

UOT 616-006.9.57.575,1:576.3

Q.M.Məmmədov
AMEA Genetik Ehtiyatlar İnstitutu
q.m.mammadov41@mail.ru

NARIN BÖLÜNMƏYƏN HÜCEYRƏ VƏ PROTOPLASTALARININ TOXUMA KULTURASINDA İNKİŞAF MEXANİZMİ VƏ ONLARIN DEDİFERENSİASİYASI

Açar sözlər: *diferensiasiya, dediferensiasiya, mitotisi, faza, hormon, auksin, bitki cövhəri, sintez, DNT, RNT, zülal, ixtisaslaşmış hüceyrə, orqanoid, protoplasta, qlaf, nüvə, ferment*

Məqalədə poliploid nar bitkisinin müxtəlif orqanlarından götürülmüş ixtisaslaşmış hüceyrələrin qapalı qidalı mühitdə dediferensiasiya və onların kallus və şiş hüceyrələrinə çevrilməsinin mexanizmi verilir. Müəyyən edilmişdir ki, poliploid nar formasının orqanlarının ixtisaslaşmış hüceyrələrini qapalı və hormonu olan məhlulda cücərtəndə onlar dediferensiasiya olunaraq bölünmələrini həndəsi silsilə ilə artırır. Bu hüceyrələrin daxilində baş verən struktur dəyişikliklərindən sonra onlar kallus hüceyrələrinə çevrilirlər. Yaranan hüceyrə kütləsinin ikinci dediferensiasiyasından bitkinin üst orqanları inkişaf edir. Qapalı sistemdəki eksplantant olan qida məhlulundakı hormonu (auksin) bitki şirəsi ilə əvəz etdikdə, şirənin eksplantanta təsirindən ixtisaslaşmış bölünməyən hüceyrələrin diferensiasiyası və onların sayı dəfələrlə artır. Kallusun əmələ gəlmə müddətinə sərf olunan vaxt qısalmır, aktivləşmiş hüceyrələrin sayı və kallusda yeri müəyyənləşir. Poliploid nar bitkisinin müxtəlif orqanlarından götürülmüş (yarpaq, budağın qabıq hissəsi, özək toxuması, tozluğun toxuma hüceyrələrə) eksplantalar xırdalayaraq fermentdə bir müddət saxladıqda bölünməyən ixtisaslaşmış toxuma hüceyrələrinin qlafları dağılır, protoplastalar sağlam və aktiv halını qoruyub saxlayırlar (fermentdən təmizləndikdən sonra). Çılpaq protoplastaların qlafları 24-36 saata bərpa olunur, onlar əvvəlki funksiyalarını yerinə yetirə bilirlər və aralıq müddətində protoplastalara informasiyalı nüvələrin köçürülməsi mümkün olur.

Г.М.Мамедов

МЕХАНИЗМ РАЗВИТИЕ НЕ ДЕЛЯЩИХСЯ КЛЕТОК ПРОТОПЛАСТОВ ГРАНАТА В ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУРЕ И ИХ ДЕДИФФЕРЕНЦИРОВКА

Ключевые слова: *дифференциация, дедифференциация, митотический цикл, фаза, меристема, гормон, ауксин, экстракт растений, синтез, ДНК, РНК, белок, специализированная клетка, ткань, органоид, протопласт, ядро, фермент*

В статье излагается механизм дедифференциация специализированных клеток взятых из разных органов полиплоидного граната в замкнутой питательной среде и их превращения в каллусовые и опухолевые клетки. Установлено что, если проращивать специализированные клеток у разных органов полиплоидного граната в гормонесуществующей растворе они дедифференцируются и деление этих клеток увеличиваются в растворе геометрической последовательностью. После структурные изменение происходящие внутри этих клеток они превращаются в каллусные клетки. После второй дедифференцировки из массы этих клеток развиваются верхние органы у полиплоидного граната. В закрытой системе если гормоноприсутствующие раствора, гормон заменить растительной экстрактом, тогда после активного действия растительного экстракта на эксплантантов их числа увеличиваются в несколько раз и место возникновения каллусообразующих зоны можно четко определить и затраченной на этой сложной процесс время уменьшается. Специализированные клеток взятых у разных органов полиплоидного граната и перенести этих эксплантантов ферментативный раствор, оболочки клеток растворяются, а протопласты остаются здоровыми и активными даже когда протопласты голые (после очищение из ферментов). Обнаженные протопласты после очищение от ферментов и перенести их в питательной раствора, они в течение 24-36 часов полностью восстанавливаются оболочки и, могут выполняют свои прежние функции.

G.M.Mammadov

RESEARCH OF DEDIFFERENTIATION AND MORPHOLOGICAL DEVELOPMENT OF FINE CELL AND PROTOPLASTS IN ENCLOSED SYSTEM

Keywords: *differentiation, dedifferentiation, mitotic cycle, phase, meristem, hormone, auxin plant juice, DNA synthesis, RNA, albumen, specialized cell, tissue, organoid, protoplast, nucleus*

The article deals with dedifferentiation of specialized cells taken from various organs of polyploid pomegranate plant in enclosed system and mechanism of evolving of them to kalium and tumor cells. It was discovered that specialized cells of polyploidy pomegranate formed organs increase their division by geometric sequence when they are planted in enclosed solution with hormone by being dedifferentiated. After structural changes occurring in these cells they are turned to kalium cells. Upper organs of the plant develop from second differentiation of appeared cell mass. When explant hormone in food solution (auxin) is substituted with plant juice, specialized non-divisible cells dedifferentiation and their number increases many times as a result of the impact of juice on explant. Time consumed for kalium germination decreases, the number of activated cells and their places in kalium are determined. When leaf, crust, core tissue, root tissue, connective taken from various organs of polyploidy pomegranate plant are kept in ferment for a period by cutting into pieces explants to

tissue cells, cover of non-divisible specialized tissue cells and collapsed and even if cells become nude, protoplasts keep their healthy and active position (after being cleaned from ferment) and covers of nude protoplasts are completely restored for 24-36 hours and they become available to implement their previous functions. It's possible to transplant nucleus with information into protoplasts during interval.

Giriş

Toxuma kulturasında ixtisaslaşmış bitki hüceyrələrini invitroda cücərdilməsi və artırılması qeyd olunan sistemin öyrənilməsinin əsasını təşkil edir. Buraya bitkinin kökü, budaq apeksi, tozluq, şişin toxuma hüceyrələri, onların agerqatları və izolyasiyada olan protoplastların tipləri daxildir. Götürülmüş materialların sterilliyi, qida məhsullarının aktivliyi, hüceyrələrin qapalı şəraitdə artımına müsbət təsir edir. Əlavə biokütlənin olması təcrübələrin statistik düzgünlüyünü təsdiq edir. Aparılmış təcrübələrdə morfogenetik mutantların alınması və dediferensiasiya mexanizminin öyrənilməsi işin əsasını təşkil edir. Bu tipli təcrübələrdə uzun müddətə tədqiqata cəlb olunan materialların istifadəsi zamanı, onların toxuma kulturasındakı qeyri stabilliyi, bəzi hallarda səhv nəticələrin alınmasına səbəb olur (somatik embrogenez, orqanagenenez zamanı).

Dediferensiasianın və morfogenetik proseslərin öyrənilməsində sitoloji metodlardan başqa fizioloji metodların da bu problemə cəlb olunması, sonda daha düzgün nəticələrin alınmasına gətirib çıxarır.

Qapalı sistemdə toxuma hüceyrələrinin çoxaldılması iki istiqamətdə aparılır.

1. İxtisaslaşmış toxuma hüceyrələrinin dediferensiasiyası və onların kallus və şiş hüceyrələrinə çevrilməsi.

2. Təşkilatlanmamış hüceyrələrin boy-inkişafa keçidi, monoton çoxalması və inkişafı:

Buraya histoloji diferensiasiya, kök və tumurcuğun inkişafı, somatik embrogenez, floral morfogenetik xüsusiyyətlər, hüceyrə dediferensiasiyası zamanı onun strukturunun dəyişməsi kimi problemlər daxildir.

Material və metodlar

Material olaraq qapalı sistemdə poliploid nar bitkisinin orqanlarındakı ixtisaslaşmış toxuma hüceyrələrindən istifadə edilmişdir. Buraya kökün ehtiyat parenximinin izolə edilmiş toxuma eksplantantı, budağın qabıq, özək toxuma parenximi, poliploid narın mezofil hüceyrələri və yarpağın epidermisi daxildir.

Bununla yanaşı qapalı sistemdə aparılan təcrübələrə tozluğun toxumaları da cəlb olunmuşdur. Çılpaq protoplastların (meristem və ixtisaslaşmış hüceyrələrdən), toxuma materialı xırdalandıqdan sonra alınan tək-tək hüceyrələrin qlaflarının dağıdılmasında fermentlərdən istifadə olunmuşdur (tripsin və onun törəmələrindən). Təcrübəyə cəlb olunmuş poliploidin ixtisaslaşmış hüceyrələrinin

qapalı sistemdə cücərdilməsi zamanı hormonların (auksin, kinetin, sitokinin) kiçik faizli məhlullarının dedifferensiasiya prosesinə təsiri öyrənilmişdir. Bununla yanaşı qidanın hazırlanmasında aqar-aqardan, saxarozadan və bitki yarpaqlarından alınmış şirələrdən qida məhlulunun hazırlanmasında bilavasitə istifadə edilmişdir. Tədqiqat işləri Subtropik bitkilərin genetikası və seleksiyası şöbəsində aparılmışdır.

Tədqiqat işinin müzakirəsi və nəticələri

Hüceyrələrin bölünmələri nəticəsində onların sayı qısa müddətdə (qapalı sistemdə) birdən 10^{12} qədər artır. Onların böyüməsi, strukturlarını formalaşdırması, aralarında funksional fərqləri yarada bilməsi, onlara xarakterik olan keyfiyyətdir. Hüceyrələrin formalaşmış spesifik funksiyasını itirməsi, onların daxilində gedən əks proseslərdə (dediferensiasiya) özünü biruzə verir. Bu tipli bölünməyən toxuma hüceyrələrinin yenidən bölünmə mexanizmi qarşıda qoyulan həllini tapmamış problemin birinci mərhələsidir. Hüceyrələrin dediferensiasiya probleminə həllini gözləyən bir sıra məsələlər daxildir. Buraya funksiya daşıyıcı hüceyrələrin davranışları, qonşu hüceyrələrdən, toxumalardan, orqanlardan və orqanizmin nəzarətinin bu hüceyrələr üzərindən götürülməsi mexanizmi də daxildir. Bu mexanizimdə, mərhələlərin ardıcılığı dediferensiasiya prosesinin gedişində xüsusi önəm daşıyır. Burada əsas maraq doğuran məsələ hüceyrələrin dediferensiasiyası zamanı onların daxili strukturunun və metabolik prosesin yenidən qurulmasına sərf olunan zamanın hüceyrələrin bölünmə induksiyası ilə sıx əlaqədə olmasıdır.

Hormonların, xüsusən fitohormonlar olan auksinin, sitokinin, gibberellinin və onların müxtəlif kombinasiyalardakı məhlullarının bölünməyən hüceyrələrə təsiri metodlarından istifadə edilmişdir. (Pilet, 261 s, 1961; Skoog, Armstrong, 359 s, 1979; Kulayeva, 157 s, 1973) İkincisi: isə dediferensiasiyaya uğramış eksplantantın travmatik sintezlə birlikdə hesablanmasıdır. (Veoman et al, 265 s, 1965, Simard, 49 s, 1971).

Bizim, habelə digər tədqiqat işlərindən məlum olmuşdur ki, zədədən sonra hüceyrələrdə sintez olunan maddələrin, xüsusən hormonların, travmatik bölünmə induksiyası arasında olan əlaqənin təsirindən yaranması mexanizmi çox mürəkkəb olub, işləmə prinsipi kifayət qədər aydınlaşdırılmamışdır. Xarici və daxili hormonların iştirakı olmadan, travmatik induksiya zamanı DNT-nin sintezi baş verə bilər (Simard, 49 s, 1971). Lakin bu yol ilə sintez, hüceyrələrin bölünmələrinə gətirib çıxarmır. Bu problemi noxud bitkisinə kinetin və auksinin təsirini öyrənən Libbengi və Torri (Libbengi, Torri, 60 s, 1973) oxşar nəticəyə gəlirlər.

Dediferensiasiya mexanizmi öyrənmək məqsədi ilə obyekt olaraq ehtiyat toxuma parenximi və izolyasiya olunmuş narın kök eksplantantı götürülmüşdür. Nar yarpağının mezofil, epidermis toxuma hüceyrələrinin qlafları fermentlərlə dağıldıqda çılpaq protoplastların örtüyünü tam bərpa edərək aktiv bölünən hüceyrələrə çevrilirlər. Bu zaman yarpaq orqanlarının toxuma hüceyrələri də sınaq təcrübələrinə cəlb edirlər. Dediferensiasianın fizioloji-biokimyəvi mexanizminin

öyrənilməsində narın reproduktiv orqanlarının toxuma hüceyrələrindən də istifadə olunmuşdur. Digər bitkilərdə kallusla boy artma və ikinci dediferensiasiya ətraflı öyrənilməsi üçün (Johry, 269 s, 1971), narda bu problemin öyrənilməsi üçün ilk dəfədir ki, təcrübələr qoyulur. Buraya tozluğun toxuma hüceyrələrinin öyrənilməsi də daxildir.

Travmatik induksiya hadisəsini öyrənən tədqiqatçılar sonralar onu iki istiqamətdə aparmışlar. Birinci istiqamətə tədqiqatda bölünmə induksiyasına daxil olan ixtisaslaşmış hüceyrələrin dediferensiasiyaanın keyfiyyətləri xüsusi önəm daşıyır.

Bizə məlumdur ki, ixtisaslaşmış bölünmə induksiyası olan hüceyrələrin təbiəti Haberlandt (Haberlandt, 42 s, 1922) tərəfindən soğanağı olan bitkilərdə öyrənilmişdir. O müəyyən etmişdir ki, izolyasiya olunmuş toxuma hüceyrələrinin dağılmasından (bölünmədə) eksplantlardan ayrılan cövhər, hüceyrələrin bölünmələrinə tənzimləyici təsir göstərir. Toxuma hüceyrələrinin aktivləşərək bölünmələrinin intensivləşdirilməsinə təsir edən zədə zonasındakı hüceyrələrində sintez olunan hormonlardır. Sonralar bu maddənin kimyəvi strukturunun ($\text{HOOC-CH=CH-(CH}_2\text{)}_8\text{-COOH}$) qeyd olunan şəkildə olduğu müəyyən edilmiş və bu struktur travmatin turşusu adlandırılmışdır.

Bizim subyektiv fikrimizə görə, DNT-də H^3 timidinin işarələnməsinin üzə çıxması reperativliklə daha çox əlaqəlidir, nəinki reperativ sintezlə.

Narın orqanlarında aparılan təcrübə işlərinə əsasən belə nəticəyə gəlmək olur ki, ehtiyat qidalı ixtisaslaşmış fotosintetik parenxim hüceyrələrinin dediferensiasiyası onların daxilindəki xloro, xromo və leykoplastların dağılmasından sonra başlayır. Yaradılmış şərait dediferensiasiyaanın bölünmə induksiyasına və hüceyrələrin çoxalmasına təsirini 12-15 saatdan sonra, incə strukturlarında baş verən dəyişiklərdən müəyyən etmək olur və bu zaman endoplazmatik retikulumun və ribosomların, sayında artım baş verir. Bu andan etibarən ixtisaslaşmış bölünməyən toxuma hüceyrələrinin nüvəciyi kəskin böyüyür və onların induktiv bölünmələri başlayır. Narın özək parenximinin eksplantant toxumasının xırdalanması zamanı, sintez olunan zədə hormonlarının təsirindən hüceyrələrin dediferensiasiyası başlayır və onların bölünmə induksiyası yüksəlir. Travmatik induksiya nəticəsində eksplantantlarda RNT, DNT, zülalın sintezi, oksidləşmənin intensivliyi yüksəlir və fermentlərin aktivliyi artır. Lakin hormonların iştirakı olmadan bu cür effektivlik uzun müddət sürmür və hüceyrələrin metabolik aktivliyi tədricən sönür.

Bəzi bitkilərdə sintez olunan şirələri eksplantant olan qida məhluluna əlavə etdikdə dediferensiasiya prosesi hüceyrələrdə güclənir və bölünən hüceyrələrin sayı meyoza və mitozda sürətlə artır. Şirənin tərkibindəki hansı maddələrin təsirindən dediferensiasiyaya uğrayan hüceyrələrin sayının artması müəyyən edilməmişdir. Eksplantantların daha çox xırdalanması onların daxili hüceyrələrini qocalmadan qoruyur. İzole edilmiş tozluğun, yarpağın, kökün xırdalanmış toxumasının

hüceyrələrini hormon olmayan qida mühitinə bitki şirəsini əlavə etdikdə, dediferensiasiya olunmuş hüceyrələrin həm bölünmələri, həm də onların ümumi sayı sürətlə artır. Özək toxuması ilə aparılan təcrübələr zamanı əlavə inkubasiyada hormonların bu prosesdə iştirakı tələb olunur. Müəyyən edilmişdir ki, proliferasiyanın və kalıus toxumasının yaranması üçün hormonların əvəzinə qida mühitinə laqfazada bitki şirəsi əlavə etdikdə dediferensiasiya (hormonların təsiri olmadan) daha çox sayda hüceyrələrdə baş verir və bölünən hüceyrələrin sayı həndəsi silsilə ilə artır.

Eksplantant inkişaf edən qida mühitinə hormonu bitki şirəsi ilə əvəz edilməsi və şirənin hüceyrələrin dediferensiasiyasına və bölünmələrinə müsbət təsirindən sonra onların gərilməsi sürətlənir. Ümumi götürdükdə əgər 50-80 saat müddətində qidadakı hormonların iştirakı ilə eksplantantlar dediferensiasiyaya uğrayaraq bölünmələrini artırırsa da, qida mühitinə əlavə olunan bitki ekstraktının təsirindən (hormonlar iştirak etməyən) dediferensiasiya olunma müddəti enərək 18-25 saata bərabər olur və onların kütləvi bölünmələri daha da intensivləşir. Şirənin eksplantant olan qidaya əlavə edilməsi tək-tək kallus əmələ gəlmə prosesi 15 gündən sonra güclənir və bu proses hormonların eksplantantlara təsirindən daha sürətlə baş verir. Proliferasiya hər iki induktorun təsirindən yaranır və şirəni proliferativ prosesdə tək-tək eksplantant olan qida məhluluna əlavə etdikdə eksplantantdakı hüceyrələrin birinin aktivliyinin digərlərinə nisbətən daha yüksək olduğu üzə çıxır.

Aparılan təcrübədə şirəni qidaya tək-tək kallus hüceyrələrinin nuklein turşusunun sintezi mərhələsində əlavə etdikdə ixtisaslaşmış hüceyrələrin bölünmələrinə bu induktorların təsirindən nuklein turşusunun bütün formalarının sintezi intensivləşir, lakin, kinetin hormonu təklikdə nuklein turşusunun sintezinə stimulyativ təsir göstərmir. Beləliklə, məhlula əlavə olunan şirə hər iki mitotik siklin G fazasında hüceyrələri bölünməyə hazırlayır və yeni mitozun əmələ gəlməsinə sərf olunan vaxtı azaldır. Bizim subyektiv fikrimizə görə şirə, sintezin qarşısını alan bloku, S-dən G₂ keçid fazasında neytrallaşdırır. Toxumaların tərkibindəki hüceyrələrin kallus hüceyrələrinə çevrilməsi, onların spesifik zülal-antigen sintez etməsi, dediferensiasiya birləşməyən toxuma hüceyrələrində baş verməsi və genlər aktivliyini dəyişərək yeni məzmununda özünü biruzə verməsi, bu prosesinin əsas göstəricisidir. Lakin biz burada şirənin induktorluğunu genomun yenidən proqramlaşaraq aktivləşməsində, eksplantantların dediferensiasiya olunmasında və bu prosesdə iştirakında görürük. Şirənin tərkibindəki dediferensiasiya effekti verən maddənin genomun necə aktivləşdirməsinin səbəbi bizə məlum olmadığı üçün burada hər hansı fikrin söylənilməsi çox çətindir. İstifadə olunan bitki şirəsinin tərkibindəki maddələr arasında hansının dediferensiasiya prosesində mediator təsiri müəyyən edilməmişdir.

Lakin çox kiçik eksplantant ($d=0,1$ mm), tam proliferasiyadan məhrum olan məhlula şirəni əlavə etdikdə ya hüceyrələr bölünməyə başlayırlar, yada

gərilirlər.

İxtisaslaşmış nar hüceyrələrinin süni qida şəraitində qapalı mühitdə cücərdilməsi zamanı təcrübələrimizdən alınan nəticələr aşağıdakı kimidir:

a) dediferensiasiya zamanı bölünməyən hüceyrələrin bölünmə intensivliyini yüksəltməsi növbəti ikinci dedifferensiasının bu hüceyrələrdə baş verməsi və onların davranışları, mitotik sikldə müəyyən edilir.

b) bu proses tez-tez spontan sinxronizasiya olunaraq fiksə olunmuş başlanğıc nöqtəsinin üzə çıxması dediferensiasiya prosesindən sonra kallus hüceyrələrinin yaranmasının əsas göstəricisidir.

Eksplantantların proliferasiyası ilə paralel üzə çıxan sitodiferensiasiya, kallusun ilk əmələ gəlməsinin başlanğıcında müşahidə edilir. Adətən, ilkin kallusda meristem tipli hüceyrələr əsas bölünmənin ilkin mənbəyi olur, sonra isə traxediyaya bənzər ligninləşmiş örtük elementləri mikroskopda görünür və bu hüceyrələrin digər qrupu çox az hallarda floemanın strukturuna bənzəyirlər.

Qeyd olunan proseslər spontan və asinxron baş verdiyi üçün, bu mexanizmin ilk kallus əmələ gəlmə prosesində öyrənilməsi çətinləşir və dediferensiasiya olunmamış hüceyrələrə xüsusi xarici təsirlərlə sitodiferensiasiyanın yaranmasında istifadə edilir. Sitodefferensiasiyanın spektri orqanizmdəkindən qat-qat zəif və az yararlı müşahidə olunur. Süni təsirlərdən artıma əsasən parenxim və meristemə bənzər hüceyrələr, (yüksək temple bölünənlər) traxeidlər və pigmentləşmiş hüceyrə tipləri arasında rast gəlinir. Çox nadir hallarda sitoyabənzər borular da müşahidə edilir. Skleroidləri, lifi və tükcükləri xüsusi rəngləyicilərdən istifadə etməklə, kolloza tam yarandıqdan sonra boruları mikroskopda müşahidə etmək mümkün olur.

Ən çox dediferensiasiya olunan traxediyanın tipləri (13-15% h), ən az diferensiasiya olunan traxediya hüceyrələridir (3-8%). Sonuncuların müşahidə olunmaması yəqin ki identifikasiya ilə əlaqədardır. Sonda isə bu hüceyrələrin çevrilmələrindən kambiya bənzər hüceyrələr inkişaf edir. Kallus hüceyrələrinin fotosintez tipli hüceyrələrə çevrilməsinin mikroskopda müşahidəsi işin əsas hissələrindən biridir. Ümumi götürdükdə nar bitkisinin fotosintetik aparatın yaranması işıq faktorudur. Mavi işığı və bitki şirəsini birgə qida olan kulturaya daxil etməklə xloroplastların əmələ gəlməsini sürətləndirmək olur. Ümumi formada belə nəticəyə gəlmək olur ki, sitodefferensiasiyanın yaranması hüceyrələrin genetik tələbi ilə olub, onlara mühit yarandıqda bölünmə fazalarının birində genetik informasiyaları, ona cavabdeh olan hüceyrələrdə reallaşdırıla bilirlər. Bitkilərin keçirici sistemlərinin inkişafı daxili hormonların təsiri ilə əlaqədar olsada, onlara nəzarət etmək çox çətin olur. Məsələn, narda daxili hormonlar olmadan nə hüceyrələr bölünürlər, nə də traxeidlərin dediferensiasiyası baş verir.

Daxili hormonların (kinetinin) az qatılığı yalnız traxediyaya bənzər hüceyrələrin əmələ gəlməsinə (dediferensiasiya zamanı) yararlı olur. Əgər, süni şəraitdə bu hormonların qatılığını yüksəltsək (müəyyən həddə qədər) onda

dediferensiasiyadan sonra traxediyaya çevrilən hüceyrələrin sayı (0,1-dən-1 mq qədər litrə) artır. Biz budaq meristemini kallusa calaq etmə metodu ilə apeksin kslema elementlərinin diferensiasiyaya təsirini narda öyrənməklə, bizdən öncəki alimlərin metodunu təcrübəmizdə istifadə etdik (Vetmore, Rier, 418 s, 1963). Lakin təcrübələrdə apeks toxuması olan qidadaki auksini və saxarozanı bitki şirəsi ilə əvəz etməklə, bu qarışığı təsirindən kallus toxumasının kiçik nəhiyəsində çox faktorlu nizamlama prosesinin getdiyini daha qabarıq şəkildə müşahidə etmək olur. Aydın məsələdir ki, auksin və saxarozasız kslemanın əmələ gəlməsi mümkün olmur. İkinci tərəfdən traxeidlərin sayı auksin ilə saxarozanın qatılığından çox asılıdır. Məhlulun qatılığını yüksəldikdə hüceyrələrin bölünmələri intensivləşir, artımı yüksəlir. Lakin digər qlukozidlərin (matoza, treqalaza) sitodiferensiasiyaya təsiri (induksiya) çox cüzi olur. Bu da saxarozanın induktor kimi ksilema elementinin yaranmasında rolundan xəbər verir. Hüceyrələrin bölünmələrinə, ksilema elementləri arasında ikitərəfli təsirin olması böyük maraq doğurur. Nar bitkisində maye keçiricilərinin yaranma elementləri merestemdəki hüceyrələrin aktivliyindən çox asılıdır (apikal meristem, prokambial və kambi hüceyrələri). Qapalı sistemdə toxuma hüceyrələrinin dediferensiasiyası ikinci, ən çox halda üçüncü bölünmə siklindən sonra başlayır. Bəzi ingibitorlarla bölünmə siklinə təsir etdikdə DNT-nin sintezinin azalması kslema hüceyrələrinin formalaşmasına əks təsir göstərir. Əgər, ingibitorlarla bölünmə siklindən sonra kselmaya təsir edilərsə onda kslemanın əmələ gəlməsinə onların hər hansı təsiri olmur.

Toxuma və hüceyrə kulturasında bir sıra bitki orqanları, inkişaf proseslərinin öyrənilməsində çoxdan istifadə edilir. Bunun əsas səbəbi bitki hüceyrələrinin dediferensiasiyaya totopotent olması, bölünməyən toxuma hüceyrələrinin meristem tipli hüceyrələrə çevrilməsi və onların dediferensiasiya qabiliyyətli olması nəticəsində tumurcuğun və kök rüşeyminin başlanğıcını verə bilməsidir. Bəzi hallarda inkişaf, embrogenez yolu ilə, somatik toxuma daxili hüceyrələrdən ziqota bənzər strukturları yaradaraq rüşeymin inkişafının başlanğıcını qoyurlar. Budaq strukturlarının yaxud embroidlərin diferensiasiyasından sonrakı inkişaf zamanı, onların rüşeym tipli cücərtilərə çevrilmələrinə və rəqenerasiyasına şans yaranır və yeni strukturlar tez bir zamanda bütün mərhələlər keçərək nəsil verə bilirlər. Məhz birkilərin somatik hüceyrələrinin bu xassəsi onları heyvan hüceyrələrinin toxuma kulturasında cücərdilməsindən ayırır. Heyvan hüceyrələrinin isə müəyyən sərhəd çərçivəsində dediferensiasiya və rediferensiasiya qabiliyyəti olur.

Hal-hazırkı təcrübələrdən alınmış nəticələrdən belə fikir söyləmək olar ki, ixtiyari hüceyrələrin dediferensiasiyası zamanı nüvəsini və protoplastasını itirməyən canlı hüceyrələrdən, kallusun başlanğıcını verən hüceyrələri almaq olar və onlar da öz növbəsində təşkilatlanan orqanizmin strukturunu yarada bilirlər. Onların bu keyfiyyəti in-siti də toxuma və bitki zədələndikdə üzə çıxır və bir sıra hüceyrə nəsillərində bu proses davam edir. Hal-hazırda subtropik bitki hüceyrələri

səviyyəsində triqger mexanizminin öyrənilməsinə (in-siti və in-vitro) çox az yer ayrılır.

Birinci halda (in-situ) bu prosesin öyrənilməsinin çətinliyi hormonların və trofik nizamlayıcılarını orqanizm səviyyəsində bir-birindən ayırmağın çox mürəkkəb vəçətin olmasıdır. İkinci çətinlik isə təcrübəyə seçilən toxuma hüceyrələrinin spesifikliyidir. Ümumi götürdükdə qapalı sistemdə hüceyrələrin fiziologiyasına və morfologiyasına aid iki əks nöqtəyi nəzər vardır. Birincidə hüceyrələrin təşkilatlanmamış strukturlardan qorunmasıdır. Sonuncuların irəli sürdüyü ideyaya görə, ayrı-ayrı hüceyrələr inkişaf prosesində ziqotların, triqger kimi embrional inkişaf formasını seçdikdə ətraflarında qonşu hüceyrələr olmur (qapalı sistem). Təcrübələrdən alınan nəticələrə görə, qapalı sistemdə inozit məhlulunda xüsusən aqar-aqar olan məhlulların çoxunda hüceyrələrin çoxu inkişaf etməyərək eliminasiyaya uğrayırlar (ziqotun və embrional inkişafı başlanğıcda).

Qapalı sistemdə müxtəlif sort və formalar arasında yalnız poliploid narin suspenziya hüceyrələrinin parenxim tipi inkişaf edir və meristematik mənbədəki hüceyrələr də bu tipə meyilli olurlar. Lakin dediferensiasiya olunmuş meristemidən o zaman budaq strukturu inkişaf edir ki, meristemdəki ayrı-ayrı hüceyrələr bölünmələrini daima davam etdirirlər. Bölünən 12-18 hüceyrənin heç də hamısı meristem tipli mənbəni nyarada bilmir. Alternativ fikrə görə, hüceyrələrin təşkilatlanmış inkişafı, fitohormonlar arasındakı kəmiyyət ölçülərinin dəyişməsi ilə əlaqədardır (auksin və sitokinin). Bizim subyektiv fikrimizə görə fitohormonların ekzogen balansı morfoloji proseslərin nizamlanması və onlara təsirində test göstəricisi ola bilər.

Lakin təcrübələrdə bəzi fitohormonlar fiksə olunmuş sahədə endogen balans təsir sistemini yarada bilmir. Fitohormonların endogen balansı, fizioloji və diffuz qradiyentindən asılı olur və kallusun hüceyrə kütləsini qapalı mühitdə əmələ gətirir. Bu cür fizioloji qradyenti kslema elementlərini inkişafda olan təşkilatlanmamış toxumaların əmələ gəlməsində görmək olur.

Nar hüceyrələrinin qapalı sistemdə inkişafında kinetinin və auksinin balans mühitini də rolunu qeyd etməklə yanaşı, bazal və apikal meristem hüceyrələrinin fosforlaşma, oksidləşmə prosesində, habelə kraxmalın sintezində əhəmiyyəti daima qalır. Burada aşağı və zirvə meristemləri arasında morfoloji inkişafa görə, kooreliyativ əlaqənin olması üzə çıxır. Kraxmalın bazal hüceyrələrdə sintezi üç gündən sonra başlayır və altıncı gün sintez intensivləşərək maksimum həddə çatır. Asılqan hüceyrələr isə tərsinə, determinasiya olunaraq onlardan yan budaqlar inkişaf edir. Bu tipli təmiz determinasiya olunmuş hüceyrələrin bölünmələri səkkiz gündən sonra başlayır. Hüceyrələrin morfogenetik determinasiyasını mühitin səthində yaranan dəyişkənliklə müşahidə etmək olur.

Lakin üçüncü gün morfogenezin qradiyenti dəyişmədiyi halda, altıncı gün ona gətirib çıxarır ki, zirvə hissədəki budağın (əvvəllər aşağıda olmuş) baş və ayaq hissələri yerlərini dəyişərək hər iki tərəfin boyu artmağa başlayır.

Toxuma kulturası səviyyəsində morfoloji inkişaf proseslərini eksplantantların ilk inkişaf mərhələsində təyin olunmasıdır. Bunu yalnız ziqota bənzər hüceyrələrin bölünmələrinin, effektiv inkişafın və erkən embrion tiplərin aktivliyinə əsasən təyin etmək olur. Meristemi yaradan hüceyrələrdən kökün yaxud budağın əmələ gəlməsinin mexanizmi anlaşılmaz qalır.

Burada qeyd olunan məsələlərin öyrənilməsi zamanı çıxan sual aşağıdakı kimidir:

- hansı xarici təsirlərlə morfogenezin yaranması mexanizmini təyin etmək olar?

Skuqanın (Skooq, Miller, 113 s, 118 s, 1957) təcrübələrindən belə nəticəyə gəlmək olur ki, morfo tipin təyin edilməsinin əsas göstəricisi qida mühitindəki auksin və sitokininin kəmiyyət nisbətləridir.

Auksinin sitokininə nisbətən yüksək qatılığı rizogenezi əmələ gətirdiyi halda aşağı qatılığı məhlul tumurcuqların inkişafını sürətləndirir.

Bir qapalı qabın içərisində həm budağın, həm də kökün rüşeym embroidlərinin bir yerdə inkişafı onu göstərir ki, konsentrasiya olunmuş toxuma qradienti ilə bu problemin həlli nəzəri cəhətcə mümkün olur.

Morfoloji proseslərin qapalı sistemdə hüceyrə səviyyəsində asinxromluğun öyrənilməsinə uzun müddət və zaman tələb olunur. Prosesi, sinxromlaşma, genetik və fizioloji bloklardan istifadə etməklə (müəyyən mərhələdə onun getməsinə gecikdirməklə) morfogenezin mərhələləri keçməsinə gecikdirə bilər.

Bizə elə gəlir ki, yuxarıda qeyd olunan məsələlərə toxunarkən bir məsələni də qeyd etməmək düzgün olmazdı. Bu, toxuma hüceyrələrinin qapalı sistemdə uzun müddət qalmasından sonra onların inkişafına xas olan keyfiyyətlərini itirməsidir. Adətən, bir sıra empirik strukturlar və tumurcuqlar bir müddətdən sonra funksiyalarını yerinə yetirə bilmirlər və toxuma hüceyrələrinin rizogenezi biraz uzun müddətli olur. Bu da qapalı sistemdəki hüceyrələrin genetik cəhətdə qeyri stabil olması və aneoploidlərin çoxalması ilə əlaqədardır. Bu zaman qapalı şəraitdə və qida məhlulunda inkişaf edən hüceyrələrin bir çoxunun hormonlardan asılı olmaması üzə çıxır. Bu tipli hüceyrələrin inkişafına qidanın tərkibindəki hormonlar təsir etmir. Bunun səbəbi müəyyən edilməmişdir. Bizim subyektiv fikrimizə görə, əsas səbəbi təcrübədə uzun müddət qalan hüceyrələrin mutasiyası və genlərin depressiyasıdır.

Hər iki halda hüceyrələrin inkişaf prosesinin hormonlarla idarə olunması qeyri-mümkün olur. Hormonlardan asılı olmayan mutant hüceyrələrin və asılı olan hüceyrələrin bir yerdə fəaliyyətdə olması orqanizmin hormonlarla nizamlanmasının sərhəddini müəyyən edir və floral morfoloji inkişaf prosesinin və izolə edilmiş meristemini hüceyrə kulturasında öyrənilməsi mümkün olur.

Burada onu da qeyd etmək çox vacibdir ki, bu metod reproduktiv dediferensiasiyaya uğramış hüceyrələrin triqger mexanizminin öyrənilməsində çox yararlıdır. Bu zaman apeksdəki hüceyrə və onun qruplarında baş verən

dəyişikliklərin qiymətləndirilməsi mümkün olur. Meristemdəki hüceyrə populyasiyalarının hetrogenliyinin floral inkişafın metabolizmində üzə çıxması bu sistem daxilində çox mürəkkəb biokimyəvi, prosesin getdiyi tam əks olunur.

Məhz bu səbəbdən digər metodlar da floral morfo inkişafın öyrənilməsində yararlı olur. Bu metodlardan biri də təcrübədə kallus toxumasından istifadə edilməsidir.

Çiçəkləyən və yaxud çiçəklənməyən nar bitkisinin zirvəsindəki hüceyrələrdən kalıus hüceyrələrinin alınması mümkündür (poliploid nar formasında). Bu hüceyrələrdən əmələ gələn kallus toplumundan bitki əvəzinə çiçək formalaşır. Bu zaman qönçəlilərin əmələ gəlməsinin sayı azaldığı halda, vegetativ tumurcuqların budaqda sayı artır. Budağın ən aşağı hissəsindəki buğum arasında yalnız vegetativ tumurcuqlar inkişaf edir (inkişafda olan budağın seqment hissəsində). Sonralar təsdiq olundu ki, çiçək və vegetativ tumurcuqların müəyyən nisbətdə yaranmasının səbəbi qida məhlulundakı şəkərin miqdarıdır. Çiçək və vegetativ tumurcuqların induksiya zamanı azalıb-çoxalması determinasiyanın ardıcıl bölünmələrdə itirilməsi ilə əlaqədardır. Təcrübələrdə uzun müddət istifadə edilən hüceyrə populyasiyaları arasında morfogenezdəki artımda daha çox adaptasiya olunmuş hüceyrələrə təsadüf edilir və onların çoxu morfo inkişaf xüsusiyyətlərini itirirlər. Qapalı və izolə edilmiş sistemdə determinasiyaya uğramış hüceyrələrin əsas xarakteri onların determinasiya olunmuş vəziyyətini bir neçə hüceyrə nəsində saxlaya bilməsidir.

Tozluqdakı hüceyrələrdən toxuma kulturasında haploid hüceyrələrin alınması xüsusi maraq doğurur. Hind embrioloqları durman bitkisinin müəyyən etmişlər ki, (Guha, Mahesvari 204 s, 497 s, 1964, Sopor 1972) cavan mikrosporlar rüşeymə bənzər strukturların başlanğıcını verə bilirlər və embriodin inkişafından haploid xromosomu olan hüceyrələri almaq olar. Bu təcrübə bütün bitkisinin qoyulmuş və oxşar nəticələr alınmışdır (Nitsch, 281 s, 1971). Bu sahədə görülən işlərin əsas məqsədi ya cavan mikrospordan embriodin, ya cücərtilərin, ya da öncə haploid saylı xromosomu olan kallus hüceyrələrinin alınması, sonra isə o hüceyrələrdən tumurcuğun inkişafı və bitkinin regenerasiya ilə bərpa olunmasıdır. Biz burada haploid hüceyrələrin alınmasının genetik tərəfinə toxunuruq.

Təcrübələrdə çoxlu miqdarda haploid embrioidlərinin alınmasından belə nəticəyə gəlmək olur ki, haploidin alınmasında ən mühüm faktor tozcuğun induksiyası üçün obyektin seçilməsidir. Buraya növün xarakteristikası, hibrid kombinasiyası və digər atributlar daxildir. Haploidin alınması zamanı qida məhlulunun tərkibi önəm daşıyır. Bu məhlulda mineral duzların, dəmirin və saxarozanın olması çox vacibdir.

Tozluğun embrogenezində əsasən qapalı kulturada sporların mərhələlərin ardıcıl getməsi xüsusi önəm daşıyır. Sanderlendin və Uiksin nəticələrinə görə (Sunderland və Wicks, 213 s, 1971) cavan bir nüvəli mikrosporlar təzə tetradanı yaradan hüceyrələr embrogenezə daha həssas qabiliyyətli olurlar.

Sonralar məlum oldu ki, müxtəlif bitkilərin morfogenetik aktivliyi müxtəlif ola bilər. Lakin bizim müxtəlif sortların tozluq hüceyrələri ilə qapalı sistemdə apardığımız təcrübələr epizodik olduğu üçün və qidanın hazırlanmasında müəyyən uyğunsuzluqların olması tozluq hüceyrələrinin kultuvasiyasından (qapalı sistemdə) haploid xromosom sayı olan embroid hüceyrələrinin alınması mümkün olmamışdır.

Toxuma kulturası metodundan istifadə etməklə bitki hüceyrələrinin izolə edilmiş protoplastalarının tədqiqində bir sıra anlaşılmaz qalan fizioloji və genetik problemlərin həllinə aydınlıq gətirmiş olardı. Genetik və fizioloji cəhətcə aydınlaşdırılmamış problemlərin həlli bizim tədqiqat proqramımıza daxil olmadığı üçün (xüsusən maddələrin membrandan keçməsi və müxtəlif faktorların protoplastaya təsir mexanizmləri) izolə edilmiş protoplasta metodundan sitodiferensiasianın və morfoloji proseslərin mexanizminin öyrənilməsində istifadə oluna bilər. Genetik və fizioloji cəhətcə həyat qabiliyyəti olan izolə edilmiş protoplastaları bitkilərin toxumalarından və hüceyrələrindən əldə edilməsi (bax: Potrucus 1, 1973. Protoplastes et fusion de cellules somotique vegetales 287 s, 1973) və onlardan müxtəlif təcrübələrin qoyulması müddətində istifadə olunması, dediferensiasianın və inkişafın mərhələlərində nüvə protoplastanın metabolizmdə ayrılmaz münasibətlərində olmasından xəbər verir.

Fermentativ təsirlərlə hüceyrə örtüyünü (qlafının) dağılmasından alınan çıpaq sağlam protoplastaları kifayət qədər fermentdən tam təmizlədikdən sonra (su və digər məhlullarla) onlar tək-tək inkubasiya olunaraq qida mühitinə qoyulur (tək-tək səpilir). Nəticədə qlafları əridilmiş protoplastların örtükləri bərpa olunaraq hüceyrələr ilkin təbii vəziyyətinə düşürlər. Bu proses poliploid hüceyrələrinin fermentlərlə dağıdılmış hüceyrə örtüklərinin çıpaq protoplastanın üzərində yenidən yaranması digər narın sort və formalarına nisbətən daha intensiv gedir. Tədqiqatdan məlum olmuşdur ki, örtüyü bərpa olunmuş hüceyrələr əvvəlki kimi bölünürlər, toxuma əmələ gətirirlər, embrogenezini və orqan əmələgəlmə qabiliyyətlərini bərpa edirlər. 24-36 saat aralıq müddətində protoplastaların ətrafında örtük əmələ gəlməyə qədər əlavə təcrübələri aparılması mümkündür.

Nəticələr

1. Poliploid nar bitkisinin xüsusi funksiyası hüceyrələrin qapalı sistemdəki məhlulda dediferensiasiyası və bölünmələrinin ikinci dediferensiasianın yaranma xüsusiyyətlərini və davranışlarını müəyyənləşdirir.

2. Bu prosesin gedişi tez-tez sinxronlaşaraq fiksə olunmuş sahənin başlanğıc nöqtəsi olur, dediferensiasiya mexanizmində metabolik proseslərin dəyişməsi ilə ixtisaslaşmış hüceyrələrin kallus hüceyrələrinə çevrilməsi təmin edilir.

3. Sitodiferensiasiya zamanı genetik təbiətli informasiyaları, ona cavabdeh olan hüceyrələrin bölünmə fazalarının birində reallaşdırılması mümkündür.

4. Qapalı sistemdə cücərdilən ixtisaslaşmış hüceyrələr arasında

hormonların təsiri olmayan ştammlara tez-tez təsadüf edilir. Bu hüceyrələrin mutasiyaya uğraması nəticəsində normal qida məhlulunda belə inkişaf və bölünmələrinin davamı etdirə bilmirlər. Bu tipli ştammların qapalı sistemdə yaranmasının mexanizmi anlaşılmaz qalır.

5. Tədqiqat nəticəsində müəyyən edilmişdir ki, vəqitativ və generativ tipli tumurcuqların miqdarında fərqlərin yaranmasında qida məhlulundakı şəkərlər mühüm rol oynayır. Şəkərlərin məhlulda qatılığının yüksəlməsi generativ tumurcuqların sayını artırır və hormonal xarakterli maddələrin məhlulda qatılığının dəyişməsi, bitkinin morfoloji xüsusiyyətlərinə təsir etmir.

6. Haploid embroldinin alınmasında və tozluğun induksiyyasında ən mühüm faktor təcrübəyə cəlb olunan bitkinin ona xarakterik olan xüsusiyyətidir. Bir nüvəli mikrosporlar qapaq sistemdəki qida məhlulunda tetradə fazasındakı strukturları tez bir anda embrogenez fazasına keçə bilirlər.

7. Qapalı sistemdə istifadə edilən ixtisaslaşmış hüceyrələrin qlafları (örtükləri) fermentlərlə dağıldıqdan sonra, çıpaq protoplastların örtükləri tezliklə qida məhlulunda bərpa olunur. Örtüyün bərpasına sərf olunan zamanın aralıq dövründə informasiyalı orqanoidləri köçürməklə hibridləşmə ilə genetik istiqamətdə təcrübələri aparmaq mümkün olur.

8. Qlaflı bərpa olunmuş protoplastalar əvvəlki hüceyrə funksiyalarını (bölünmələrini, toxuma əmələ gətirmələrini, embrogenezini və orqanagenezini) yenidən yerinə yetirə bilirlər.

ƏDƏBİYYAT

1. *Pilet P.E.* 1961. Les phytohormones de croissance. Paris, massom et cie 210
2. *Skooq F., Armstrong D.J.* 1970. Cytokinins - Annual rev.plant physiol 21, 359.
3. *Kulaeba O.H.* 1973, Цитокипин, их структура и функция Москва., "Наука" 157.
4. *Veomen M.M., Dayek A., Robertson A.Y.* 1965. Growth and differentiation of plant fissul culture – Ann. Bot.I. 29, 265.
5. *Simard A.* 1971. Imitation of DNA synthesis by kinetin and experimental factors in tobacco pithicues in Vitor – Canada I.Bot 49, 1451.
6. *Libbenqa K.K., Torrey J.G.* 1973. Hormone induced endoreduplication prior to mitosis in cultured pea root cortex cells. Amep.J.Bot 60, 7, 293.
7. *Johri B.M.* Embryogenesis in tissus de plantes. Paris, C.N.R.S, p 269.
8. *Haberlandt G.* 1922. Über Zellteilung shormone und ihre Beziehungen zuk Wundteilung. Befruchtung pathenoqenezis und Adventifenbriptione. Bidzlt, 42, 145.
9. *Wetmore R.H., Rier J.P.* 1963, Experimental induction of vascular tissue in callus of anqiosperm – Amer. J. Bot. 50, 418.
10. *Skooq F.Miller C.O.* 1957 chemical regulation of growth and organ formation implant tissues cultured in Vitro. Sym. exper boil. 113, 118.

11. *Cuha S., Maheswani S.C.* 1964. Invitru production of embryos from anthers of *Datura* – *Nature*, 204, 497.
12. *Sopory S.K.* 1972. Physiology of development of poller embroiders in daturi in noxia Mill. Ph. Dr. thesis, Delhi unvek.
13. *Nitsch J.P.* 1971. La prodaction invitro d'embryones haploides: Resultates et perspectives – incultures de tissues de plantes. Paris C.N.R.S. 281.
14. *Sunderland N., Wicks F.* 1971. Embryoid formation inpollen grains of nicotian a tabaccum – *J.Exper.Bot.* 22, N.70, 213.
15. *Portycus I.* Protoplastes et fusion decellules somatique vegetables. 1973.69.287.

Redaksiyaya daxil olub 08.11.2021