სსიპ – ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

ფიტოპათოლოგიის და ბიომრავალფეროვნების
ინსტიტუტი

მეთოდური მითითებები სოკოვან ფიტოპათოგენთა გამოყოფა-იდენტიფიკაციაზე

ქობულეთი

2015

ნაშრომი გამოცემულია შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის ფუნდამენტური კვლევებისათვის სახელმწიფო სამეცნიერო გრანტის N31/73 ფარგლებში

მეთოდური მითითებები მომზადებულია პროექტის მონაწილეების, ფიტოპათოლოგიის და ბიომრავალფეროვნების ინსტიტუტის მთავარი მეცნიერ-თანამშრომლების ზოია სიხარულიძის, გალინა მეფარიშვილის და ლამზირი გორგილაძის მიერ და გამიზნულია მცენარეთა პათოლოგიების მკვლევართა და აგრარული და ბიოლოგიური პროფილის ფაკულტეტის სხვადასხვა საფეხურის სტუდენტებისათვის.

ნაშრომში განხილულია მცენარეთა დაავადებების ნიმუშების შეგროვების, ნიმუშებიდან სოკოვანი პათოგენების გამოყოფის და იდენტიფიცირების ძირითადი მეთოდები და პათოგენებთან მუშაობის ზოგადი წესები.

რეცენზენტი: ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი– ო. შაინიძე

რედაქტორი: ქ. ნაცარიშვილი

მცენარეთა დაავადებების დიაგნოსტირების პროცესი შემდეგ საფეხურებს მოიცავს:

- დაავადების ნიმუშების შეგროვება
- ნიმუშების ლაბორატორიული ანალიზი
- პათოგენობის ტესტის ჩატარება
- დაავადების გამომწვევი მიკროორგანიზმის იდენტიფიკაცია ანუ დაავადების დიაგნოსტირება

მცენარეთა გამოკვლევა და დაავადების ნიმუშების შეგროვება

მცენარეთა დაავადებების გავრცელების მონიტორინგის და დაავადების ნიმუშების შეგროვების მიზნით სხვადასხვა გეოგრაფიულ ზონაში არსებული სასოფლო სამეურნეო თუ სხვა მცენარეების გამოკვლევა ტარდება წინასწარ განსაზღვრული გეგმისა და მარშრუტის შესაბამისად მცენარეთა ვეგეტაციის მანძილზე.

დაავადებული ნიმუშების შეგროვება ხდება შემდგომში მისი მიკროსკოპული ანალიზისა და დაავადების დიაგნოსტირების მიზნით. მცენარეთა ნათესების და ნარგაობის გამოკვლევისას ყოველთვის უმჯობესია მთლიანი მცენარის დათვალიერება. აღებული და შეგროვებული უნდა იქნას მცენარის მხოლოდ ის ნაწილები, რომელზედაც კარგად იქნება გამოხატული დაავადების სიმპტომები (ლაქები, ნაფიფქი, მეჭეჭები, წყლულები, დეფორმაციები და სხვა) და დამჭკნარი ან გამხმარი მცენარეები გარეგნული სიმპტომების გარეშე. სასურველია კონკრეტული სიმპტომების მქონე რამდენიმე მცენარის გამოკვლევა. ზოგჯერ აუცილებელია მთლიანი მცენარის შეგროვება. მცენარე ბარის საშუალებით უნდა ამოითხაროს მიწიდან, არ დაექაჩოთ და არ ამოგლიჯოთ მცენარე, რადგან ამ დროს შესაძლებელია ფესვებზე დასახლებული პათოგენის სტრუქტურების ან ინფიცირებული

ქსოვილის დაზიანება გამოიწვიოთ. რაც საბოლოო ჯამში დიაგნოსტიკის გაძნელებას გამოიწვევს. დაავადების დიაგნოსტირება შედარებით უფრო ადვილია, როცა ინფიცირებულ მცენარეზე მკვეთრად არის გამოხატული პათოგენის რეპროდუქტიული ან სხვა სტრუქტურები, როცა დაავადებულ მცენარესთან ერთად გვაქვს იგივე, ჯანსაღი მცენარე შესადარებლად და როცა ნიმუშები ახალია. ყოველთვის უმჯობესია აღებული ნიმუშები მაშინვე იქნას მიტანილი ლაბორატორიაში. თუ ამის შესაძლებლობა არ არის, აუცილებელია ნიმუშების შენახვა გრილ ადგილას და მათი შენახვის გარკვეული წესების დაცვა.

ფოთლების დაავადების დიაგნოსტირებისას სასურველია აღებული იქნას 10-20 ფოთლის ნიმუში, ხოლო ტუბერების კვლევისას - 20-30 ტუბერის ნიმუში. დაავადებული ფოთლებიდან, ყლორტებიდან, ტუბერებიდან და სხვა დაავადებული ორგანოდან ინფიცირებული ადგილის ამოჭრისას სასურველია, რომ სინჯში წარმოდგენილი იყოს ქსოვილის ჯანსაღი ნაწილიც.

ნიმუშების აღებიდან ლაბორატორიული ანალიზის ჩატარებამდე გარკვეული დროა საჭირო. აქედან გამომდინარე, აუცილებელია ნიმუშების შეფუთვის და შენახვის წესების დაცვა. თავდაპირველად აუცილებელია ნიმუშების კარგად გაშრობა ჰაერზე, სიგრილეში. შემდეგ ნიმუშები თავსდება ცალფა ქაღალდის კონვერტებში, შემდეგ უფრო დიდი ზომის ქაღალდის პარკში და ბოლოს, პოლიეთილენის პარკში ან პლასტიკურ კონტეინერში ტრანსპორტორებისას ნიმუშების დაზიანებისგან დასაცავად. კონვერტზე კეთდება წარწერა: მასპინძელი მცენარე და ჯიში, ნიმუშის აღების ადგილი და თარიღი, მცენარის განვითარების ფაზა, სიმპტომის ტიპი ან შესაძლო დაავადება, დაავადების გავრცელების და განვითარების ინტენსივობა, ფერმერის გვარი და მისამართი (თუ ეს შესაძლებელია). გარდა ამისა სასარგებლოა

ისეთი ინფორმაციის შეგროვება როგორიცაა: გარემო პირობები (ტემპერატურა, ტენინობა), ნიადაგის ტიპი, წინამორბედი კულტურა, დრენაჟი, პესტიციდების მოხმარება, გამოკვება (Чумаков и др. 1974).

აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ კონკრეტული ტიპის ნიმუშის შენახვისას აუცილებელია სპეციფიკური დეტალების გათვალისწინება (ცხრილი 1).

ცხრილი 1. **დაავადების ნიმუშების შენახვის წესი**

ნიმუშის სახე	შენახვის წესი
მთლიანი მცენარე	შეფუთეთ ფესვი პოლიეთილენის პარკში ისე, რომ პარკი შემოახვიოთ ირგვლივ ღეროზე ფესვის ყელთან და მიამაგრეთ, ფოთლებს შემოახვიეთ მშრალი ქაღალდის ხაოიანი პირსახოცი და მთლიანი მცენარე მოათავსეთ უფრო დიდ პოლიეთილენის ჩანთაში და დალუქეთ. ბოლოს, ნიმუში მოათავსეთ მუყაოს ყუთში და გაუკეთეთ ეტიკეტი.
ფესვი	ფესვი მოათავსეთ პოლიეთილენის პარკში და შეუკარით თავი. შემდეგ ის ჩადეთ მყარ მუყაოს ან პლასტიკურ ყუთში და ზემოდან გადააკარით ეტიკეტი. სასურველია ნიმუში გრილ და ნოტიო ადგილას შეინახოთ ლაბორატორიაში მიტანამდე.
მცენარის მთავარი ღერო (შტამბი)	მოათავსეთ პოლიეთილენის პარკში და შეუკარით თავი.

ნაყოფები, ყვავილები, კვირტები, ყლორტები, ტოტები (ხილი, ბოსტნეული)	ნიმუში შეახვიეთ მხოლოდ მშრალი გაზეთის, საშრობ ან ფილტრის ქაღალდში(არ გამოიყენოთ პოლიეთილენის პარკი), შემდეგ ის ჩადეთ უფრო დიდ ქაღალდის კონვერტში ან პოლიეთილენის პარკში, მაგრამ ერთ ადგილას პარკი გახვრიტეთ, რათა ჰაერის მოძრაობის საშუალება იყოს და ბოლოს, შეფუთული ნიმუში მოათავსეთ მყარ კონტეინერში ლაბორატორიაში გასაგზავნად.
ტუბერები, ბოლქვები	შეახვიეთ ნებისმიერ მშრალ, საშრობ ქაღალდში (არ გამოიყენოთ პოლიეთილენის პარკი), შემდეგ უფრო დიდ ქაღალდის პარკში. უმჯობესია ცალკეული საანალიზო ტუბერის თუ ბოლქვის ცალ-ცალკე შეფუთვა.
ფოთლები	ნიმუში გააშრეთ 3 დღეს ჰაერზე ჩრდილში. ფოთლები მოათავსეთ ფილტრის ან ნებისმიერ მშრალ ქაღალდში და დაპრესეთ სპეციალურ მოწყობილობაში ან უფრო სქელი ქაღალდისგან დამზადებულ მეორე სტერილურ პაკეტში. პაკეტებს შორის მჭიდროდ მოათავსეთ სქელი მუყაოს ფირფიტები. ამ სახით ინახება ნიმუშები კვლევის დაწყებამდე. ცალკეულ ნიმუშს გაუკეთეთ წარწერა.
ნიადაგი	მოათავსეთ პოლიეთილენის პარკში და შეუკარით თავი. შემდეგ ნიმუში ჩადეთ პლასტიკურ კონტეინერში და ზემოდან გადააკარით ეტიკეტი.

ნიმუშების შეგროვებისას უნდა შეივსოს სპეციალური ფორმა, რომელშიც მითითებული უნდა იყოს ნიმუშის რეგისტრაციის ნომერი, მასპინძელი მცენარე და ჯიში, ნიმუშის აღების ადგილი და თარიღი, მცენარის განვითარების ფაზა, შესაძლო დაავადება, ნიმუშის შემგროვებლის გვარი. ლაბორატორიაში ნიმუშის მიტანისას მას თან უნდა ახლდეს ზემოთ აღნიშნული ფორმა. ლაბორატორიაში საანალიზოდ შესული ნიმუში უნდა აღირიცხოს სპეციალურ რეგისტრაციის ჟურნალში, სადაც გადმოაქვთ ნიმუშის აღრიცხვის ფორმაში წარმოდგენილი ინფორმაცია და მას ემატება გრაფა – ინფიცირებული ნიმუშების უტილიზაციის ხერხი (ცხრილი 2).

ცხრილი 2. დაავადების ნიმუშების რეგისტრაციის ჟურნალი

№	ნიმუშის რეგისტრაციის №	მასპინძელი-მცენარე	ნიმუშის აღების ადგილი	ნიმუშის აღების თარიღი	მცენ. განვით. ფაზა	შესაძლო დაავადება	შემგროვებელი	ნარჩენების უტილიზაციის ხერხი

ნიმუშების ლაბორატორიული ანალიზი

კვლევის მიზნისა და გამოყენებული მეთოდების მიხედვით მიკროსკოპული სოკოების კულტივირება მიმდინარეობს შემდეგი ეტაპების შესაბამისად:

- საწყისი ნიმუშების მომზადება, საიდანაც უნდა გამოიყოს დაავადების გამომწვევი;
- დაავადების გამომწვევის სუფთა კულტურის გამოყოფა და განვითარება აგარიზებულ საკვებ არეზე;
- სუფთა კულტურის გადათესვა დიფერენცირებულ

სადიაგნოსტიკო საკვებ არეებზე სოკოების სახეობრივ დონეზე იდენტიფიცირების მიზნით;

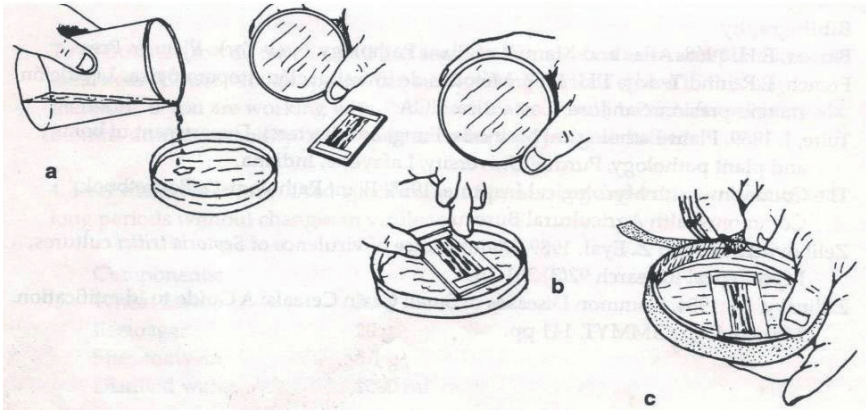
დაავადების გამომწვევის სუფთა კულტურის გამოყოფა. დაავადების დიაგნოსტიკის და შემდგომი შესწავლისათვის აუცილებელია მცენარის ინფიცირებული ნაწილიდან დაავადების გამომწვევი მიკროორგანიზმის გამოყოფა, კულტივირება და მისი იდენტიფიცირება. პათოგენთა ბიოლოგიური თავისებურებებიდან გამომდინარე, ობლიგატური სოკოვანი ორგანიზმების გამოყოფა ხდება ცოცხალ მცენარეებზე, ხოლო ფაკულტატური სოკოებისა — შესაბამის საკვებ არეებზე. სოკოს სუფთა კულტურების გამოყოფა და მათზე დაკვირვება ხდება in vitro პირობებში.

ამ მიზნით თავდაპირველად გამოიყენება ე.წ. „ნოტიო კამერის" მეთოდი (Gilchrist-Saavedra et al.,1997).

ნოტიო კამერის მომზადება. სარკვევი სოკოს სუფთა კულტურის მიღების წინაპირობა გახლავთ საპროფიტული მიკობიოტისაგან თავისუფალი პათოგენის მიცელიუმის ან სპორების არსებობა. სოკოს მიცელიუმის და სპორების წარმოქმნის ერთ-ერთი ყველაზე მარტივი მეთოდია ე.წ. ნოტიო კამერის მეთოდი, რომელიც ასტიმულირებს მიცელიუმის წარმოქმნას მომატებული ტენიანობის პირობებში. ნოტიო კამერა არის სწრაფი და პირდაპირი გზა პათოგენის სპორულაციის სტიმულაციისთვის ზოგიერთი დაავადების გამომწვევი პათოგენების იდენტიფიცირების პროცესში. განსაკუთრებით სასარგებლოა ნოტიო კამერის გამოყენება იმ მიკროორგანიზმების იდენტიფიკაციისას, რომლებიც მასპინძელ მცენარეზე იზრდებიან და ვითარდებიან ისე სწრაფად და კარგად, როგორც საპროფიტები.

როგორც წესი, ნოტიო კამერის გასაკეთებლად გამოიყენება ერთჯერადი პეტრის ან კოხის ჯამი. ჯამების ფსკერზე ამოფენილ შე-

საბამისი დიამეტრის მრგვალ სტერილურ ფილტრის ქაღალდს ატენიანებენ სტერილური წყლით (სურათი 1a). ამის შემდეგ, პატარა ნაწილებად დაჭრილი და ზედაპირულად დეზინფიცირებულ დაავადებულ ფოთლებს ან ღეროებს ათავსებენ პირდაპირ ჯამის ფსკერზე ან სტერილურ სასაგნე მინაზე ისე, რომ ცალკეული სეგმენტები არ ეხებოდნენ ერთმანეთს (სურათი 1b). ჯამს თავზე ახურავენ და ჯამის კიდეებს ლუქავენ პარაფინის სპეციალური ლენტით (სურათი 1c).



სურათი 1. როგორ მოვამზადოთ ნოტიო კამერა

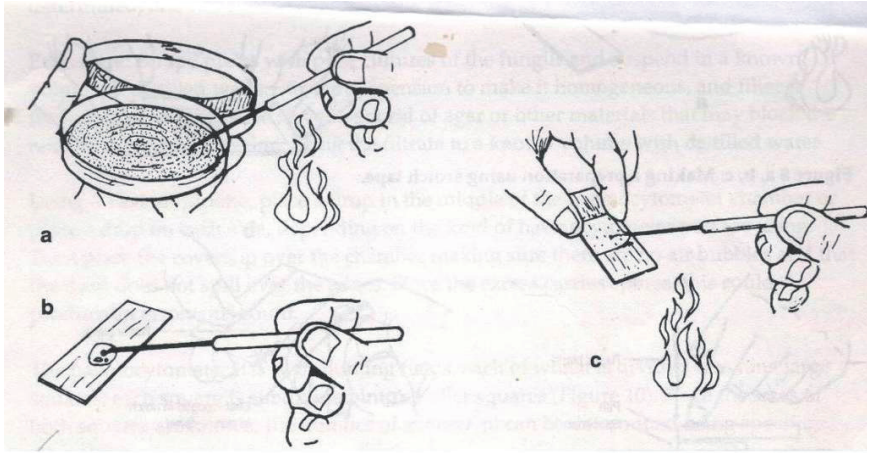
შემდეგ ჯამებს ათავსებენ თერმოსტატში 20-25^{0}C-ზე. მრავალჯერადი გამოყენების შემთხვევაში კი მინის პეტრის ჯამებს რამდენჯერმე რეცხავენ გამდინარე წყლით, (საჭიროების შემთხვევაში ირეცხება სარეცხი საშუალებებით), შემდეგ ჯამებს ახვევენ პერმანგანატის ქაღალდში და ასტერილებენ საშრობ კარადაში 1-2სთ-ის განმავლობაში 180-200^{0}C-ზე.

დაავადების ნიმუშებს ასტერილებენ სხვადასხვა სადეზინფექციო საშუალებებით (მაგალითად, 5-10% სოდის ჰიპოქლორიდში 30 -60 წმ -ით, 50-70% ეთილის სპირტში 1-5წთ; კალიუმის პერმანგანატის, სპილენძის სულფატის ხსნარში და ა.შ.). შემდეგ

აუცილებელია ნიმუშების მრავალჯერადი გავლება სტერილურ წყალში და გაშრობა საშრობი ქაღალდით. ნიმუშების სტერილიზაციის ხანგრძლივობა დამოკიდებული ნიმუშის ტიპზე. არის მოსაზრება, რომ ნიმუშების ნაწილი არ უნდა გასტერილდეს, რადგან ზოგიერთი პათოგენი ძალიან მგრძნობიარეა სტერილიზაციისადმი. ნოტიო კამერაში მოთავსებული ნიმუშის მიკროსკოპული კვლევისას სოკოს ნაყოფიანობას ან მიცელიუმს, გამოჩენისთანავე, გადათესავენ პეტრის ჯამში წინასწარ ჩამოსხმულ აგარიზებულ საკვებ არეზე და ატავსებენ თერმოსტატში. ობლიგატურ პარაზიტებს გადათესავენ ცოცხალ მცენარეებზე ან სპეციფიკურ არეზე.

დიდი ზომის ნიმუშების ანალიზისას ნოტიო კამერის სახით გამოიყენება პლასტმასის გაჭვირვალე ყუთები და პოლიეთილენის პარკები.

სინჯების მომზადება მიკროსკოპის ქვეშ ანალიზისათვის. დაავადების დიაგნოსტირების პროცესში ერთ-ერთი პირველი ნაბიჯია ინფიცირებული ქსოვილის ან იზოლირებული კულტურის უშუალოდ მიკროსკოპის ქვეშ დათვალიერება. სინჯის ასაღებად დაავადებული ნიმუშის ინფიცირების ზონიდან ან სოკოს გაზრდილი კოლონიიდან სტერილური ანატომიური ნემსით ფრთხილად ამოჭრიან პატარა ნაწილს და ათავსებენ სასაგნე მინაზე სტერილური წყლის წვეთში (სურათი 2a, 2b). შემდეგ აფარებენ საფარი მინას ისე, რომ ჰაერის ბუშტუკები გამოიდევნოს, რადგან ეს უკანსაკნელი ხელს უშლის მიკროსკოპის ქვეშ ნათელი სურათის მიღებას (სურათი 2c). ვინაიდან ზოგიერთი სოკოს სპორები და კონიდიები არ სველდება წყლით, წყალს ამატებენ ეთილის სპირტს 1:1 ან კონცენტრირებულ ძმარმჟავას.



სურათი 2. სინჯების მომზადება მიკროსკოპული ანალიზისთვის

შესაძლებელია, აგრეთვე, ნიმუშის (ფოთლები, ღერო, ფესვი და ა. შ.) თხელი ანათალის აღება სკალპელით. სასურველ პოზიციაში სინჯის მოსათავსებლად გამოიყენეთ ნემსი. ეს მეთოდი რეკომენდებულია კულტურის ზრდის პროცესში პათოგენის სტრუქტურების მიკროსკოპში დათვალიერებისათვის.

სოკოვანი დაავადების გამომწვევი მიკროორგანიზმის სუფთა კულტურის მიღება. სუფთა კულტურა არის ხელოვნურ საკვებ არეზე გაზრდილი ერთი სახეობის სოკოვანი მიკროორგანიზმის პოპულაცია. ფიტოპათოგენური მიკრომიცეტების გამოყოფა ხდება მცენარის სხვადასხვა ინფიცირებული ნაწილებიდან. არ არის მიზანშეწონილი ისეთი ნიმუშის გამოყენება, რომლის ქსოვილი ძალიან დაზიანებულია.

ფესვებიდან გამოყოფა. ახლად ამოთხრილი ფესვები ირეცხება ჯერ გამდინარე და შემდეგ სტერილური წყლით, შემდეგ იწურება რამდენიმე ფენა ფილტრის ქაღალდში, 1-3სმ სიგრძის ფესვის ნაწილები თავსდება პეტრის ჯამში და ბოლოს თერმოსტატში 26 °C-

ზე. სოკოს განვითარებაზე დაკვირვება ხდება 24-48 სთ შემდეგ და მომდევნო დღეებში. განვითარებული მიცელიუმი გადააქვთ საკვებ არეზე პეტრის ჯამში.

ფოთლებიდან გამოყოფა. ფოთლების ინფიცირებული ზონებიდან უნდა ამოიჭრას რამდენიმე პატარა 5-10 მმ^2 ფართობის სეგმენტები ისე, რომ სინჯს თან ახლდეს გარეგნულად ჯანსაღი ქსოვილის ნაწილიც. სეგმენტებს ათავსებენ სადეზინფექციო ხსნარში (მაგ., 3,5% ნატრიუმის ჰიპოქლორიტში) 1 წუთით. როცა სინჯები კარგად დასველდება, ისინი მორიგეობით გადააქვთ პინცეტით 3 მენზურაში, რომლებშიც დისტილირებული წყალია და კარგად ავლებენ. შემდეგ სეგმენტებს ათავსებენ სტერილურ ფილტრის ქაღალდში, აშრობენ და ბოლოს გადააქვთ საკვებ არეზე 3 ან 5 პეტრის ჯამში.

ღეროებიდან, ნაყოფებიდან, ტუბერებიდან და სხვა ზედაპირული ნაწილებიდან გამოყოფა. ამ შემთხვევაშიც შესაძლებელია ფოთლებიდან პათოგენის გამოსაყოფად აღწერილი ტექნიკის გამოყენება. თავდაპირველად აუცილებელია ნაყოფების, ძირხვენების, ტუბერების რეცხვა ჩვეულებრივი წყლით, მიწის მოცილება და ზედაპირული სტერილიზაცია. ღეროებიდან, ნაყოფებიდან უფრო ადვილია ინფექციის საწყისის გამოყოფა, რადგან პათოგენი იჭრება რა უფრო ღრმად ქსოვილში, შლის მას, იწვევს ქსოვილის გამოცალკავებას ჯანსაღი ნაწილიდან და შედეგად ინფიცირებული ზონა ძალიან ღიაა. ინფიცირებული და ჯანსაღი ნაწილის საზღვარზე სტერილური სკალპელით ჭრიან პატარა სეგმენტს და ათავსებენ მას პირდაპირ საკვებ არეზე.

მარცვლებიდან და თესლებიდან გამოყოფა. ამ შემთხვევაშიც შეიძლება იქნას გამოყენებული ზემოთ აღწერილი მეთოდოლოგია. თუ

თვლიან, რომ თესლების შიგნით ინფექციაა, მხოლოდ ამ შემთხვევაში ხდება მათი დეზინფიცირება. ზედაპირული დეზინფექციის შემდეგ თესლებს ან მარცვლებს ათავსებენ ფილტრის ქაღალდზე პეტრის ჯამში ერთმანეთისგან 0,5-1 სმ-ის დაშორებით. ერთი გამოსაკვლევი პარტიიდან საანალიზოდ იღებენ 100-1000 მარცვალს. ჯამებს ათავსებენ თერმოსტატში და რამდენიმედღიანი ინკუბაციის შემდეგ, სოკოს ნაყოფიანობას, გამოჩენისთანავე, გადაიტანენ საკვებ არეზე.

სოკოს გამოყოფა ნიადაგიდან. 1. როსი-ხოლოდნის მეთოდი – სტერილურ სასაგნე მინას მჭიდროდ ათავსებენ ნიადაგზე. რამდენიმე დღის შემდეგ მინას ამოიღებენ, გაფერთხავენ და ათავსებენ მიწიანი ზედაპირით აგარიზებულ საკვებ არეზე. გაზრდილ მიცელიუმს აკვირდებიან მიკროსკოპში მცირე გადიდებაზე და გარკვეული საინკუბაციო პერიოდის შემდეგ გაზრდილ კოლონიას გადაიტანენ სუფთა საკვებ არეზე.

2. ნიადაგის სუსპენზიის განზავების მეთოდი – ხშირად ამ შემთხვევაში მიმართავენ შემდეგნაირ განზავებას: 1:10 (10გრ ნიადაგი-10მლ წყალზე), 1:100, 1:1000. დიდი განზავების სუსპენზიას ჩათესავენ აგარის საკვებ არეზე, ხოლო სოკოს მიცელიუმს ან ნაყოფიანობას, გამოჩენისთანავე, გადათესავენ აგარიზებულ სხვა საკვებ არეზე პეტრის ჯამში ან სინჯარაში დაცერებულ არეზე.

იმისათვის, რომ თავიდან იქნას აცილებული ბაქტერიების განვითარება, სოკოს გამოყოფა და შემდგომი კულტივირება ხდება საკვებ არეზე, რომელშიც დამატებულია ანტიბაქტერიული მოქმედების ფართო სპექტრის ანტიბიოტიკი (მაგალითად, კანამიცინი) 1-2გ/1ლ კონცენტრაციით.

ზოგიერთ შემთხვევაში ასეც იქცევიან: პეტრის ჯამის ფსკერზე მოთავსებულ ფილტრის ქაღალდის დისკს ასველებენ სტერილური წყლით. შემდეგ ჯამის ფსკერზე მოათავსებულ სასაგნე მინაზე დებენ

ნიმუშის სეგმენტებს. ჯამს ახურავენ სახურავს და ლუქავენ პარაფინის ლენტით, რათა შენარჩუნდეს ტენიანობა. იმის გამო, რომ ბევრი სოკოვანი ორგანიზმი არ ვითარდება სინათლის და სიბნელის ფაზის მონაცვლეობის გარეშე, ზოგიერთ შემთხვევაში საჭიროა პეტრის ჯამი მოათავსოთ მონაცვლეობით ჯერ სინათლეზე 10 სთ-ის მანძილზე და შემდეგ 14 სთ-ს – სიბნელის პირობებში 18-22^{0}C-ზე. 24, 48, 72 საათის ინკუბაციის შემდეგ ჯამს ხსნიან, სასაგნე მინაზე არსებულ ნიმუშს აკვირდებიან სინათლის მიკროსკოპის მცირე გადიდების ქვეშ. ჯამში ლაქაზე განვითარებული სტრუქტურების მცირე ნაწილი შეიძლება აიღოთ ნემსით და მოათავსოთ ახალ სასაგნე მინაზე წყლის წვეთში და დააფაროთ საფარი მინა. მიკროსკოპში შეიძლება დაინახოთ მიცელიუმი, კონიდია, კონიდიოფორები და სხვა სოკოვანი სტრუქტურები. თუ ეს სტრუქტურები არ არის მკაფიოდ ხილული, დაახურეთ ჯამს, დალუქეთ კვლავ ისე, რომ ტენიანობა შენარჩუნებული იქნას და გააგრძელეთ დაკვირვება (Дудка и др. 1982). ჩახატეთ აღმოჩენილი სტრუქტურები ან გადაიღეთ სურათი.

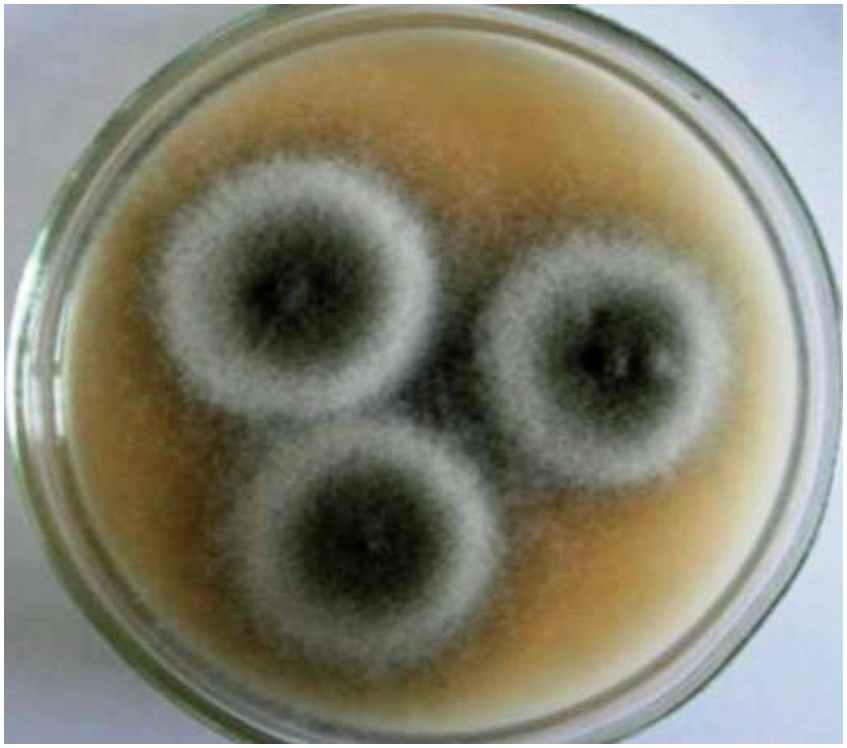
სუფთა კულტურის მიღების შემდეგ იმუნოლოგიური, პოპულაციური და სხვა კვლევების განხორციელების მიზნით შეიძლება პათოგენის ზრდის, მორფოგენეზის და სპორათწარმოქმნის თავისებურებების შესწავლა, ნაყოფსხეულებისა და ნაყოფიანობის ტიპების დადგენა, გარემოს ფაქტორებთან (ტემპერატურა, ტენი სინათლე) პათოგენთა დამოკიდებულების და სოკოების მეტაბოლიზმის პროდუქტების (ტოქსინები, ვიტამინები, ფერმენტები) განსაზღვრა.

კულტურის გასუფთავება. კონკრეტული სოკოვანი მიკროორგანიზმის კვლევისას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება კულტურის გასუფთავებას, რომელიც შეიძლება განხორციელდეს რამდენიმე გზით:

1.სოკოს ნაყოფიანობის მცირე რაოდენობას იღებენ მარყუჟით და საკვებ არეზე რამდენიმე შტრიხს მოავლებენ, რაც უფრო

გრძელი იქნება შტრიხები, მით უფრო მეტად დაშორებული და განცალკევებული კოლონიები განვითარდება (სურათი 3).

2. სინჯარაში, რომელშიც 10მლ სტერილური წყალია მარყუჟით შეიტანენ სპორებიან ინოკულუმს და განაზავებენ. შემდეგ სტერილური პიპეტით 1მლ სუსპენზიას გადაიტანენ მეორე სინჯარაში, სადაც 9 მლ წყალია და ამ პროცედურას რამდენჯერმე იმეორებენ საჭიროებიდან გამომდინარე. ბოლო განზავებიდან კი 1მლ სუსპენზია გადააქვთ საკვებ აგარზე.



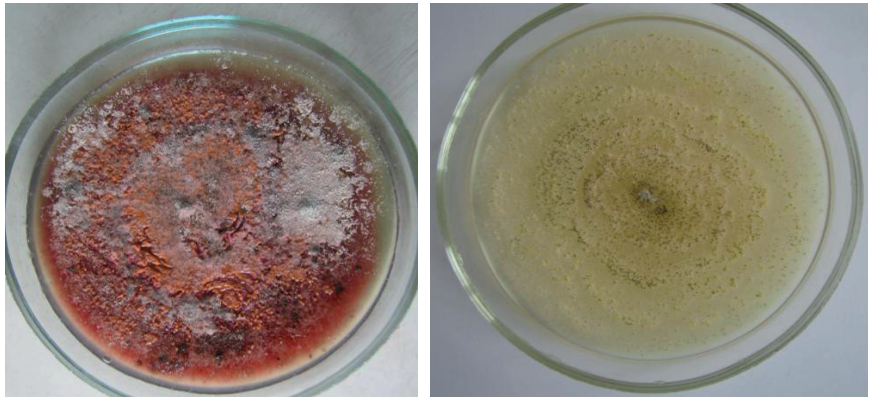
სურათი 3. სოკოვანი პათოგენის სუფთა კულტურა

დაავადების გამომწვევის იდენტიფიკაცია. გამოყოფილი მიკროორგანიზმის იდენტიფიცირების მიზნით პათოგენობის ტესტი

ტარდება კოხის პოსტულატების (Koch, 1893) შესაბამისად. ჯანსაღ მცენარეებს 1-3 ფოთლის ფაზაში ხელოვნურად აავადებენ სარკვევი მიკროორგანიზმის სუფთა კულტურის სუსპენზიის შესხურებით და ათავსებენ ნოტიო კამერაში 24 - 48 საათის განმავლობაში. ინოკულაციიდან 7-15 დღის შემდეგ მცენარეზე მიღებული სიმპტომები იმ დაავადებული მცენარის სიმპტომების იდენტური უნდა იყოს, საიდანაც თავდაპირველად იქნა გამოყოფილი პათოგენი. ამის შემდეგ, ინოკულირებული მცენარეებიდან დაავადების გამომწვევი თავიდან გამოიყოფა ანუ ხდება რეიზოლაცია და რეიზოლატის შედარება საწყის, ორიგინალურ პათოგენთან. მიკროორგანიზმის საბოლოო იდენტიფიცირებისთვის აუცილებელია პათოგენის საკვანძო მახასიათებლების, კერძოდ, მორფოლოგიურის (ნაყოფიანობის ტიპი, ნაყოფიანობის დიფერენციაციის ხარისხი, შეფერილობა, სიმაღლე და სიგანე, სპორების აგებულება, განლაგება, შეფერილობა, წარმოშობის გზები, სპორას კედლის ფორმა და სტრუქტურა) და კულტურალურის (კოლონიების აგებულება, შეფერილობა, მიცელიუმის და მისი სახეცვლილებების აგებულება, შეფერილობა, ზომა) აღწერა სარკვევებისა და მონაცემთა ბიბლიოთეკების გამოყენებით და პარალელურად მათი შედარება საერთაშორისო კოლექციებიდან მოპოვებულ სტანდარტულ, ტიპიურ შტამებთან.

მონოსპოროვანი კულტურების მეთოდი. სხვადასხვა გეოგრაფიული წარმოშობის პოპულაციების ანალიზისას და სხვა თეორიული კვლევებისას აუცილებელია ერთი სპორიდან მიღებული კულტურების ანუ მონოსპოროვანი კულტურების გამოყენება (სურათი 4). მონოსპოროვანი კულტურების მიღება შეიძლება შემდეგნაირად: სინჯარაში, რომელშიც სტერილური წყლია, მარყუჟით ათავსებენ სპორულირებული კულტურის მცირე ნაგლეჯს

და სინჯარას ანჯღრევენ. შემდეგ მისგან იღებენ 4-5 წვეთ სუსპენზიას და ათავსებენ სტერილურ სასაგნე მინაზე. სუსპენზიის მიკროსკოპული ანალიზის გზით ითვლიან სპორებს წვეთებში. სინჯარაში იქამდე ამატებენ წყალს, სანამ სუსპენზიის 1 წვეთში ერთი სპორა იქნება. ამის შემდეგ, სასურველი განზავების სუსპენზიის 3-4 წვეთი გადააქვთ პეტრის ჯამში აგარიზებულ საკვებ არეზე. წვეთები მნიშვნელოვნად უნდა იყოს დაშორებული ერთმანეთისგან. მიკროსკოპის საშუალებით ითვლიან სპორების რაოდენობას წვეთებში ჯამის ქვედა მხრიდან, რისთვისაც პეტრის ჯამს ფრთხილად გადააბრუნებენ. ერთ სპორიან წვეთებს მონიშნავენ მარკერით ჯამზე. ამის შემდეგ ერთი სპორადან მიღებულ კოლონიებს გადათესავენ სინჯარაში დახრილ აგარზე. ზოგჯერ ერთი წვეთის შემცველ სუსპენზიას გადაიტანენ სასაგნე მინაზე, შემდეგ მასში ათავსებენ საკვები არის მცირე ნაწილს და როცა საკვებ არეზე კულტურა გაიზრდება, მას გადათესავენ სინჯარაში დახრილ აგარზე.



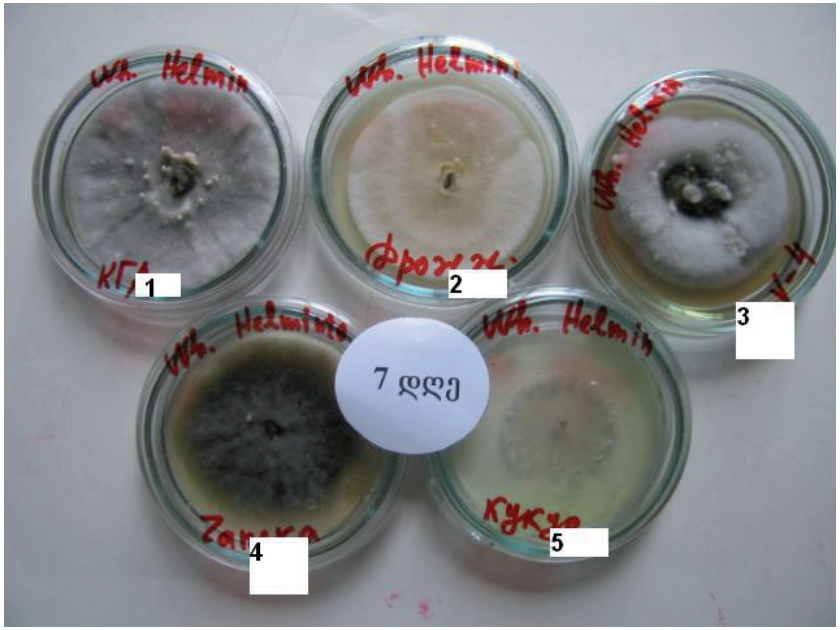
სურათი 4. მონოსპოროვანი სუფთა კულტურები

ობლიგატური სოკოვანი ორგანიზმების მონოსპოროვანი კულტურები მიიღება ცოცხალ მცენარეზე. მაგალითად, ხორბლის ღეროს ჟანგას გამომწვევის *P. graminis*-ის სუსტი სპოროვანი სუსპენზიით ხელოვნურად აავადებენ ხორბლის აღმონაცენს. ინოკულაციიდან რამდენიმე დღეში ინფიცირებული აღმონაცენის ფოთოლზე გაფანტული ურედინიების გამოჩენისთანავე, თითოეულ ფოთოლზე ტოვებენ მხოლოდ ერთ ურედინიას და ფოთოლს ათავსებენ მინის მილში იზოლაციისათვის. მომწიფების შემდეგ, თითოეული ურედინია ფრთხილად ლანცეტის მეშვეობით, ცალცალკე გადაიტანება „საათის შუშაზე“ 2-3 წვეთ წყალში. მიღებული სუსპენზიით ხდება ახალი ხორბლის აღმონაცენის დასენიანება და შესაბამისად, *P. graminis*-ის მონოსპოროვანი კულტურის მიღება.

პათოგენთა მორფოლოგიური და კულტურალური თვისებების შესწავლა

იდენტიფიცირებული პათოგენის სუფთა კულტურიდან სტანდარტულ აგარიზებულ საკვებ არეზე გამოიყოფა მონოსპოროვანი იზოლატები (არა უმცირეს 100 სპორა ყოველი პათოგენისთვის). კულტურები ინკუბაციისთვის თავსდება ოპტიმალურ პირობებში (თერმოსტატში). ინკუბაციის მესამე დღიდან მიკროსკოპის მცირე გადიდების ქვეშ ყოველდღიურად ტარდება კულტურების კულტურალურ -მორფოლოგიური თვისებების ვიზუალური აღწერა ზრდის სიჩქარის, პიგმენტაციის, ტოპოგრაფიის, კოლონიის ფერის, სპორულირების უნარის და სპორების მორფოლოგიის მიხედვით. ამ მახასიათებლების შესწავლა ტარდება სხვადასხვა საკვებ არეზე (სურათი 5). მორფოლოგიური და კულტურალური თვისებების შესწავლით დგინდება კონკრეტული სახეობის პოპულაციის მრავალ-

ფეროვნება, განისაზღვრება ამა თუ იმ მორფოტიპის სიხშირე და ჰეტეროგენობის დონე.



სურათი 5. მორფოლოგიურ-კულტურალური თვისებები სხვადასხვა საკვებ არეზე

საკოლექციო შტამების სტაბილიზაცია. პათოგენთა სუფთა კულტურების სტაბილიზაცია აუცილებელია გენეტიკურად ერთგვაროვანი მასალის მისაღებად, რისთვისაც გამოიყენება მონოსპოროვანი/მონოკონიდიალური კულტურის მიღების მეთოდი. მონოსპოროვანი/მონოკონიდიალური კულტურის მისაღებად, როგორც საწყისი მასალა, გამოიყენება სოკოს სპორულირებადი იზოლატები. სუფთა კულტურა 7-14 დღის განმავლობაში საინკუბაციოდ თავსდება თერმოსტატში, მოცემული პათოგენისათვის შესაფერისი ტემპერატურული რეჟიმის პირობებში. სტანდარტულ აგარი-

ზებულ საკვებ არეებზე მათი 3-4-ჯერ თანმიმდევრული გადათესვისას (არა უმცირეს 100 პეტრის ჯამისა) მიიღება გენეტიკურად ერთგვაროვანი და სტაბილური მორფოლოგიურ-კულტურალური თვისებების მქონე კოლონიები, რის შემდგომაც შტამები გადაეცემა შესანახად.

პათოგენების შენახვა. სოკოვანი პათოგენების შენახვა ხდება როგორც ინფიცირებული ორგანოების სახით, ისე მათი სუფთა კულტურებით. პათოგენთა შენახვა მშრალი ინფიცირებული ფოთლების სახით პრობლემას წარმოადგენს იმიტომ, რომ პათოგენობისა და სპორულაციის უნარი შეიძლება შემცირდეს ან პათოგენი საერთოდ განადგურდეს. ამ პრობლემის გადასაჭრელად საჭიროა პათოგენთა კულტურების სუბკულტივირება მრავალჯერადი გადათესვის გზით, ხოლო პათოგენობის ამაღლება მიიღწევა კონტროლირებად პირობებში შენახული კულტურებით პატრონ მცენარის მიმღებიანი ჯიშების ხელოვნური ინოკულაციის შედეგად.

ფოთლებს, რომლებზეც განვითარებულია დაავადების სიმპტომები აშრობენ ოთახის ტემპერატურაზე 48-სთ განმავლობაში და ინახავენ 4^{0}C-ზე მაცივარში. იმ შემთხვევაში, როცა შეუძლებელია ნიმუშის გამოშრობა (წვნიანი ნაყოფები, ძირხვენები), ხდება მათი ფიქსაცია მაკონსერვებელი ნივთიერებების (70% სპირტი, 5% ფორმალინი, 1% სპილენძის სულფატი და სხვა) გამოყენებით. სხვადასხვა პათოგენებს განსხვავებული სიცოცხლისუნარიანობა აქვთ შენახვის დროს. მაგალითად, *Helminthosporium tritici-repentis* შეიძლება დარჩეს სიცოცხლისუნარიანი 6 თვის განმავლობაში მშრალი ფოთლების სახით, ხორბლის მურა ჟანგა კი - 1 წლის მანძილზე.

ასევე განსხვავებულია სხვადასხვა სოკოების კულტურების შენახვის ხანგრძლივობა. სუფთა კულტურების შესანარჩუნებლად

აუცილებელია მათი გადათესვა ახალ საკვებ არეზე წელიწადში 2-3-ჯერ. მაგალითად, *Cladosporium, Fusarium, Aspergilus* გვარის სოკოები უნდა გადაითესოს ყოველი 3 თვის შემდეგ. კარტოფილის ფიტოფტოროზის გამომწვევის *Phytophtora infestans* კულტურა კი მხოლოდ 3 კვირას ინარჩუნებს სიცოცხლისუნარიანობას.

კულტურის გადათესვისას ძირითადად გადააქვთ პათოგენის სპორები, ხოლო იმ ფორმების შემთხვევაში, რომლებიც სპორებს არ წარმოქმნიან, გადააქვთ პათოგენის მიცელიუმი კოლონიის კიდურა ზონიდან. გადათესვებს ატარებენ ორჯერადი განმეორებით, ხოლო ინახვენ ყოველი პათოგენის კულტურის 3 ეგზემპლარს. ხანგრძლივი დროით შენახვისას უმჯობესია შაქრებით ღარიბი სახამებლიანი და ცელულოზიანი საკვები არეების გამოყენება. ნახევრადსაპროფიტი სოკოების ნაწილი კარგად ინახება სტერილურ ბუნებრივ მასალაზე 4-5°C-ზე (მაგალითად, *Cytospora* გვარის სოკოები მასპინძელი მცენარის ტოტებზე).

უფრო ხანგრძლივი დროით სოკოს კულტურების შენახვა შეიძლება ლიოფილიზებული სახით (როცა ვაკუუმის ქვეშ ხდება სოკოს გაყინული სუსპენზიიდან წყლის მოშორება) და თხევადი აზოტის გამოყენებით.

ხანგრძლივი დროით სამუზეუმო მიკროორგანიზმების კოლექციაში შენახვის კარგი საშუალებაა ფიქსირებული პრეპარატი, რომლის მიზანია საკვლევე ობიექტში მიმდინარე სასიცოცხლო პროცესების შეწყვეტა და მიკროორგანიზმის უჯრედების ნაზი სტრუქტურის უცვლელად შენარჩუნება. ეს მიიღწევა ადუღებულ წყალში საკვლევი ობიექტის წამიერად მოთავსებით, 20-30 წუთის განმავლობაში ჰაერზე პრეპარატის გამოშრობით და ქიმიური ნივთიერებების (ეთილის სპირტი, ფორმარილიანი სპირტი, ფლემინგის ხსნარი და სხვა) გამოყენებით და სოკოს მიცელიუმის და კონიდიების ფიქსაციით (Smith & Onions, 1994).

საკვები არეები

დაავადებული ნიმუშებიდან ფაკულტატური საპროფიტი და ფაკულტატური პარაზიტი სოკოების გამოყოფა, პათოგენთა სუფთა კულტურების მიღება, შემდგომი გასუფთავება, მონოსპოროვანი კულტურების მიღება, ინოკულუმის დაგროვება და სოკოვანი დაავადებების გამომწვევთა სხვადასხვა ასპექტების შესწავლა ხდება სხვადასხვა ხელოვნურ საკვებ არეზე (Хохряков, 1979).

საკვები არეების ტიპები

საკვები არე არის ნიადაგი ერთი ან მეტი მიკროორგანიზმის გასაზრდელად. ის შეიძლება იყოს მყარი ან თხევადი. მათ შორის ერთი განსხვავებაა. მყარი ნიადაგი შეიცავს აგარს, მზადდება კოლბებში, პეტრის ჯამებში, სინჯარებში და გამოიყენება ბუნებრივი სუბსტრატიდან სოკოს სუფთა კულტურის გამოსაყოფად და შესანახად.

თხევადი არე ძირითადად გამოიყენება საკვები არეების შემადგენელ ნივთიერებებზე სოკოს მოთხოვნების ხარისხობრივი და რაოდენობრივი ასპექტების შესასწავლად, სოკოების და ბაქტერიების დაგროვებისათვის, მათი ფიზიოლოგიური მდგომარეობის განსაზღვრისათვის. შემადგენლობის მიხედვით თხევადი არეები შეიძლება იყოს არასაკვები არე და საკვები ხსნარი.

საკვები ხსნარები თავის მხრივ იყოფა ბუნებრივ, სინთეზურ და ნახევრად სინთეზურ არეებად. ბუნებრივი ხსნარები შეიცავს მხოლოდ მცენარეული ქსოვილს (ფოთოლი, ფესვი, მარცვალი) მცირე ნაჭრების ან დაქუცმაცებული, ფხვნილის სახით.

ნახევრად სითეზური არე შეიცავს როგორც ნატურალურ (ცხოველური ან მცენარეულ ექსტრაქტებს), ისე სინთეზურ კომ-

პონენტებს.

სინთეზური არეები მზადდება სპეციალური ექსპერიმენტებისათვის და შეიცავს სხვადასხვა ქიმიურ ნივთიერებებს. ზოგიერთი ნახევრად სინთეზური ან სინთეზური არის დეჰიდრატაცია ხდება მათგან წყლის მოშორებით ან მათზე წყლის დამატებით. ამ დროს გამოიყენება მხოლოდ დისტილირებული წყალი.

მოცემული სოკოვანი მიკროორგანიზმის მოთხოვნილებისა და კვლევის მიზნიდან გამომდინარე ხდება კონკრეტული ტიპის საკვები სუბსტრატის შერჩევა. შესაფერისი საკვები არის შერჩევას დიდი მნიშველობა აქვს, რადგან მასზე იქნება დამოკიდებული პათოგენის ინფექციურობა და ინოკულუმის წარმოების ხარისხი. მაგალითად, დაავადების გამომწვევის მიერ გამოყოფილი ტოქსიკური ნივთირებებისადმი მცენარეთა იმუნიტეტის შესაფასებლად და ამ პათოგენის ზრდა-განვითარებაზე ტოქსინების ზეგავლენის შესასწავლად აუცილებელია უხვი სპორულაცია.

სპეციფიკური არეების შერჩევა ხდება ექპერიმენტის მიმდინარეობის დროს. სოკოვან ორგანიზმს თესავენ ერთდროულად რამდენიმე განსხვავებულ არეზე პეტრის ჯამებზე და ამყოფებენ პათოგენის განვითარებისთვის საჭირო ოპტიმალურ ტემპერატურულ პირობებში. სოკოს ზრდა-განვითარებაზე დაკვირვება გრძელდება 12-15 დღე – ღამე და საბოლოოდ ამოარჩევენ შესაფერის საკვებ არეს. სტანდარტული სინთეზური არეების გამოყენებისას შეიძლება მათი შემადგენლობის შეცვლა სხვადახვა ქიმიური კომპონენტების დამატებით ან გამოკლებით.

პათოგენური სოკოების სისტემატიკური ჯგუფების განსაზღვრისას მრავალი მკვლევარის მიერ შერჩეული იქნა ბუნებრივი საკვები არეები და დადგენილი იქნა მათი ქიმიური შემადგენლობა. მაგალითად, დად-

გინდა, რომ *Fusarium* გვარის სოკოები კარგად იზრდება ბრინჯის ნახარშზე; *Piricularia* გვარის სოკოები უხვ სპორულაციას იძლევიან აგარის, მარცვლოვანთა თესლების ან სტაფილოს ნახარშის არეზე;

საკვები არეების მომზადებისას მხედველობაშია მისაღები შემდეგი გარემოებები:

1. სოკოები, როგორც წესი, იზრდება ნახშირწყლებით მდიდარ საკვებ არეებზე, მაგრამ მათი დიდი ხნის განმავლობაში გამოყენებისას შესაძლებელია სოკოვანი მიკროორგანიზმების სპორულაციის შეჩერება.

2. სოკოების უმრავლესობისთვის უმჯობესია სუსტი მჟავე რეაქციის არე (pH 6,0-6,5),

3. აგარი უნდა გაიხსნას კონკრეტული საკვები არისათვის მოცემული ნორმის წყლის ნახევარ მოცულობაში 1-2 სთ-ის განმავლობაში, ხოლო საკვები ნივთიერებები – დანარჩენ ნახევარში, ამის შემდეგ კომპონენტებს ერთმანეთს შეურევენ.

4. პეპტონის გამოყენება შესაძლოა საერთოდ გამოირიცხოს სოკოების კვლევისას

5. ზოგჯერ უმჯობესია გადადუღებული წლის გამოყენება, ვიდრე დისტილირებულის, რადგან პირველი სასარგებლო მიკროელემენტებს შეიცავს. თუმცა *Phytophthora* გვარის სოკოებისთვის უკეთესია დისტილირებული წყლის გამოყენება.

6. მცენარეული მასალის შემცველი არეების (მაგალითად, კარტოფილის აგარი ან კარტოფილი-დექტროზა-აგარი) მომზადებისას თავდაპირველად მცენარეული მასალისგან აკეთებენ გამონაწვლილს დაბალ ან მაღალ ტემპერატურაზე.

7. ტოქსინებისა და ფერმენტების შესწავლისას გამოიყენება თხევადი საკვები არეები.

ცალკეული სოკოების თუ სოკოების ჯგუფების შესაფერისი მყარი საკვები არეების შემადგენლობა მოცემულია ცხრილში 3.

ცხრილი 3. ფიტოპათოგენური სოკოვანი მიკროორგანიზმების საკვები არეების შემადგენლობა

საკვები არის დასახელება	კომპონენტები (გრ) 1 ლ წყალზე	სოკოების ჯგუფი
აგარის არე	აგარ-აგარი (15-20)	სოკოების უმრავლესობისთვის
მარცვლოვნების არე	სიმინდი (30), აგარ-აგარი (20)	*Phytophthora, Pytilium*
კარტოფილ-გლუკოზის აგარი	კარტოფილი (200), გლოკოზა (20), აგარი (20)	სოკოების სახეობების უმრავლესობა
კარტოფილ-საქაროზის აგარი	1000 მლ კარტოფილის ექსტრაქტი (1800გრ კარტოფილი, 4500 მლ წყალი,საქაროზა (40), აგარი (40)	*Venturia, Fusarium Monilia, Botrytis*
კარტოფილ-დექსტროზის აგარი	კარტოფილი (200), დექსტროზა (20—50), აგარი (20)	სოკოების სახეობების უმრავლესობა
კარტოფილის აგარი	კარტოფილი (200), აგარი (20)	*Fusarium, Phytophthora*
ალაო-პეპტონის აგარი	ალაოს ექსტრაქტი (20), პეპტონი (10), ლიმონმჟავა (0,5), აგარი (20)	ნიადაგის სოკოები, თესლის პარაზიტები

პეტრის მინერალური ხსნარი	კალციუმის ნიტრატი (0,40), მაგნიუმის სულფატი (0,15), კალიუმის ფოსფატი (0,15), კალიუმის ქლორიდი(0,06)	*Phytophthora* (სპორანგიების მისაღებად)
შვრიის აგარი	შვრია (100) ან შვრიის ფანტელი(150), აგარი (20)	*Clasterosporium, Fusarium*
ჩაპეკის სინთეზური აგარი	მაგნიუმის სულფატი (0,5), უწყლო კალიუმის ფოსფატი (1,0), კალიუმის ქლორიდი((0,5), რკინის სულფატი (0,01), ნატრიუმის ნიტრატი (2,0), დექსტროზა (30), აგარი (20), დისტილირებული წყალი	ნიადაგის პათოგენები, მერქნის დამშლელი პარაზიტები
ბარნესის არე	ფოსფორმჟავა კალიუმი (1), აზოტმჟავა ამონიუმი (1), აზოტმჟავა კალიუმი (1), გლუკოზა (1), აგარი (20)	ჩანთიანი სოკოები (ნაყოფსხეულების მისაღებად)
ლუდის ბადაგის აგარი	7%- ლუდის ალაო(1000) სვიას გარეშე წყლის მაგივრად და აგარი (20)	ფიტოპათოგენთა უმრავლესობა

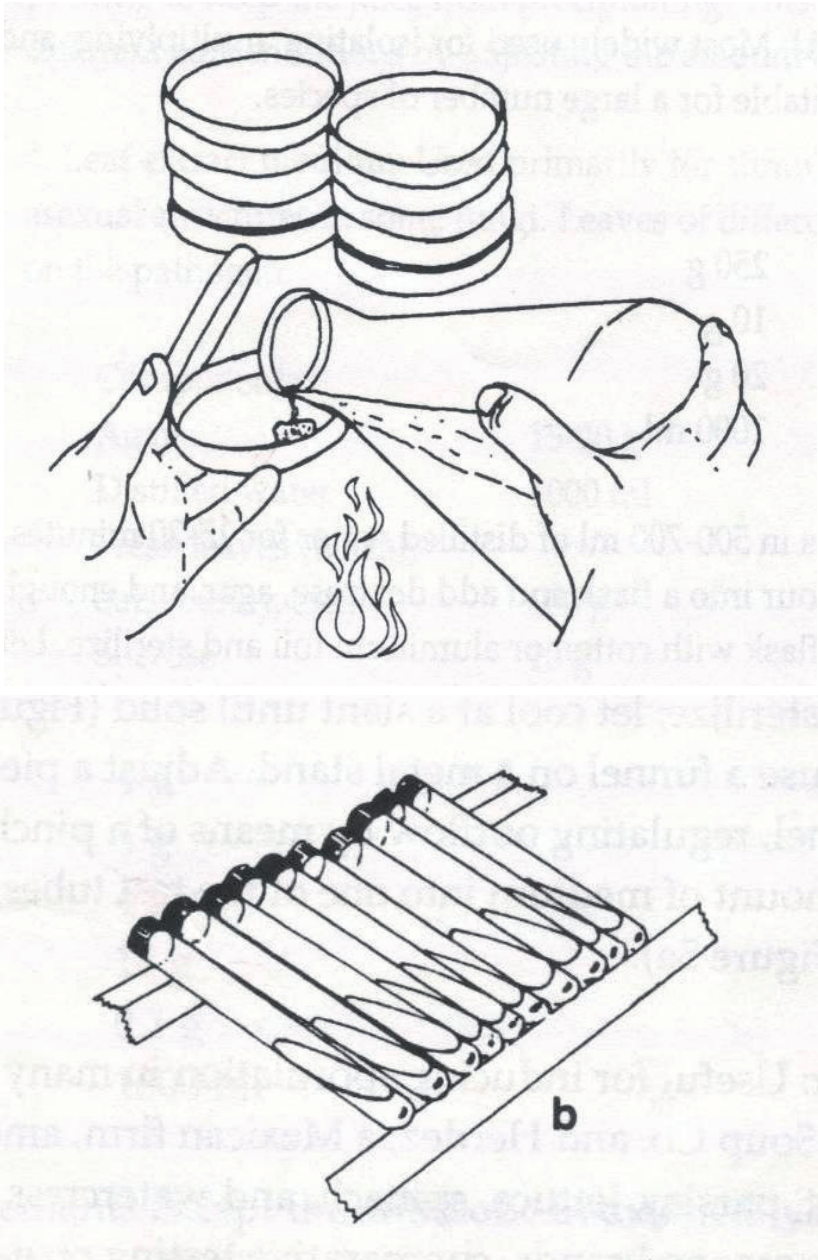
მნიშვნელოვანი ფაქტორია აგრეთვე pH -ის დონე საკვებ არეში. სოკოებისათვის pH მერყეობს 4-6.5 ფარგლებში.

რიგი ფიზიკური ფაქტორები (აერაცია, სინათლე, ტენიანობა, ტემპერატურა) გავლენას ახდენს პათოგენის ზრდაზე და

სპორულაციაზე. ამ ფაქტორების მინიმალური და მაქსიმალური მაჩვენებლები ან ოპტიმალური ფარგლები, პათოგენის ზრდა-განვითარება და სპორულაცია დამოკიდებულია შესასწავლ ობიექტზე. სპორულაცია, ჩვეულებრივ, მოითხოვს ისეთ პირობებს, რომელიც არახელსაყრელია ვეგეტატიური ზრდისათვის.

საკვები არის მომზადება. საკვები არის მომზადების წინ აუცილებელია ყურადღება მიაქციოთ რიგ ფაქტორებს. კერძოდ, ოთახი, სადაც მზადდება არეები, უნდა იყოს დეზინფიცირებული (ოთახის კედლები, იატაკი, ჭერი, უნდა გაირეცხოს 2%-იანი ქლორამინის წლიანი ხსნარით ან სხვა მადეზინფიცირებელი საშუალებით), მრავალჯერადი მოხმარების კოლბები სტერილიზაციის წინ უნდა იყოს დაფარული ფოლგით. სტერილიზაციის შემდეგ ბოქსში შეტანამდე არ უნდა მოცილდეს საფარი.

საკვები არე გასაცივებლად უნდა მოთავსდეს წყლის აბაზანაში 46 ^{0} C -ზე 30 წთ-ს. სპეციალური ხელსაწყოს უქონლობის შემთხვევაში, საკვები არე უნდა დატოვოთ ოთახის ტემპერატურაზე გასაგრილებლად. ამ შემთხვევაში გაგრილებას უფრო მეტი დრო დასჭირდება. თუ საკვები არე ოდნავ თბილია, ის მზად არის ლაბორატორიულ ჭურჭელში ჩამოსასხმელად. საკვები არე უნდა ჩამოისხას გამოყენებამდე 24-48 საათით ადრე, რათა პეტრის ჯამებში წარმოქმნილი კონდენსატი გამოშრეს. კონტამინაციის თავიდან ასაცილებლად კოლბიდან საკვები არის ჩამოსხმისას ფართოდ არ უნდა ახადოთ სახურავი პეტრის ჯამს და უნდა შეარჩიოთ მინიმალური მანძილი კოლბასა და ჯამს შორის. სინჯარებს, როგორც წესი, აცივებენ დახრილ მდგომარეობაში, რათა შექმნან უფრო მეტი ფართობი პათოგენის ზრდისათვის (სურ. 6). პეტრის ჯამებში ან სინჯარებში ჩამოსხმული საკვები არე უნდა მოთავსდეს სტერილურ კამერაში.



სურათი 6. საკვები არეების ჩამოსხმა

როცა სინჯარები ან სხვა ტიპის კონტეინერები მზად არის გამოსაყენებლად, საკვები არის ჰომოგენურობის მისაღწევად შეიძლება მათი გაცხელება.

წარმოგიდგენთ რამდენიმე საკვები არის მომზადების წესს:

წყალი-აგარი: უფრო ხშირად გამოიყენება პათოგენის იზოლაციის, სპორულაციის და მონოსპოროვანი კულტურების მისაღებად. გახსენით 15-20 გრ აგარი 1 ლიტრ დისტილირებულ წყალში ნახევრად სავსე კოლბაში და გაასტერილეთ.

კარტოფილ-დექსტროზა ან გლუკოზა-აგარი: გამოიყენება სოკოების გამოყოფა-გამრავლება-შენახვის მიზნით. შესაფერისია ბევრი სახეობისათვის. მოხარშეთ 200-250 გრ. კარტოფილი 700 მლ დისტილირებულ წყალში 15-20 წთ. შემდეგ მარლაში გაწურული ნახარში გადაიტანეთ კოლბაში და დაამატეთ მას დექსტროზა ან გლუკოზა 10-20 გრ, აგარი 20 გრ. და შეავსეთ წყლით 1 ლიტრამდე. კოლბას დაახურეთ ბამბის საცობი, ფოლგა და გაასტერილეთ, შემდეგ გააგრილეთ და ჩამოასხით პეტრის ჯამებში.

V-8 აგარი. ბოსტნეულის აგარი განსაკუთრებით გამოიყენება, მაშინ როცა სპორულაციაა მისაღები. გამოიყენება მრავალი სოკოვანი მიკრორგანიზმის შემთხვევაში. V-8-ის წვენი ქარხნული წესით დამზადებულიც იყიდება და შეიცავს პომიდორს, ჭარხალს,

მომზადება: კოლბაში მოთავსებულ V-8 მზა წვენს (200 მლ) დაამატეთ 3 გრ კალციუმის კარბონატი, 15-20 გრ აგარი და 1 ლ წყალი. აურიეთ და გააცხელეთ. ჩამოსხმის წინ კარგად აურიეთ, გააგრილეთ და ჩამოასხით.

თუ მზა წვენი არ არის ხელმისაწვდომი, ბოსტნეულის წვენის

მომზადება შეიძლება შემდეგნაირად: ნედლი ბოსტნეულის ფოთლები (100 გრ) მოხარშეთ 20-30 წთ და გაწურეთ. მიღებული წვენი დაამატეთ 15-20გრ აგარს, დაამატეთ 1 ლიტრი დისტილირებული წყალი, აურიეთ, გაასტერილეთ და ჩამოასხით პეტრის ჯამებში ან სინჯარებში.

ალაო-აგარის საფუვრიანი არე – ხშირად გამოიყენება *Septoria tritici* -ს გამოსაყოფად.

ალაოს ექსტრაქტი – 4 გრ; საფუვრიანი ექსტრაქტი – 4 გრ; სტრეპტომიცინი 0,1 გრ. აგარი – 18 გრ. საქაროზა – 4 გრ. დისტილირებული წყალი 1 ლ. ყველა ინგრედიენტი სტრეპტომიცინის გარდა უნდა მოათავსოთ დისტილირებულ წყალში, კარგად აურიოთ და გაასტერილოთ 20 წთ. სანამ საკვებ არე თბილია, უნდა დაამატოთ ანტიბიოტიკი და შემდეგ ჩამოასხათ ჯამებში ან სინჯარებში.

სოკოების შესანახი საკვები არე. 6 თვეში ან წელიწადში ერთხელ უნდა მოხდეს სოკოვანი მიკროორგანიზმების გადათესვა პათოგენობის ცვალებადობის თავიდან ასაცილებლად. თუ შესაძლებელია უმჯობესია ზოგიერთ სოკოს შენახვა ბუნებრივ სუბსტრატზე (მაგალითად, *Pythium*-ის გვარის სოკოების – ხორბლის ფოთლებზე, *Fusarium*-ის გვარის და სხვა სოკოებისთვის საუკეთესოა ხორბლის თესლი). შენახვის პროცედურები ძალიან არის დამოკიდებული საკვლევ ობიექტზე.

სხვადასხვა სახეობის მარცვლოვნები გამოიყენება განსაზღვრული გვარის სოკოების შესანახად. ამ შემთხვევაში სოკო ინარჩუნებს სტაბილურობას და არ კარგავს ვირულენტობას ან სპორულაციის უნარს. ამისათვის მარცვლები უნდა მოათავსოთ 24 სთ-ით დისტილირებულ წყალში, შემდეგ გააშროთ და ჩაყაროთ

სინჯარებში ან კოლბებში, თავი დაუცოთ კოლბებს და გაასტერილოთ ავტოკლავში 2 სთ. 48-72 სთ-ით, შემდეგ მოათავსოთ ოთახის ტემპერატურაზე (20-22°C). ამის შემდეგ შეიძლება ხელოვნურად დაასენიანოთ თესლები პათოგენის სუფთა კულტურით და მოათავსოთ 7-10 დღით ინკუბატორში კარგი სპორულაციის მისაღებად. ინკუბაციის პერიოდში ყოველი 2 დღის შემდეგ უნდა ამოიღოთ კოლბები და შეანჯღრიოთ, რათა ხელი შეუწყოთ სოკოს ზრდას. შემდეგ კოლბები პლასტიკურ კონტეინერებში უნდა მოათავსოთ და შეინახოთ მაცივარში.

სტერილური ნიადაგი, როგორც საკვები არე. კოლბებში და სხვა კონტეინერებში მოთავსებული ტენიანი მიწა გაასტერილეთ 2 სთ-ის განმავლობაში 24 საათიანი ინტერვალით რამდენჯერმე. სტერილიზაციის შემდეგ ნიადაგი მზად არის სუფთა კულტურებით ინოკულაციისთვის.

სტერილური წყალი ფოთლის ნაწილებით, როგორც საკვები ნიადაგი, საუკეთესოა *Pythium*-ის გვარის სახეობებისათვის. 2 სმ სიგრძის 5-6 ფოთლიან ხორბლის აღმონაცენს აშრობენ ჰაერზე და შემდეგ აჩერებენ სინჯარაში 9 მლ დისტილირებულ წყალში. სინჯარას ახურავენ საცობს და ასტერილბენ ავტოკლავში. სოკოს კულტურა აგარის მცირე ნაწილით გადააქვთ სინჯარებში და ინკუბაციის მიზნით რამდენიმე დღე ტოვებენ ოთახის ტემპერატურაზე. ბოლოს ლუქავენ სინჯარებს პარაფინით და ინახავენ 4-5^{0}C-ზე. ასეთი იზოლატები ინახება 1 წელი ან ზოგჯერ მეტი დამატებითი გადათესვის გარეშე.

ფოთლების ექსტრაქტის არე გამოიყენება დიდი ხნით *Septoria tritici*-ს შესანახად ვირულენტობის ცვალებადობის გარეშე: ხორბ-

ლის ფოთლებს (30 გრ) აქუცმაცებენ ან აბლენდერებენ 1 ლ წყალთან ერთად, ფილტრავენ მარლაში, ამატებენ აგარს და ასტერილებენ 20 წუთს. როცა არე თბილია, ამატებენ სტრეპტომიცინს და ფრთხილად ურევენ ერთგვაროვანი მასის მიღებამდე. საკვები არე პეტრის ჯამში უნდა ჩამოასხათ იმდენი, რომ ფსკერი დაიფაროს. ჯამის შუა ნაწილში გადააქვთ *Septoria tritici* კოლონიები. რამდენიმე ჯამს ერთმანეთზე აწყობენ, ზემოდან აფარებენ ფოლგას და ინახავენ 20-25^0 C-ზე დაახლოებით 3 თვეს, სანამ კონდენსატი აორთქლდება საკვები არიდან. პიკნიდები მომწიფდება მესამე თვეს. ამგვარად მომზადებული კულტურები ინახება 3 წელზე მეტ ხანს 4-6^0 C -ზე.

მცენარეთა პათოლოგიის ლაბორატორიის ძირითადი მოთხოვნები

მცენარეთა პათოლოგიის ლაბორატორიაში მიმდინარეობს ფიტოპათოგენების გამოყოფა, მრავალჯერადი გადათესვა, პათოგენთა სხვადასხვა თვისების შესწავლა, პათოგენობის ტესტის ჩატარება, ინოკულუმის დაგროვება და სხვა. პათოგენებთან მუშაობისას აუცილებელია სისუფთავის, ბიოუსაფრთხოების და ბიოდაცულობის წესების დაცვა, რაც შეიძლება უზრუნველყოფილი იქნას ლაბორატორიის შესაბამისი აღჭურვილობითა, მოწყობით და გაწრთვნილი კადრებით.

ლაბორატორიის ძირითადი მოწყობილობებია: სტერილიზატორები, ავტოკლავი, საიზოლაციო კამერები, ინკუბატორები, მიკროსკოპები, წყლის აბაზანები, საშრობი კარადები და სხვა.

დეზინფიცირება და სტერილიზება

ლაბორატორიაში ბიოუსაფრთხოების დაცვისათვის განსაკუთ-

რებული მნიშვნელობა აქვს დეზინფექციის და სტერილიზაციის წესების დაცვას. იქიდან გამომდინარე, რომ შეუძლებელია ძლიერ დაბინძურებული საგნების სასწრაფოდ დეზინფიცირება ან სტერილიზება, დიდი მნიშვნელობა აქვს დეზინფიცირებამდე წინასწარი დამუშავების პრინციპების ცოდნას. დეკონტამინაციის პირობები ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში დამოკიდებულია ექსპერიმენტის სახეობაზე და გამოყენებულ ინფექციურ აგენტზე.

დეზინფიცირება არის ფიზიკური და ქიმიური საშუალებებით მიკროორგანიზმთა და არა მათი სპორების განადგურება, ხოლო სტერილიზება არის პროცესი, როცა კვდება ყველა კლასის მიკროორგანიზმი და მათი სპორები.

დეზინფიცირების და სტერილიზების დროს გამოიყენება სხვადასხვა საშუალებები.

ანტისეპტიკური ნივთიერებების გამოყენებისას მიკროორგანიზმის ზრდა-განვითარება შეჩერებულია, მაგრამ პათოგენი არ კვდება. ბაქტერიოციდული ქიმიური საშუალებები კი კლავს მიკროორგანიზმებს.

დეკონტამინაცია პროცესია, როცა ხდება მიკროორგანიზმთა ან საშიში ქიმიური/რადიაქტიური ნივთიერებების განადგურება.

ძალიან დიდი მნიშვნელობა აქვს ლაბორატორიაში სისუფთავის დაცვას დეზინფექციის ჩატარებამდე. რადგან ბევრი გერმიციდი ეფექტურია მხოლოდ წინასწარი წმენდის შემდეგ. ამისათვის აუცილებელია ლაბორატორიის ყოველდღიური დალაგება, მტვრისა და ლაქების მოცილება ლაბორატორიული ხელსაწყოებიდან და სხვადასხვა საგნებიდან. ამის მიღწევა შეიძლება ჯაგრისების, მტვერსასრუტის, მშრალი და სველი ჩვრის გამოყენებით.

ლაბორატორიული ოთახის, ავეჯის და აპარატურის დეკონტამინაციის მიზნით გამოიყენება ნატრიუმის ჰიპოქლორიტის ხსნარი, რომლის 1 ლიტრი შეიცავს 1 გ აქტიურ ქლორს. საუკეთე-

სო მადეზინფიცირებელი საშუალებაა წყალში განზავებული 70% ეთილის სპირტი. სპირტით შეიძლება ხელების, სამუშაო მაგიდის, ავეჯის, აპარატურის ზედაპირის, ბიოუსაფრთხოების კაბინეტის დამუშავება. სპირტის წყალხსნარი არ ტოვებს ნალექს დამუშავებულ ზედაპირზე.

სტერილიზება მაღალი ტემპერატურით. პათოგენთა დეკონტამინაციისათვის გამოიყენება სხვადასხვა ფიზიკური ხერხი, კერძოდ, მშრალი ორთქლი, როცა გასაუვნებელი მასალა თავსდება 160^0 C-ზე ან უფრო მაღალ ტემპერატურაზე 2-4 საათის განმავლობაში. გამოწვა და დაწვაც ასევე მშრალი ორთქლით დამუშავების ერთ-ერთი ფორმაა. განსაკუთრებით ეფექტურია ავტოკლავირებისას გამოყენებული სველი ორთქლი. სპეცტანსაცმლის და ინსტრუმენტების სტერილიზაციის მიზნით გამოიყენება აგრეთვე ხარშვა. გამოხარშული ინსტრუმენტები ისე უნდა იქნას შენახული, რომ გამოყენებამდე შენარჩუნდეს მათი სისუფთავე.

ავტოკლავირება ანუ წნევის ქვეშ ინტენსიური ორთქლის გამოყენება წარმოადგენს ლაბორატორიული მასალების სტერილიზების ყველაზე უფრო ეფექტურ და საიმედო საშუალებას.

სხვადასხვა მიზნით სტერილიზაციას სწორად ჩატვირთულ ავტოკლავში უზრუნველყოფს შემდეგი ციკლების მონაცვლეობა:

1. სასტერილიზაციო მასალის გაჩერება 134^0C-ზე 3 წთ-ის განმავლობაში
2. სასტერილიზაციო მასალის გაჩერება 126^0C-ზე 10 წთ-ის განმავლობაში
3. სასტერილიზაციო მასალის გაჩერება 121^0C-ზე 15 წთ-ის განმავლობაში
4. სასტერილიზაციო მასალის გაჩერება 115^0C-ზე 25 წთ-ის

განმავლობაში

ავტოკლავში მასალები მჭიდროდ არ უნდა ჩაიტვირთოს, რათა ორთქლმა ადვილად შეაღწიოს მასალებში და ჰაერი ადვილად გამოიდევნოს.

საიზოლაციო კამერა – ბიოუსაფრთხოების კაბინეტი იგივე ლამინარ ბოქსი, სადაც ხდება ნიმუშებიდან დაავადების გამომწვევი მიკროორგანიზმის გამოყოფა. ბიოუსაფრთხოების კაბინეტით სარგებლობისას აუცილებელია ბოქსში მუშაობის ყველა პროცედურის კარგად ცოდნა და სათანადო წესების დაცვა

ინკუბატორი – მოწყობილობაა, სადაც განათებისა და ტემპერატურის კომბინაციის ფართო სპექტრის პირობებში შეიძლება მრავალი ფიტოპათოგენის გამოზრდა.

მაცივრები გამოიყენება ინფიცირებული მცენარეული მასალის, სუფთა კულტურების, საკვები არეების რეაგენტების, მზა საკვები არეების და სხვათა შესანახად.

წყლის აბაზანა წარმოადგენს სათავსოს, რომელშიც წყალი მუდმივ ტემპერატურამდე ინახება. მას მრავალმხრივი გამოყენება აქვს. მაგ., მასში შეიძლება მოთავსდეს საკვები არე 45^0C-მდე გასაგრილებლად, სანამ პეტრის ჯამებში გადავიტანთ.

მიკროსკოპები გამოიყენება საწყისი ნიმუშების, მიკროსკოპული ნიმუშების დათვალიერებისას, პათოგენთა იდენტიფიცირების პროცესში და ა.შ.

გამოყენებული ლიტერატურა:

ლაბორატორიული ბიოუსაფრთხოების სახელმძღვანელო. 2004. ჯანმრთელობის მსოფლიო ორგანიზაცია, მე-3 გამოცემა, ჟენევა, 260გვ.

Agrios George N. 1997. Plant Pathology, fourth edition, Academic press, San Diego, California, USA, 635p.

Gilchrist –Saavedra L., Fuentes-Davila G. and Martinez-Cano C. 1997. Practical guide to the identification of selected diseases of wheat and barley. P. 64.

Koch, R. (1893). "Ueber den augenblicklichen Stand der bakteriologischen Choleradiagnose" [About the instantaneous state of the bacteriological diagnosis of cholera]. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* (in German) **14**: 319–38. doi:10.1007/BF02284324.

Smith, D. & Onions, A.H.S. 1994. The Preservation and Maintenance of Living Fungi, second edition CAB Bioscience UKCentre (Egham) Technical Handbooks 2: Wallingford, CAB INTERNATIONAL.

Дудка И.А., Вассер С.П., Элланская И.А. и др. 1982. Методы экспериментальной микологии. Киев: Наукова думка,. 552 с.

Хохряков М.К. 1979. Методические указания по экспериментальному изучению фитопатогенных грибов. Ленинград, ВИЗР,. – 78 с.

Чумаков А.Е., Минкевич И.И. , Власов Ю. И., Гаврилова Е.А. 1974. Основные методы фитопатологическых исследований. Москва. Колос,. 188с.