მცენარეთა დაცვა
Plant protection

ხორბლის რიზოსფეროს არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოების შესწავლის მეთოდოლოგია

ს. შანიძე-აგრარულ მეცნიერებათა ფაკულტეტის მაგისტრანტი,
ნ. ბიწაძე-სოფლის მეურნეობის მეცნიერებათა კანდიდატი,
საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტი.

საკვანძო სიტყვები: ენდომიკორიზა, მიკროსკოპია, შეღებვა, ვიზუალიზაცია.

რეფერატი

აგროეკოსისტემების უმეტესობაში მიკორიზული სოკოები ნიადაგის მიკობიოტის ძირითადი კომპონენტია და აღნიშნულია მცენარეთა სახეობების 90%-ის ფესვებზე. ცნობილია, რომ ისინი განაპირობებენ მინერალური ნივთიერებების აბსორბციას და ტრანსლოკაციას ნიადაგიდან მასპინძელ მცენარეზე და იწვევენ ტოლერანტულობის გაზრდას ბიოტური და აბიოტური ფაქტორების და სტრესების მიმართ. საქართველოში მცენარეების მიკოტროფულობის შესწავლა მე-20 საუკუნის მეორე ნახევრიდან დაიწყო. ქართველ მეცნიერთა მიერ აღწერილია სხვადასხვა მცენარის ფესვების კოლონიზაცია არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოებით. თუმცა, ნაკლებად არის შესწავლილი სოკოების ბიომრავალფეროვნება, რადგან არ ყოფილა სოკოს სპორების ნიადაგიდან გამოყოფის მცდელობა.

წინამდებარე სტატიის მიზანი იყო ხორბლის რიზოსფეროდან არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოს სპორების გამოყოფის და მცენარის უჯრედშიდა სტრუქტურების ვიზუალიზაციის გამარტივებული მეთოდიკის შემუშავება, რომელიც წარმატებით იქნა გამოყენებული ხორბლის რიზოსფეროს მიკორიზული სოკოების შესასწავლად. აღწერილი მეთოდიკით მოხერხდა არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოების ექსტრარადიკალური ჰიფების და ქლამიდოსპორების გამოყოფა, ასევე, ფესვის ქსოვილებში გავრცელებული სოკოს ინტრაცელულარული მიცელიუმის და ვეზიკულების გამოვლენა და ფოტოდოკუმენტაცია.

საკითხის აქტუალობა

არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოები ბუნებრივი და სოფლის მეურნეობის ეკოსისტემების მნიშვნელოვან კომპონენტს წარმოადგენს, რადგან ისინი სიმბიოზურად არიან დაკავშირებულები ხმელეთის მცენარეების უმრავლესობის ფესვებთან. ისინი ობლიგატური სიმბი-\ონტები არიან და მცენარეების 80%-94% თან არიან დაკავშირებულები (Smith & Read, 1997; Brundrett, 2009). მიკორიზულ ასოციაციებში სოკო ახდენს მასპინძელი მცენარის ფესვების ქსოვილების კოლონიზაციას. ეს სიმბიოზი ხელს უწყობს მცენარისთვის საკვები ნივთიერე-ბების მიწოდებას და ზრდის აბიოტური სტრესების მიმართ ტოლერანტობას. (Smith & Read, 2009).

არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოები ობლიგატური სიმბიონტი ორგანიზმებია Glomero-mycota-ს ტიპიდან, ამის გამო მათი გამოყოფა ხელოვნურ საკვებ არეზე შეუძლებელია და მათი შესწავლა მხოლოდ მათთან ასოცირებულ მცენარეების რიზოსფეროშია შესაძლებელი.

მცენარეების და სოკოების სიმბიოზის შესახებ პირველი კვლევები 1840-იანი წლების ევროპაში დაიწყო და დღესაც აქტუალურია, რადგან მათ დიდი გავლენა აქვთ მცენარის კვებასა და ზრდა-განვითარებაზე. მიკორიზული სიმბიოზის შესწავლა და უკეთ გაგება ბიოლოგიის, ეკოლოგიის და სოფლის მეურნეობის მნიშვნელოვანი გამოწვევაა (Smith & Read, 2008). საქართველოში მიკორიზებისა და მცენარეების სიმბიოზის კვლევა მე–20 საუკუნის 1950-იან წლებში დაიწყო (სამხარაძე, 1956). საქართველოში შესწავლილია სხვადასხვა მცენარის: ტუნგის ხის (სამხარაძე 1956), კეთილშობილი დაფნის (სანიკიძე, 1968), საქართველოს მთის ალპური ზონის მცენარეების (ბალახოვან მცენარეთა 850 სახეობის) (ნოზაძე 1979), კარტოფილის (მინდიაშვილი, 1979) მიკოტროფულობა და არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოების გავლენა

ციტრუსების და კურკოვანი ხეხილის ზრდაზე და ჭურჭლოვანი ქსოვილების პათოგენებისადმი გამძლეობაზე (მშვიდობაძე, 2002, 2004, 2009). თუმცა, არ მოგვეპოვება ინფორმაცია საქართველოში არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოების ნიადაგი-დან გამოყოფა-იდენტიფიცირების შესახებ (Rożek et al, 2018).

საქართველოს სასოფლო-სამეურნეო კულტურათა მიკორიზულ სოკოებზე დამოკიდებულების შესწავლა მათი აგრო-ეკოლოგიის შესწავლის მნიშვნელოვანი ნაწილია.

წინამდებარე სტატია მიზნად ისახავს აღწეროს რიზოსფეროდან არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოს სპორების გამოყოფის და მცენარის უჯრედშიდა სტრუქტურების ვიზუალიზაციის მეთოდიკა, რომელიც წარმატებით იქნა გამოყენებული ხორბლის რიზოსფეროს მიკორიზული სოკოების შესასწავლად.

მასალები და მეთოდები

არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოს სტრუქტურების გამოსაყოფად შეირჩა საქართველოს აგრარული უნივერსიტეტის გენეტიკური ბანკის ბაზა, მცხეთის მუნიციპალიტეტში, სოფელ მუხრანის ტერიტორიაზე. 2017 წლის შემოდგომაზე შეგროვდა მცენარეთა გენეტიკური ბანკის ხორბლის ქართული სახეობების რიზოსფეროს ნიადაგი, 200-400 მლ მოცულობით.

არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოების გამოყოფა ნიადაგიდან.

სოკოს სპორების გამოსაყოფად გამოყენებული იქნა სველი გაცრის მეთოდი (Powell at al. 1984) მცირეოდენი ცვლილებებით. ეს მეთოდი გულისხმობს განსხვავებული ზომის საცრების საშუალებით წყლის ჭავლის ქვეშ ნიადაგის გაცრას. ნიადაგიდან ნიმუშის მისაღებად მცენარის ფესვები და რიზოსფეროს ნიადაგი მშრალად დაქუცმაცდა როდინით. მიღებული მასიდან 50 მლ ნიმუში გაიცრა სველი მეთოდით. ამისთვის სულ მცირე ორ საცერი, საუკეთესო შემთხვევაში კი ოთხი (0.5მმ, 0.25მმ, 0.1მმ და 0.04მმ) ლაგდება ისე, რომ ყველაზე ფართო ფორებიანი საცერი იყოს ყველაზე ზემოთ, ხოლო ყველაზე მცირე ფორებიანი ყველაზე ქვემოთ. ყველაზე ზედა საცერში მოთავსდა ნიმუში და გამდინარე წყალით, ჩაირეცხა ნიადაგის ფრაქციები, ფესვის ნაგლეჯები და სპორები. სველი გაცრა გრძელდებოდა, საცრების რიგიდან გამოსული წყლის გასუფთავებამდე. საცრებიდან ამოღებული ფესვების ნაწილები შესაღებად იქნა გამოყენებული. დარჩენილი ნიადაგის მასას გადატანილი იქნა ცენტრიფუგის სინჯარაში (50მლ).

სპორების გამოსაცალკევებლად ნიადაგის ფრაქციებისგან გაცრილი ნიადაგი მოთავსდა ცენტრიფუგის სინჯარებში და შეივსო ბოლომდე 60%-იან საქაროზის ხსნარით. ცენტრიფუგირება მოხდა წუთში 2000 ბრუნის სიმძლავრით, 2 წუთის განმავლობაში. ცენტრიფუგირების შემდეგ ნიადაგის ფრაქციები დაილექა ჭურჭლის ფსკერზე, ხოლო სპორები და სხვა ორგანული მასა ტივტივებდა ხსნარის ზედაპირზე.

ხსნარში მოტივტივე სპორები ფრთხილად იქნა გადატანილი 0,4 მმ საცერზე და შაქრის მოსაშორებლად გაირეცხა გამდინარე წყალში, 1 წუთის განმვლობაში. ამის შემდეგ საცრიდან სპორები გადატანილი იქნა ბიუხნერის ფილტრში და ვაკუუმის საშუალებით გაიფილტრა (ფილტრის ქაღალდზე, ან ნეილონის დოლბანდზე). გაფილტრვის შედეგად ფილტრის ქაღალდზე დარჩენილი მშრალი სპორები მოთავსდა სასაგნე მინაზე მიკროპი-პეტით და შესწავლილი იქნა ბიოლოგიური მიკროსკოპის საშუალებით, 400X გადიდების პირობე-ბში.

ფესვების შეღებვა.

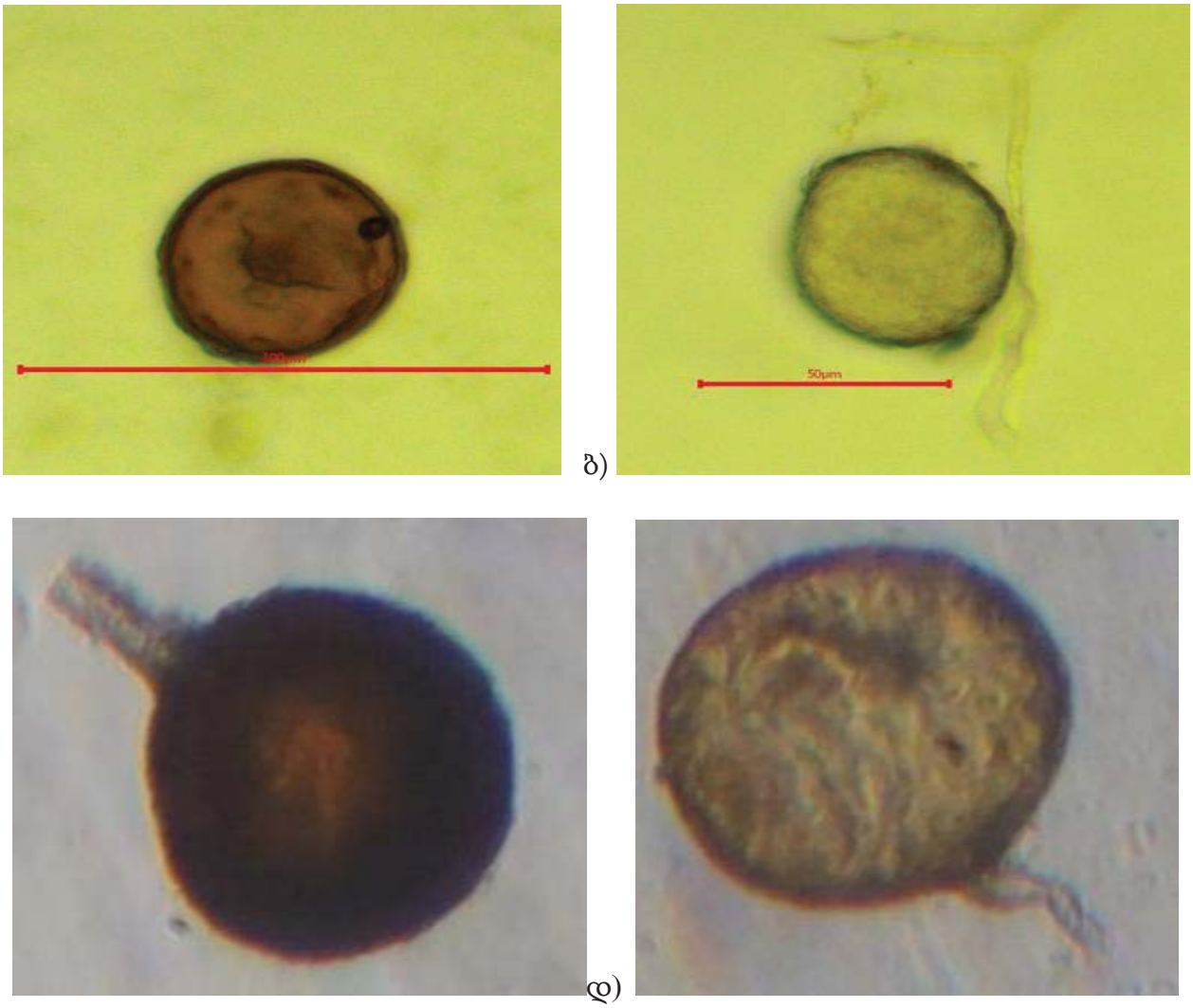
მცენარეების მიკოტროფულობის შესწავლისათვის გამოყენებული იქნა ფესვების მაცერაციის და შეღებვის მეთოდი (Vierheillig (1998) და Walker (2005) მცირეოდენი სახეცვლილებებით. გამოყენებული მეთოდი სხვადასხვა ავტორებთან ერთმანეთისაგან განსხვავდება მაცერაციის ხსნარში კალიუმის მწვავე ტუტის პროპორციით, მაცერაციის დროით და შესაღებად გამოყენებული საღებავით, თუმცა მსგავს შედეგს იძლევა და მიკორიზული სოკოს ენდოფიტურ სტრუქტურებს მიკროსკოპით შესამჩნევს ხდის. მიკორიზიანი ფესვების შესაღებად გამოყენებული იქნა KOH–ის 10%-იანი ხსნარი, 10% ძმარმჟავის ხსნარი, მელანი გაზავებული 10% ძმარმჟავით. ქიმიური დამუშავების წინ, მიწის ნაწილაკებისაგან გასათავისუფლებლად ფესვები გაირეცხა გამდინარე წყალში, გარეცხილი ფესვებიდან შესაღებად შეირჩა საშუალო სისქის ფესვები. ფესვები დაიჭრა ისე, რომ თითო ნიმუშის წონა არ აღემატებოდა 2 გრამს. უჯრედების შიგთავსის გამოსარეცხად ფესვები დამუშავდა KOH -ის 10% -იანი ხსნარით, 12 საათის

განმავლობაში. ტუტით დამუშავებული ფესვები 5 წუთით ჩაიდო 10%-იან ძმარმჟავის ხსნარში. შესაღებად გამოიყენებული იქნა მელნის და ძმარმჟავას 10%-იანი ხსნარი, რომელშიც შესაღები მასალა 4 საათის განმავლობაში მოთა-ვსდა. შეღებილი ფესვები გაირეცხა გამდინარე წყალში და მოთავსდა წყლიან ჭურჭელში 4°C ტემპერატურაზე. პრეპარატები შესწავლილი იქნა ბიო-ლოგიური მიკროსკოპის საშუალე-ბით.

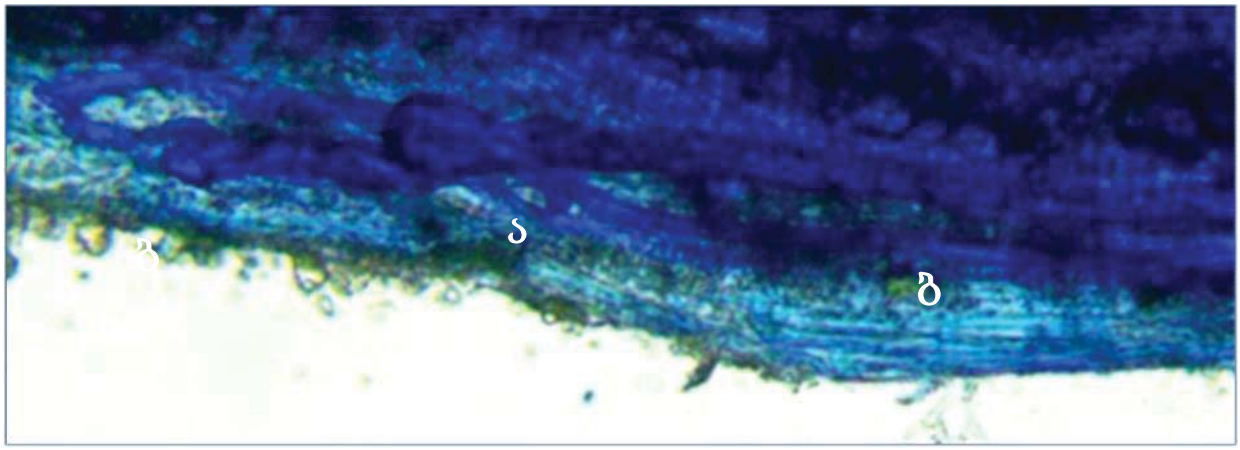
შედეგები:

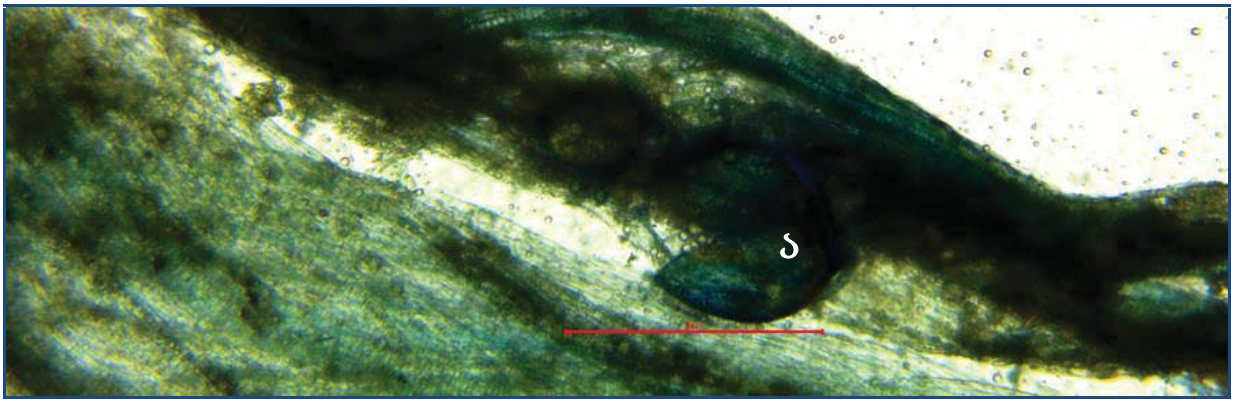
არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოების გამოყოფა ნიადაგიდან.

სველი გარეცხვის მეთოდის გამოყენებით მოხერხდა არბუსკულურ მიკორიზული სოკოების გამოყოფა ნიადაგიდან (სურ 1). სპორების ზომები 40-60 მკმ-ს აღწევდა, რაც შეესაბამება არბუსკულურ მიკორიზული სოკოების სპორების ზომებს.



სურ1. ნიადაგიდან გამოყოფილი არბუსკულურ–მიკორიზული სოკოების ქლამიდოსპორები, ექსტრარადიკალური მიცელიუმის ნაწილებით.





სურ. 2 შეღებვის შედეგად ხორბლის ფესვების ქსოვილებში გამოვლენილი არბუსკულურ–მიკორიზული სოკოს ინტრაცელულარული ჰიფები (ბ) და ვეზიკულა (ა)

ხორბლის ფესვების შეღებვის შედეგად შესაძლებელი გახდა ფესვის ქსოვილებში გავრცელებული არბუსკულურ–მიკორიზული სოკოების ინტრაცელულალური მიცელიუმის და ვეზიკულების გამოვლენა.

აღნიშნული მეთოდები მარტივია და ჯანმრთელობისთვის უსაფრთხო ნივთიერებების გამოყენებით პრეპარატების მაღალი გარჩევადობის შედეგის მიღების საშუალებას გვაძლევს.

მადლობა:

აღნიშნული კვლევა განხორციელდა საქართველოს შოთა რუსთაველის ეროვნული სამეცნიერო ფონდის მიერ დაფინანსებული პროექტის "არბუსკულურ-მიკორიზული სოკოების გავლენა ხორბლის ზოგიერთი ქართული გენოტიპის მიერ ფოსფორის შეთვისების უნარზე" (MR201_4.1_113). ფარგლებში.

გამოყენებული ლიტერატურა:

მინდიაშვილი ჟ., მასალები კარტოფილის მიკოტროფულობის შესახებ აღმოსავლეთ საქართველოში მისი მოყვანის პირობებში, ბოტანიკის ინსტიტუტის შრომები ტ. 20, 1979;

მშვიდობაძე ლ., ციტრუსოვან და ხეხილოვან მცენარეთა მიკოტროფულობის შესწავლი-სათვის, საქართველოს სახელმწიფო აგრარული უნივერსიტეტი, აგრარული მეცნიერებების პრობლემები, სამეცნიერო შრომათა კრებული, ტ. XXXVI, 2002;

მშვიდობაძე ლ., ენდელაძე ნ., ბაკურაძე ნ., მიკრომიცეტების ანტაგონისტური ბუნება და მისი პრაქტიკული გამოყენების შედეგები, ლ. ყანჩაველის სახელობის მცენარეთა დაცვის სამეცნიერო-კვლევითი ინსტიტუტი, მცენარეთა დაცვის პრობლემები, სამეცნიერო შრომათა კრებული, ტ. XXXVII, 2005;

მშვიდობაძე ლ., მიკორიზის როლი ტრაქეომიკოზებისადმე მცენარეთა გამძლეობაში, საქართველოს სახელმწიფო აგრარული უნივერსიტეტი, სამეცნიერო შრომათა კრებული, ტ. 2 (47), 2009

ნოზაძე ლ., რთულყვავილოვანთა სახეობის მიკოტროფულობა ვერტიკალურ სარტყელიანობასთან დაკავშირებით საქართველოში, ბოტანიკის ინსტიტუტის შრომები ტ. 20, 1979;
სამხარაძე თ., ტუნგოს ხის მიკორიზის შესწავლის საკითხისათვის, ბათუმის ბოტანიკური ბაღის მოამბე 7, 1956;
სანიკიძე გ., კეთილშობილი დაფნის რიზოსფეროს მიკროფლორა და მისი ცვლილებები სასუქების შეტანასთან დაკავშირებით, შრომის წითელი დროშის ორდენის საქართველოს სასოფლო-სამეურნეო ინსტიტუტის შრომები 74, 1968
Baon, J. B., S. E. Smith, A. M. Alston, and R. D. Wheeler. (1992). Phosphorus Efficiency of 3 Cereals as Related to Indigenous Mycorrhizal Infection. Australian Journal of Agricultural Research 43 (3):479-491.
Brundrett M.C., Mycorrhizal associations and other means of nutrition of vascular plants: understanding the global diversity of host plants by resolving conflicting information and developing reliable means of diagnosis, Plant and Soil 203, 2009;
https://invam.wvu.edu/methods/spores/spore-extraction
https://www.i-beg.eu/protocols.htm
Powell C. LI, Bagyaraj D. J. VA Mycorrhiza, 1984 CRC Press. 234 pp.
Rożek, Katarzyna; Błaszkowski, Janusz; Nowak, Arkadiusz; Zalewska-Gałosz, Joanna; Nobis, Marcin;
Mleczko, Piotr; Zubek, Szymon, Arbuscular mycorrhizal fungi in Georgia, the Caucasus region: the first report of species diversity and root colonization, Nova Hedwigia Band 106 (2018), p. 473 – 483.
Smith S.E., Read D., Mycorrhizal Symbiosis, 3rd Edn, Academic Press, San Diego, 2008;
Vierheilig, H., A.P. Coughlan, U. Wyss, Y. Piche, Ink ad vinegar a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi. Applied Environmnental Microbiology., 1964: 5004-5007. 1998
Walker C., A simple blue staining technique for arbuscular mycorrhizal and other root-inhabiting fungi, Inoculum 56(4), 2005

ethodology for studying arbuscular-mycorrhizal fungi of wheat rhizosphere

S. Shanidze-MS student of Agricultural faculty
N. Bitsadze-PhD
Agricultural University of Georgia.

Key words: endomycorrhiza, microscopy, staining, visualization

Abstract

Mycorrhizal fungi are the main components of the soil microbiota in most of the agro-ecosystems and colonize nearly 90% of plant species roots. They are generally known to increase the absorption and translocation of mineral nutrients from the soil to the host plants to improve the tolerance of the host plant towards biotic and abiotic stress factors. Research about mycotrophy of the plants has been started since the second half of the 20th century in Georgia. Georgian scientists described colonization of plant roots with arbuscular-mycorrhizal fungi but it has to be mentioned that AM fungal biodiversity are less likely to be studied as there was no attempt to isolate AMF spores from the soil. The aim of the article was to elaborate simple method of isolation and visualization of AMF spores from the wheat rhizosphere. With described method there were visualized and photo documented extra radical hypha, chlamydospores, intracellular mycelium and vesicles a from wheat rhizosphere and roots.