სსიპ „ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტი“
საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტი
ბიოლოგიის დეპარტამენტი

მაკა მურადაშვილი

საქართველოში გავრცელებული Ralstonia-ს გვარის ფიტოპატოგენური ბაქტერიების ბიომრავალფეროვნება და პათოგენური პოტენციალი

სპეციალობა - **მიკრობიოლოგია**

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად
წარმოდგენილი დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

ბათუმი
2016

სადისერტაციო ნაშრომი შესრულებულია ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის ბიოლოგიის დეპარტამენტში.

სამეცნიერო ხელმძღვანელები: **მარინე თედიაშვილი** - ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი; თბილისის გ. ელიავას სახ. ვირუსოლოგიის, მიკრობიოლოგიისა და ბაქტერიოფაგის ინსტიტუტის ასოცირებული პროფესორი;

გალინა მეფარიშვილი - ბიოლოგიის აკადემიური დოქტორი, ბსუ, ფიტოპატოლოგიისა და ბიმრავალფეროვნების ინსტიტუტის მთავარი მეცნიერი თანამშრომელი

რეცენზენტები: **ლეილა ახვლედიანი** - ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტი (ბსუ), ასოცირებული პროფესორი;

ზაურ ლომთათიძე - სსიპ სოხუმის სახ. უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერე-ბათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის პროფესორი, ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი;

რუსუდან ვადაჭკორია - ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,BAU ბათუმის სართაშორისო უნივერსიტეტის ასოც. პროფესორი;

თემელ გოკთურქი - ართვინის ჭოროხის უნივესიტეტის სატყეო დეპარტამენტის პროფე-სორი;

ს.გ. ნანაგულიანი - ერევანის სახელმწოფო უნივერსიტეტის ბოტანიკისა და მიკოლოგიის ფაკულტეტის გამგე, პროფესორი, ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი

სადისერტაციო ნაშრომის დაცვა შედგება 2017 წლის 18 თებერვალს, 13:00 საათზე, ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტის საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის სადისერტაციო საბჭოს სხდომაზე.

მისამართი: ბათუმი 6010, ნინოშვილის ქ. #35, უნივერსიტეტის მეორე კორპუსი, აუდიტორია # 328. სადისერტაციო ნაშრომის გაცნობა შესაძლებელია ბათუმის შოთა რუსთაველის სახელმწიფო უნივერსიტეტის ბიბლიოთეკაში.

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი, ასოცირებული პროფესორი **ნანი გვარიშვილი**.

ნაშრომის ზოგადი დახასიათება

თემის აქტუალობა: დღეს, მიმდინარე გლობალიზაციის პირობებში არსებობს დიდი საფრთხე იმისა, რომ, ზოგიერთი მაღალი მავნეობით გამორჩეული პათოგენის გავრცელებამ ფართო მასშტაბები მიიღოს და მოერგოს განსხვავებულ ეკოლოგიურ პირობებს მრავალ რეგიონში. ეს კი განსაკუთრებით საშიში იქნება განვითარებადი ქვეყნებისთვის, სადაც სასურსათო უსაფრთხოების გარანტიები ნაკლებად არის დაცული.

ზოგადად, სტრატეგიულ კულტურულ მცენარეთა დაავადებებთან ბრძოლა მსოფლიო მნიშვნელობის პრობლემაა, განსაკუთრებით როცა დაავადება მაშტაბურ ხასიათს იღებს და ქვეყანას მნიშვნელოვან ეკონომიკურ ზარალს აყენებს. ჩვენი ქვეყნისთვის მნიშვნელოვან კულტურებად ითვლება ძაღლყურძენისებრთა ოჯახის მცენარეები - კარტოფილი, პომიდორი, ბადრიჯანი და წიწაკა.

არსებული მონაცემებით, ძაღლყურძენისებრთა ოჯახის მცენარეების დაავადებებს შორის ერთ-ერთ განსაკუთრებით ეკონომიკურად მნიშვნელოვან დაავადებას წარმოადგენს ბაქტერიული სიდამპლე, რომლის გამომწვევია გრამ-უარყოფითი, ნიადაგის ბაქტერია - *Ralstonia solanacearum*. იგი აავადებს მცენარეთა სახეობების უჩვეულოდ ფართო სპექტრს და ყველაზე მეტად აზიანებს ეკონომიკურად მნიშვნელოვან კულტურებს, როგორიცაა: კარტოფილი, პომიდორი, თამბაქო. პათოგენი მცენარეს აინფიცირებს ფესვების გავლით, ახასიათებს ინტენსიური გამრავლება და ძლიერი ტროპიზმი მასპინძელი ორგანიზმის სპეციფიკური ქსოვილების მიმართ (Yao... 2006).

R. solanacearum ხასიათდება დიდი მრავალფეროვნებით. დაჯგუფებულია ოთხ დიდ ფილოტიპურ ჯგუფად (ფილოტიპად), 5 რასად და 5 ბიოვარად. Ralstonia -ს გვარის სახეობათა კომპლექსიდან ყველაზე მაღალი მავნეობით გამოირჩევა რასა 3

ბიოვარი 2, რომელიც იწვევს კარტოფილის მურა სიდამპლეს. ეს რასა ფართოდაა გავრცელებული დაახლოებით 80 ქვეყანაში. ზარალი ყოველ წელს 950 მილიონ დოლარს შეადგენს (Floyd, 2007). მრავალ ქვეყანაში (დიდი ბრიტანეთი, ნიდერლანდები, შვედეთი და სხვა) ის საკარანტინო ობიექტია და შეტანილია ევროპის მცენარეთა პათოლოგიის ორგანიზაციის (EPPO) ე.წ. A2 ნუსხაში, როგორც შეზღუდულად გავრცელებული საკარანტინო ობიექტი (EPPO, Bulletin, 2004). ეს პათოგენი შესულია აგრეთვე აგროკულტურათა ბიოტერორიზმის აგენტთა სიაში (Directive 2000/29/EC of 8 May 2000). საქართველოს სოფლის მეურნეობის მინისტრის N2–13 2006 წლის 31 იანვრის ბრძანების მიხედვით *R. solanacearum* შესული იყო საქართველოს მცენარეთა არარეგისტრირებულ საკარანტინო ობიექტების ნუსხაში, ხოლო ჩვენს მიერ განხორციელებული კვლევების შემდეგ *R. solanacearum* შეზღუდულად გავრცელებულ, საკარანტინო კატეგორიის პათოგენს წარმოადგენს. ამდენად, თემა მეტად აქტუალურია, ხოლო დისერტაციის **სამეცნიერო სიახლეს** წარმოადგენს ის რომ, საქართველოში მიკროორგანიზმი *R. solanacearum* გავრცელების არეალი და ქართული პოპულაციის ბიოლოგია დღემდე არ ყოფილა შესწავლილი.

სწორედ ამიტომ, **კვლევის მიზანს** წარმოადგენდა საქართველოში *R. solanacearum* - ის მიერ გამოწვეული მცენარეთა ბაქტერიული დაავადების შემთხვევების გამოვლენა, სამიზნე ფიტოპათოგენის ბიოლოგიისა და მისი გავრცელების ინტენსივობის შესწავლა. ჩვენს ქვეყანაში გავრცელებული პოპულაციის რასისა და ბიოვარის დადგენა. დაავადების გამომწვევი მიკროორგანიზმის ქართული პოპულაციის სუბტიპირება სპეციფიკური ფაგებისადმი მგრძნობელობის საფუძველზე (ფაგოტიპირება), აგრეთვე ცალკეული მცენარეული ანტიმიკრობული ნივთიერებების მოქმედების განსაზღვრა *R. solanacearum*-ის იზოლატებზე.

გარემოს სინჯების 7, 83 %-დან, უმეტესობა კი იმ ადგილებიდან, სადაც დაავადება გავრცელებულია მაღალი ინტენსივობით (ქობულეთის მდინარეები: აჭყვა, დეხვა, კინტრიში, შავი ზღვა). გამოყოფილი ფაგების ნაწილი ხასიათდებოდა ფართო ლიზისურ სპექტრით, ხოლო ზოგიერთი ფაგი - ვიწრო სპექტრით.

10. გამოვავლინეთ *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატების მგრძნობელობა ფაგების მიმართ. დავადგინეთ რომ, იზოლატების 30% რეზისტენტულია ფაგების მიმართ, 20% - ს ახასიათებდა მაღალი ფაგომგრძნობელობა, ხოლო 50% ხასიათდება საშუალო ფაგომგრძნობელობით. მათ შორის მოვახდინეთ განსაკუთრებით მგრძნობიარე ფაგების ჯგუფის გამოყოფა, რომლებზეც გაგრძელდება შემდგომი კვლევები.

11. შევისწავლეთ *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატების მგრძნობელობა დასავლეთ საქართველოს აჭარაში მოზარდი ადგილობრივი და ეგზოტიკური (როგორც ფოთოლმცვენი, ასევე მარადმწვანე) მერქნიანი სახეობების ექსტრაქტების მიმართ. დადგინდა საკვლევი მცენარეების ექსტრაქტების განსხვავებული, ანტიბაქტერიული მოქმედება. ყველაზე მაღალი აქტივობა გამოავლინა Hamamelidaceae - ის ოჯახში შემავალი ფოთოლმცვენი ბუჩქის *Corylopsis pauciflora* - ს ნედლი ფოთლების ექსტრაქტმა, რომელიც მომავალში შესაძლებელია წარმატებით იქნას გამოყენებული, როგორც ბრძოლის ეფექტური, ბიოლოგიური საშუალება მცენარეთა ბაქტერიოზების საწინააღმდეგოდ.

კერძოდ ჩხურუწყუსა და ქუთაისში, როგორც ღია ასევე დახურული გრუნტის პირობებში არსებულ ნათესებში და შეადგინა 63,15%, ზემო აჭარაში (ხულოში და ქედის რ/ნ -ში) - 50%, ხოლო ქობულეთის რ/ნ-ში კი, 48,48%.

6. პირველად, განვსაზღვრეთ საქართველოში გავრცელებული *R. solanacearum* -ის რასა და ბიოვარი. ძირითადად გვხვდება იზოლატების ორი განსხვავებული ჯგუფი. ერთი მათგანი ეკუთვნის რასა 3 ბიოვარ 2 - ს, ხოლო მეორე რასა1 ბიოვარ 3 - ს. დადგენილი იქნა, რომ სამცხე-ჯავახეთში მაღალი ინტენსივობით გავრცელებულია *R. solanacearum* -ის პანდემური რასა 3 ბიოვარი 2, რომელიც კარგად ადაპტირებული აღმოჩნდა მაღალმთიანი რეგიონის კლიმატურ პირობებთან.

7. პირველად ჩატარდა *R. solanacearum* -ის ქართული პოპულაციის ფილოგენეტიკური ანალიზი და გამოვლინდა ფილოგენეტიკური ჯგუფები: ფილოტიპ II, რომელიც აერთიანებს რასა 3 ბიოვარ 2-ის იზოლატებს, და ფილოტიპი I, რომელშიც შედის რასა 1 ბიოვარ 3-ის იზოლატები.

8. დადგინდა, რომ ფილოტიპ II - ის შემადგენლობაში შემავალი ქართული შტამები ძალიან ახლოს დგას ევროპული წარმოშობის შტამებთან - NCPPB 3857 UK და CFBP 3858 და სავარაუდოდ, მათაც იგივე, ევროპული, წარმოშობა აქვთ. ფილოტიპის I მქონე ქართული იზოლატი *R. solanacearum* - KoT47 ძალიან ახლოს მდგომი აღმოჩნდა აზიური წარმოშობის შტამებთან, მათ შორის ჯანჯაფილიდან მიღებული შტამთან, და შეგვიძლია დავუშვათ, რომ ფილოტიპი I -ის ქართულ იზოლატებსაც აზიური წარმოშობა აქვთ. ამდენად, საქართველოში *R. solanacearum* -ის ორი სხვადასხვა წარმოშობის პოულაციის არსებობის ფაქტი მიგვანიშნებს ქვეყანაში პათოგენის შემოჭრის ორ სხვადასხვა გზაზე.

9. შესწავლილ იქნა *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატების მიმართ სპეციფიკური ფაგების, როგორც ინდიკატორების, გავრცელება გარემოში. სპეციფიკური ფაგები გამოყოფილ იქნა 29

დასახული მიზნის განსახორციელებლად შევასრულეთ შემდეგი ამოცანები:

1. გამოვიკვლიეთ საქართველოს სხვადსხვა გეოგრაფიულ ზონაში *Ralstonia solanacearum*-ის მასპინძელი მცენარეების არსებული ნარგაობები. დავადგინეთ ამ ფიტოპათოგენი ბაქტერიის გავრცელების არეალი;

2. შევაგროვეთ დაავადებული ნიმუშები, მცენარეთა განვითარების სხვადასხვა სტადიაზე როგორც მინდვრის, ისე საცავების პირობებში (კარტოფილის შემთხვევაში);

3. მოვახდინეთ დაავადების გამომწვევი მიკროორგანიზმის გამოყოფა და იდენტიფიცირება;

4. შევისწავლეთ საქართველოში გავრცელებული პოპულაციის ბიოლოგიური თვისებების თავისებურებები და გამოვავლინეთ რასა, ბიოვარი და ფილოტიპური ჯგუფები.

5. შევისწავლეთ *R. solanacearum*-ის ადგილობრივი შტამების მგრძნობელობა სპეციფიკური ბაქტერიოფაგებისა და ანტიმიკრობული აქტივობის მქონე მცენარეთა ექსტრაქტების მიმართ.

კვლევის ობიექტი, მასალა და მეთოდიკა:

კვლევის ობიექტს წარმოადგენს საქართველოს სხვადასხვა გეოგრაფიულ ზონაში გავრცელებული მცენარეთა ბაქტერიული სიდამპლით დაავადებული ნიმუშებიდან გამოყოფილი მიკროორგანიზმი *Ralstonia solanacearum*-ის 101 შტამი, აგრეთვე დიდი ბრიტანეთის სურსათისა და გარემოს კვლევის ცენტრში (FERA)http://fera.co.uk/, არსებული ნაციონალური კოლექციის მცენარეთა პათოგენური ბაქტერიათა შტამები - NCPPB 3725,NCPPB 3996, NCPPB 4008, NCPPB325, NCPPB 909, NCPPB 3857, NCPPB 4156, NCPPB 4161, NCPPB 4211, NCPPB 4214, რომლებიც სრულად არის სექვენირებული და შესწავლილი. გარდა ამისა, კვლევაში ვიყენებდით გენბანკში არსებულ *R. solanacearum* - ის რეფერირებულ შტამებს, რომლებიც სხვადსხვა ფილოტიპურ

ჯგუფს ეკუთვნის. მუშაობის პროცესში გამოყენებული იყო ფაგური ნარევები. აღნიშნული ამოცანების განსახორციელებლად გამოვიყენეთ მიკრობიოლოგიური კვლევის სტანდარტული მეთოდები, როგორიცაა (ბაქტერიათა კულტივირება (Kelman 1954) და ბიოქიმიური ტესტირება (მათ შორის საიდენტიფიკაციო ბიოქიმიური ტესტების ჩათვლით (Suslow... 1982; Hossain... 2007; Schaad, 1980; Hayward, 1964). ასევე გამოყენებულ იქნა მოლეკულური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდები, კერძოდ, გენეტიკური იდენტიფიკაცია სპეციფიკური და რეალური დროის პჯრ მეთოდით (Pastrik... 2000; Weller... 2000); ერთეული გენისა და სრული გენომის სექვენირება (Fegan and Prior 2006).

დისერტაციის **პრაქტიკული მნიშვნელობა.** მიღებული შედეგები და დაგროვილი ცოდნა მნიშვნელოვან საფუძველს შექმნის ბრძოლის უსაფრთხო, ბიოლოგიური მეთოდების შემუშავებისათვის, რომელიც შესაძლოა წარმატებით იყოს გამოყენებული სოფლის მეურნეობაში.

კვლევის შედეგების აპრობაცია:

სადისერტაციო ნაშრომის წინასწარი განხილვა გაიმართა **2016 წლის 17 მაისს** ბსუ-ს საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა და ჯანდაცვის ფაკულტეტის ბიოლოგიის დეპარტამენტზე.

სტრუქტურა და მოცულობა: სადისერტაციო ნაშრომის მოცულობა შეადგენს კომპიუტერული ტექსტის 173 გვერდს. დისერტაცია შედგება შესავალის, სამი თავის, დასკვნის, ბიბლიოგრაფიისა და დანართისაგან. დისერტაციაში გაანალიზირებულია 222 ქართული და უცხოური წყარო, რომელიც მოიცავს ინფორმაციას მცენარეთა ბაქტერიული დაავადებების მოკლე ისტორიის, გამომწვევი პათოგენის ბიოლოგიის, მასპინძელი მცენარეების, გეოგრაფიული გავრცელების, ფიტოპათოგენური ბაქტერიების ფაგებისა და მათი პრაქტიკული მნიშვნელობის შესახებ.

დასკვნები:

1. ჩვენს მიერ 2011-2015 წწ. განხორციელებული კვლევებით, პირველად გამოვლინდა მცენარეთა ბაქტერიული ლპობის შემთხვევები საქართველოში და იდენტიფიცირებული იქნა დაავადების გამომწვევი - ფიტოპათოგენური ბაქტერია *Ralstonia solanacearum.* საქართველოს სოფლის მეურნეობის მინისტრის N2–13 2006 წლის 31 იანვრის ბრძანების მიხედვით *R. solanacearum* შესული იყო საქართველოს მცენარეთა არარეგისტრირებულ საკარანტინო ობიექტების ნუსხაში. ჩვენი კვლევების შედეგების გათვალისწინებით მთავრობის 2014 წლის 14 ივლისის დადგენილება # 446 -ის (16.07.2014) საფუძველზე, *R. solanacearum* მიეკუთვნა საქართველოში შეზღუდულად გავრცელებულ, საკარანტინო კატეგორიის პათოგენებს.
2. პირველად, გამოვლენილ იქნა *R. solanacearum* - ის მასპინძელი მცენარეები საქართველოში: კარტოფილი, პომიდორი, წიწაკა, ბადრიჯანი და დეკორატიული მცენარეები: *Streilizia spp., და Pelargonium zonale*. დაავადების უმეტესობა გამოვლინდა კარტოფილის მცენარეზე - 57,7%, ხოლო პომიდორზე ბაქტერიული ჭკნობის ინტენსივობა შეადგენდა - 54,8%-ს.
3. პირველად, დავადგინეთ ბაქტერია *R. solanacearum*- ის გავრცელების გეოგრაფიული არეალი საქართველოში: სამცხე - ჯავახეთი, ზემო აჭარა, კოლხეთის დაბლობი და შიდა ქართლი.
4. გამოვავლინეთ მცენარეთა ბაქტერიული ჭკნობის გავრცელების ინტენსივობა. *R. solanacearum* - ით გამოწვეული მცენარეთა ბაქტერიოზები ყველაზე მაღალი ინტენსივობით გვხვდებოდა სამცხე-ჯავახეთში და შეადგენდა 63,6%, ყველაზე ნაკლებად დაფიქსირდა შიდა ქართლში - 23%.
5. კარტოფილის მურა სიდამპლის შემთხვევების ყველაზე მაღალი მაჩვენებელი იყო სამცხე -ჯავახეთში და ქობულეთში (63,3% და 62,5 %). პომიდორის ბაქტერიული ჭკნობა ყველაზე მაღალი სიხშირით გამოვლინდა დასავლეთ საქართველოში,

ანტიბაქტერიული აქტივობის სახეობები: *Abies nordmanniana (Stev.)Spach., Iuglans regia L., Taxus baccata L.,Parrotiopsis jaquemontiana (Decne.) Rehd., Corylopsis sinensisHemsl. , Pittosporum floribundum Wight. etArn., Liquidambar formosanaHance., Corylopsis spicataSieb. etZucc., Eucaliptus cinerea F. Muell. etBenth., Laurocerasus officinalis M. Roem., Ginkgo biloba L* .

ამრიგად *In vitro* პირობებში, ჩვენს მიერ ჩატარებული მცენარეთა ანტიბაქტერიული აქტივობის სკრინინგის შედეგების საფუძველზე, შეგვიძლია ვთქვათ რომ, შესაძლებელია წარმატებით გამოვიყენოთ აღნიშნული მცენარეთა ექსტრაქტი, როგორც პოტენციური ბრძოლის საშუალება, ბაქტერია *R. solanacearum* -ით გამოწვეული ბაქტერიოზების წინააღმდეგ. აღნიშნული კვლევა სიახლეა და მოითხოვს შემდგომ ღრმა კვლევის გაგრძელებას, რათა შესწავლილ იქნას ექსტრაქტის თუ რომელი შემადგენელი კომპონენტი თრგუნავს კონკრეტულად ბაქტერიის ზრდას, რომელიც სამომავლოდ, შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას ბიოპრეპარატის შექმნაში.

სადისერტაციო ნაშრომის ძირითადი შედეგები ასახული იქნა შემდეგ **პუბლიკაციებში:**

1. **Maka Muradashvili**, Mariam Metreveli, Julieta Jakeli, Galina Meparishvili, Feride Tchaidze and Dali Kamadadze **“ Screening of Adjara seaside’s Dendron plant extraction in-vitro growth to of *Ralstonia solanacearum”*** International Journal of Current Research Vol. 8, Issue, 01, pp.24894-24896, January, 2016.
2. **მურადაშვილი მაკა,** მეფარიშვილი გალია, სიხარულიძე ზოია, ლაშხი ნინო, თედიაშვილი მარინა, **“კარტოფილის სუფთა პროდუქტის წარმოება: კარტოფილის მურა სიდამპლის კონტროლი ბაქტერიოფაგების საშუალებით”,** საერთაშორისო სამეცნიერო კონფერენციის მასალებში „ეკოლოგიურად სუფთა პროდუქტების წარმოების თანამედროვე ტექნოლოგიები სოფლის მეურნეობის მდგრადი განვითარებისათვის“. 2016 წელი, თბილისი, საქართველო
3. **M.T. Muradashvili***, G.V. Meparishvili*, M.I. Tediashvili **, Z. V.Sikharulidze* “**Phenotypic Properties of Georgian isolates of *Ralstonia solanacearum”*** Journal of Agronomy and Agroecology ANNALS OF AGRARIAN SCIENCE, vol. 13, no. 3, 2015, WWW. agrscience ge.
4. **Muradashvili M**., Meparishvili G., Sikharulidze Z., Meparishvili S. **“First report of potato brown rot caused by *Ralstonia solanacearum* in Georgia”**, Journal of Plant Pathology V. 96, #4 Supplement)S.4. 113 – S4. 131. Doi: 10.4454/Jpp.N9614.022, 2014; http://sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/issue/current
5. **მ. მურადაშვილი**, გ. მეფარიშვილი, ზ. სიხარულიძე, ს. მეფარიშვილი **“ფიტოპათოგენური ბაქტერიის - *Ralstonia solanacearum* გავრცელება საქართველოში“.** საქ. სოფ. მეურნ. მეცნ. აკადემიის მოამბე, # 33, p. 101 – 104, 2014
5. **მურადაშვილი მ.,** მეფარიშვილი გ., თედიაშვილი მ., სიხარულიძე ზ., **“*Ralstonia solanacearum*-ის ქართული პოპულაციის ბიომრავალფეროვნება“** ბოტანიკური ბაღების მნიშვნელობა მცენარეთა მრავალფეროვნების შენარჩუნებაში; ნაწილი II; 2013 წელი, გვ.213-21

6. G.Mepharishvili; Z.sikharulidze; R.Thwaites; **M.muradashvili**; **"First confirmed report of bacterial wilt of tomato in Georgia caused by *Ralstonia solanacearum*".** New Disease Reports (2012)25, 16. [doi:10.5197/j.2044-0588.2012.025.

მიღებული შედეგები წარდგენილი იქნა შემდეგ საერთაშორისო კონფერენციებზე:

1. **6th International Bacterial Wilt Symposium** – Toulouse 3rd - 7th July 2016; „Next Generation Sequencing Based Analysis of quarantine plant bacterial pathogen *Ralstonia solanacearum* isolated in Georgia";
2. **6th International Bacterial Wilt Symposium** – Toulouse 3rd - 7th July; 2016; „*Ralstonia solanacearum* inGeorgia: Phylogenetic analysis and inference of likely origins of introduction".
3. **19th Triennial Conference of the European Association for Potato Research (EAPR)** - BROWN ROT IN GEORGIA; 6 to 11 July 2014 Brussels; Abstract book,p. 242;
4. **11th conference of the European Foundation for Plant Pathology** - Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* in Georgia, 8-13 September 2014, Cracow, POLAND;
5. **32nd Annual Meeting of the European Culture Collections' Organization ECCOXXXII Biodiversity versus Sustainability** - The culture collection of fungal phytopathogens; 12-14 June 2013Athens, Greec; Abstract book, p. 37-38.

კვლევაში გამოყენებული იქნა 2012-2015 წლებში შეგროვილი *R. solanacearum*-ის ქართული შტამები, რომლებიც იზოლირებული იყო სხვადასხვა მასპინძელი მცენარიდან (კარტოფილი, პომიდორი, წიწაკა).

ანტიბაქტერიული მოქმედების შესასწავლად *Ralstonia solanacearum*-ის შემთხვევაში საანალიზო მასალა აღებული იქნა გაზაფხულის, ზაფხულისა და შემოდგომის პერიოდებში. მცენარის ექსტრაქტს ვღებულობდით ახლად დაკრეფილი გამოსაკვლევი მცენარის ფოთლებიდან (100გრ), რომელთაც ვასუფთავებდით დისტილირებული და სტერილური წყლით, კარგად ვაქუცმაცე-ბდით სტერილური მაკრატლით და ვსრესდით მექანიკურ როდინში, 100მლ სტერილური წყლის დამატებით. შემდგომ ვახდენდით ცენტრიფუგირებას (5000 ბრუნი/წთ) 10 წთ-ის განმავლობაში და სუპერნატანტს ვიყენებდით ჩვენს კვლევაში.

ცდების შედეგად გამოვლინდა რომ, მცენარეთა ექსტრაქტების ნაწილმა გავლენა ვერ მოახდინა ბაქტერია *R. solanacearum* - ის ზრდაზე, ხოლო ნაწილმა დადებითი შედეგი მოგვცა. აღსანიშნავია, რომ დადებითი შედეგი მოგვცა აგვისტოს თვეში ჩატარებულმა ცდებმა. ფოთლების ექსტრაქტების მოქმედებით მიღებული ბაქტერიული კულტურის ზრდის დათრგუნვის ზონის დიამეტრის, ლიზისური უბნების მიხედვით მივიღეთ ძლიერი და საშუალო ანტიბაქტერიული მოქმედების სახეობები (ცხრილი 22). 1) ძლიერი ანტიბაქტერიული აქტივობის სახეობები: *Parrotia persica (DC.)C. A. Mey, Hamamelis japonica Sieb. et Zucc., Hamamelis virginiana L., Hamamelis mollis Oliv., Myrtus communis, Liquidambar styraciflua L., Corylopsis pauciflora Sieb. et Zucc., Buxus colchica Pojark.;* მათ შორის ყველაზე მაღალი მგრძნობელობა გამოავლინა ფოთოლმცვენი ბუჩქის *Corylopsis pauciflora* - ს ნედლი ფოთლების ექსტრაქტმა. ბაქტერიული კულტურის ინჰიბირებული ზონის დიამეტრი ≥30±2 -ს აღწევდა. ეს სახეობა მიეკუთვნება Hamamelidaceae - ის ოჯახს და გვხვდება იაპონიაში, ჩინეთში და ტაივანში. 2) საშუალო

ქართული პოპულაცია წარმოდგენილია ფაგებისადმი მრავალფე-როვანი მგრძნობელობის მქონე შტამებით. ჩვენს მიერ გამორჩეული იქნა განსაკუთრებით მგრძნობიარე ფაგების ჯგუფი, რომლებზეც გაგრძელდება შემდგომი კვლევები.

1.12. *R. solanacearum* -ის მიმართ აჭარის ზღვისპირეთის ფლორის მერქნიანი სახეობების ანტიბაქტერიული აქტივობის შესწავლა

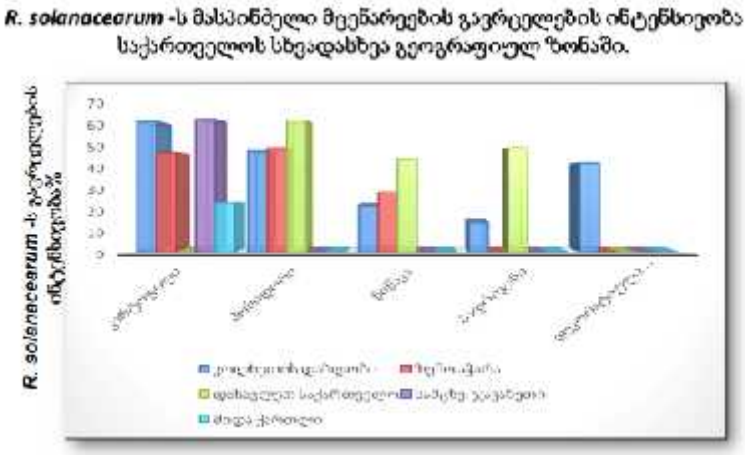
R. solanacearum - ის მიმართ მცენარეთა ექსტრაქტების ანტიბაქტერიული აქტივობის შესასწავლად განვახორციელეთ სკრინინგი. ამ მიზნით შერჩეული იქნა დასავლეთ საქართველოს აჭარის ტენიანი სუბტროპიკული კლიმატის პირობებში მოზარდი ადგილობრივი და ეგზოტური მერქნიანი სახეობებიდან, ფოთოლმცვენი და მარადმწვანე მერქნიანი მცენარეების 60 სახეობა, კერძოდ, *Bignonia, Viburnum, Rhododendron, Manihot, Corylopsis, Hamamelis, Liquidambar, Loropetalum, Distylium, Parrotiopsis, Parrotia, Fortunearia, Illicium, Iuglans, Cinnamomum, Machilus, Neolitzea, Magnolia, Cocculus, Dorifora, Eucalyptus, Camellia, Myrtus, Pittosporum, Laurocerasus, Buxus* გვარები. ეს სახეობები ძირითადად წარმოადგენენ ბათუმის ბოტანიკური ბაღის მდიდარ მერქნიან მცენარეთა კოლექციის ნაწილს, ბევრი მათგანი კი უკვე ფართოდ და წარმატებით არის დანერგილი დასავლეთ საქართველოს აჭარის ზღვისპირეთის დეკორატიულ მებაღეობაში, ბაღების, სკვერების და სხვადასხვა მწვანე ობიექტის განაშენიანებაში. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ შესწავლილი სახეობებიდან 9 წარმოადგენს მსოფლიო წითელი ნუსხის *(IUCN)* მცენარეებს: *Abies nordmanniana, Corylopsis pauciflora, Ginkgo biloba, Iuglans regia, Liquidambar styraciflua, Magnolia delavayi, Magnolia officinalis, Taxus baccata.*

თავი 1.

1.1. *Ralstonia solanacearum* - ით გამოწვეული მცენარეთა ბაქტერიული დაავადებების გავრცელება საქართველოში

საქართველოში *Ralstonia solanacearum* - ის გავრცელების დასადგენად და მასპინძელი მცენარეების გამოვლენის მიზნით 2011-2015 წლებში მონიტორინგი განვახორციელეთ, სხვადსხვა გეოგრაფიულ ზონაში, როგორიცაა (ახალციხე, ზღვის დონიდან - 1200მ-ზე ხულო - 923მ-ზე; ქობულეთი - 10მ-ზე), მარშრუტული გამოკვლევების გზით. შევისწავლეთ კარტოფილის, პომიდორის და წიწაკის საკარმიდამო და ფერმერულ მეურნეობებში გაშენებული ნათესები (როგორც ღია, ასევე დახურული გრუნტის პირობებში), ინფიცირებულ მცენარეთა გამოსავლენად. ასევე, კვლევა ჩავატარეთ ბათუმის ბოტანიკური ბაღის ტერიტორიაზე, რადგან ცნობილია, რომ *R. solanacearum* აავადებს მრავალ დეკორატიულ მცენარეს (Belén...2010).

ბოლო წლებში (2011-2015) ჩატარებული კვლევებიდან გამომდინარე შეგვიძლია ვთქვათ, რომ ისეთი აგრესიული ფიტოპათოგენი, როგორიცაა ბაქტერია *R. solanacearum*, ჩვენს ქვეყანაში საკმაოდ კარგად არის გავრცელებული და მოიცავს შემდეგ გეოგრაფიულ ზონებს: 1. სამცხე-ჯავახეთი, სადაც კარტოფილის მურა სიდამპლე 63,6% შეადგენს. 2. კოლხეთის დაბლობი, სადაც დაავადების გავრცელების ინტენსივობა იყო - 48,54% და აღინიშნებოდა სხვადასხვა მასპინძელ მცენარეზე (კარტოფილი, პომიდორი, წიწაკა), მათ შორის დაავადება ყველაზე მაღალი პროცენტით დაფიქსირდა კარტოფილზე - (62, 5%) და პომიდორზე - (48,48%). 3. ზემო აჭარა, სადაც ბაქტერიული ლპობის შემთხვევების რაოდენობა შეადგენდა - 43,13%. მათგან, უმეტესი წილი მოდიოდა კარტოფილის მურა სიდამპლეზე. ზოგადად, დასავლეთ საქართველოში დაავადების გავრცელების ინტენსივობა შეადგენდა - 63,15%, რომელიც მოიცავდა როგორც ღია ასევე, სასათბურე მეურნეობებს (დიაგრამა 1).



დიაგრამა 1. *R. solanacearum* - ით დაავადებული მასპინძელი მცენარეების გავრცელების ინტენსივობა საქართველოს სხვადასხვა გეოგრაფიულ ზონაში.

კვლევის პროცესში გამოვავლინეთ საქართველოს სხვადასხვა გეოგრაფიულ ზონაში გავრცელებული *R. solanacearum* - ის მასპინძელი მცენარეები, რომლებზეც ბაქტერიოზები სხვადასხვა ინტენსივობით გვხვდებოდა. მათ შორის ყველაზე მეტად აღინიშნებოდა კარტოფილის მურა სიდამპლე - 57,7%, შემდეგ - პომიდორის ბაქტერიული ჭკნობა (54,8%). ჩვენს მიერ განხორციელებული მონიტორინგის შედეგად გამოვლინდა, რომ *R. solanacearum* -ის გავრცელების არეალი მოცავს საქართველოს დასავლეთ და აღმოსავლეთ ნაწილს, როგორც ვაკე, ისე მთიან რეგიონებს (სურათი 1). მასპინძელ მცენარეებზე ბაქტერიოზების გავრცელების განსხვავებული ინტენსივობა აღინიშნა საქართველოს სხვადასხვა რეგიონში. აგრეთვე დადგენილ იქნა, რომ ქართული შტამები ხასიათდებოდა პატრონ მცენარეთა მრავალფეროვნებით, რაც თავის მხრივ, პათოგენის შიდასახეობრივ მრავალფეროვნებაზე მეტყველებს (http://www.cabi.org/).

AcP98, KhT89; III - KeT93, KoP97, KePe99, AcP61, NCBPP3725, NCBPP 3996, NCBPP4214, NCBPP325, NCBPP4211, KhPe91; ბორჯომის ხეობის მდინარე მუჯახელადან აღებულ ნიმუშში ორ ჯგუფად: I - AcP3, AcP5, AcP58, KhP9, KhP8, KoP18, AkhP80, II - KhT88, AcP62, KoPe19, AcP57, KoT65, KhP33, KoT50, Ko48; ქობულეთის მდინარე დეხვას წყლის ნიმუშში სამ ჯგუფად: I -KhT88, AcP62, KPe19, AcP57, KoT65, KhP33, KoT50, Ko48; II – KoT46, AkhP38, AcP55, KoT47, OzT67, KeT92, KheT96, KePe94, AkhP100, AcP98, KhT89; III - KeT93, KoP97, KePe99, AcP61, NCBPP3725, NCBPP 3996, NCBPP4214, NCBPP325, NCBPP4211, KhPe91.

უნდა აღინიშნოს, რომ ზამთრის თვეებში და ადრე გაზაფხულზე ფიტოპათოგენებისადმი სპეციფიური ფაგები გარემოში ფაქტობრივად არ ვლინდებიან, რაც პირველ რიგში დაკავშირებული უნდა იყოს მათ მიმართ მგრძნობიარე ბაქტერიების მინიმალურ რიცხობრიობასთან და ასევე კლიმატურ ფაქტორებთან. ტემპერატურისა და სინესტის მატებასთან და შესაბამისად დაავადების გავრცელების ალბათობის ზრდასთან ერთად, ფაგების გამოყოფის სიხშირე მატულობდა და პიკს ზაფხულის ბოლოს, შემოდგომის დასაწყისში აღწევდა.

სტანდარტულად გამდიდრებული ნარევების ინკუბაციისას, მიღებული ლიზატების ცენტრიფუგირებისა და მემბრანული ფილტრაციის შემდეგ, ვახდენდით ბაქტერიოფაგების შემცველობის გამოვლენას სპოტ - ტესტის მეშვეობით (იხ.ზემოთ).

კვლევებმა გვიჩვენა რომ, *R. solanacearum*-ის ქართული იზოლატები ავლენდნენ განსხვავებულ მგრძნობელობას ფაგების მიმართ. შტამების 30% რეზისტენტული იყო ჩვენს მიერ გამოყოფილი ფაგური ნარევების მიმართ. *Ralstonia solanacearum* -ის იზოლატების 50% ავლენდა საშუალო ხარისხის ფაგომგრძნობელობას, ხოლო 20%-ს ახასიათებდა მაღალი მგრძნოებლობა.

ამრიგად, კვლევის ამ ეტაპზე ჩვენი შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია ვთქვათ რომ, *R. solanacearum*-ის

1.11. სპეციფიური ბაქტერიოფაგების მგრძნობელობის შესწავლა *R. solanacearum* -ის ქართული იზოლატების მიმართ

მიმდინარე კვლევის პერიოდში *R. solanacearum* - ის მიმართ სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გავრცელების შესწავლის მიზნით, გამოვიკვლიეთ საქართველოს სხვადასხვა მდინარეებიდან აღებული წყლის სინჯები და ნიადაგის ნიმუშები. მონიტორინგი მოიცავდა ახალციხის, ბორჯომ-წაღვერის და ქობულეთის რაიონს, იქ სადაც დადგენილი იყო *R. solanacearum* - ის გავრცელება. ფაგების გამოყოფა მოვახდინეთ წყლის ნიმუშებიდან, რომლებიც მოგროვებული იყო ქობულეთის მდინარეებიდან (დეხვა; აჭყვა; კინტრიშის ხეობის ღელე), შავი ზღვიდან, ახალციხის ხეობის მდინარიდან და ბორჯომის ხეობის მდინარე მუჯახელადან. ნიმუშების აღება ხდებოდა წლის სხვადასხვა, ძირითადად თბილ პერიოდში.

R. solanacearum-ის სპეციფიკური ბაქტერიოფაგების გამოსავლენად გამოყენებული იყო ფაგების გამოყოფის სტანდარტული გამდიდრების მეთოდი, სადაც მასპინძელ ბაქტერიებად ჩათესილი იყო საქართველოში მოგროვებული მასალიდან გამოყოფილი *R. solanacearum*-ის 32 შტამი. გამდიდრებული ნარევის მომზადების მიზნით მოვახდინეთ მათი დაჯუფება და ჩათესვა შემდეგნაირად: ახალციხის ხეობის მდინარის ნიმუშში იზოლატები ჩავთესეთ ორ ჯგუფად: I - KhT88, AcP62, KPe19, AcP57, KoT65, KhP33, KoT50, Ko48; II - AcP3, AcP5, AcP58, KhP9, KhP8, KoP18, AkhP80. ქობულეთის ზღვის წყალში სამ ჯგუფად -I -KoT46, KoEg31,NiP43, AkhP38, AcP55,KoT47, KoP63, AcP2, OzT67, II - KhT88, AcP62, KPe19, AcP57, KoT65, KhP33, KoT50, Ko48; III - KeT93, KoP97, KePe99, AcP61, NCBPP3725, NCBPP 3996, NCBPP4214, NCBPP325, NCBPP4211, KhPe91; ქობულეთის მდინარე აჭყვის წყლიდან აღებულ ნიმუშში სამ ჯგუფად I – AcP59, KoP18, KhT88, AkhP80, AKhP42, NiP43, KhP33, KoT50, Ko48; II - KoT46, AkhP38, AcP55, KoT47, OzT67, KeT92, KheT96, KePe94, AkhP100,

1.2. დაავადებულ მცენარეთა შეგროვილი ნიმუშების შესწავლის შედეგები

საქართველოს სხვადსხვა რეგიონში ჩატარებული მონიტორინგის განმავლობაში, ჩვენს მიერ შეგროვილ მცენარეთა ნიმუშებს ახასიათებდათ დაავადების ისეთი ნიშნები, როგორიცაა ფოთლების სიყვითლე და ზედა ყლორტების ჭკნობა, ხოლო დაავადების პროგრესულად განვითარებისას, კი მცენარეები ზრდა-განვითარების ადრეულ სტადიაზე მთლიანად ხმებოდა სველი სიდამპლის თანხლებით.

დაავადებული კარტოფილის ტუბერების დათვალიერებისას, აღვრიცხავდით, როგორც ლატენტურად დაავადებულ ფორმებს, ასევე, მკვეთრად გამოხატულ სიმპტომების მქონე მცენარეებს, რომელთა გორგლების გადანაჭერზე კარგად ჩანდა წრიული, ყავისფერი რგოლები, რძისფერი გამონადენით. ზოგ შემთხვევაში, ტუბერებზე სტალონებთან ახლოს, აღინიშნებოდა თვალის ფორმის, შავი ლაქები, საიდანაც გამოედინებოდა ბაქტერიული, ლორწოვანი მასა (სურათი 2).

სურათი 2. მურა სიდამპლის დაავადების სიმპტომები კარტოფილის ტუბერებზე

ბაქტერიული სიდამპლით დაავადებული პომიდორის მცენარეები გამოვლენილი იქნა, როგორც ღია ასევე, დახურული გრუნტის პირობებში. როგორც #3 სურათიდან ჩანს, დაავადებული პომიდორის ღეროს გამტარი ქსოვილი იღებს მუქ შეფერილობას, სადაც გროვდება ბაქტერიული მასა. ასევე მცენარის წყლით მომარაგების პროცესის დარღვევა იწვევს ტურგორის დაკარგვას, ჩვენს მიერ შეგროვილ ნიმუშებს, სადაც დაავადება პროგრესულად მიმდინარეობდა უვითარდებოდათ მიწისზედა ფესვები და ახასიათებდათ ჭურჭლოვანი სისტემის გახევება, რასაც თან ახლდა ფოთლების გაყვითლება, ცვენა და მცენარის ჭკნობა (სურათი 3).

სურათი 3. ბაქტერიული ჭკნობის დაავადების სიმპტომები პომიდორის მცენარეზე (ა. სათბურის პირობებში და ბ. დაავდებული პომიდორის ღეროს განივი ჭრილი)

ამრიგად, საქართეველოში *R.solanacearum* - ით ინფიცირებული მასპინძელ მცენარეებში გამოვლენილია იგივე სიმპტომები, რაც აღწერილია, მთელი რიგ სამეცნიერო შრომებში

საქართველოს სხვადსხვა რეგიონს. ფილოტიპი I, რომელიც აერთიანებს 3,4,5 ბიოვარს აქვთ აზიური წარმოშობა (Seal... 1999; Poussier... 1999). პათოგენისათვის ზრდა - განვითარებისათვის ოპტიმალური ტემპერატურაა 30-32^0 C . ფილოტიპი I -ის ჯგუფში შედიან *R. solanacearum*-ის ის შტამები, რომლებიც გავრცელებული იყო დასავლეთ საქართველოს სუბტროპიკულ ზონაში (ქობულეთის რაიონი), სადაც კლიმატი ცხელი და უხვ ნალექიანია. ასეთი კლიმატი კი ხელსაყრელია პათოგენის არსებობისა და გავრცელებისათვის.

მიღებული მონაცემებით შეგვიძლია გამოვიტანოთ დასკვნა, რომ ამჟამად საქართველოში ცირკულირებს ორი სხვადსხვა პოპულაცია და ყავს მრავალი მასპინძელი მცენარე (კარტოფილი, პომიდორი, წიწაკა, ბადრიჯანი და დეკორატიული მცენარეები), რაც მიუთითებს პოპულაციის ჰეტეროგენულობაზე. გარდა ამისა, ჩვენი კვლევების საფუძველზე დავადგინეთ რომ, სამცხე-ჯავახეთში გავრცელებულია *R. solanacearum* -ის პანდემური რასა 3 ბიოვარი 2 რომლის, გავრცელების ინტენსივობა საკმაოდ მაღალია. აღმოჩნდა რომ პათოგენი კარგად ადაპტირებულია მაღალმთიან, გრილ კლიმატურ პირობებთან, ამ ფაქტის გამოვლენა მეტად მნიშვნელოვანი და საყურადღებოა.

ჩვენი შემდგომი კვლევა მოიცავს ბაქტერიოფაგებისა და მცენარეთა ექსტრაქტების ანტიბაქტერიული აქტივობის შესწავლას *R. solanacearum* - ით გამოწვეული მცენარეთა ბაქტერიოზების წინააღმდეგ. რომელიც ითვალისწინებს შესაბამისად პათოგენის მიმართ მგრძნობიარე ბაქტერიული ვირუსების გამოვლენას და ლიზისური სპექტრის შესწავლას.

(მიღებული იყო ქობულეთში პომიდვრის ნიმუშიდან) ენდოგლუკონაზა გენის სექვენსური თანმიმდევრობა, ძალიან ახლოსაა იაპონიაში გავრცელებულ მცენარე ჯანჯაფილიდან მიღებულ *R. solanacearum* -ის იზოლატთან და შესაბამისად ეს ორი შტამი ერთიანდება იმ კლასტერულ ჯგუფში, სადაც შედის ფილოტიპი I რეფერენს შტამები. ვარუდობენ, რომ, ამ ფილოტიპში გაერთიანებული შტამები წარმოშობილია აზიიდან. II ფილოტიპის შტამებთან შედარებით მათ ახასიათებთ ზრდის მაღალი ოპტიმალური ტემპერატურა და გამოირჩევიან პატრონ მცენარეთა ფართო სპექტრით.

ლიტერატურული წყაროებიდან (Swanson... 2005; Nelson... 2013) ცნობილია, როგორც კარტოფილის ტუბერები, ასევე ჯანჯაფილის ფესვებიც ადვილად ინფიცირდება ბაქტერია *R. solanacearum* - ით და ლატენტურად ინფიცირებული სათესლე მასალის ექსპორტი წარმოადგენს დაავადების გავრცელების მაღალ რისკ ფაქტორს მთელს მსოფლიოში (Pegg... 1974; Indrasenan... 1981; Kumar... 2002).

ამრიგად, ჩვენს მიერ განხორციელებული კვლევებიდან გამომდინარე, შეგვიძლია ვთქვათ, რომ საქართველოში ამჟამად გავრცელებულია *R. solanacearum* ორი ფილოგენეტიკური ჯგუფი: ფილოტიპი IIB და ფილოტიპი I, რომელთაც სხვადასხვა წარმოშობა აქვთ. IIB ფილოტიპი შტამები არიან ძირითადად ევროპული წარმოშობის და მათი ზრდის ოპტიმალური ტემპერატურა შედარებით დაბალია (Kim... 2003; Daughtrey 2003). რასა 3 ბიოვარი 2 -ის შტამები გვხვდება მთიან რეგიონებში (სამცხე-ჯავახეთი, ზემო აჭარა), სადაც კლიმატი ცივია. აღნიშნული რეგიონები ჩვენი ქვეყნისათვის მეკარტოფილეობის ზონებად ითვლება, ამიტომ ეს ფაქტი განსაკუთრებით საყურადღებოა. გარდა ამისა, ამ ჯგუფს მიეკუთვნება აგრეთვე შტამები, რომლებიც გამოყოფილია სხვადასხვა მასპინძელი მცენარეებიდან, როგორიცაა კარტოფილი, პომიდორი, წიწაკა, რომელთა გავრცელების ადგილი მოიცავს

(McCarter, 1991; Elphinstone... 1998 ; Swanson... 2005, Champoiseau... 2009; Milling... 2009; Champoiseau...2010; EPPO, 2015).

1.3. პათოგენის გამოყოფა და იდენტიფიკაცია

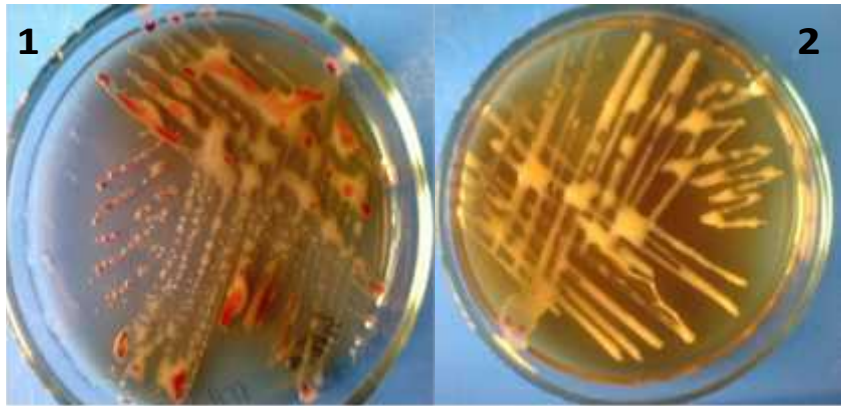
მინდვრისა და საცავების პირობებში სიმპტომური ნიმუშების გამოკვლევისას ვიყენებდით იმუნო დიაგნოსტიკურ ტესტებს (იხილეთ 2.5.1. თავში), რამაც საშუალება მოგვცა გადაგვერჩია პოტენციურად ინფიცირებული მცენარეთა ნიმუშები (სურათი 4)

სურათი 4. დაავდებულ კარტოფილზე იმუნოდიაგნოსტიკური ცდის შედეგი

შეგროვილი ნიმუშები შემდეგომ შესწავლილ იქნა ლაბორატორიულ პირობებში, ზემოთ აღწერილი მიკრობიო-ლოგიური და მოლეკულური ბიოლოგიის თანამედროვე მეთოდების გამოყენებით (იხილეთ. 2.5.2.; 2.9.; 2.9.1.;).

1.4. *Ralstonia solanacearum* - ის კულტივირება და იდენტიფიცირება სტანდარტული მიკრობიოლოგიური მეთოდით

ჩვენს მიერ შეგროვილი დაავადებულ მცენარეების (რომლებსაც ქონდათ დამახასიათებელი სიმპტომები) ნაწილე-ბიდან, ვახდენდით ბაქტერიული პათოგენის კულტივირებას, რისთვისაც ვიყენებდით სელექციურ საკვებ ნიადაგებს: კელმანის ტრიფენოლ ტეტრაზოლიუმიან - TZC და მოდიფიცირებული SMSA არეებს (სურათი 5), (იხილეთ თავი 2.5.2.). შეგროვილი ნიმუშებიდან გამოყოფილი *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატები, წარმოქმნიდნენ ტიპიურ კოლონიებს, რომლებიც შეესაბამებოდა სხვა მეცნიერთა მიერ მოწოდებულ აღწერილობას (Cook and Sequeria,1991; French… 1995; Caruso… 2003; Ozakman and Schaad, 2003; Marco-Noales… 2008).



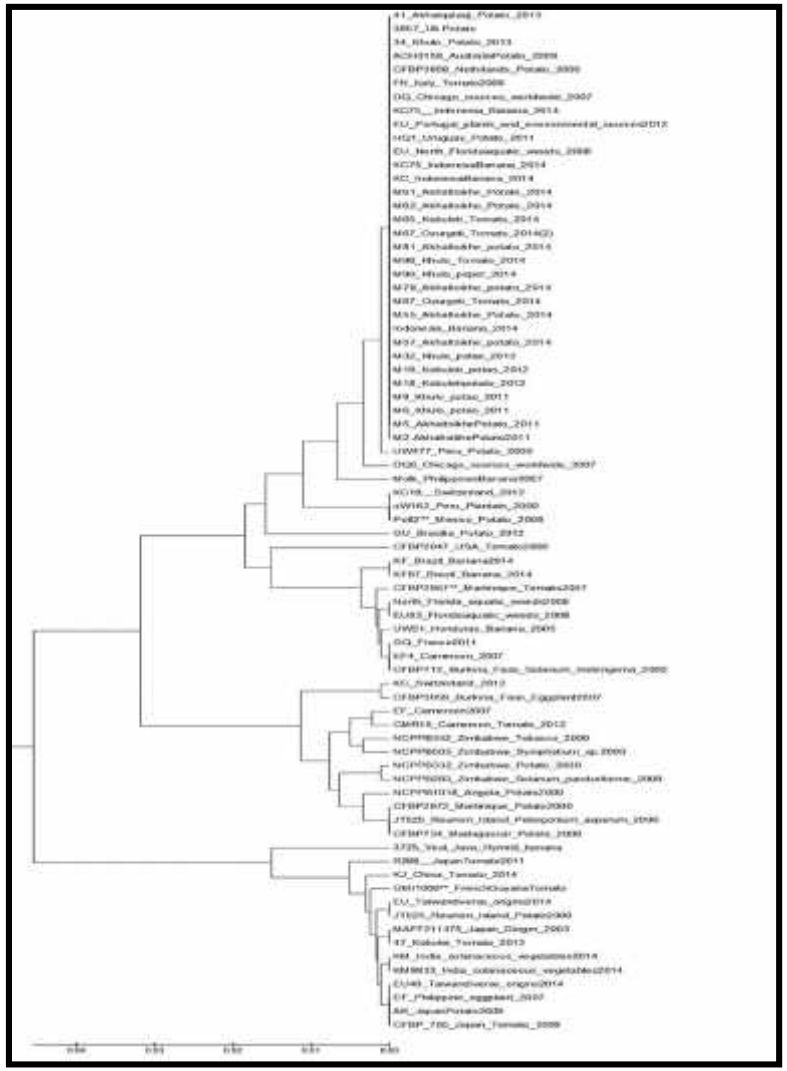
სურათი 5. *R. solanacearum* – ის კოლონიები მოდიფიცირებულ 1. SMSA და 2. CPG საკვებ არეზე

სულ, 2011-2015 წლებში განხორციელებული კვლევების შედეგად შეგროვილი იქნა *R. solanacearum* -ის 101 იზოლატი, რომლებიც იზოლირებული იყო სხვადასხვა მასპინძელი

გაანალიზებული ნიმუშების კლასტერებად დაჯგუფებისას გამოიკვეთა შემდეგი სურათი: *R. solanacearum* - ის ქართული შტამების უმეტესობა დაჯგუფდა ერთ კლასტერულ ჯგუფად, რომლებიც ძალიან ახლოს იდგნენ ინდონეზიის შტამთან - KC75, რომელიც გამოყოფილი იყო დაავადებული ბანანიდან 2014 წელს. ორი იზოლატი: *R. solanacearum* KhP34 და *R. solanacearum* AkhP41 ახლოს მდგომია შტამებთან: 3857 UK (კარტოფილი, დიდი ბრიტანეთი), CFBP 3858 (კარტოფილი, ნიდერლანდები, 2000) და ACHO 158 (კარტოფილი, ავსტრალია, 2009). მათგან განსხვავებით იზოლატი *R. solanacearum* KoT47 მოხვდა სხვა კლასტერულ ჯგუფში, ახლოს იაპონურ იზოლატთან - MAFF 2011475 (სანელებელი მცენარე ჯანჯაფილი, იაპონია, 2003).

შესწავლილი შტამების ფილოგენეტიკური ანალიზით უნდა აღინიშნოს, რომ *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატების რეფერენს შტამებთან შედარებისას მათი უმეტესი ნაწილი მიეკუთვნა ფილოტიპ IIB / სექვოვარ 1 (IIB1), რომელიც საყოველთაოდ ცნობილია, როგორც რასა 3 ბიოვარი 2 (Janse, 1996; Janse... 2004; Sanchez-Perez, 2008; Siri... 2011). ეს არის ე.წ. პანდემიური რასა, რომელიც გავრცელებულია მთელს მსოფლიოში. არსებობს მოსაზრება, რომ აღნიშნული რასის გავრცელებას ხელი შეუწყო ლატენტურად ინფიცირებული სათესლე კარტოფილის იმპორტმა იმ რეგიონებიდან, სადაც დაავადება ენდემურია (Janse... 1996; Cellier and Prior, 2010; Wicker... 2011).

II ფილოტიპის შტამები წარმოშობილია ცენტრალურ და სამხრეთ ამერიკაში, მაგრამ არ გვხვდება ჩრდილოეთ ამერიკაში, სადაც *R. solanacearum* აგრო ტერორიზმის აგენტთა სიაში არის შეყვანილი (Swanson… 2005). გარდა ამისა, იგი საკარანტინო მიკროორგანიზმია დიდ ბრიტანეთში, ევროკავშირის მრავალ ქვეყანაში და მათ შორის საქართველოშიც. საინტერესო შედეგი გამოვლინდა *R. solanacearum* KoT47 ანალიზისას. ამ იზოლატის

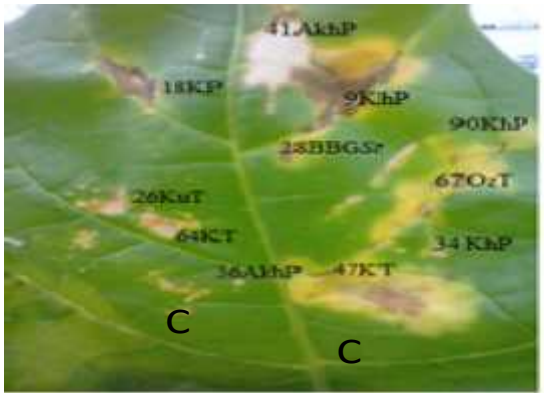


სურათი 14. *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატებისა და სხვასხვა წარმოშობის რეფერენს შტამებისგან შექმნილი ფილოგენეტიკური ხე

მცენარიდან (იხილეთ დანართი1). მათ შორის ინფიცირებული კარტოფილის ნიმუშებიდან გამოყოფილი იყო *R. solanacearum* 56 იზოლატი (მთლიანი რაოდენობის 55%). პომიდორიდან - 26 იზოლატი (25,7%), წიწაკიდან მიღებული იზოლატების პროცენტული რაოდენობა შეადგენდა - (11,8%), ბადრიჯნიდან - (0.9%) და დეკორატიული მცენარეებიდან - (5.9%).

1.5. ჰიპერმგრძნობელობითი რეაქცია

შეგროვილი ნიმუშების გამოკვლევის მიზნით, ჩავატარეთ ჰიპერმგრძნობელობითი რეაქცია თამბაქოს ფოთოლზე, ზემოთ აღწერილი მეთოდის მიხედვით (იხ 2.4. თავი). ჩვენს მიერ მოპოვებული მასალიდან *R. solanacearum* -ის 101 იზოლატი ავლენდა მაღალ ჰიპერმგრძნობელობით რეაქციას, რომლებზეც გავაგრძელეთ შემდგომი კვლევები (სურათი 6).



სურათი 6. *R. solanacearum* -ის იზოლატების ჰიპერმგრძნობელობითი რეაქციის შედეგი თამბაქოს ფოთოლზე

1.6. *Ralstonia solanacearum*–ის ქართული შტამების იდენტიფიცირება ელექტრონული მიკროსკოპის საშუალებით

Ralstonia solanacearum–ის ქართული შტამების უჯრედების მორფოლოგიისა და ზომების შესასწავლად განვახორციელეთ ბაქტერიული კულტურებიდან მომზადებული პრეპარატების ელექტრონული მიკროსკოპირება, გამჭოლი ელექტრონული მიკროსკოპი JEM 100SSX (Jeol)-ის გამოყენებით, ელიავას გ. მიკრობიოლოგიის, ვირუსოლოგიისა ბაქტერიოფაგიის ინსტიტუტში.

შედეგებმა გვიჩვენა, *R. solanacearum*–ის ქართული იზოლატებში მორფოლოგიური ვარიაბელობა. შეინიშნებოდა დიდი და პატარა ზომის ჩხირისებური, მომრგვალებულ ბოლოებიანი ფორმები, რომელთა ზომების მაჩვენებლები იყო: სიგრძე - 1,8-1,24 მკმ, სიგანე -0,8 -1მკმ. 2-6მკმ -ის სიგრძის პოლარული შოლტი (ერთი ან ორი) (Anonymous, 1998; EU, 1998; Anonymous, 2006), (სურათი 7).

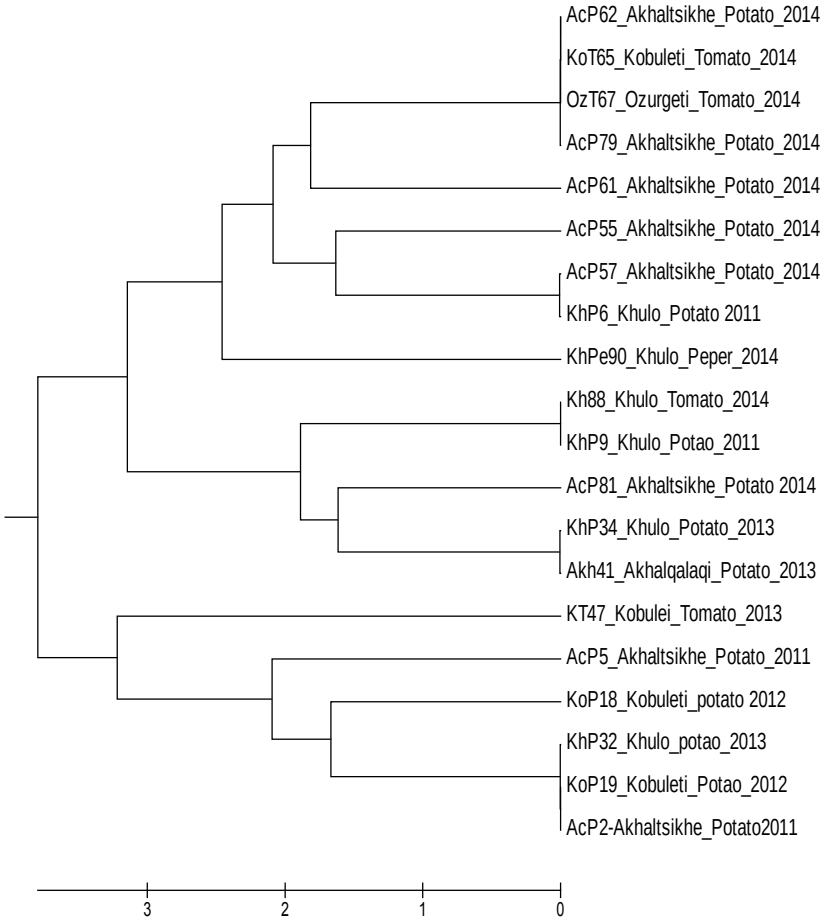
სურათი 7. *R. solanacearum* - ის იზოლატების KoPe19 (A), AcP5 (B) ელექტრონული მიკროსკოპირების სურათი (მიკროსკოპი JEM 100SX (Jeol))

ამრიგად, ელექტრონული მიკროსკოპირებისას ნათლად გამოიკვეთა ქართული პოპულაციის მორფოტიპი, რომ თითოელული არის მომრგვალებულ ბოლოებიანი ერთი ან ორი პოლარული შოლტის მქონე დიდი და პატარა ზომის უჯრედები.

ვლინა ქართული ფილოგენეტიკური ჯგუფების წარმომავლობა და რაობა.

კვლევაში გამოვიყენეთ FERA -ს მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიის საცავში არსებული *R. solanacearum* სტანდა-რტული შტამების შესახებ მონაცემები http://ncppb.fera.defra.gov.uk/. გარდა ამისა, მოვახდინეთ ჩვენი დასექვენირებული ნიმუშების შედარება გენბანკში უკვე შესწავლილი და რეფერირებული *R. solanacearum* - ის შტამებთან http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast, რომლებიც სხვადსხვა ფილოტიპურ ჯგუფს მიეკუთვნება (დანართი 2).

გავაერთიანეთ შტამების სექვენსების მონაცემები (დანართი 9) და შედარებითი ანალიზისათვის ავაგეთ ფილოგენეტიკური ხე (სურათი 14).



სურათი 13. *R. solanacearum*-ის ქართული იზოლატების ფოლოგენეტიკური ხე, აგებული UPGMA კლასტერული მეთოდით, სექვენირებული ენდოგლუკონაზა გენის მონაცემების საფუძველზე

ჩვენი კვლევის შედეგები შევადარეთ გლობალურ მონაცემებთან (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast) რათა, გამოგვე-

1.7. *R. solanacearum*-ის შტამების ფენოტიპური იდენტიფიკაცია

R. solanacearum-ის შტამების ფენოტიპური იდენტიფიკაცი-ისათვის შევისწავლეთ მათი მორფოლოგიურ - ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური მახასიათებლები.

პათოგენის კულტურალურ - მორფოლოგიური და ბიოქიმიური პროფილის შესწავლისას გამოვლინდა, რომ ჩვენი საკვლევი იზოლატების ბიოქიმიური მახასიათებლები მსგავსი იყო *R. solanacearum* - ის ტიპიური შტამებისა, რაც გულისხმობდა იდენტობას, უკვე არსებულ შესწავლილ შტამებთან (Hossain... 2007). კერძოდ, ყველა ქართული იზოლატი იყო გრამ უარყოფითი, რასაც ადასტურებდა 3%-იანი KOH –ის ტესტის შედეგები, იყვნენ კატალაზა და ოქსიდაზა დადებითი, ახასიათებდათ გლუკოზის ფერმეტული ჟანგვა მხოლოდ ჟანგბადიან პირობებში, რაც გამოვლენილი იქნა ჰიუ-ლეიფსონის ტესტით. იზოლატები კარგად იზრდებოდნენ 1%-იანი NACl-ის შემცველ არეში, ხოლო 2%-იანი NACl თრგუნავდა იზოლატების უმეტესობის ზრდას, (AcP98; OzT85; AkhP79; SaGhT68; AcP61). ცნობილია, ბაქტერიის უარყოფითი დამოკიდებულება მარილიანი არისადმი (Saddler 1994). *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატები არ იზრდებოდა 41 ^{0}C -ის და 4^{0}C -ის ტემპერატურაზე, რაც ასევე საკვლევი პათოგენის ერთ-ერთი მახასიათებელია (Bradbury 1986).

ბიოვარების გამოვლენის მიზნით, შევისწავლეთ სატესტო იზოლატების მერ შაქრებისა და სპირტების უტილიზაციის უნარი. შედეგებმა აჩვენა რომ, *R. solanacearum* - ის ქართული პოპულაცია შედგება შაქრებისა და სპირტების მიმართ განსხვავებული ათვისების უნარის მქონე იზოლატებისგან. კერძოდ, იზოლატები შეიძლება დავყოთ ორ ჯგუფად: I - შტამები, რომლებიც ახდენენ ოქსიდაციას დისაქარიდებისა (ლაქტოზა, მალტოზა, ცელობიოზა) და სპირტებისა (მანიტოლო, დულციტოლი, სორბიტოლი). II - შტამები, რომელებიც აითვისებენ მხოლოდ შაქრებს და არ გააჩნიათ აღნიშნული სპირტების ოქსიდაციის უნარი. რიგი

მეცნიერთა მიერ შემუშავებული სქემაზე დაყრდნობით (Hayward 1964; He...1983) and Kumar... 1993) I ჯგუფს მიეკუთვნებიან ბიოვარ 3-ის იზოლატები, ხოლო II ჯგუფში შედიან ბიოვარ 2 -ის შტამები (ცხრილი #1).

***R. solanacearum*-ის ქართული იზოლატების ბიოვარებად კლასიფიკაცია.**

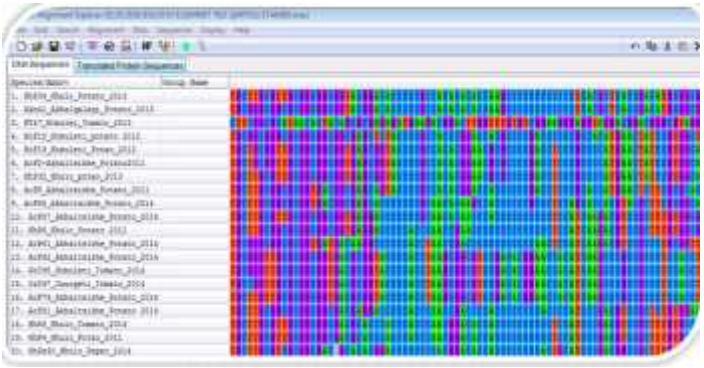
ცხრილი #1

ჯგუფი	*Ralstonia solanacearum* იზოლატი #	ლაქტოზა	მალტ-ოზა	ცელობიოზა	მანიტოლი	სორბიტოლი	დულციტოლი	ბიოვ-არი
I	KoP11, KoP12 KuT26, ChkhT27, BBG.*Str*.28, Ko*Pel*.29, NiP43, KoP45, KoT46, KoT47, KoT48, KoT49, KeT51,	+	+	+	+	+	+	3
II	AcP1, AcP2, AcP3, AcP4, AcP5, AcP6, KhP7, KhP8, KhP9,KhP10,KoP13,KoP14, GoP15, KoP16, KoP17, KoP18, KoPe19, KoP20, KoP21,TsP22, TsP23, TsP24, KoT25, KoP30, KoEg3, KhP32, KhP33, KhP34, KhP35, AkhP36, AkhP37, AkhP38, AkhP39, AkhP9, NiP40, AkhP41, AkhP42, AkhP44, KoGhT50, KhT52, AcP55, AcP56, AcP57, AcP58, AcP59, AcP60, AcP62, KoP63, KoT64, OzT66, OzT67, SaGhT68, SaGhT69, SaGhT70, AkhP77, AkhP78, AkhP79, AkhP80, AkhP81, BBG.*Str*.84, OzT85, OzT87, KhT88, KhPe90, KhPe91, KeT92, KeT95, KheT96, KoP97, AcP98, KePe99, AkhP100, AkhP101	+	+	+	-	-	-	2

"ფენოტიპური კონვენსია" -ის Penotypic convevce (PC) სახელით არის ცნობილი. ეს მუტაციები გამოიხატება ვირულენტური თვისებების ტრანსფორნმაციით არავირულენტურში. გენეტიკური ცვლილება ასახვას ჰპოვებს ფენოტიპურად, რაც მდგომარეობს ლორწოვანი, მუკოიდური კოლონიების, არავირულენტურ მშრალ და არამუკოიდურ ფორმებად გარდაქმნაში. ამ მოვლენას ხშირად ჰქონდა ადგილი ბაქტერიოლოგიური კვლევების მიმდინარეობისას ჩვენს ლაბორატორიაში.

შესწავლილი ნიმუშების ფილოგენეტიკურმა ანალიზმა გვიჩვენა რომ, *R. solanacearum* - ის იზოლატეები - KP19, KT65, KhP34, OzT67 სექვენსური თანმიმდევრობით იყვნენ ერთმანეთის მსგავსი, ამიტომ დალაგდნენ ახლოს. *R. solanacearum* KHP6 და *R. solanacearum* AcP57 კი, დაჯგუფდნენ ერთ კლასტერში, რადგან ახასიათებდათ მსგავსი ვარიაბელური უბნები. ერთმანეთის მსგავსი აღმოჩნდა ნიმუში KhT88 და KhP9, ხოლო იზოლატები KhP34, Akh41 ერთმანეთის (სურათი 11). ზოგადად, გაანალიზებული იზოლატების უმრავლესობა ერთ დიდ კლასტერულ ჯგუფში გაერთიანდნენ ხოლო, ერთი შტამი *R. solanacearum* KoT47 აღმოჩნდა სრულიად განსხვავებული, რაზეც მეტყველებს სტატისტიკური მონაცემები. მიღებული კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ჩვენს მიერ შეწავლილი *R. solanacearum* ქართული იზოლატები წარმოადგენენ ორ სხვადსხვა პოპულაციას. მიღებული შედეგების ნუკლეოტიდური სექვენსების გაანალიზება მოვახდინეთ კომპიუტერული პროგრამა MEGA6 უზრუნველყოფით. სექვენირებულ ქართულ იზოლატებს შორის ევოლუციური კავშირის დასადგენად, ავაგეთ ფილოგენეტიკური ხე (სურათი 13).

შედარებითი ანალიზი. სურათი 10 ნათლად წარმოაჩენს ქართულ იზოლატებს შორის არსებულ მსგავსება - განსხვავებებს ნუკლეოტიდური მიმდევრობის მიხედვით. *R. solanacearum* KoT47, რომლის მასპინძელია პომიდორი, ხოლო გავრცელების ადგილი - ქობულეთი, სრულიად განსხვავდება დანარჩენი იზოლატებისგან. პირველი ტრიპლეტის ნუკლეოტიდური ფუძეების თანმიმდე-ვრობა ყველა ნიმუშში მსგავსია და წარმოდგენილია თიმინით, გუანინით და ციტოზინით (TGC), მაშინ როცა ნიმუშ KoT47-ის შემთხვევაში ის სრულიად განსხვავებულია თანმიმდევრობით ციტოზინი, თიმინი, თიმინი (CTT) (სურათი 12). იზოლატი KhP34 და AKh41 ძალიან ახლოს არიან, ასევე *R. solanacearum* KoP18, KoP19, AcP2 და KhP32 მსგავსი არიან ნუკლეოტიდური უბნების მონაცვლეობით.



სურათი 12. დასექვენირებული ქართული იზოლატების ნუკლეოტიდური თანმიმდევრობის შედარებითი ანალიზი.

პოპულაციის შიგნით ადგილი ჰქონდა ვარიაბელურ უბნებს, რომელთა სიხშირე ძალიან დაბალია. გამოვლენილი მუტაციები შესაძლებელია ახსნილი იყოს ბაქტერიული პათოგენისათვის დამახასიათებელი თვისებით, რომელიც ლაბორატორიულ პირობებში პათოგენის ხშირი კულტივირებისას ვლინდება და

1.8. *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატების პათოგენობის ტესტის შედეგები

ქართული პოპულაციის რასობრივი შემადგენლობის განსაზღვრის მიზნით ჩვენს მიერ ჩატარებულ იქნა პათოგენობის ტესტი, რომელიც ითვალისწინებდა საქართველოს სხვადსხვა რეგიონში შეგროვილი *R. solanacearum* - ის იზოლატების პათოგენობის დადგენას სხვადსხვა მასპინძელი მცენარეების მიმართ. ცდები ჩატარებული იყო ფიტოპათოლოგიისა და ბიომრავალფეროვნების ინსტიტუტის სათბურის ბაზაზე და ასევე დიდი ბრიტანეთის სურსათისა და გარემოს კვლევის ლაბორატორიის (FERA) სათბურში (სურათი 8). პათოგენობის ტესტები განვახორციელეთ შემდეგ მცენარეებზე: კარტოფილი (*Solanum tuberosum),* პომიდორი (*Lycopersicon esculentum),* ბადრიჯანი *(Solanum melongena),* წიწაკა *(Capsicum annum)* და თამბაქო (*Nicotiana tabacum).* აღნიშნული მცენარეები გაზრდილი იყო სტერილურ ნიადაგიან ქოთანში. ინოკულაციას ვახორციელებდით მცენარის სამი - ოთხი ჭეშმარიტი ფოთლის სტადიაზე, ღეროში ჩხვლეტის მეთოდით (სურათი 6), (Winstead and Kleman, 1952).

სურათი 8. ინოკულაცია ინფექციური მასალით (*R. solanacearum*-ის სუსპენზია) კარტოფილის მცენარეზე

პათოგენურების ცდის მიმდინარეობაზე დაკვირვებამ გვიჩვენა, რომ საწყისი დაავადების ნიშნები, მაღალ მიმღებიან მცენარეებში ჩნდებოდა ინოკულაციიდან 5-8 დღის შემდეგ და თავდაპირველად გამოიხატებოდა იმ ფოთლებზე და ღეროს ნაწილზე, რომელთა დასნებოვნებაც მოხდა. კოხის კლასიკური პოსტულატების თანახმად (http://www.life.umd.edu/) მცენარის სიმპტომური ნაწილიდან ვახდენდით პათოგენის რეიზოლოცაიას და მის შემდგომ იდენტიფიცირებას კლასიკური და მოლეკულური ბიოლოგიის მეთოდების გამოყენებით (Kelman 1954; Pastrik... 2000). ჩატარებული ცდის შედეგები საფუძველს გვაძლევს, ჩვენს მიერ შესწავლილი *R. solanacearum*-ის იზოლატები დავაჯგუფოდ ორ ჯგუფად პათოგენობის მიხედვით. პირველ ჯგუფში გავაერთიანეთ იზოლატების შედარებით დიდი რიცხვი, რომლებიც მაღალვირულენტურია კარტოფილის, პომიდორის მიმართ. ამავე დროს დაბალ ან საშუალოდ ვირულენტურია ბადრიჯანის და წიწაკის მიმართ, ხოლო თამბაქოს მიმართ არ ავლენენ ვირულენტობას. მე - 2 ჯგუფი წარმოდგენილია იზოლატებით, რომლებიც მაღალ, ან საშუალოდ ვირულენტურია კარტოფილისა და პომიდორის მიმართ და დაბალ ვირულენტურია, წიწაკისა და თამბაქოს მიმართ. პირველ ჯგუფში გაერთიანებული შტამები მიეკუთვნება რასა 3 ბიოვარ - 2 -ს, ამას ადასტურებს მასპინძელი მცენარეების მხრიდან გამოვლენილი რეაქციაც, რადგან ამ შტამების მიმართ მაღალმიმღებიანობა ყველაზე მეტად ახასიათებს კარტოფილს და პომდორს. მაშინ როდესაც, მეორე ჯგუფის შტამებს აქვთ მასპინძელ მცენარეთა ფართო სპექტრი და მიეკუთვნებიან რასა 1- ს.

ამრიგად, რასების დადგენის მიზნით, განხორციელებულმა სათბურის ცდებმა გვიჩვენა რომ *R. solanacearum*–ის ქართული პოპულაცია შედგება ძირითადად ორი რასისგან. ეს არის რასა 3, რომელსაც ეკუთვნის ბიოვარი 2 -ის იზოლატები და რასა 1, რომელიც აერთიანებს ბიოვარ 3-ის იზოლატებს.

11	AcP61	ახალციხე, სოფ: მსხვირისი N1მინდორი	კარტოფილი	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
12	AcP62	ახალციხე, სოფ: მსხვირისი N2 მინდორი	კარტოფილი	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
13	AcP57	ახალციხე, დაბა წნისი, ელკანას საცდელი მეურნეობა.	კარტოფილი ჯიში პიკასო	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
14	KoT65	ქობულეთი, სოფ. ხუცუბანი	პომიდორი	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
15	OzT67	ოზურგეთი, სოფძიმისი	პომიდორი	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
16	AkhP79	ახალქალაქი, „აგრო ქართუს“ საცდელი ნაკვეთი	კარტოფილი ჯიში იმპალა	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
17	AkhP81	ახალქალაქი, სოფ: რუსთავი, N2 მინდორი	კარტოფილი	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
18	KhT88	ხულო სოფ. ქედლები	პომიდორი	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
19	KhPe90	ხულო სოფ.დეკანოს იძეები	წიწაკა	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
20	KoT47	ქობულეთი	პომიდორი	2013	ფილოტიპი I	რასა 1

ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა *Egl* –გენის სტუქტურის საფუძველზე, გამოგვევლინა *R. solanacearum* - ის ქართული პოპულაციის შიდასახეობრივი მრავალფეროვნება. სექვენირებული ნიმუშების მონაცემები გავაერთიანეთ და მოვახდინეთ მათი

კვლევა განვაგრძეთ იმ ნიმუშებზე, სადაც თვალსაჩინო იყო, *Egl* -ის ამპლიფიკაცია, შემდეგ ვახდენდით პჯრ პროდუქტის გასუფთავებას და სექვენირებას. იზოლატების სია შესაბამისი ფილოგენეტიკური მახასიათებლებით მოცემულია მე -2 ცხრილში.

ფილოგენეტიკურად შესწავლილი *R. solanacearum*-ის ქართული იზოლატების სია

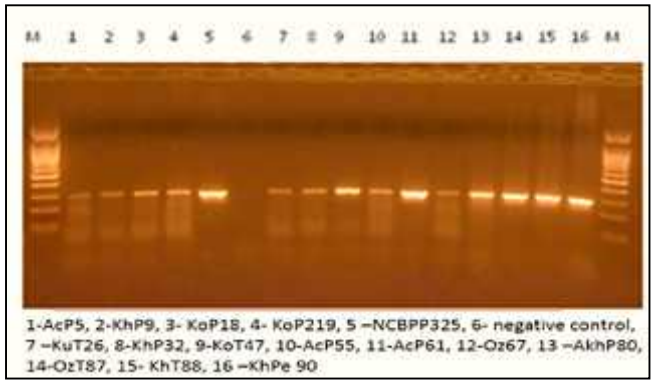
ცხრილი #2

#	იზოლატი	შემთხვევის ადგილი	მასპინძელი მცენარე	შემთხვევის დრო	ფილოგენეტიკური ჯგუფი	რასა / ბიოვარი
1	AcP2	ახალციხე	კარტოფილი, ჯიშიმარაბელი	2011	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
2	AcP5	ახალციხე	კარტოფილი ჯიში ჯელი	2011	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
3	KhP6	ხულო	კარტოფილი ჯიში პიკასო	2011	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
4	KhP9	ხულო	კარტოფილი ჯიში მარფონა	2011	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
5	KoP18	ქობულეთი, ინსტიტუტის, საცდელი ნაკვეთი	კარტოფილი ჯიში მარფონა	2012	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
6	KoPe19	ქობულეთი	წიწაკა	2012	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
7	KhP32	ხულო	კარტოფილი ჯიში ვიქტორია	2013	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
8	KhP34	ხულო	კარტოფილი, ჯიში დეზირე	2013	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
9	AkhP41	ახალქალაქი	კარტოფილი	2013	ფილოტიპი I I	რ3/ბII
10	AcP55	ახალციხე, დაბა წნისი	კარტოფილი, ჯიში იმპალა	2014	ფილოტიპი I I	რ3/ბII

1.9. *R. solanacearum*–ის ქართული იზოლატების იდენტიფიცირება პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) მეთოდით

R. solanacearum – ის მიღებული იზოლატების გენეტიკური იდენტიფიკაციისათვის ვიყენებდით სახეობა - სპეციფიურ, პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (პჯრ) მეთოდს. იდენტიფიკაცია მოვახდინეთ *R. solanacearum*–ის „უნივერსალურ“ სპეციფიკურ პრაიმერების წყვილით OLI_1/Y_2. დადებით კონტროლად გამოყენებული იყო სტანდარტული შტამი კოლექციიდან NCPPB (National Collection of plant pathgenic Bacteria) *R. solanacearum* - 325. უარყოფით კონტროლად ვიყენებდით დისტილირებულ წყალს. დნმ ის ფრაგმენტების ზომის მარკერად გამოყენებული იყო 100bp დნმ ის კიბე (PLUS BLUE DNA Ladder).

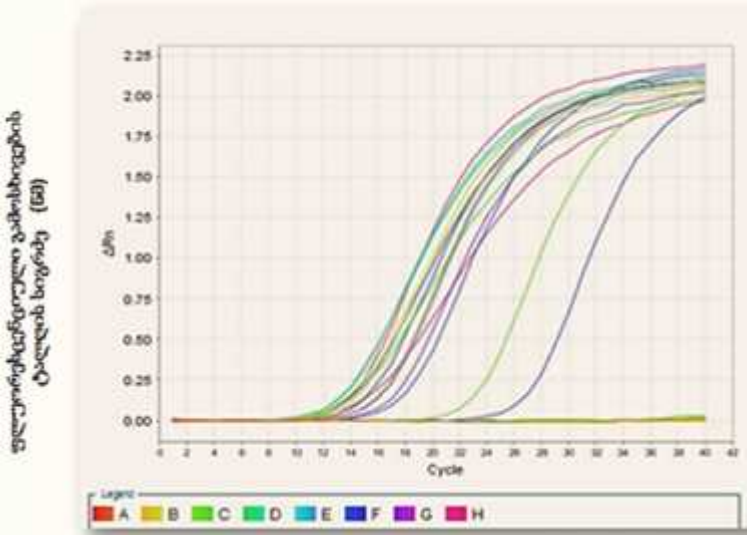
ამპლიფიცირებული პროდუქტების ვიზუალიზაციას ვახდენდით ელექტროფორეზით 1,5%- იან, 0.5მგ/მლ. აგაროზის გელში ეთიდიუმ ბრომიდის დამატებით (Pastrik... 2000). მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ საცდელი შტამების დნმ-ის ფრაგმენტის ზომები შეესაბამებოდა *R. solanacearum* - ის რეფერენტ შტამის ბენდის ზომას (სურათი 9).



სურათი 9. OLI_1/Y_2 პრაიმერებით *R. solanacearum*-ის ქართული იზოლატებიდან გამოყოფილი ამპლიფიცირებული დნმ-ების ელექტროფოროგრამება

ჩვენს მიერ შეგროვილ *R. solanacearum*–ის ქართულ იზოლატებზე კვლევები გავაგრძელეთ FERA -ს მოლეკულური ბიოლოგიის ლაბორატორიის ბაზაზე. იზოლატების დიაგნოსტირებასვაგრძელებდით რეალურ დროის პოლიმერაზული ჯაჭვური რეაქციის (Real-Time PCR), TaqMan® -ის მეთოდით.

მიღებულმა ცდის შედეგმა აჩვენა (სურათი 10), რომ *R. solanacearum* შტამების მაქსიმალური ფლუორესცენციული გამოსხივების ინტენსივობა შეესაბამებოდა ამპლიფიკაციის მრუდზე 1.5 დან 2.2-მდე ნიშნულს, რაც მიუთითებდა, დადებით შედეგზე.



სურათი 10. *R. solanacearum* - ის დნმ-ს ექსპონენციალური ზრდის მრუდი, ამპლიფიკაციის ციკლების ზრდასთან ერთად.

ამრიგად, განხორციელებული ექსპერიმენტით, კიდევ ერთხელ დადასტურდა ჩვენს მიერ შეგროვებულ ნიმუშებში *R. solanacearum* - ის არსებობა.

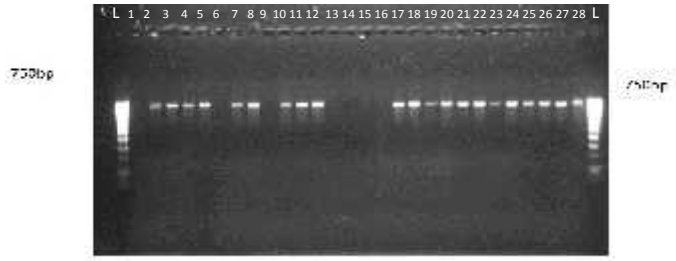
1.10. *R. solanacearum* - ის ქართული იზოლატების ენდოგლუკონაზა (Egl) გენის სექვენირება

სექვენირების შედეგად მიღებული იქნა საშუალოდ 3.772.955 თანმიმდევრობა, 7.551.697 ფრაგმენტის სახით.

R. solanacearum - ის ქართული იზოლატების გენეტიკური პროფილის დასახასიათებლად ჩვენთვის მეტად საინტერესო იყო პათოგენურობის განმსაზღვრელი - ენდოგლუკონაზა გენის შესწავლა, რადგან ეს გენი მეტად სპეციფიკურია ჩვენი კვლევის ობიექტისათვის და როგორც ლიტერატურული წყაროებიდან ცნობილია, წარმოადგენს ბაქტერიის ვირულენტობის განმსაზღვრელ ერთ-ერთ ფაქტორს და წარმოაჩენს სახეობის შიგნით გენეტიკურ მრავალფეროვნებას (Saile... 1997).

ენდოგლუკონაზა გენის იდენტიფიკაციისათვის გამოვიყენეთ პრაიმერების წყვილი Endo–F (5'-ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC-3') და Endo-R (5'-GCGTTGCCCGGCACGAACACC-3').

არსებული პროტოკოლის თანახმად პჯრ-ის შედეგად უნდა ამპლიფიცირებულიყო *Egl* –გენის 750bp ზომის უბანი (სურათი 9).



L - დნმ ის ფრაგმენტების ზომის მარკერი. ნიმუშების განაწილება გელზე: 1-,ნეგატიური კონტროლი. 2 –ACP2; 3-ACP5; 4- KHP6; 5-KHP9; 6- KHP10; 7- KOP18; 8-KOPE19; 9 -KOP14 ; 10-KHP32; 11-KHP34; 12 -AKHP41; 13-KUT26 ; 14-KHP33; 15-ACP60; 16-OZPE72; 17- ACP55; 18- ACP61; 19- ACP62; 20- ACP57; 21-KOT65; 22- OZT67; 23- AKHP79; 24-AKHP81; 25- KHT88; 26- KOT47; 27 -NCBPP 325, 28-NCPPB4211

სურათი 11. *R. solanacearum*–ის ენდოგლუიკონაზა გენის შესაბამისი ამფლიპიცირებული ფრაგმენტის ელექტროფოროგრამა