთესო ვარიანტია, ვინაიდან ზიგოტურ ემბრიონს გააჩნიათ ორგანოების განვითარების უკეთესი პოტენციალი და კომპეტენცია სხვა, დიფერენცირებული ორგანოებისაგან განსხვავებით (Elhiti M., and Stasolla C., 2010).

ზიგოტური ემბრიოგენეზი უმაღლეს მცენარეებში აღწერს განვითარების პერიოდს, რომელშიც ზიგოტა განიცდის დიფერენცირების მოვლენას, რასაც მომწიფებული ემბრიონის ფორმირება მოყვება. ძირითადი ემბრიონული ორგანოების ჩამოყალიბება იწყება აპიკალურ-ბაზალური ღერძის გასწვრივ დაყოფით და ამ მოვლენას ხელს უწყობს ჰორმონი აუქსინი. სამი ემბრიონული ქსოვილის სისტემის ფორმირება ხდება რადიალური ღერძის პერპენდიკულართან ერთად აპიკალურ-ბაზალურ ღერძზე. მომწიფებული ზიგოტური ემბრიონი არის განვითარებული, მასშია აკუმულირებული სამარაგო ნივთიერებები და

დაცულია გარემო ფაქტორებისგან თესლის ქსოვილით (Elhiti M. and Stasolla C. 2010; John .,J et al., 2010).

წაბლის მიკროგამრავლების პროცესში ერთ-ერთ დიდ პრობლემას წარმოადგენს ფენოლური ნაერთები, რომლებიც ზრდას თრგუნავენ. ამ პრობლემის აღმოსაფხვრელად გამოიყენება სხვადასხვა ფენოლთა ინჰიბიტორები. ექსპერიმენტალური მონაცემებით აქტივირებული ნახშირის დამატება დადებით ზეგავლენას ახდენს ყლორტების ზრდასა და ემბრიონების წარმოქმნაზე. აქტივირებული ნახშირბადის ზედაპირზე ხდება ექსპლანტის მიერ გამოყოფილი ტოქსიკური ნივთიერებების ადსორბცია, როგორცაა ფენილმმარნჟავა, ბენზონის მჟავა, პელარგონიუმის მჟავა, კაპრილმჟავა. ასკორბინის მჟავა, ლიმონმჟავა, პოლივინილპიროლიდონი (PVP) აქტიურად გამოიყენება როგორც ფენოლთა ინჰიბიტორები ((Monaco L., 1977; D. Shimelis et al., 2015)

მცენარეების *in vitro* კოლექციების შენახვა საკმაოდ შრომატევადია და ყოველთვის მაღალია მასალის დაბინძურების რისკი, ასევე სომაკლონური ვარიაციები (ანუ სპონტანური მუტაციები ქსოვილთა კულტურებში, მისი სიხშირე იზრდება სუბკულტივირების სიხშირესთან ერთად).

დღეს ქსოვილთა კულტურების ტექნოლოგია გვთავაზობს ორ ძირითად მიდგომას მცენარეთა გენეტიკური რესურსების *ex situ* კონსერვაციისათვის, ნელი ზრდით შენახვა (საშუალოვადიანი კონსერვაცია საფონდო კულტურების ნულის ზემოთ რამდენიმე გრადუსზე) და კრიოპრეზერვაცია. კრიოპრეზერვაცია თხევად აზოტში ან გაყინვითპრეზერვაცია ულტრადაბალ ტემპერატურაზე (-196°C) არის ალტერნატივა მცენარეთა გენეტიკური რესურსების ხანგრძლივადიანი კონსერვაციისათვის (Benson E.E., 1999).

1.7 მცენარეთა გრძელვადიანი კონსერვაცია კრიოპრეზერვაციის გზით

კრიოპრეზერვაცია გულისხმობს ნიმუშების შენახვას თხევად აზოტში (-196°C), ამ პირობებში, ბიოქიმიური და ყველა ფიზიკური პროცესი მთლიანად შეჩერებულია. მცენარეული მასალა შეიძლება ინახებოდეს შეუზღუდავი პერიოდის განმავლობაში. უფრო მეტიც, გენეტიკური რესურსების კონსერვაციის გარდა, კრიოპრეზერვაცია ძალზედ სასარგებლოა მცენარეთა ქსოვილების უსაფრთხო გრძელვადიანი შენახვისათვის სპეციფიკური მახასიათებლებით, როგორცაა სამკურნალო და ალკალოიდ წარმომქმნელი უჯრედების ხაზები, ფესვის კულტურები, გენეტიკურად ტრანსფორმირებული (Elleuch H. et al., 1998) და ტრანსფორმაციის კომპეტენტური კულტურის ხაზები (Gordon-Kamm W.J. et al., 1990). ცოტა ხნის წინ დადასტურდა, რომ კრიოთერაპია წარმატებით შეიძლება გამოყენებულ იქნას ვირუსების აღმოსაფხვრელად ქლიავის, ბანანისა და ყურძნისგან (Brison M. et al., 1997; Helliot B. et al., 2002; Wang Q.C. et al., 2003).

კრიოპრეზერვაცია საყოველთაოდ გამოიყენება სუსპენზიური და კალუსური კულტურის შენახვისათვის და ამჟამად უფრო სასარგებლოა ორგანიზებული ქსოვილებისთვის. ბიოლოგიური ქსოვილების კრიოპრეზერვაცია წარმატებული იქნება მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ თავიდან აცილებულია შიდა უჯრედული ციხულის კრისტალების ფორმირება, ვინაიდან ციხულის კრისტალები იწვევს უჯრედული მემბრანების შეუქცევად დაზიანებას და ამით მათი ნახევრად გამტარობა ნადგურდება. ბუნებაში, ზოგიერთმა მცენარეთა სახეობამ შეიმუშავა სისტემები, სადაც ციხულის კრისტალების ფორმირება, სუბ-ნულოვანი ტემპერატურის დროს, შეიძლება თავიდან იქნას აცილებული კონკრეტული ნივთიერებების სინთეზით მეშვეობით (როგორცაა შაქარი, პროლინი და ცილები), რომლებიც ამცირებენ ცოცხალ მცენარეთა უჯრედებში გაყინვის წერტილს, რის შედეგადაც მიიღება "supercooling". კრისტალიზაციის "თავიდან აცილება", როდესაც ჯერ კიდევ შენარჩუნებულია სიცოცხლისუნარიანობისთვის საჭირო მინიმალური ტენიანობის დონე, შეუძლებელია კრიოპრეზერვაციის ულტრა-დაბალი ტემპერატურის შემთხვევაში. კრისტალის ფორმირება უჯრედული წყლის უკიდურესი შემცირების გარეშე შესაძლებელია მხოლოდ "ვიტრიფიკაციის" მეშვეობით, რაც გულისხმობს თხევადი

ნივთიერებების გადასვლას არაკრისტალურ ან ამორფულ („სტრუქტურის გარეშე“) მდგომარეობაში, როგორცაა მინა (Sakai A., 2000).

კრიოპრეზერვაციის გამოყენებისას უჯრედისთვის ორი მოთხოვნა უნდა დაკმაყოფილდეს: (i) სწრაფი გაყინვის ტემპები და (ii) კონცენტრირებული უჯრედული ხსნარი. სწრაფი გაყინვის სიჩქარე (6 °C / წმ) ჩვეულებრივ მიღწეულია კრიოსინჯარებში, თხევადი აზოტში ჩადირული ექსპლანტისთვის. მაღალი გაციების ტემპი შეიძლება მიღებულ იქნას მერისტემებისათვის „semen straws“-ის მიკროსინჯარებში, რის შედეგადაც გაციების ტემპერატურა დაახლოებით 60 °C / წმ-ია ან გამოიყენება "წვეთოვანი გაყინვის მეთოდი", სადაც მასალა განთავსდება ალუმინის ფოლგის ზოლებზე, რომლებიც უშუალოდ თხევად აზოტში იძირება, იზრდება გაგრილების სისწრაფე 130 °C / წმ. (Panis B. et al., 2005; Schäfer-Menuhr A. et al., 1997).

მასალის თხევად აზოტში შენახვამდე აუცილებელია მცენარეთა უჯრედების ციტოზოლის დაკონცენტრირება, რომლის მიღწევაც ხდება ჰაერის საშრობით, გაყინვით დეჰიდრატაციით, გამჭოლადი ან არაგამჭოლადი ნივთიერებების (კრიოპროტექტანტები) გამოყენებით ან ადაპტირებული მეტაბოლიზმით (შეგუება, ადაპტირება). ხსნარის ვიტრიფიკაციისთვის მაღალი გაგრილების ეტაპზე, საჭიროა წყლის მარაგის შემცირება მინიმუმ 20-30 % -მდე.

თესლის და მინდვრის კოლექციები იყო ერთადერთი საიმედო ვარიანტი ხე-მცენარეების სახეობების გენეტიკური რესურსების გრძელვადიანი შენახვისათვის. თუმცა, ფარულთესლოვნების მრავალრიცხოვან ტყეებს (მაგალითად, *Acer* spp., *Quercus* spp, chestnut, horsechestnut და ბევრი ტროპიკული სახეობა) აქვთ ძნელად გალივებადი („non-orthodox“) თესლები, ძალიან შეზღუდული შენახვის პერიოდით. ხილის ხეები, რომლებიც, ძირითადად, ვეგეტატიურად მრავლდებიან, მოითხოვს ნიმუშების უზარმაზარი რაოდენობით კონსერვაციას კლონურ ბადებში, (ძველი და ახალი შერჩეული კულტურების ჩათვლით, ადგილობრივი ჯიშები და ველური მასალები) სადაც მნიშვნელოვანია პერიოდული და უსაფრთხო მონიტორინგი დაცული ხეების. მაგალითად, *Prunus*-ის ევროპული გენეტიკური რესურსის პრეზერვაციისათვის, 30 000-ზე მეტი ნიმუშის შენარჩუნება ხდება 21-ზე მეტი ქვეყნის მინდვრების საცავში (Gass T. Et al., 1996). აქედან გამომდინარე, კრიოპრეზერვაცია უნდა ჩაითვალოს, როგორც სტრატეგიულად

მნიშვნელოვანი მხარდამჭერი ტრადიციული მინდვრის ბანკებისათვის. ნამდვილად, ტრადიციული კონსერვაციის მიდგომების კომბინაცია კრიოგენული ტექნოლოგიის პოტენციალთან ერთად წარმოადგენს მნიშვნელოვან წინგადადგმულ ნაბიჯს ტყის მცენარეულობის გენეტიკური რესურსების შემთხვევითი დაკარგვის რისკის მინიმუმამდე შემცირებისთვის (Panis B., Lambardi M. 2006).

კრიოპრეზერვაციის სამიზნედ მცენარეთა არჩევისას გამოყენებული კრიტერიუმები შეიძლება იყოს სხვადასხვა: მორფოლოგიური და გენეტიკური ვარიაციები, გეოგრაფიულ კრიტერიუმები, მეორადი მეტაბოლიტის წარმოქმნა ან რისკის ქვეშ მყოფი მცენარეები. მცენარეთა რისკში იგულისხმება საფრთხის ქვეშ მყოფი სახეობები, რომელთაც ემუქრებათ დაავადების, კლიმატური პირობების, მწერების ან სხვა გარემო პირობებით გამოწვეული პრობლემები, რამაც შეიძლება გამოიწვიოს მცენარეთა სიკვდილი. ზოგადი გამოცდილება გვიჩვენებს, რომ მცენარეები, რომლებიც დაავადებულნი არიან ცუდი კანდიდატებია კრიოპრეზერვაციისთვის. კრიოპრეზერვაციისათვის მცენარეები ან კულტურები უნდა იყვნენ ზრდის ოპტიმალურ ფაზაში და „მძინარე“ მასალები სრულად უნდა იყოს „მშვიდი“ და სათანადოდ აკლიმატიზირებული სიცივის მიმართ. ემბრიოგენური კულტურებისათვის, რომლებიც დროთა განმავლობაში ემბრიონის ფორმირების შესაძლებლობას კარგავენ, კრიოპრეზერვაცია უზრუნველყოფს შენახვას, აღდგენას და უფრო მეტ ემბრიონებს აწვდის მოგვიანებით (Barbara M., 2008).

კრიოპრეზერვაციისათვის მცენარეული მასალის შესანახი ფორმა შეიძლება იყოს თესლი, მტვერი, ღეროს აპექსი, მძინარე კვირტი, ემბრიონული ღერძი, ზიგოტური ან სომატური ემბრიონები, კალუსი ან უჯრედების კულტურა. მძინარე კვირტების კრიოპრეზერვაცია საუკეთესოდ გამოიყენება ყინვაგამძლე ტყის მცენარეებისთვის, რომლებიც შეიძლება დაიმყნას (Forsline et al., 1998; Niino et al., 2000). *In vitro* გაზრდილი მცენარის ღეროს აპექსი შეიძლება შეინახოს მცირე სივრცეში და შეინარჩუნოს ზუსტი გენოტიპი ტროპიკული და ზომიერი მცენარეების (Benson E. 1999; Reed and Chang, 1997). კალუსი და სომატური ემბრიონები უზრუნველყოფენ დიდი რაოდენობით მასალას შენარჩუნებისათვის და ხშირად ადვილად შესანახია (Engelmann F., 2000). წყალმცენარეებისა და დაბალი მცენარეების კრიოპრეზერვაცია სასარგებლოა გარემოსდაცვითი და ექსპერიმენტული მიზნებისათვის (Day JG. et al., 1999).

გაზრდილია სხვადასხვა ორგანოებისა და ქსოვილების რიცხვი, მცენარეთა ქსოვილურ კულტურებში, რომლებიც შეიძლება გამოიყენებულ იქნეს თხევადი აზოტში შენახვისათვის. ბალახოვანი სახეობებისათვის აღწერილ ექსპლანტებს შორის სამი კატეგორიაა, რომელიც ძირითადად გამოიყენება ხე მცენარეების კრიოპრეზერვაციისთვის, ეს არის I. ღეროს წვერი, დიფერენცირებული ორგანოები, რომლებიც გამოიყენება ვეგეტატიურად გამრავლებადი მცენარეებისათვის, როგორცაა ბევრი ხილის და მერქნიანი მცენარეების კულტივარები, რომლისთვისაც გენეტიკური სტაბილურობის შენარჩუნება ფუნდამენტურია. ღეროს წვერები (საშუალოდ 1-2 მმ) მიღებულია აპიკალური ან ღერძული კვირტებიდან, ამოჭრილი *in vitro* მზარდი ღეროს კულტურებიდან. სტერილური პირობების ქვეშ, კვირტის კონტროლი ხდება აპიკალური მერისტემის შესანარჩუნებლად, გარშემორტყმული რამოდენიმე ნამდვილი პრიმორდიალური ფოთლისა და ფოთოლაკისაგან (Niino T. et al., 1992). II. თესლი ან იზოლირებული ემბრიონის ღერძი გამოიყენება, სახეობების შესანარჩუნებლად, რომლებიც ძირითადად თესლით მრავლდებიან. იმ სახეობებისათვის, რომლებიც ხასიათდება „ურჩი“ ან სუბორთოდოქსული თესლებით, რომლებიც არ შეიძლება ინახებოდეს ტრადიციული თესლის ბანკებში, კრიოპრეზერვაცია შეიძლება ჩაითვალოს როგორც მნიშვნელოვანი ვარიანტი გენეტიკური რესურსების გრძელვადიანი კონსერვაციისათვის (Pence V.C., 1995). III. ემბრიონული კალუსების ხაზები, რომლებიც იძლევა ძნელად გაღივებადი თესლების მქონე მცენარეთა გენეტიკური რესურსების კონსერვაციის საშუალებას, ისევე როგორც ბიოინჟინერიაში გამოყენებული ღირებული ემბრიოგენური ხაზების შენარჩუნებას. მაგალითად, ამ გზით თავიდანაა აცილებული ემბრიოგენური პოტენციალის დაკარგვა, რომელსაც იწვევს განმეორებითი სუბკულტივირება ან ტრანსგენური მასალების შენახვა (Panis B. and Lambardi M. 2006).

ბოლო წლებში, "ვიტრიფიკაცია / ერთი ნაბიჯი გაყინვის" ტექნიკა მუდმივად უმჯობესდება და გამოიყენება მერქნიანი ჯიშების მზარდი რაოდენობისათვის. კრიოგენული ტექნიკის გამოყენება ტყის სახეობებისათვის გახდა ძალიან პოპულარული მას შემდეგ, რაც PVS2-ის ხსნარი იქნა დანერგილი ფორთოხლის (*Citrus sinensis*) ჩანასახოვანი უჯრედების კრიოპრეზერვაციისათვის (Sakai A. et al., 1990). დღეისათვის, PVS2 ხსნარი წარმატებით გამოიყენება რამდენიმე ეკონომიკურად მნიშვნელოვანი მერქნიანი ხის ღეროს წვერის კრიოპრეზერვაციისათვის, როგორცაა *Malus, Pyrus, Prunus, Castanea, Populus* და *Vitis*, მათთვის ადვილად მისაღწევი გადარჩენის სიხშირე უფრო მაღალია, ვიდრე 50% (Lambardi M.

and De Carlo A., 2003). ყველაზე მაღალი პროცენტული მაჩვენებელი ღეროს წვერის გადარჩენის (90 %-ზე მეტი) გადმოცემულია *Prunus jamasakura* (Niino T. et al., 1997) და *Populus alba* (Lambardi M. Et al., 2000) სახეობებისათვის. მნიშვნელოვანია, აღინიშნოს, რომ როდესაც ექსპლანტი თავსდება PVS2 ხსნარში, გამოლღობის შემდგომი გადარჩენის ხარისხი დიდია, რომელზეც ზეგავლენას ახდენს ხანგრძლივი დამუშავება, რომელიც უნდა იყოს საკმარისად ხანგრძლივი, რომ დაზღვეული იქნას უჯრედების საკმარისი დეჰიდრატაცია ციტოტოქსიური ეფექტის გარეშე. როდესაც ხსნარი გამოიყენება 25 °C- ზე, ექსპოზიციის დრო 20-დან (Matsumoto T. Et al., 2001) 120 წთ-მდეა (Niino T. et al., 1997). გარდა ამისა, იმისათვის რომ შემცირდეს ტოქსიურობის რისკი შეიძლება იქნას გამოყენებული გაცივებული ხსნარი (0 °C) ან კონცენტრაციული გრადიენტი (50 % 30 წუთი, 100 % 50 წუთით) (Caccavale A. et al., 1998). თხევად აზოტში შენახვის შემდეგ საჭიროა წყლის აბაზანში სწრაფი გამოლღობა. ეს თავიდან აგვაცილებს რეკრისტალიზაციას და უზრუნველყოფს ვიტრიფიცირებული მასალის აღდგენას. დნობის ტემპერატურა მერქნიანი სახეობებისათვის შემოიფარგლება 20 °C- დან 45 °C -მდე, 40 °C ყველაზე ხშირად გამოიყენება.

ასევე "ინკაფსულაცია / დეჰიდრატაციის" ტექნიკამ არაერთხელ აჩვენა, რომ ძალიან ეფექტურია მერქნიანი სახეობების გრძელვადიანი კონსერვაციისათვის. ეფექტური მეთოდოლოგია უკვე შემუშავდა რამდენიმე მნიშვნელოვანი სახეობისათვის, მსგავსად *Malus*, *Pyrus* და *Prunus spp.*, გამოლღობის შემდგომ ღეროს ქსოვილის გადარჩენის და ხელახლა ზრდის ხარისხი 80 %-მდეა აყვანილი (Lambardi M. and De Carlo A., 2003).

„ინკაფსულაცია/ვიტრიფიკაცია“ არის ახალი ტექნოლოგია, აერთიანებს ექსპლანტის ინკაფსულაციას ვიტრიფიკაციის ნარევის გამოყენებით. უკვე წარმატებით იქნა გამოყენებული ვაშლის და ქლიავის ღეროს წვერებისთვის. მეორეს მხრივ, ეს ნაკლებად ეფექტური აღმოჩნდა, ვიდრე კლასიკური „ვიტრიფიკაცია/ერთი ნაბიჯით გაყინვის“ მიდგომა ახალგაზრდა ღეროს წვერების ხანგრძლივი შენარჩუნებისათვის, ეს აჩვენებს, რომ აუცილებელია მეთოდოლოგიის შემდგომი გაუმჯობესება (De Carlo A. Et al., 2000; Paul H. et al., 2000).

კრიოპრეზერვაციის მეთოდი მძინარე ვეგეტატიური კვირტებისთვის (ზამთრის კვირტი), დაფუძნებული ორიგინალურ პროცედურაზე, რომელიც აღიწერა საკაის მიერ (Sakai A. 1960), გამოყენებული იქნა ვაშლის 1 915 ნიმუშისათვის. ამისათვის, ზამთრის კოლექციის

ყლორტები გამოაშრეს ცივ ოთახში, $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ზე 30% -იანი ტენიანობის პირობებში და ძალიან ნელა გააცივეს ($1\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{სთ}$) $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -მდე, სადაც ისინი 24 საათის განმავლობაში რჩებიან თხევადი აზოტის ორთქლის ფაზაში გადასვლამდე ($-160\text{ }^{\circ}\text{C}$). მარაგიდან დაბრუნების და ფესვის ნაწილზე დამყნობის შემდეგ, მთლიანი ნიმუშების 90% -მა აჩვენა გადარჩენის 30% -ზე მაღალი მაჩვენებელი. ანალოგიურად, წარმატებული მრავალნაბიჯიანი წინასწარ გაყინვის პროცედურა შემუშავდა თუთის და მსხლის ზამთრის კვირტისთვის. აქ, შეგუებით დამუშავება მოიცავდა $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ზე კვირტის ტემპერატურის დღის განმავლობაში შემცირებას, რათა ტემპერატურამ დაიწიოს $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ -დან $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ -მდე გადასვლა, რასაც მოჰყვება თხევად აზოტში პირდაპირი ჩაშვება. უფრო კლასიკური "ვიტრიფიკაცია / ერთი ნაბიჯი გაყინვა" მიდგომა შემოთავაზებულია ხურმის (*Diospyros kaki*) ზამთრის მძინარე კვირტების კრიოპრეზერვაციისთვის, რომელიც შეგროვებულ იქნა პირდაპირ მინდვრიდან (Matsumoto T. et al., 2004).

ღეროს წვერობთან შედარება, გვამცნობს რომ ემბრიონული კალუსის და სომატური ემბრიონის კრიოპრეზერვაცია შეზღუდულია მერქნიანი მცენარეებისათვის. მერქნიანი სახეობების რაოდენობა, რომელთათვისაც შემუშავდა „ერთი ნაბიჯი გაყინვის“ პროცედურა ბოლო წლებში განვითარდა, მათ შორის არის ევროპული წაბლი (*Castanea sativa*), (*Fraxinus angustifolia*), კორპის მუხა (*Quercus suber*), ზეთის ხე (*Olea europea*) და *Aesculus hippocastanum*. ასევე ზოგიერთი ტროპიკული ტყის და ხილის სახეობების ემბრიოგენული კალუსები წარმატებით იქნა კრიოპრეზერვირებული. იზოლირებული სომატური ემბრიონები ან ემბრიოგენური კალუსების ნაწილები გამოიყენება როგორც ექსპლანტი და მუშავდება PVS2-ით ან, სხვაგვარად, ინკაფსულირდება და დეჰიდრატირდება, პირდაპირ თხევადი აზოტში ჩადირვით (Correidoira E. et al., 2004; Panis B. and Lambardi M. 2006).

მყარმერქნიანი სახეობებისათვის, ნიმუშის პირდაპირ თხევად აზოტში ჩადირვის გარდა, ნელი გაგრილების ტექნიკის გამოყენება ჯერ კიდევ არ არის გავრცელებული. ნელი გაგრილების მიდგომით ღეროს წვერის გადარჩენის ხარისხი ცვლადია, დაწყებული მინიმუმ 34% -დან (ჩვეულებრივი კაკლის ხე (*Juglans regia*)) მაქსიმუმ 92% -მდე (*Malus* spp.). ასევე „ინკაფსულაცია/დეჰიდრატაციის“ და ნელი გაყინვის კომბინაცია შემოთავაზებულია კაკლის სომატური ემბრიონის კრიოპრეზერვაციისათვის (de Boucaud M.T. and Brison M., 1995; de Boucaud M.T. et., 1994).

კრიოპრეზერვაცია თამაშობს მნიშვნელოვან როლს წიწვოვნების კლონური შერჩევის პროგრამებში. სომატურ ემბრიოგენეზზე დაფუძნებული ნელი გაგრილების მიდგომა, ეფექტური პროცედურაა, რომლებიც წარმატებით განვითარდა მრავალრიცხოვანი სახეობების *Picea*, *Pinus*, *Larix*, *Abies* და *Pseudotsuga* ემბრიოგენური კულტურისათვის. მნიშვნელოვანი პროგრამა, რომელიც გამოიყენება წიწვოვნების გენეტიკური რესურსების კრიოპრეზერვაციისათვის განვითარდა „British Columbia“-ში, სადაც 5 000-ზე მეტი ემბრიონული ხაზი ამჟამად ინახება თხევად აზოტში (Cyr D.R., 2000).

დღეისათვის, არანაირი ინფორმაცია არ არის ხელმისაწვდომი წიწვოვნების ღეროების წვერის კრიოპრეზერვაციის შესახებ.

თესლის გრძელვადიანი შენახვისთვის, განვითარებული იქნა ეფექტური კრიოპრეზერვაციული პროცედურები, როგორც მთელი თესლისთვის და ასევე ემბრიოგენური ღერძებისათვის, რომლებიც მიღებულია მრავალი ზომიერი და ტროპიკული ხის სახეობიდან. წინასწარი გამოშრობით ტენიანობის შემცველობა 20 %-ზე ნაკლებია რასაც მოჰყვება ნელი გაგრილება ან პირდაპირი ჩაძირვა თხევადი აზოტში, ეს არის საერთო მეთოდოლოგია გამოიყენებული „არა ურჩი“ თესებისათვის. თუმცა, ძალიან პერსპექტიული შედეგები იქნა მიღწეული ასევე ტყის სახეობებით, რომლებიც ხასიათდება „სუბ-ორთოდოქსული“ ან ძნელად გაღებადი (რეკალციტრატული) თესლებით. პოლიემბრიულ ციტრუსში და მასთან დაკავშირებულ სახეობებში, შემუშავდა სხვადასხვა პროცედურები, მათი თესლის კრიოშენახვისათვის და აღინიშნა ორივე ზიგოტური და ჩანასახოვანი ემბრიონის ხელახალი ზრდა. ორივე სახის ემბრიონები ძალიან მნიშვნელოვანია ციტრუსების სახეობების ევოლუციის, გამოყვანისა და გამრავლებისთვის (Panis B. and Lambardi M. 2006).

2. მეთოდები

2.1 კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა ევროპული წაბლის (*Castanea sativa* Mill.) ნაყოფები, რომლებიც მოვიპოვეთ ოქტომბერ-ნოემბერში, საჩხერისა და ტყიბულის რაიონებში. იდენტიფიცირებული მასალა ექსპერიმენტის დაწყებამდე ინახებოდა +4 °C ტემპერატურაზე, მშრალ პირობებში. ექსპლანტად გამოვიყენეთ მომწიფებული წაბლის ნაყოფებიდან იზოლირებული ზიგოტური ემბრიონები.

2.2 ექსპლანტის იზოლირება და სტერილიზაცია

წაბლის ნაყოფებს კარგად ვრეცხავდით საყოფაცხოვრებო დეტერგენტის გამოყენებით, შემდეგ ვაყოვნებდით 2-3 დღის განმავლობაში წყალში. მომდევნო ეტაპზე ნაყოფს ვაშორებდით პერიკარპს და ისევ კარგად ვრეცხავდით დეტერგენტით. შემდეგ ვათავსებდით 1.5-2 წუთის განმავლობაში 70 %-იან ეთანოლში. ნაწილობრივ გასტერილებულ მასალაც 3-5-ჯერ გადავრეცხავდით დისტილირებული წყლით და ვასტერილებდით ნატრიუმისჰიპოქლორიდის (SIGMA-ALDRICH) 10 %-იანი ხსნარით (ვუმატებდით 2-3 წვეთ დეტერგენტს (TWEEN 20)) 20 წთ-ის განმავლობაში. ყველა დანარჩენ მანიპულაციას ვატარებდით ლამინარ ბოქსში. ჰიპოქლორიდით გასტერილებულ ნაყოფებს კარგად ვრეცხავდით (5-ჯერ) დისტილირებული სტერილური წყლით.

2.3 ექსპლანტების დეჰიდრატაცია

დეჰიდრატაციის თითოეული ექსპერიმენტული წერტილსათვის იზოლირებულ 50 ემბრიონს ვათავსებდით ღია პეტრის ჯამზე და ვაყოვნებდით სტერილური ჰაერის ნაკადის ზემოქმედების ქვეშ 1, 2, 3, 4 და 5 სთ-ის განმავლობაში. ამის შემდეგ, ვიღებდით 10

ემბრიონს და ვწონილით ცალ-ცალკე, ემბრიონის მასა შეესაბამებოდა მის „საწყის მასა“-ს (FW), შემდეგ ნიმუშებს ვათავსებდით საშრობ კარადაში 85 °C-ზე 24 საათის განმავლობაში. ერთი დღე-ღამის შემდეგ ემბრიონებს ისევ ვწონილით და ვიგებდით მათ „შშრალ მასა“ -ს (DW). ტენიანობის პროცენტულ შემცველობას ვანგარიშობდით შემდეგი ფორმულით:

$$\text{ტენიანობა(\%)} = \frac{(FW - DW) \times 100}{FW}$$

თითოეული საექსპერიმენტო დროისათვის ვიღებდით 50 ემბრიონს, რაც ჯამურად შეადგენდა 300.

2.4 ემბრიონების დამუშავება PVS-2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით

ვიტრიფიკაციისათვის გამოყენებული ემბრიონების საერთო რაოდენობა იყო 200. რომლებიც გადავანაწილეთ ექსპერიმენტის 5 წერტილზე (T₀, T₃₀, T₆₀, T₉₀, T₁₂₀), თითოეულზე 40 ემბრიონი, რომლებიც ხსნარებით გარკვეული დამუშავების შემდეგ განკუთვნილი იყო კვლევის სხვადასხვა ეტაპისათვის. ექსპერიმენტის ყველა წერტილიდან ემბრიონებს თავდაპირველად ვათავსებდით 20 წუთის განმავლობაში „loading solution“-ში, რომელიც დავამზადეთ 2 M გლიცეროლისა და 0.4 M საქაროზის გამოყენებით. აღნიშნული ხსნარიდან ემბრიონები გადაგვქონდა შესაბამისი დროის განმავლობაში PVS2 ხსნარში 0 °C ტემპერატურაზე. ექსპერიმენტის წერტილებს შორის განმასხვავებელი სწორედ PVS2 ხსნარში (30 % გლიცეროლი, 15 % ეთილენგლიკოლი და 15 % დიმეთილსულფოქსიდი (DMSO), თითოეული კომპონენტი გავხსენით 0.4 M საქაროზის შემცველ MS არეში) ექსპოზიციის დრო იყო. T₃₀-ის შემთხვევაში PVS2 ხსნარში დაყოვნების დრო იყო 30 წთ, T₆₀-სათვის -60 წთ, T₉₀-

სათვის - 90 წთ და T_{120} -სათვის - 120 წთ. T_0 -ის შემთხვევაში ემბრიონები მხოლოდ „loading solution“-ში გვექონდა მოთავსებული, PVS2-ში მოთავსების გარეშე და შემდეგ გადავრეცხეთ. გადარეცხვისათვის გამოვიყენეთ სპეციალური გადასარეცხი ხსნარი, რომელიც მხოლოდ 1.2 M საქაროზის ბაზაზე დავამზადეთ. ემბრიონები გადავრეცხეთ 2-ჯერ 10 წთ-ის განმავლობაში, მაგრამ არ გავრეცხეთ ემბრიონები, რომლებიც შევინახეთ თხევად აზოტში. საკონტროლოდ ავიღეთ ემბრიონები ყოველგვარ ხსნარში მოთავსების გარეშე ($T_{control}$).

2.5 ემბრიონების კრიოპრეზერვაცია და გამოლღობა

დეჰიდრატაციითა და ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებულ ემბრიონებს ვათავსებდით 2 მლ-იან კრიოსინჯარებში (10 ცალი ერთ სინჯარაში), ვდგამდით კრიო დიუარში და ვინახავდით თხევად აზოტში ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ზე) 24 საათის განმავლობაში. თხევადი აზოტიდან ემბრიონები გამოვალღვეთ $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ზე, 2 წუთის განმავლობაში, წყლის აბაზანაში.

2.6 ემბრიონების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა

სიცოცხლისუნარიანობის შეფასება ხდებოდა ტეტრაზოლიუმის ტესტის საშუალებით (TTC). გამოვიყენეთ BioFroxx-ის პრეპარატი Tetrazoliumchlorid. მეთოდის არსი დაფუძნებულია ქიმიურ რეაქციაზე, რომლის დროსაც 2,3,5 ტრიფენილტეტრაზოლიუმის უფერო ხსნარი ცოცხალ ქსოვილებში გადადის წითელი ფერის ფორმაზინში (რეაქციის კატალიზატორია H-ის გადამტანი ფერმონტი ჰიდროგენაზა).

დეჰიდრატაციის და ვიტრიფიკაციის თითოეული ექსპერიმენტული წერტილიდან, თხევად აზოტში მოთავსებამდე და აზოტიდან გამოლღობის შემდგომ, 10 ემბრიონი გადაგვექონდა ფილტრის ქალაღიან პეტრის ჯამზე და ზემოდან ვასხამდით 2 მლ 1 %-იან ტეტრაზოლიუმის ხსნარს, მასალას ვათავსებდით სიბნელეში 24 საათის განმავლობაში და შემდეგ ვნახულობდით შედეგს. ცოცხალი ემბრიონები წითლად იღებებოდა.

2.7 ემბრიონების აღმოცენების უნარის განსაზღვრა

ემბრიონების აღმოცენების უნარის შესაფასებლად დეჰიდრატირებული და ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ემბრიონები თხევად აზოტში მოთავსებამდე და გამოლობის შემდგომ გადაგვქონდა WPM (Lloyd and McCown, 1981) საკვებ არეზე და ვათავსებდით $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ტემპერატურულ პირობებში 16/8 საათიანი დღე-ღამური ფოტოპერიოდიზმის და $36\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (2000 Lux) ფლუორესცენტრული დღის განათების ინტენსივობის პირობებში.

კულტურის ინიცირებისათვის გამოყენებული იქნა WPM (Lloyd and McCown, 1981) საკვები არე, რომელსაც დაემატა საქაროზა 30 გ/ლ კონცენტრაციით, აგარი (Plant media a division of bioWORLD) 6 გ/ლ, ფენოლური ნაერთების ინჰიბიტორი გააქტივებული ნახშირი(SIGMA-ALDRICH) (0,3 %) და ზრდის რეგულატორს 6-ბენზინამინოპურინს (BAP) 0.4 μM -ს.

აღმოცენების უნარიანობას ვაკვირდებოდით და ვაფასებდით თხევად აზოტში გაუყინავი ემბრიონების შემთხვევაში ერთი თვის განმავლობაში, ხოლო აზოტიდან გამომდვალი ემბრიონების შემთხვევაში ორი თვის მანძილზე.

ექსპერიმენტის მსვლელობისას შვეისწავლეთ სხვადასხვა პარამეტრები, როგორცაა მთლიანი მცენარის განვითარება, მხოლოდ ფესვის განვითარება, ფესვისა და ღეროს ზრდის სტატუსი. შედეგების აღირიცხებოდა ორ კვირიანი ინტერვალით.

2.8 მონაცემთა სტატისტიკური დამუშავება

დეჰიდრატაციისა და ვიტრიფიკაციის ექსპერიმენტები გავიმეორეთ ორჯერ. დეჰიდრატაციის თითოეული ექსპერიმენტული წერტილისათვის ვიღებდით 50 ემბრიონს და ჯამში დავამუშავეთ 600 ემბრიონი. ვიტრიფიკაციის შემთხვევაში თითოეულ წერტილზე ავიღეთ 40 ემბრიონი და ჯამურად გამოვიყენეთ 400 ემბრიონი.

მცენარის სრულ აღმოცენებასა და მხოლოდ ფესვგანვითარებულ ინდოვიდებს ვადგენდით, აღნიშნული მახასიათებლების მქონე მცენარეთა პროცენტული რიცხის დათვლით. ღეროსა და ფესვის სიგრძეების ანალიზის შემთხვევაში ვითვლიდით, თითოეული ექსპერიმენტული წერტილისათვის საშუალო მნიშვნელობებს და საშუალო სტანდარტულ გადახრებს.

სტატისტიკური ანალიზი შესრულებული იქნა t-test-ის გამოყენებით.

3. კვლევის შედეგები და ანალიზი

3.1 დეჰიდრატაციით დამუშავებული წაბლის ზიგოტური ემბრიონების სხვადასხვა პარამეტრის შესწავლა

3.1.1 ზიგოტურ ემბრიონებში ტენის შემცველობა დროის სხვადასხვა პერიოდში გამოშრობის შემდეგ, თხევად აზოტში მოთავსებამდე

იდენტიფიცირებული წაბლის ნაყოფებიდან, სტერილიზაციის შემდეგ, მოვახდინეთ ზიგოტური ემბრიონების იზოლირება ექსპერიმენტის მომდევნო ეტაპებისათვის (სურ. 1). სტერილიზაციის სხვადასხვა საშუალებების გამოყენებით ექსპლანტების დაბინძურების ხარისხი შემცირდა მინიმუმამდე. სტერილური ექსპლანტის გამოყენება მნიშვნელოვანი ფაქტორია მცენარის *in vitro* გამრავლების პროცესში და კონსერვაციისათვის.

ტენის შემცველობა განვსაზღვრეთ დეჰიდრირებული ემბრიონებისათვის. აღნიშნული პარამეტრის დასადგენად, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ვიგებდით ექსპლანტების საწყის მასას (FW) და მშარალ მასას (DW), მათზე გადათვლებით ვადგენდით ტენის პროცენტულ რაოდენობას (სურ. 1). მიღებულმა შედეგებმა გვიჩვენა, რომ ლამინარ-ბოქსში ზიგოტური ემბრიონების გამოშრობის დროის გაზრდასთან ერთად ტენის შემცველობა იკლებს, ანუ არსებობს უკუპროპორციული დამოკიდებულება. ტენის შემცველობის ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი (66.21 %) ჰქონდა საკონტროლოდ აღებულ გამოუშრობ ემბრიონებს, ხოლო დანარჩენ ექსპერიმენტულ წერტილებში ტენის შემცველობა კლებულობდა გამოშრობის ხანგრძლივობის გაზრდასთან ერთად, ყველაზე მცირე მაჩვენებელი მივიღეთ 5 საათანი შრობის შედეგად (21.38 %) (ცხრილი 1).

3.1.2 დეჰიდრირებულ, გაუყინავ ზიგოტურ ემბრიონებში ტენის შემცველობის დამოკიდებულება სიცოცხლისუნარიანობასა და გაღივების ხარისხთან

გარკვეული კორელაცია დაფიქსირდა დეჰიდრირებული ზიგოტური ემბრიონების ტენის შემცველობასა და მათ სიცოცხლისუნარიანობა-გაღივების ხარისხს შორის, როგორც თხევად აზოტში მოთავსებამდე, ასევე თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ. ცხრილი 1-დან კარგად ჩანს, რომ დეჰიდრატაციის ექსპერიმენტის ყველა წერტილის: 1, 2, 3, 4 და 5 საათის განმავლობაში ლამინარ-ბოქსში გამომშრალი და საკონტროლოდ აღებული, ემბრიონები თხევად აზოტში მოთავსებამდე იყვნენ 100 %-ით სიცოცხლისუნარიანები ანუ ექსპლანტის ქსოვილები არ იყო დაზიანებული და გაუწყლოების მაჩვენებელი არ იყო იმდენად მაღალი, რომ ემბრიონს სიცოცხლის უნარი დაეკარგა. აქედან გამომდინარე, ემბრიონები სიცოცხლიუნარიანობის მაჩვენებლის შესაბამისად მივიღეთ აღმოცენების 100 % ანუ ზიგოტური ემბრიონების გაღივების ხარისხი იყო მაქსიმალური (სურ. 2). ამ შემთხვევაში საყურადღებოა, ტენის შემცველობის დაბალი მაჩვენებელი 4 და 5 საათის განმავლობაში გამომშრალ ემბრიონებში ექსპერიმენტის დანარჩენ წერტილებთან შედარებით, მაგრამ შეგვიძლია ვთქვათ, რომ წყლის შემცველობის 21-22 % ზიგოტურ ემბრიონში, სავსებით საკმარისია მისი გაღივების და საკვებ არეზე ზრდისათვის. როგორც ჩანს, ტენის ეს რაოდენობა კარგად უზრუნველყოფს ემბრიონის აღმოცენების პროცესში მიმდინარე

ფერმენტული რეაქციათა ჯაჭვის აქტივაციასა და მიმდინარეობას, კერძოდ ჰიდროლაზების ფუნქციონირებას.

3.1.3 დეჰიდრირებულ ზიგოტურ ემბრიონებში ტენის შემცველობის დამოკიდებულება, თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდგომ სიცოცხლისუნარიანობასა და გაღივების ხარისხთან

კრიოპრეზერვაციის შემდეგ მივიღეთ ზიგოტური ემბრიონების სიცოცხლისუნარიანობისა და გაღივების შეცვლილი სურათი. ექსპლანტთა ნაწილმა დაკარგა თხევად აზოტში მოთავსებამდე დაფიქსირებული 100 %-იანი მაჩვენებელი. კონკრეტულად, ტეტრაზოლიუმის ტესტით სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრამ აჩვენა გარკვეული კავშირი ემბრიონებში ტენის შემცველობასა და შეღებვის ფერის ინტენსივობას შორის, რითაც ვადგენდით სიცოცხლის უნარს. 1-ლი ცხრილიდან ჩანს, რომ სადაც ყველაზე მაღალი იყო ტენის შემცველობა, საკონტროლო წერტილში, ყველაზე დაბალი მივიღეთ სიცოცხლისუნარიანობა 40 %. ტენის მაჩვენებლის კლებასთან ერთად, მოიმატა სიცოცხლისუნარიანობამ (60 %, 80 %, 90%) და საბოლოოდ მაქსიმალური 100 % შეინარჩუნა 4 და 5 საათიანმა ექსპერიმენტულმა წერტილებმა, რომელთა ზიგოტური ემბრიონები ყველაზე მცირე რაოდენობით წყალს შეიცავდნენ. თხევადი აზოტიდან გამომდვალმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა მსგავსად სიცოცხლისუნარიანობისა, უკუპროპორციული დამოკიდებულება აჩვენა ტენის შემცველობასა და ემბრიონის გაღივებას შორის. ამ შემთხვევაშიც საკონტროლო წერტილის ზიგოტური ემბრიონები ვერ აღმოცენდა, მათი გაღივების მაჩვენებელი იყო 0 %, 1 საათის განმავლობაში გამშრალ ემბრიონებშიც გაღივების დაბალი, 21 % დაფიქსირდა. შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ზიგოტური ემბრიონების გაღივების ესეთი დაბალი მაჩვენებელი გამოიწვია ტენის მაღალმა შემცველობამ, რომელიც თხევად აზოტში მოთავსებულ ემბრიონებში გადაიქცა ყინულის კრისტალებად, დააზიანა უჯრედების მემბრანები და შედეგად ქსოვილებმა განიცადა კვდომა. გამოშრობის ხანგრძლივობის გაზრდის და ტენის შემცირების პარალელურად მოიმატა აღმონაცენების პროცენტულმა მაჩვენებელმა. შედარებით მაღალი გაღივება-აღმოცენების უნარი გამოავლინა 4 და 5 საათის განმავლობაში დეჰიდრატირებულმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა, რომელთა

სიცოცხლისუნარიანობა იყო მაქსიმალური. გაღვივების მაჩვენებელი აღნიშნულ შემთხვევაში მივიღეთ 62-80 %, რაც კრიო შენახვის შემდეგ საკმაოდ მაღალი მნიშვნელობაა (სურ. 2).

3.1.4 დროის სხვადასხვა პერიოდში გამოძმრალი, თხევად აზოტში გაუყინავი, ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების შეფასება

წაბლის ნაყოფიდან იზოლირებული ზიგოტური ემბრიონების, ლამინარ-ბოქსში მეთოდით გათვალისწინებული დროის განმავლობაში გამოშრობის და საკვებ არეზე გადატანის შემდეგ, შევაფასეთ გაღვივების ხარისხი ანუ მცენარეთა რა ნაწილმა დაიწყო აღმოცენება, აქ ვითვალისწინებდით, როგორც მთლიანად განვითარებულ ასევე მხოლოდ ფესვ განვითარებულ *in vitro* მცენარეებს. ვაკვირდებოდით აღმონაცენების მორფოლოგიური განვითარების სტადიებს, რის შედეგადაც მივიღეთ, რომ დეჰიდრირებულმა, გაუყინავმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა საკვებ არეზე მოთავსებიდან 1 კვირაში (5-8 დღე) გამოიღო პირველი ფოთოლი (ნამდვილი ფოთლის ფაზა), ამ პერიოდში აღმონაცენებს დაახლოებით 12-17 მმ ზომის ფესვები ჰქონდათ განვითარებული (სურ. 8).

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, არაკრიოპრეზერვირებული დეჰიდრირებული ზიგოტური ემბრიონების გაღვივების მაჩვენებელი ყველა ექსპერიმენტული წერტილისათვის იყო მაქსიმალური, მსგავს სურათს არ იმეორებდა მთლიანი მცენარის განვითარება. 1, 2, 3 და 4 საათიანი გამოშრობის შემდეგ ექსპლანტებიდან განვითარებულ ყველა აღმონაცენს ჰქონდა ფესვი და ღერო ანუ ამ შემთხვევაში მივიღეთ მთლიანი მცენარის განვითარების 100 %-იანი მაჩვენებელი, ხოლო ეს რიცხვი შედარებით შემცირებული იყო 3 და 5 საათის განმავლობაში გამოძმრალი ზიგოტური ემბრიონებისათვის (87 %; 93 %). მოცემული მონაცემების შესაბამისად მხოლოდ ფესვ განვითარებული ინდივიდები დაფიქსირდა 3 და 5 საათიან ექსპერიმენტულ წერტილებზე (სურ. 3; ცხრილი 1).

ექსპერიმენტის მიმდინარეობისას ჩვენთვის საინტერესო იყო აღმოცენებული მცენარების ვეგეტატიური ორგანოების ზომის და ზრდის ინტენსივობის შეფასება. ყოველ კვირეული მონიტორინგის საშუალებით ვაფასებდით ფესვისა და ღეროს სიგრძეებს და

ნაზრდს. ცხრილ 2-ში მოცემულია ფესვის სიგრძის ცვლილების ოთხი კვირის შედეგები გაუყინავ და თხევადი აზოტიდან გამომდვალ ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენებისათვის. არაკრიოპრეზერვირებულმა, დეჰიდრირებულმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა დაიწყეს ფესვის ინტენსიური ზრდა საკვებ არეზე გადატანიდან პირველივე კვირას. ფესვის ზომის თითქმის ერთნაირი, დაახლოებით 11-16 მმ, მაჩვენებელი დაფიქსირდა ექსპერიმენტის ყველა წერტილის ემბრიონების აღმონაცენებისათვის (სურ. 8). მეორე კვირას ფესვის ზრდის ინტენსივობა შედარებით შენელდა 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ემბრიონების აღმონაცენებში. ყველა დანარჩენმა ნიმუშმა ფესვის ზომა საწყის მაჩვენებელთან შედარებით გაიორმაგა. მესამე კვირას ფესვის ინტენსიური ზრდა შენარჩუნდა საკონტროლოდ აღებულ ემბრიონთა აღმონაცენებში და ასევე 5 და 4 საათიან ექსპერიმენტულ წერტილებში. შედარებით შესუსტდა ზრდა, წინა ორ კვირასთან შედარებით, 1 და 3 საათიან ნიმუშებში და ძალიან მცირე ნაზრდი აღენიშნა 2 საათის განმავლობაში გამომშრალ ემბრიონთა აღმონაცენებს. მეოთხე კვირის საბოლოო მონაცემებით, ყველაზე დიდი ზომის ფესვი განივითარა საკონტროლოდ აღებული, გამოუშრობი ზიგოტური ემბრიონებიდან აღმოცენებულმა მცენარეებმა, დაახლოებით 55 მმ სიგრძის, შემდეგი იყო 4 და 5 საათის მანძილზე გამომშრალი ემბრიონების აღმონაცენები, დაახლოებით 50-52 მმ ზომის (სურ. 9).

მეორე მნიშვნელოვანი პარამეტრი, რომლის მიხედვითაც მცენარეთა *in vitro* აღმონაცენებს ვაფასებდით იყო ღეროს სიგრძე. მე-3 ცხრილიდან ჩანს რომ, გაუყინავი ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენების ღერომ, დეჰიდრატაციის ექსპერიმენტის ყველა წერტილისათვის, პირველივე კვირას დაიწყო ზრდა და თითქმის ერთნაირი ინტენსივობით. ერთი კვირის მცენარეებს დაახლოებით 6 მმ სიგრძის ღერო განუვითარდათ. მეორე კვირას, საკონტროლო წერტილის გარდა, ყველა დანარჩენში ზრდა თითქმის ერთნაირი ინტენსივობის იყო და ნაზრდიც მსგავსი დაფიქსირდა. მესამე კვირას ზრდა შედარებით შესუსტდა 3 და 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენებში. ოთხი კვირის შემდეგ ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი ღეროს ზომის დაფიქსირდა საკონტროლო წერტილში, დაახლოებით 33 მმ სიგრძის ღეროები (სურ. 8). ერთმანეთის მსგავსი მაღალი მაჩვენებელი აჩვენა სამმა წერტილმა 1, 2 და 4 საათის მანძილზე გამომშრალმა ემბრიონებმა, მათ *in vitro* აღმონაცენებს ჰქონდა დაახლოებით 28-33 მმ ზომის ღეროები, რომლებიც კარგად განვითარებული ფოთოლთა სისტემით ხასიათდებოდნენ.

შედარებით მცირე ზომის ღერო გაეზარდა, დაახლოებით 23 მმ, 3 და 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენებს.

3.1.5 დროის სხვადასხვა პერიოდში გამომშრალი, თხევადი აზოტიდან გამომდვალი, ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების შეფასება

თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ, საკვებ არეზე გადატანილი, კრიოპრეზერვირებული ზიგოტური ემბრიონების ყველა *in vitro* აღმონაცენმა განივითარა ფესვი და ღერო. ნამდვილი ფოთლის ფაზა დაიწყო 2 კვირის შემდეგ. კრიოპრეზერვირებული ზიგოტური ემბრიონებიდან მთლიანი მცენარის განვითარება, თითქმის ემთხვევა და სქემატურად მიყვება გალივების შედეგს, საკონტროლო წერტილის აღმოცენება იყო 0 % და შესაბამისად აქ არც მთლიანი და არც ნაწილობრივ განვითარებული მცენარე არ მიგვიღია. 1 საათის მანძილზე გამოშრობილი ემბრიონების გალივების ხარისხი იყო 21 % და ყველა ეს აღმონაცენი გულისხმობდა მხოლოდ ფესვის განვითარებას და მოცემული მცენარეებიდან არც ერთს არ ჰქონდა სრულად ჩამოყალიბებული მცენარის ყველა ვეგეტატიური ორგანო. 2, 3, 4 და 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების ნაწილი იყო მთლიან მცენარედ განვითარებული და ნაწილს მხოლოდ ფესვის ზრდა აღენიშნებოდა. მთლიანი მცენარის განვითარების მხრივ ორი შედარებით კარგი ვარიანტი გამოიკვეთა, 4 და 5 საათიანი შრობის რეჟიმები, მაგრამ ყველა ექსპერიმენტულ წერტილზე საუკეთესო აღმოჩნდა 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონებიდან მთლიანი მცენარის განვითარების რიცხვი, დაახლოებით 67 % (ცხრილი 1; სურ. 3).

კრიოპრეზერვირებული, დეჰიდრირებული ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენების ფესვის ზრდა შენელებულად მიმდინარეობდა და მიღებული ფესვები ზომითა და განვითარებით იყო გაცილებით ნაკლები ვიდრე გაუყინავი ემბრიონების აღმონაცენების. კრიოპრეზერვირებული საკონტროლო წერტილის ემბრიონები ვერ აღმოცენდა, მიუხედავად სიცოცხლისუნარიანობის 40 %-იანი მაჩვენებლისა, ჩანასახები იყო დაზიანებული თხევადი

აზოტის მიერ. 1 საათიანი გამოშრობით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების ფესვის ზრდა დაიწყო მეოთხე კვირას და *in vitro* აღმონაცენების ფესვები იყო მცირე ზომის, ძალიან სუსტად განვითარებული, დაახლოებით 6 მმ. 2 და 3 საათის განმავლობაში გამომშრალმა ემბრიონებმა ფესვის განვითარება დაიწყეს მეორე კვირას, მაგრამ პროცესი იყო საკმაოდ შენელებული და სუსტი, ოთხკვირიანი მცენარის ფესვის სიგრძე მსგავსი იყო 1 საათის განმავლობაში გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონების აღმოცენებისა. 4 საათიანი ექსპერიმენტული წერტილის ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენებმა ფესვის ზრდა დაიწყეს პირველივე კვირას, მაგრამ ამ შემთხვევაშიც ზრდის მაჩვენებელი არ იყო მაღალი და საბოლოოდ დაახლოებით 8 მმ-იანი ფესვის მქონე მცენარეები მივიღეთ. საუკეთესო შედეგი აჩვენა 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენებმა. მათ ფესვის ზრდა დაიწყეს პირველივე კვირას და მისი სიგრძე მოცემულ მომენტში ექსპერიმენტის ყველა სხვა წერტილის ოთხკვირიანი აღმონაცენის ფესვის ზომაზე მეტი იყო. პროცესი შედარებით შენელდა მეორე კვირის განმავლობაში, მაგრამ აქტიურად გაგრძელდა მესამე კვირიდან, საბოლოოდ ოთხი კვირის მცენარეს ჰქონდა დაახლოებით 40 მმ სიგრძის, საკმაოდ მძლავრი ფესვები, რაც მცენარეთა გადატანის საშუალებას იძლეოდა, შემდგომი აკლიმატიზაციისათვის (ცხრილი 2).

საკვებ არეზე გადატანილმა, თხევადი აზოტიდან გამომდვალმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა ღეროს განვითარებისა და ზრდის განსხვავებული სურათი გვაჩვენეს. მე-3 ცხრილიდან ჩანს, რომ ღერო არ განუვითარდა საკონტროლოდ აღებულ და 1 საათიანი გამოშრობით დამუშავებული ემბრიონების აღმონაცენებს. 2 და 3 საათიანი ექსპერიმენტული წერტილების ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების ღერომ ზრდა დაიწყო მეორე კვირას და ოთხი კვირის შემდეგ მივიღეთ მცირე ზომის, სუსტი, 5-6 მმ სიგრძის მქონე მცენარეები. მსგავსი სურათი იყო 4 საათიანი გამოშრობის ემბრიონებისათვის. მიუხედავად იმისა, რომ აღნიშნულ შემთხვევაში აღმოცენება და ღეროს ზრდა დაიწყო პირველივე კვირას ღეროს ზრდის პროცესი, მსგავსაც ფესვის ზრდისა ძალიან ნელა და სუსტად მიმდინარეობდა, შესაბამისად ოთხი კვირის შემდეგ მივიღეთ 7 მმ ღეროს სიგრძის მქონე მცენარეები. საუკეთესო შედეგი აჩვენა 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენებმა, ღეროს ზრდა დაიწყო პირველივე კვირას, მცირე იყო ნაზრდი მეორე კვირას, მაგრამ ელონგაციის პროცესმა მესამე კვირას ინტენსიური სახე მიიღო და საბოლოოდ მცენარეებმა განვითარეს 22 მმ ზომის კარგად განვითარებული ფოთლის საფარის მქონე

ღეროები და მცენარეები გადავიტანეთ აკლიმატიზაციისათვის კონტროლირებად კამერაში (სურ. 12).

თუ შევადარებთ *in vitro* აღმონაცენების ფესვისა და ღეროს განვითარების სურათს თხევად აზოტში მოთავსებამდე და გამოლღობის შემდეგ, შევამჩნევთ, რომ ექსპერიმენტის წერტილებმა, რომელთა ზიგოტურმა ემბრიონებმა ფესვისა და ღეროს ზრდის საუკეთესო მაჩვენებელი დააფიქსირეს კრიოპრეზერვაციამდე, გაყინვის შემდეგ ან საერთოდ ვერ განვითარდნენ ან მათი ზრდა ძლიან სუსტად მიმდინარეობდა. ორივე პარამეტრის განვითარების მხრივ, საუკეთესო ვარიანტად ისახება ზიგოტური ემბრიონების 5 საათის განმავლობაში გამოშრობის დანერგვა მცენარეთა კრიოპრეზერვაციისათვის, ეს არის ოპტიმალური წერტილი, რადგან ამ დროის მანძილზე გამომშრალმა ექსპლანტებმა არ დაკარგეს აღმოცენების უნარი და საკმაოდ კარგი ნაზრდი მოგვცეს გაყინვამდე და მსგავსი ზრდის ტემპი შეინარჩუნეს გაყინვის შემდგომაც, ყველა სხვა ვარიანტთან შედარებით.

3.2 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული წაბლის ზიგოტური ემბრიონების სხვადასხვა პარამეტრის შესწავლა

3.2.1 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების სიცოცხლისუნარიანობა თხევად აზოტში გაყინვამდე და გამოლღობის შემდეგ

ტეტრაზოლიუმის ტესტით (TTC) სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრამდეჰიდრირებული ემბრიონებისა და PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ემბრიონების განსხვავებული შედეგები გვიჩვენა, მონაცემებს ვაანალიზებდით მიღებული შეფერილობის ინტენსივობის მიხედვით. ზემოთ ვისაუბრეთ, ლამინარ-ბოქსში სხვადასხვა დროის განმავლობაში გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონების სიცოცხლისუნარიანობის მაჩვენებლებზე კრიოპრეზერვაციამდე და კრიოპრეზერვაციის შემდეგ (სურ. 4 და 5). შედარებით შეცვლილი სურათი მივიღეთ PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ექსპლანტების შემთხვევაში (სურ. 6 და 7).

PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებულმა ემბრიონებმა თხევად აზოტში მოთავსებამდე აჩვენეს სიცოცხლისუნარიანობის საკმაოდ მაღალი პროცენტი (90-100 %). 100

%-იანი შედეგი კრიოშენახვის შემდეგ შეინარჩუნა ორმა ექსპერიმენტულმა წერტილმა : ზიგოტურმა ემბრიონებმა რომლებიც მხოლოდ „loading solution“-ში გვექონდა მოთავსებული (T₀) და ემბრიონები, რომლებიც PVS2 ხსნარით 30 წუთის განმავლობაში დამუშავდნენ (T₃₀). 80% აჩვენა ემბრიონებმა, რომელთა ექსპოზიციის დრო ვიტრიფიკაციის ხსნარში იყო 60 წუთი (T₆₀) და 90 წუთი (T₉₀). 120 წუთის განმავლობაში PVS2 ხსნარით დამუშავებული ექსპლანტების 70 % აღმოჩნდა სიცოცხლისუნარიანი. ყველაზე დაბალი მაჩვენებელი 40% მივიღეთ საკონტროლო წერტილზე (ცხრილი 4).

3.1.4 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენების ღეროსა და ფესვის სტატუსის შეფასება თხევად აზოტში გაყინვამდე

PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებულმა, თხევად აზოტში გაყინვამ ემბრიონებმა, საკვებ არეზე გადატანიდან ერთ კვირაში დაიწყო აღმოცენება. პირველი ფოთლის ფაზა დაიწყო 7-8 დღეში.

PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებულმა არაკრიოპრეზერვირებულმა ემბრიონებმა სიცოცხლისუნარიანობის 100%-იანი მაჩვენებელი ვერ შეინარჩუნეს საკვებ არეზე გადატანის შემდეგ და მათი გაღვივების პროცენტული მაჩვენებელი იყო დახლოებით 75-83 % (ცხრილი 4). მხოლოდ კონტროლმა შეინარჩუნა გაღვივების მაქსიმალური მნიშვნელობა, იქედან გამომდინარე რომ აღნიშნული წერტილის ზიგოტური ემბრიონები არ დამუშავებულა PVS2 ხსნარით. სიცოცხლისუნარიანობისა და გაღვივების ამგვარი კავშირი შესაძლოა გამოწვეული იყოს სხვადასხვა ფაქტორებით. შესაძლებელია ზიგოტური ემბრიონის ქსოვილები შეიღებოს ტეტრაზოლიუმის ხსნარით და მივიღოთ მკვეთრი წითელი შეფერვა და ვამბობთ, რომ მასალა 100 %-ით სიცოცხლისუნარიანია, მაგრამ ექსპლანტში გარკვეული ქსოვილთა უჯრედები იყოს დაზიანებული PVS2 ხსნარის შემადგენელი

კომპონენტებით, მაგალითად როგორცაა DMSO. მისი ხანგრძლივი მოქმედება, იწვევს მემბრანების განვლადობის ზედმეტად გაზრდას და უჯრედების დაზიანებას.

არაკრიოპრეზერვირებული ზიგოტური ემბრიონებიდან მთლიანი მცენარის რეგენერაციის ყველაზე მაღალი პროცენტული მაჩვენებელი მივიღეთ საკონტროლოდ აღებული ემბრიონების შემთხვევაში (100%), შემდეგი მაღალი მაჩვენებელი 67% აჩვენა, მხოლოდ „loading solution“-ით დამუშავებულმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა და ჩვენთვის ყველაზე საინტერესო იყო PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავების გავლენა მთლიანი მცენარის რეგენერაციის ხარისხზე. ცხრილი 4-დან ჩანს, რომ ყველა ექსპერიმენტული წერტილისათვის, გაღვივების მაჩვენებელზე დაბალი იყო მთლიანი მცენარის აღმოცენების რიცხი, რადგან ყველა აღმოცენებულ მცენარეს არ განუვითარდა ღერო. PVS2 ხსნარში ექსპლანტების დაყოვნების პერიოდის გაზრდასთან ერთად დაიკლო მთლიანი მცენარის რეგენერაციის ხარისხმა. ყველაზე მაღალი - 67% მივიღეთ 30 წუთიანი ექსპერიმენტული წერტილის შემთხვევაში (სურ. 10) და ყველაზე მცირე 40 % 120 წუთის განმავლობაში PVS2 ხსნარით დამუშავებული ექსპლანტების შემთხვევაში. იქედან გამომდინარე, რომ მცენარის მთლიანი აღმოცენების რიცხვი არ ემთხვევა ზოგადად გაღვივების მაჩვენებელს, შესაბამისად ექსპერიმენტში გვექონდა მცენარეები, რომლებმაც მხოლოდ ფესვი განივითარეს. 30 და 120 წუთის განმავლობაში PVS2 ხსნარით დამუშავებულმა გაუყინავი ემბრიონების აღმონაცენებმა მხოლოდ ფესვის განვითარების ერთნაირი 8 %-იანი შედეგი აჩვენეს, 60 წუთის განმავლობაში დამუშავებულმა ემბრიონებმა გვიჩვენა 25 % და 90 წუთიანი ექსპერიმენტული წერტილის შემთხვევაში ყველაზე მაღალი 42 % მივიღეთ მხოლოდ ფესვგანვითარებული მცენარეები .

ღეროს ზრდაზე დაკვირვებამ გვიჩვენა, რომ PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით სხვადასხვა დროის განმავლობაში დამუშავებულმა ემბრიონებმა თხევად აზოტში მოთავსებამდე, საკვებ არეზე, განსხვავებული ზრდის სიჩქარე აჩვენა და შესაბამისად ოთხი კვირის აღმონაცენები ღეროს განვითარების სტატუსით განსხვავდებოდნენ ერთმანეთისაგან. ღეროს ზრდა ექსპერიმენტის ყველა წერტილის წარმომადგენლებმა პირველივე კვირას დაიწყეს. ზრდის ყველაზე კარგი მაჩვენებელი დაფიქსირდა საკონტროლოდ აღებული ზიგოტური ემბრიონების შემთხვევაში და ოთხი კვირის აღმონაცენებს ჰქონდათ დაახლოებით 42 მმ სიგრძის ღეროები. ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ექსპერიმენტული წერტილების შემთხვევაში, საუკეთესო აღმოჩნდა 30 წუთის განმავლობაში PVS2 ხსნარში დაყოვნებული ემბრიონების

აღმონაცენები, დაახლოებით 30 მმ სიგრძის ღეროს განვითარებით, თითქმის მსგავსი შედეგი გვიჩვენა ემბრიონებმა, რომლებიც არ დამუშავდა ვიტრიფიკაციის PVS2 ხსნარით და მოთავსებული გვექონდა მხოლოდ „loading solution“-ში. ვიტრიფიკაციის PVS2 ხსნარით დამუშავება და ღეროს ზრდის მაჩვენებელს შორის რაიმე კანონზომიერება არ შეინიშნა. ფესვის განვითარების შემთხვევაშიც საუკეთესო მაჩვენებელი აღინიშნა საკონტროლო წერტილისათვის, დაახლოებით 65 მმ. ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ემბრიონებიდან ფესვის ზრდის მიხედვითაც საუკეთესო აღმოჩნდა, PVS2 ხსნარში 30 წუთის განმავლობაში დაყოვნებული ემბრიონების აღმონაცენები. ფესვისა და ღეროს განვითარების ყველაზე სუსტი შედეგი მივიღეთ PVS2 ხსნარში 90 და 120 წუთის განმავლობაში დაყოვნებული ემბრიონების აღმონაცენებისათვის (ცხრილი 5 ; სურათი 11).

3.1.5 PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენების ღეროსა და ფესვის სტატუსის შეფასება თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ

თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ, PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებულმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა აღმოცენება დაიწყეს საკვებ არეზე გადატანიდან ოთხი კვირის შემდეგ. PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებულმა კრიოპრეზერვირებულმა ზიგოტურ ემბრიონებმა აჩვენეს უკუპროპორციული დამოკიდებულება PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარში ექსპოზიციის დროსა და გალივების ხარისხს შორის, რაც უფრო იზრდებოდა ხსნარში დაყოვნების დრო მით უფრო იკლებდა აღმოცენების პროცენტული მაჩვენებელი. კერძოდ, რომ განვიხილოთ PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით 30 წუთის განმავლობაში დამუშავებულმა ზიგოტურმა ემბრიონებმა გალივების საუკეთესო მაჩვენებელი გამოავლინეს ექსპერიმენტის სხვა წერტილებთან შედარებით, ეს იყო 55 %. PVS2 ხსნარში 2 საათის განმავლობაში დაყოვნებულმა ექსპლანტებმა გალივების მხოლოდ 20 % აჩვენეს. მსგავსად, დაბალი 19 %-იანი შედეგი მივიღეთ ზიგოტური ემბრიონების შემთხვევაში, რომლებიც მხოლოდ საქაროზის შემცველი ხსნარით

დამუშავდნენ და არ მოგვითავსებია PVS2 ხსნარში. შედარებით მაღალი 25 %-იანი შედეგი აჩვენა ერთ საათიანმა ექსპერიმენტულმა წერტილმა. კრიოპრეზერვაციამ დამლუპველად იმოქმედა საკონტროლოდ აღებულ ემბრიონებზე, მსგავსად დეჰიდრატაციისა, თხევადმა აზოტმა გამოიწვია ქსოვილების დაზიანება და ემბრიონები არ აღმოცენდა (ცხრილი 4).

კრიოპრეზერვირებული ზიგოტური ემბრიონებისათვის მთლიანი მცენარის რეგენერაციის სურათი საგრძნობლად შეიცვალა არაკრიოპრეზერვირებულთან შედარებით. მე-4 ცხრილის მიხედვით, საკონტროლო წერტილის ზიგოტურმა ემბრიონებმა ვერ შეძლეს აღმოცენება. PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარში 60, 90 და 120 წუთით დაყოვნებულმა ემბრიონებმა აჩვენეს დაბალი პროცენტული რიცხვი (20-25 %) მთლიანი მცენარის აღმოცენების. გაუყინავ ემბრიონებთან შედარებით დაბალი, მაგრამ კრიოპრეზერვირებულ მასალებში საუკეთესო შედეგი აჩვენა PVS2 ხსნარით 30 წუთის განმავლობაში დამუშავებულმა ემბრიონებმა, აღნიშნული ექსპერიმენტული წერტილისათვის მთლიანი მცენარის განვითარების პროცენტული მაჩვენებელი იყო, დაახლოებით, 56 %. თხევადი აზოტიდან გამომდვალი ზიგოტური ემბრიონების ამონაცენებს შორის არ გვქონდა მხოლოს ფესვ განვითარებული *in vitro* მცენარეები.

ფესვისა და ღეროს განვითარების განსხვავებული სურათი მივიღეთ კრიოპრეზერვირებული ემბრიონების აღმონაცენებზე დააკვირვებისას. საკონტროლო წერტილის ემბრიონები არ აღმოცენდა. ძალიან სუსტი ღეროსა და ფესვის განვითარება აჩვენა მხოლოდ „loading solution“-ით დამუშავებული ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენებმა, ეპიკოტილესა და ჰიპოკოტილეს განვითარების საუკეთესო შედეგი აჩვენა ემბრიონებმა, რომელთა ექსპოზიციის დროს PVS2 ხსნარში 30 წუთი იყო. აღნიშნულ ექსპერიმენტული წერტილის ემბრიონთა აღმონაცენებს ჰქონდა საშუალოდ 23 მმ ღერო და 27 მმ ზომის ფესვი (სურ. 12). ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავების პერიოდის გაზრდასთან ერთად გამომდვალი ემბრიონების ფესვისა და ღეროს ზრდის მაჩვენებელი იკლებს. ვიტრიფიკაციის PVS2 ხსნარით დამუშავებული ემბრიონების შემთხვევაში ყველაზე სუსტად განვითარებული ფესვის მქონე *in vitro* აღმონაცენები მივიღეთ 90 წუთის განმავლობაში დამუშავებული ემბრიონების აღმონაცენების შემთხვევაში, ყველაზე სუსტი ღეროს მქონე 120 წუთის განმავლობაში PVS2 ხსნარში დაყოვნებული ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენები აღმოჩნდნენ (ცხრილი 6).

ყველა ზემოთ განხილული პარამეტრის მიხედვით, PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავებული კრიოპრეზერვირებული და არაკრიოპრეზერვირებული ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების განვითარების ხარისხის შეფასებისას კარგად ჩანს, რომ საუკეთესო ვარიანტი PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით ექსპლანტების დამუშავებისათვის არის 30 წუთი. ეს დრო საკმარისია, რომ ზიგოტურ ემბრიონში წარიმართოს ფიზიკური პროცესები სწორად და თხევადი აზოტის მკაცრ პირობებში, შეძლოს შეინარჩუნოს სიცოცხლისუნარიანობის გარკვეული მაღალი დონე და კრიოპრეზერვაციის შემდეგ სრულყოფილად აღმოცენდეს.

საბოლოოდ, რომ შევაჯამოდ და შევადართო დეჰიდრატაციისა და ვიტრიფიკაციის გამოყენებით დამუშავებული წაბლის ზიგოტური ემბრიონების განვითარებით მიღებული სურათი, კრიოპრეზერვაციისათვის უმჯობესია ლამინარ-ბოქსში ემბრიონების 5 საათის განმავლობაში გამოშრობა და შენახვა თხევად აზოტში, ვიდრე ვიტრიფიკაციის PVS2 ხსნარით 30 წუთის განმავლობაში დამუშავება, რადგან კრიოპრეზერვირებული დეჰიდრირებული ემბრიონებისგან განსხვავების ვიტრიფიცირებული ემბრიონები გვიან იწყებს აღმოცენებას.

დასკვნები

1. კრიოპრეზერვაციული შენახვისათვის წაბლის ზიგოტური ემბრიონების დამუშავება ორივე, დეჰიდრატაციის და ვიტრიფიკაციის ტექნოლოგიებით იძლევა მცენარის ექსპლანტის გაყინვის შემდგომი სრული რეგენერაციის შესაძლებლობას.
2. მწიფე ზიგოტური ემბრიონების დეჰიდრატაცია იძლევა უკეთეს შედეგებს ვიტრიფიკაციის ტექნოლოგიასთან შედარებით გამოლღობის შემდგომი მცენარის განითარების ვადების და მორფოლოგიური მაჩვენებლების მიხედვით.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. გეგჰკორი ა., მურვანიძე მ., შეთეკაური შ. „ბიომრავალფეროვნება და კონსერვაცია“ (2011) თსუ-ს გამომცემლობა
2. სსიპ ეროვნული სატყეო სააგენტო „ეროვნული სატყეო სააგენტოს მიერ 2013 წელს გაწეული მუშაობის ანგარიში“. 2014 თბილისი <http://forestry.gov.ge/files/angarishebi/Annual%20report%202013.pdf>
3. ბ. თავაძე, ა. სუპატაშვილი, შ. კაპანაძე. ქედის რაიონის წაბლნარების სატყეო-პათოლოგიური მდგომარეობა. სატყეო მოამბე. 2011წელი. #4 (გვ.68-71)
4. თავაძე ბ., სუპატაშვილი ბ., კაპანაძე გ., მამუკაშვილი ც., ტყიბულის რეგიონის წაბლნარების სატყეო-პათოლოგიური მდგომარეობა. სატყეო მოამბე, 2012 თბილისი, #5
5. საქართველოს გარემოს დაცვისა და სოფლის მეურნეობის სამინისტრო <http://www.moe.gov.ge/ka/თემები/tye-da-biomravalferovneba/>
6. საქართველოს გარემოს დაცვისა და სოფლის მეურნეობის სამინისტრო, „საქართველოს ბიომრავალფეროვნების სტრატეგია და მოქმედებათა გეგმა 2014 – 2020“ <http://moe.gov.ge/res/images/file-manager/strategiuli-dokumentebi/strategiebi-gegmebi/saqarTvelos-biomravalferovnebis-strategia-da-samoqmedo-gegma-2014-2020.pdf>
7. სუჯაშვილი მ., შოშიაშვილი ზ., ფიცხელაური ს., კაპანაძე ი., ბეწუკლიშვილი ი., უგრეხელიძე თ., „ნორჩი მეტყევის ცნობარი“ 2015 თბილისი, https://www.undp.org/content/dam/georgia/docs/publications/UNDP_GE_EE_Young_Ranger_Guide_2015.pdf
8. ჩერქეზიშვილი ტ. „ტყე და ადამინი“. 2009 თბილისი. გამომცემლობა „გოდოლი პრინტი“
9. ჩერქეზიშვილი ტ. „კაკალნაყოფიან მცენარეთა გაშენების აგრომითი თეზები“ 2012 თბილისი, გამომცემლობა „ახალი აგრარული საქართველო“.
10. Barbara M. Reed (2008) Cryopreservation - Practical Considerations <file:///D:/1.Cryopreservation-PracticalConsiderations.pdf>
11. Bauer R. „Die Edelkastanie Vermehrung und Wachstum“ (2015) <http://maroni.upwind.at/maroni-html-doc/maroni.html>
12. Benson E.E. (1999) Cryopreservation. In: E.E. Benson (ed), Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis, London, pp. 83-95.
13. Bissegger, M. and Heiniger, U., 1991. Chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) north of the Swiss Alps. Forest Pathology, 21(4), pp.250-252
14. Brison M., deBoucaud M.T., Pierronnet A., Dosba F. (1997) Effect of cryopreservation on the sanitary state of a Prunus rootstock experimentally contaminated with Plum Pox Potyvirus. Plant Sci. 123: 189-196.
15. BGCI (2005). In: <http://www.bgci.org/>
16. Bounous, G. (2005) The chestnut: a multipurpose resource for the new millennium. Act. Hort. 693: 3340.

17. Caccavale A., Lambardi M., Fabbri A. (1998) Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplar. *Acta Hort.* 457: 79-83.
18. A. Chiarini, M. Micucci, M. Malaguti, R. Budriesi, Pierfranco Ioan, M. Lenzi, C. Fimognari, T. G. Toschi, P. Comandini, S. Hrelia. Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Bark Extract: Cardiovascular Activity and Myocyte Protection against Oxidative Damage. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013, ArticleID471790, 10 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/471790>
19. Cyr D.R. (2000) Cryopreservation: roles in clonal propagation and germplasm conservation of conifers. In: F. Engelmann and H. Takagi (eds), *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp. 261-268.
20. Corredoira E., San José M.C., Ballester A., Vieitez A.M. (2004) Cryopreservation of zygotic embryo axes and somatic embryos of European chestnut. *CryoLetters* 25: 33-42.
21. Day J.G., Benson E.E., Fleck R.A. (1999) In vitro culture and conservation of microalgae: Applications for aquaculture, biotechnology and environmental research. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 35: 127-136
22. de Boucaud M.T., Brison M., Negrier P. (1994) Cryopreservation of walnut somatic embryos. *CryoLetters* 15: 151-160.
23. de Boucaud M.T., Brison M. (1995) Cryopreservation of germplasm of walnut (*Juglans* species). In: Y.P.S. Bajaj (ed), *Cryopreservation of Plant Germplasm I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 32. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 129-147.
24. De Carlo A., Benelli C., Lambardi M. (2000) Development of a shoot-tip vitrification protocol and comparison with encapsulation-based procedures for plum (*Prunus domestica* L.) cryopreservation. *CryoLetters* 21: 215-222.
25. Elhiti, M., and Stasolla, C. (2010) The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation: An Overview. In: *Methods in Molecular Biology*, 1st edn; T. A. Thorpe, E. C. Yeung, eds. (Humana Press), p.229-255.
26. Elleuch H., Gazeau C., David H., David A. (1998) Cryopreservation does not affect the expression of a foreign sam gene in transgenic *Papaver somniferum* cells. *Plant Cell Rep.* 18: 94-98.
27. Engelmann F. (2000) Importance of cryopreservation for the conservation of plant genetic resources. In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of Tropical Germplasm Current Research Progress and Application*. Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, pp 8-20
28. Freinkel, S., 2009. *American chestnut: the life, death, and rebirth of a perfect tree*. Univ of California Press
29. Forsline PL, Towill L, Waddell J, Stushnoff C, Lamboy W, McFerson JR (1998) Recovery and longevity of cryopreserved dormant apple buds. *J Am Soc Hortic Sci* 123: 365-370
30. Gordon-Kamm W.J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Adams W.R., Willetts N.G., Rice T.B., MacKey C.J., Krueger

- R.W., Kausch A.P., Lemaux P.G. (1990) Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell* 2: 603- 618.
31. Gresshoff, P.M., Doy, C.H. (1972) Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum*. *Planta* 107: 161-170.
 32. Helliot B., Panis B., PouMay Y., Swennen R., Lepoivre P., Frison E. (2002) Cryopreservation for the elimination of cucumber mosaic and banana streak viruses from banana (*Musa* spp.). *Plant Cell Rep.* 20: 1117-1122.
 33. IPGRI (2004). In: <http://www.ipgri.cgiar.org/themes/human/economics.htm>
 34. IUCN (2019) <https://www.iucn.org/about>; <https://www.iucn.org/resources/conservation-tools/iucn-red-list-threatened-species>
 35. IUCN Red List Categories and Criteria version 3.1 (2001).[www.iucnredlist.org/ technical-documents/categories-and-criteria/2001-categories-criteria](http://www.iucnredlist.org/technical-documents/categories-and-criteria/2001-categories-criteria)
 36. John .,J Harada, Mark F Belmonte, Raymond W Kwong. *Plant Embryogenesis (Zygotic and Somatic)* (2010)
 37. Lambardi M., De Carlo A. (2003) Application of tissue culture to the germplasm conservation of temperate broad-leaf trees. In: S.M. Jain and K. Ishii (eds), *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Ac. Pub., Dordrecht, pp. 815-840
 38. Lambardi M., Fabbri A., Caccavale A. (2000) Cryopreservation of white poplar (*Populus alba* L.) by vitrification of in vitro-grown shoot tips. *Plant Cell Rep.* 19: 213-218.
 39. Lloyd, G., McCown, B.H. (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia folia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings International Plant Propagators Society*, 30: 421-427.
 40. Matsumoto T., Mochida K., Itamura H., Sakai A. (2001) Cryopreservation of persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) by vitrification of dormant shoot tips. *Plan Cell Rep.* 20: 398-402.
 41. Monaco L . C., Sondahl M . R ., Cazvalho A . et al Application of tissue culture in the improvement of coffee. - In : *Appl . and fundam aspects. // Plant cell, Tissue and organ cult. B . etc . . Spzing . Verl., 1977 , pp 109 - 130 .*
 42. Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
 43. Niino T., Sakai A., Yakuwa H., Nojiri K. (1992) Cryopresevation of in vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 28: 261-266.
 44. Niino T., Seguel I., Murayama T. (2000) Cryopreservation of vegetatively propagated species (mainly mulberry). In: Engelmann F, Takagi H (eds) *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm Current Research Progress and Application*. Japan International Research Center for Agricultural Sciences and International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp 194-199
 45. Niino T., Tashiro K., Suzuki M., Ohuchi S., Magoshi J., Akihama T. (1997) Cryopreservation of in vitro shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Sci. Hort.* 70: 155-163.

46. Panis B., Lambardi M. (2006) Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees) FAO 61-78 <http://www.fao.org/biotech/docs/panis.pdf>
47. Panis B., Piette B., Swennen R. (2005). Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. *Plant Sci.* 168: 45-55
48. Panis B., Wennen R., Engelmnn F. (2001) Cryopreservation of plant germplasm. Proc. IV IS on In Vitro Cult. & Hort. Breeding Eds. S. Sorvari et al. *Acta Hort* 560,
49. Paul H., Daigny G., Sangwan-Norreel B.S. (2000) Cryopreservation of apple (*Malus x domestica* Borkh.) shoot tips following encapsulation-dehydration or encapsulation-vitrification. *Plant Cell Rep.* 19: 768-774.
50. Pence V.C. (1995) Cryopreservation of recalcitrant seeds. In: Y.P.S. Bajaj (ed), *Cryopreservation of Plant Germplasm I. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32. Springer, Berlin Heidelberg, pp. 29-50.
51. Reed BM., Chang Y. (1997) Medium- and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops. In: Razdan MK, Cocking EC (eds) *Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro*. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, USA, pp 67-105
52. Sakai A. (1960) Survival of the twigs of woody plants at -196°C . *Nature* 185: 393-394.
53. Sakai A. (2000) Development of cryopreservation techniques. In: F. Engelmann and H. Takagi (eds), *Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm*. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, pp. 1- 7.
54. Sakai A., Kobayashi S., Oiyama I. (1990) Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Rep.* 9: 30-33
55. Schäfer-Menuhr A., Schumacher H.M., Mix-Wagner G. (1997) Cryopreservation of potato cultivars - design of a method for routine application in genebanks. *Acta Hort.* 447: 477-482.
56. Schenk, R.V. and Hildebrandt, A.C. (1972) Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50, 199-204. <https://doi.org/10.1139/b72-026>
57. Shimelis D., Bantte K., Feyiss T. Effects of Polyvinyl Pyrrolidone and Activated Charcoal to Control Effect of Phenolic Oxidation on In Vitro Culture Establishment Stage of Micropropagation of Sugarcane (*Saccharum Officinarum* L.) *Advances in Crop Science and Technology* ISSN. Shimelis et al., *Adv Crop Sci Tech* 2015, 3:4 <http://dx.doi.org/10.4172/2329-8863.1000184>
58. Tafazoli M., Hosseini Nasr S. M., Jalilva H., Bayat D. Plant regeneration through indirect organogenesis of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) *African Journal of Biotechnology* Vol. 12(51), pp. 7063-7069, 18 December, 2013 Available online at <http://www.academicjournals.org/AJB>
59. Towill L.E., Forsline P.L., Walters C., Waddell J.W., Laufmann J. (2004) Cryopreservation of *Malus* germplasm using a winter vegetative bud method: results from 1915 accessions. *CryoLetters* 25: 323-334.

60. Vernon H., Haywood, Jose M., Iriundo (2003) Plant conservation: old problems, new perspectives. *Biological Conservation* 113 (2003) 321–335
https://www.academia.edu/22875709/Plant_conservation_old_problems_new_perspectives
61. Vieitez A.M., Sanchez M.C., Garcia-nimo M.L., and Ballester A. (2007) Protocol for micropropagation of *Catanea sativa*
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.494.9323&rep=rep1&type=pdf>
62. Wang Q.C., Mawassi M., Li P., Gafny R., Sela I., Tanne E. (2003) Elimination of grapevine virus A (GVA) by cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of *Vitis vinifera* L. *Plant Sci.* 165: 321-327.

დანართები

ცხრილი 1. ევროპული წაბლის ზიგოტურ ემბრიონებში ტენის შემცველობის დამოკიდებულება სისიცოცხლისუნარიანობასა და აღმოცენების პარამეტრებზე, დროის

დეჰიდრატაციის დრო (სთ)							
		0	1	2	3	4	5
ტენის შემცველობა (%)		66.21	62.77	41.25	28.63	22.71	21.38
საწყისი მასა (გ)		0.0207±0.0072	0.0203±0.0050	0.0137±0.0045	0.0103±0.0025	0.0073±0.0021	0.0106±0.0024
მშრალი მასა (გ)		0.0070±0.0027	0.0129±0.0038	0.0080±0.0021	0.0074±0.0018	0.0057±0.0016	0.0084±0.0018
სიცოცხლისუნარიანობა (%)	LN-	100a	100a	100a	100a	100a	100a
	LN+	40.0b	60.0b	80.0a	90.0a	100a	100a
მხოლოდ ფესვი (%)[^]	LN-	0.0a	0.0a	0.0a	7.1b	0.0a	15.6c
	LN+	0.0a	21.4c	7.2b	7.7b	15.3c	13.3c

სხვადასხვა პერიოდში.

*Mean ± st. Dev

[^]თითოეულ რიგში, რომლებიც მსგავსი ნიშნით ბოლოვდებიან მონაცემები არ არიან მნიშვნელოვნად განსხვავებულნი, P=0.05 (t-test)

(LN- არაკიოპრეზერვირებული; LN+ კრიოპრეზერვირებული)

ცხრილი 2. სხვადასხვა პერიოდით გამოშვებული *C. Sativa*-ს ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების ფესვის სიგრძის ცვლილება თხევად აზოტში მოთავსებამდე და გამოღობის შემდეგ.

		ფესვის სიგრძე (მმ)*			
დეჰიდრატაციის დრო (სთ)		I კვირა	II კვირა	III კვირა	IV კვირა
0	LN- LN+	15.2±10.9 -	34.8±9.4 -	50.5±2.3 -	54.6±10.9 -
1	LN- LN+	15.1±6.8 -	30.9±10.7 -	38.9±7.8 -	48.8±3.2 5.7±1.5
2	LN- LN+	15.8±6.4 -	33.0±10.9 4.1±2.3	34.6±4.5 4.4±1.6	40.1±4.2 5.0±2.0
3	LN- LN+	11.6±6.1 -	21.9±11.3 5.0±0.5	27.2±9.9 5.7±0.4	43.8±6.6 6.0±1.5
4	LN- LN+	12.6±8.4 3.0±0.3	31.5±10.2 6.2±0.9	43.0±8.2 7.6±0.6	52.2±11.4 8.0±1.2
5	LN- LN+	16.9±7.7 9.0±0.5	26.6±5.7 9.7±0.7	36.7±9.0 20.0±1.6	49.7±9.1 40.1±1.1

*Mean ± st. dev

(LN- არაკიოპრეზერვირებული; LN+ კრიოპრეზერვირებული)

ცხრილი 3. დეჰიდრირებული ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების ღეროს სიგრძის ცვლილება თხევად აზოტში მოთავსებამდე და გამოღობის შემდეგ, ოთხი კვირის მანძილზე.

		ღეროს სიგრძე (მმ)*			
დეჰიდრატაციის დრო (სთ)		I კვირა	II კვირა	III კვირა	IV კვირა
0	LN-	6.9±1.1	19.4±6.8	26.5±7.8	33.0±7.8
	LN+	-	-	-	-
1	LN-	7.5±1.7	12.6±2.6	22.3±4.9	31.8±6.4
	LN+	-	-	-	-
2	LN-	7.3±1.1	11.5±3.9	21.8±6.4	28.4±6.1
	LN+	-	3.0±0.4	3.0±0.4	5.0±2.0
3	LN-	6.0±1.4	10.2±3.5	16.9±5.2	23.2±6.2
	LN+	-	4.7±0.5	5.6±0.8	5.8±1.1
4	LN-	6.3±1.6	11.6±2.6	22.4±6.5	29.8±10.2
	LN+	3.3±0.6	5.6±1.1	6.2±0.4	7.13±3.9
5	LN-	7.1±0.9	10.9±3.5	16.6±5.7	23.0±7.97
	LN+	9.4±0.3	10.4±3.3	20.3±2.9	22.2±2.3

*Mean ± st. dev

(LN- არაკიოპრეზერვირებული; LN+ კრიოპრეზერვირებული)

ცხრილი 4. PVS2 ვიტრიფიკაციის ხნართ, დროის სხვადასხვა პერიოდით, დამუშავებული წაბლის ზიგოტური ემბრიონების სიცოცხლისუნარიანობა და *in vitro* აღმონაცენების მახასიათებლები.

	ვიტრიფიკაციის დრო (წთ)						
	კონტროლი	T ₀	T ₃₀	T ₆₀	T ₉₀	T ₁₂₀	
სიცოცხლისუნარიანობა (%)	LN- LN+	100a 40b	100a 100a	100a 100a	90b 80c	90b 80c	100a 70c
გაღვივა (%) [^]	LN- LN+	100a 0.0c	83.4b 19.4d	75.0b 55.6e	75.0b 25.0d	83.3b 21.4d	83.3b 20.0d
მხოლოდ ფესვი (%) [^]	LN- LN+	0.0a 0.0a	16.7b 0.0a	8.3b 0.0a	25.0c 0.0a	41.6d 0.0a	8.3b 0.0a
სრული აღმოცენება (%) [^]	LN- LN+	100a 0.0a	66.7b 19.4b	66.7b 55.6c	50.0c 25.0d	41.7c 21.4d	40.2c 20.0d

[^]თითოეულ რიგში, რომლებიც მსგავსი ნიშნით ბოლოვდებიან მონაცემები არ არიან მნიშვნელოვნად განსხვავებულნი, P=0.05 (t-test)

(LN- არაკიოპრეზერვირებული; LN+ კრიოპრეზერვირებული)

ცხრილი 5. PVS2 ვიტრიფიკაციის ხნართ დამუშავებული, *C. Sativa*-ს გაუყინავი ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების ფესვისა და ღეროს ზრდა

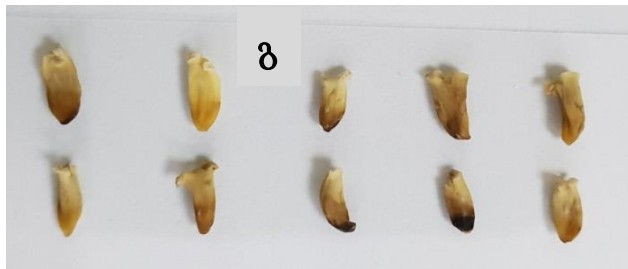
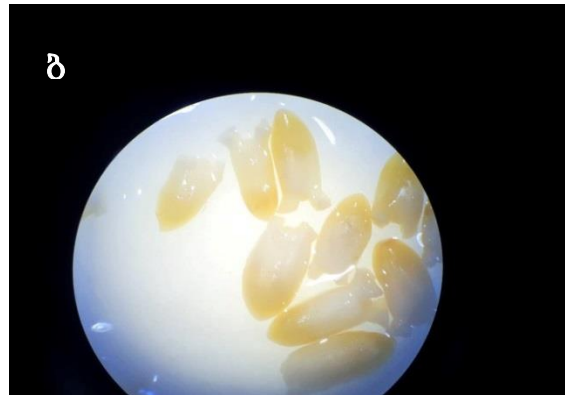
		ფესვის სიგრძე (მმ)*				ღეროს სიგრძე (მმ)*			
ვიტრიფიკაციის დრო (წთ)		I კვირა	II კვირა	III კვირა	IV კვირა	I კვირა	II კვირა	III კვირა	IV კვირა
კონტროლი	LN-	15.2±10.9	34.8±9.4	50.5±2.3	66.5±3.9	6.9±1.1	19.4±6.8	26.5±7.8	42.0±3.3
T ₀	LN-	5.4±3.8	12.4±2.4	13.0±4.2	20.0±4.3	4.5±1.6	7.9±2.9	18.2±7.9	30.0±3.3
T ₃₀	LN-	4.6±0.6	9.6±5.3	15.0±5.3	36.3±6.4	4.6±1.5	7.3±2.2	11.3±6.3	30.0±3.0
T ₆₀	LN-	2.6±1.6	3.1±1.5	3.4±1.2	10.7±1.2	3.2±1.5	3.4±1.3	11.3±3.7	21.7±5.6
T ₉₀	LN-	4.4±1.6	7.5±9.9	11.5±6.3	26.3±10.1	3.8±1.5	5.4±4.1	9.9±6.4	26.0±2.0
T ₁₂₀	LN-	4.0±1.7	5.6±4.1	12.3±4.1	24.7±2.7	4.9±1.9	6.9±2.6	13.9±5.8	24.4±6.9

*Mean ± st. dev

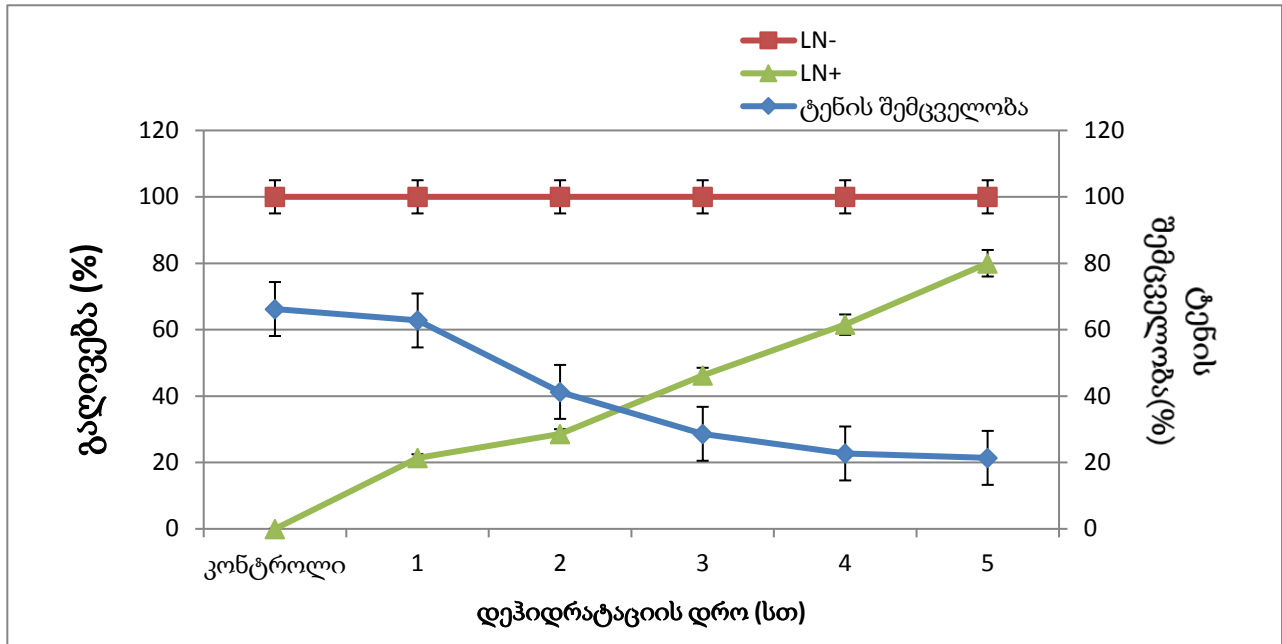
ცხრილი 6. PVS2 ვიტრიფიკაციის ხნართი დამუშავებული, *C. Sativa*-ს ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების ფესვისა და ღეროს ზრდა, თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ.

		ფესვის სიგრძე (მმ)*				ღეროს სიგრძე (მმ)*			
ვიტრიფიკაციის დრო (წთ)		V კვირა	VI კვირა	VII კვირა	VIII კვირა	V კვირა	VI კვირა	VII კვირა	VIII კვირა
კონტროლი	LN+	-	-	-	-	-	-	-	-
T ₀	LN+	-	-	-	5.0±1.1	-	-	1.75±0.4	4.0±0.7
T ₃₀	LN+	-	-	-	27±0.7	3.5±0.9	5.3±1.2	7.4±1.3	23.4±1.3
T ₆₀	LN+	-	-	-	8.3±1.6	3.3±1.3	4.0±0.7	5.0±0.9	11.2±0.8
T ₉₀	LN+	-	-	-	7.9±1.8	-	-	1.5±0.5	9.7±0.8
T ₁₂₀	LN+	-	-	-	9.9±1.8	3.3±1.8	3.7±0.9	4.0±1.0	6.7±0.9

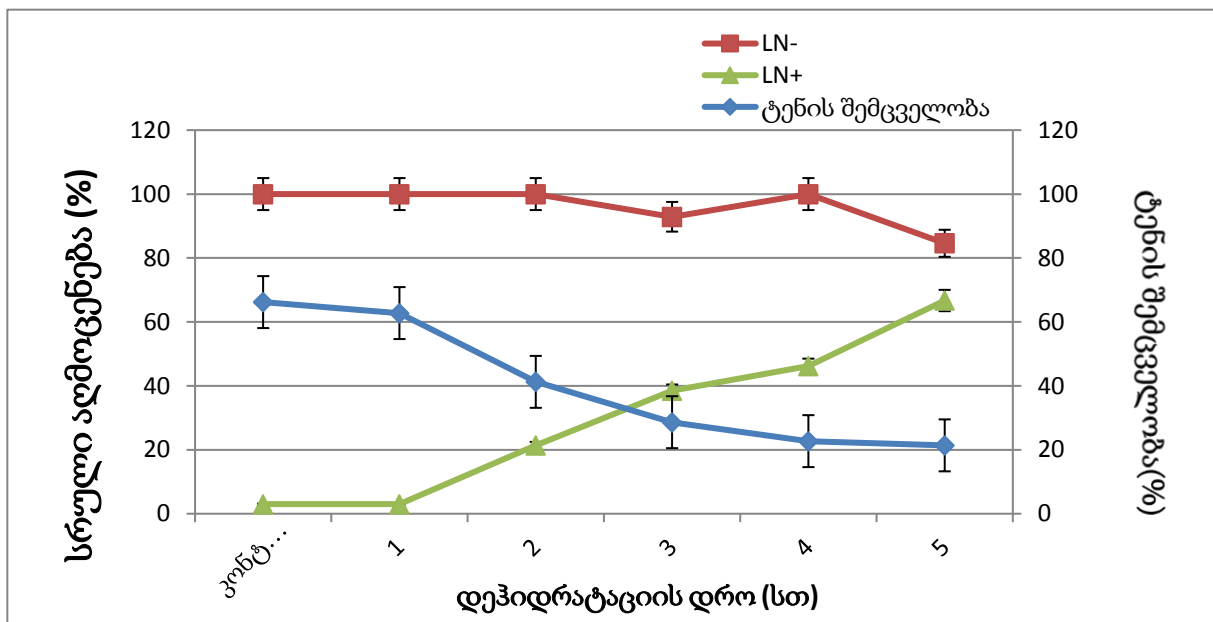
*Mean ± st. dev



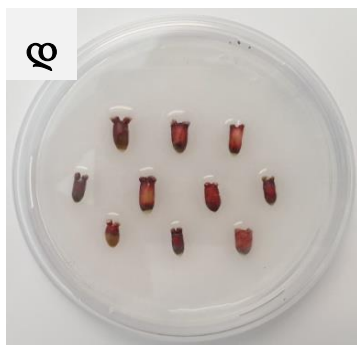
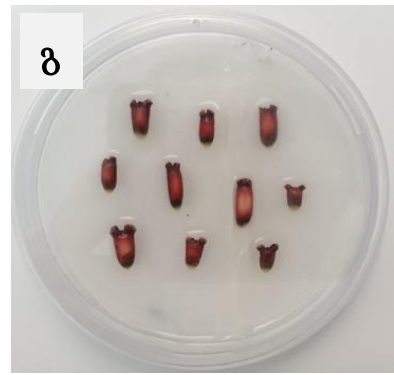
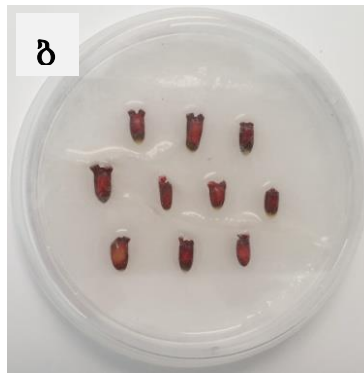
სურ. 1. *C. sativa*-ს მწიფე ნაყოფები (ა); მწიფე ნაყოფებიდან იზოლირებული ზიგოტური ემბრიონები (ბ); 24 სათის განმავლობაში საშრობ კამერაში, 85 °C-ზე გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონები (გ).



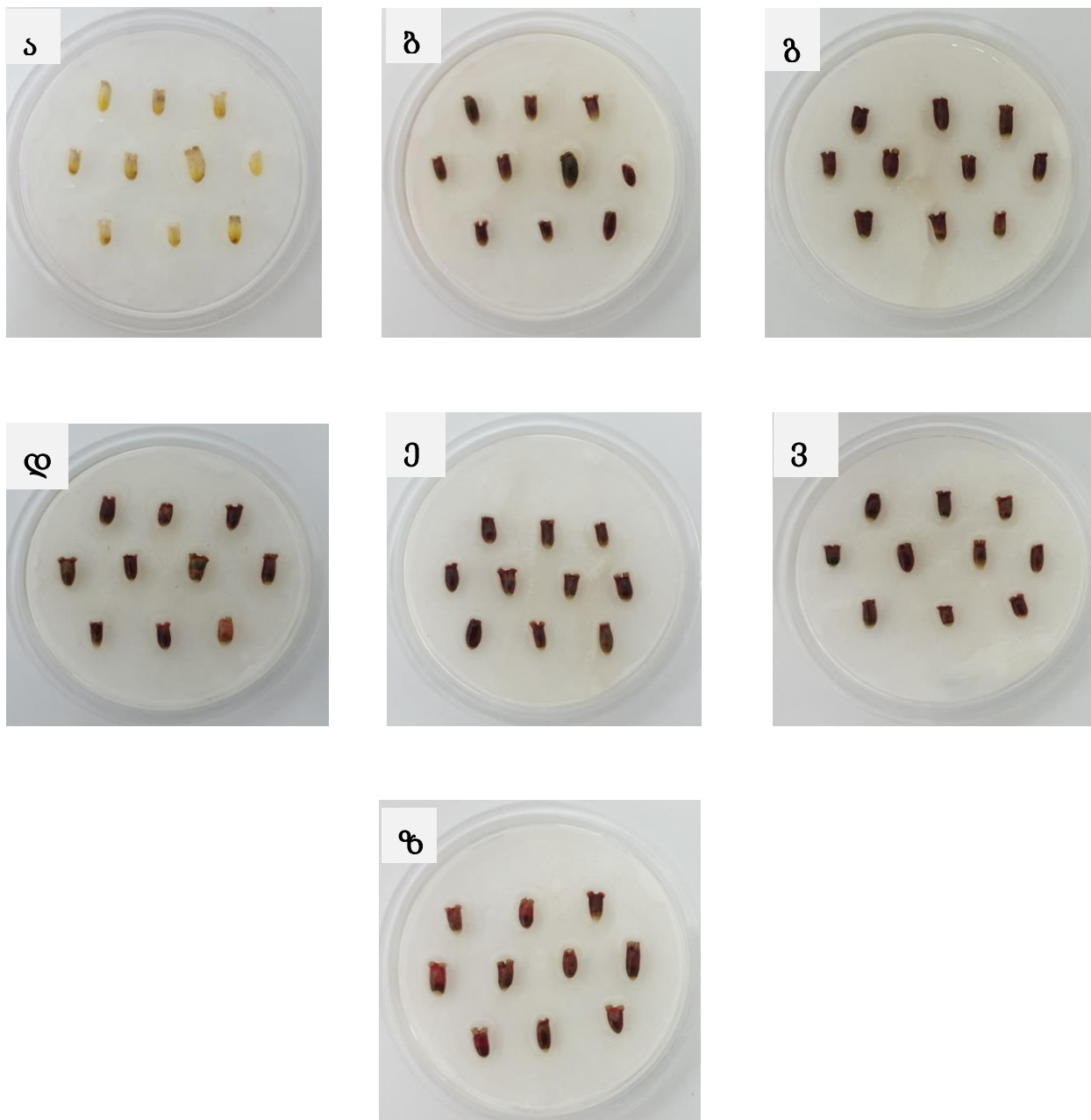
სურ. 2. წაბლის, ზიგოტურ ემბრიონებში დროის სხვადასხვა პერიოდში გამოშრობის შემდეგ, ტენის შემცველობის დამოკიდებულება გაღვივების ხარისხთან. კონტროლად აღებულია ემბრიონები გამოშრობის გარეშე. (LN- არაკიოპრეზერვირებული; LN+ კრიოპრეზერვირებული)



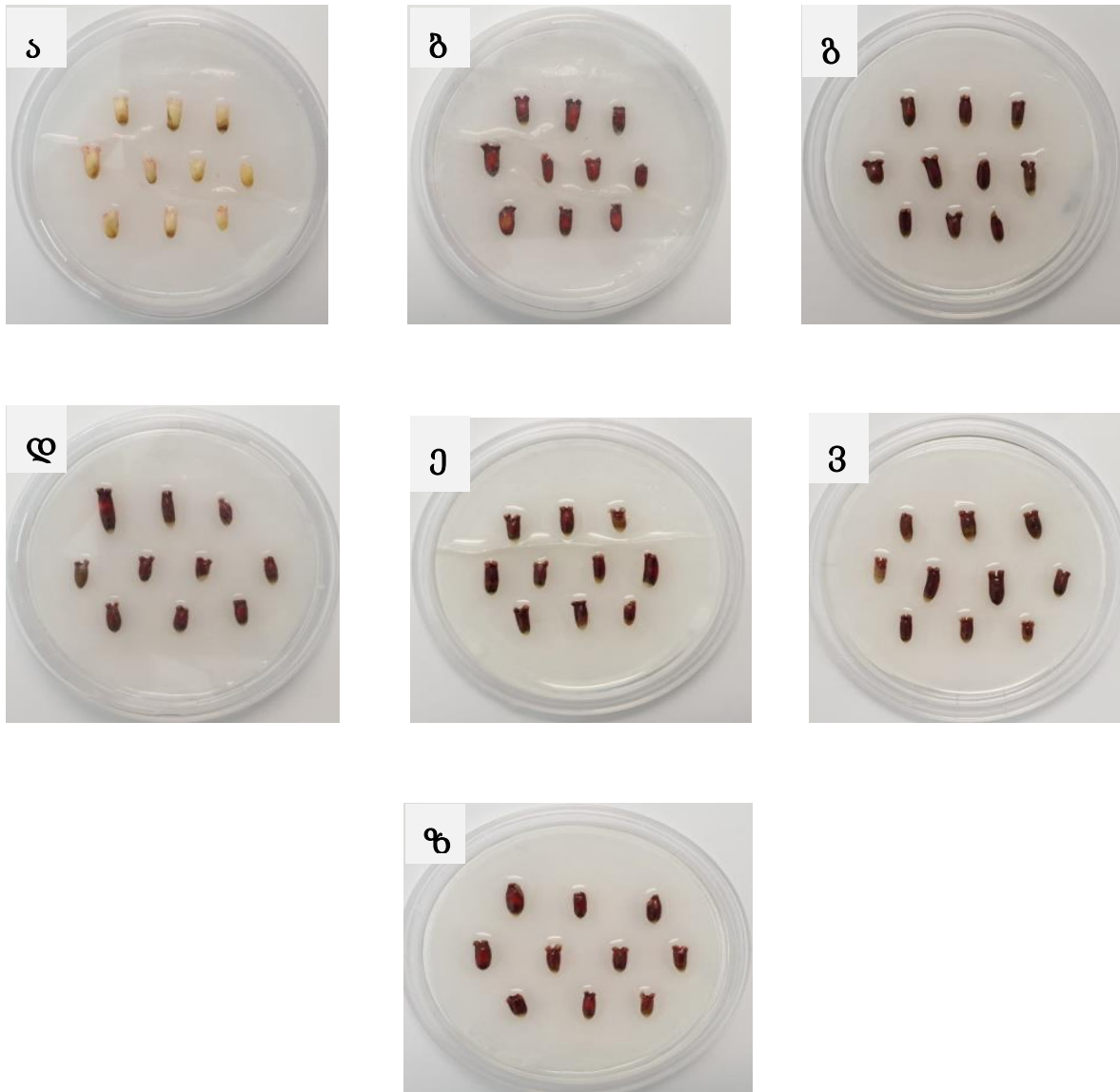
სურ. 3. *C. sativa*-ს, ზიგოტურ ემბრიონებში დროის სხვადასხვა პერიოდში გამოშრობის შემდეგ, ტენის შემცველობის დამოკიდებულება მცენარის სრული აღმოცენების მაჩვენებელთან. კონტროლად აღებულია ემბრიონები გამოშრობის გარეშე. (LN- არაკიოპრეზერვირებული; LN+ კიოპრეზერვირებული)



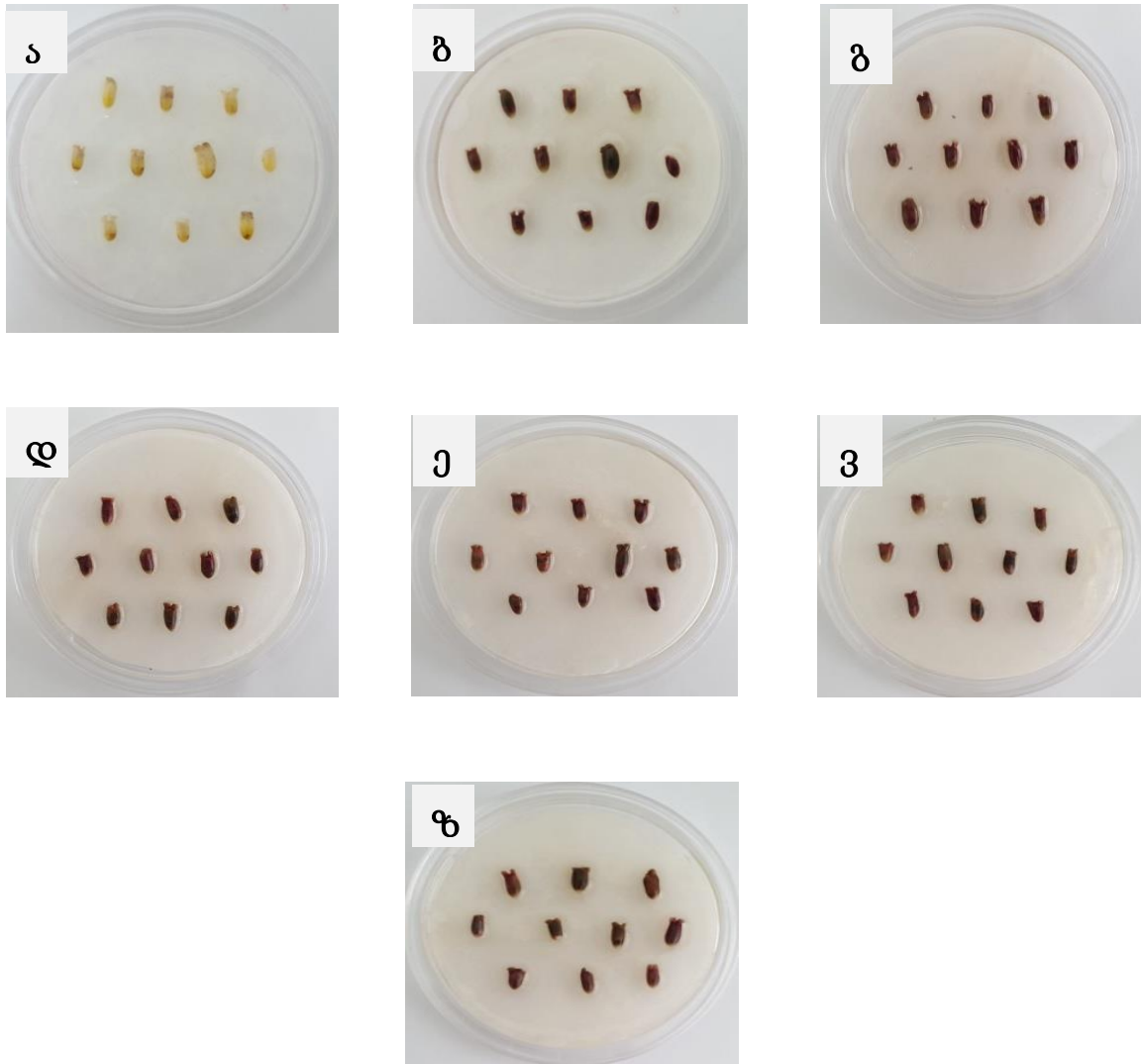
სურ. 4. დეჰიდრატაციის შემდგომი სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა ტეტრაზოლიუმის ტესტით, თხევად აზოტში მოთავსებამდე, გამომშრობის დროის სხვადასხვა პერიოდით. შეუღებავი ემბრიონები (ა); საკონტროლო (0 საათიანი გამომშრობა) (ბ); 1 საათიანი გამომშრობა (გ); 2 საათიანი გამომშრობა (დ); 3 საათიანი გამომშრობა (ე); 4 საათიანი გამომშრობა (ვ); 5 საათიანი გამომშრობა (ზ).



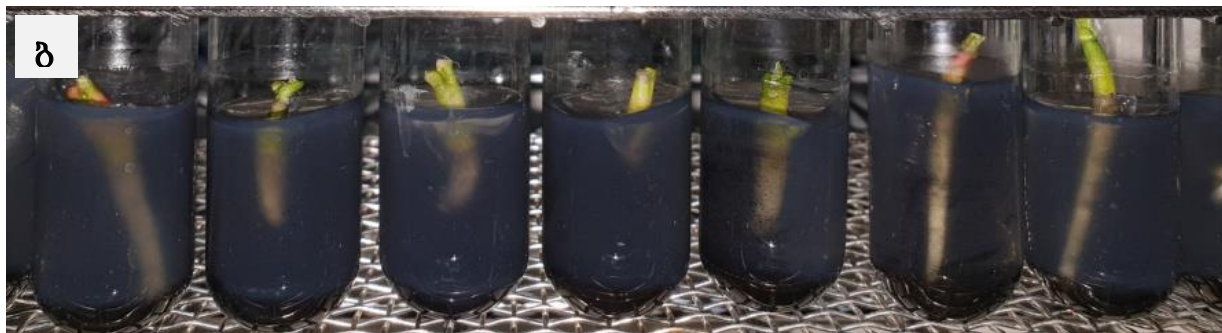
სურ. 5. დეჰიდრატაციის შემდგომი სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა ტეტრაზოლიუმის ტესტით, თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ, გამოშრობის დროის სხვადასხვა პერიოდით. შეუღებავი ემბრიონები (ა); საკონტროლო (0 საათიანი გამოშრობა) (ბ); 1 საათიანი გამოშრობა (გ); 2 საათიანი გამოშრობა (დ); 3 საათიანი გამოშრობა (ე); 4 საათიანი გამოშრობა (ვ); 5 საათიანი გამოშრობა (ზ).



სურ. 6. *C. sativa*-ს ზიგოტური ემბრიონების PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავების შემდგომი სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა ტეტრაზოლიუმის ტესტით , თხევად აზოტში გაყინვამდე, დროის სხვადასხვა პერიოდში. შეუღებავი ემბრიონები (ა); საკონტროლო (ყოველგვარი დამუშავების გარეშე) (ბ); მხოლოდ „loading solution“-ში დაყოვნებული (გ); PVS2-ში 30 წუთი დაყოვნებული (დ);PVS2-ში 60 წუთი დაყოვნებული (ე); PVS2-ში 90 წუთი დაყოვნებული (ვ); PVS2-ში 120 წუთი დაყოვნებული (ზ).



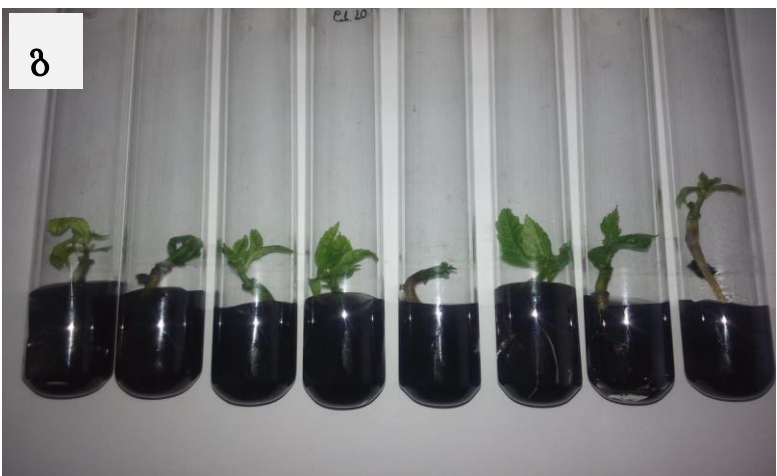
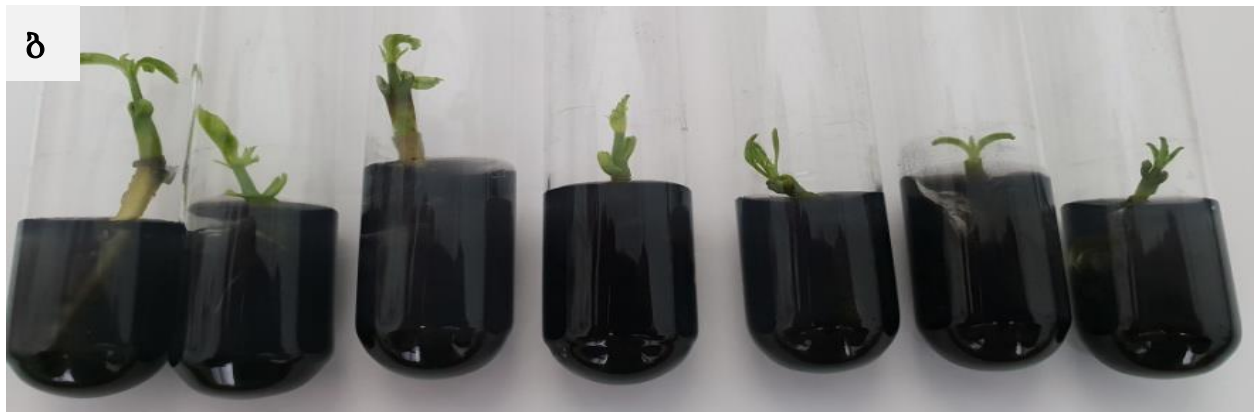
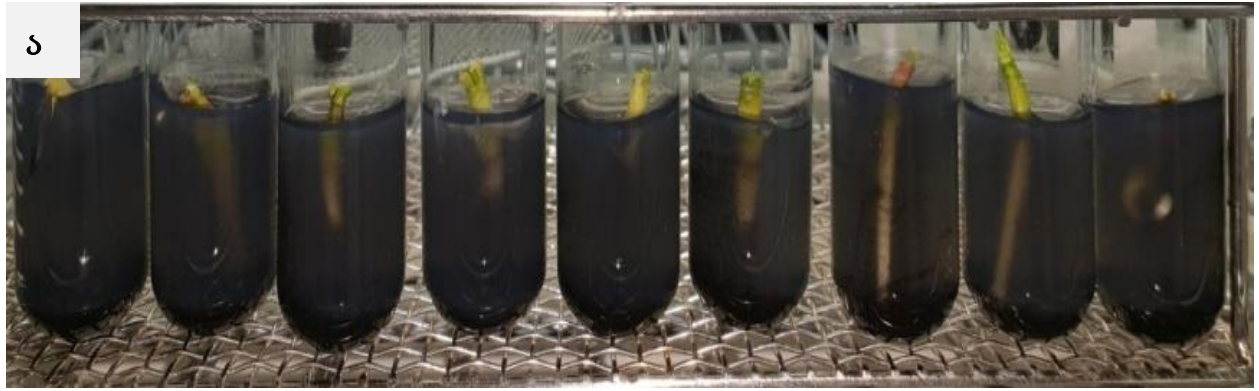
სურ. 7. *C. sativa*-ს ზიგოტური ემბრიონების PVS2 ვიტრიფიკაციის ხსნარით დამუშავების შემდგომი სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა ტეტრაზოლიუმის ტესტით , თხევადი აზოტიდან გამოღობის შემდეგ, დროის სხვადასხვა პერიოდში. შეუღებავი ემბრიონები (ა); საკონტროლო (ყოველგვარი დამუშავების გარეშე) (ბ); მხოლოდ „loading solution“-ში დაყოვნებული (გ); PVS2-ში 30 წუთი დაყოვნებული (დ); PVS2-ში 60 წუთი დაყოვნებული (ე); PVS2-ში 90 წუთი დაყოვნებული (ვ); PVS2-ში 120 წუთი დაყოვნებული (ზ).



სურ. 8. გაუყინავი, დეჰიდრირებული ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენების ნამდვილი ფოთლის ფაზა(ა); ერთ კვირიანი აღმონაცენები (ბ); გამოუმრობი ზიგოტური ემბრიონების ოთხი კვირიანი აღმონაცენები (გ).



სურ. 9. გაუყინავი, დროის სხვადასხვა პერიოდით გამომშრალი ზიგოტური ემბრიონების 4 კვირიანი *in vitro* აღმონაცენები. 1 საათიანი გამოშრობა(ა); 2 საათიანი გამოშრობა (ბ); 3 საათიანი გამოშრობა (გ); 4 საათიანი გამოშრობა (დ); 5 საათიანი გამოშრობა (ე); ემბრიონები გამოშრობის გარეშე (ვ).



სურ. 10. PVS2 ვიტრიფიკაციის ხნართ 30 წუთის განმავლობაში დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების 1 კვირიანი *in vitro* აღმონაცენები (ა); 2 კვირიანი აღმონაცენები (ბ); 4 კვირიანი აღმონაცენები (გ).



სურ. 11. გაუყინავი, PVS2 ვიტრიფიკაციის ხნარით დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების 4 კვირიანი *in vitro* აღმონაცენები. „loading solution“-ში დაყოვნებული ზიგორუტური ემბრიონების (ა); PVS2 ხნარით 30 წუთი დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების აღმონაცენები (ბ); 60 წუთიანი დამუშავება (გ); 90 წუთიანი დამუშავება (დ); 120 წუთიანი დამუშავება (ე); ემბრიონები ხსნარებით დამუშავების გარეშე (ვ).





სურ. 12. ევროპული წაბლის (*Catanea sativa* Mill.) 5 საათის განმავლობაში გამომშრალი ზიგოტურ ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენები (ა, ბ, ე) და ვიტრიფიკაციის PVS2 ხნარით 30 წუთის განმავლობაში დამუშავებული ზიგოტური ემბრიონების *in vitro* აღმონაცენები (გ, დ, ვ) თხევად აზოტში მოთავსებამდე (LN+) და გამოღობის შემდეგ (LN-).