ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ ВА МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013.В.01.03 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

ШУРЫГИН ВЯЧЕСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ

ШЎРЛАНИШ ШАРОИТИДА НЎХАТНИНГ ЎСИШИ ВА РИВОЖЛАНИШИНИ КУЧАЙТИРИШДА ҲАМДА УЛАРНИНГ ИЛДИЗ КАСАЛЛИКЛАРИНИ БИОЛОГИК НАЗОРАТ ҚИЛИШДА РИЗОСФЕРА МИКРООРГАНИЗМЛАРИНИНГ РОЛИ

03.00.04 – Микробиология ва вирусология
(биология фанлари)

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

УДК: 63:576.8+635.657+576.858 (584.4)

Докторлик диссертацияси автореферати мундарижаси
Оглавление автореферата докторской диссертации
Content of the abstract of doctoral dissertation

Шурыгин Вячеслав Владимирович
Шўрланиш шароитида нўхатнинг ўсиши ва ривожланишини кучайтиришда ҳамда уларнинг илдиз касалликларини биологик назорат қилишда ризосфера микроорганизмларининг роли ..……..……..…. 3

Шурыгин Вячеслав Владимирович
Роль ризосферных микроорганизмов в стимуляции роста и развития нута и биологическом контроле его корневых болезней в условиях засоления……2
9

Shurigin Vyacheslav Vladimirovich
The role of rhizosphere microorganisms in stimulation of growth and development of chickpea and biological control of its root diseases in salinity conditions ……..……..…..… 55

Эълон қилинган ишлар рўйхати
Список опубликованных работ
List of published works……...79

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ ВА МИКРОБИОЛОГИЯ ИНСТИТУТИ ҲУЗУРИДАГИ ФАН ДОКТОРИ ИЛМИЙ ДАРАЖАСИНИ БЕРУВЧИ 16.07.2013. В.01.03 РАҚАМЛИ ИЛМИЙ КЕНГАШ

ЎЗБЕКИСТОН МИЛЛИЙ УНИВЕРСИТЕТИ

ШУРЫГИН ВЯЧЕСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ

ШЎРЛАНИШ ШАРОИТИДА НЎХАТНИНГ ЎСИШИ ВА РИВОЖЛАНИШИНИ КУЧАЙТИРИШДА ҲАМДА УЛАРНИНГ ИЛДИЗ КАСАЛЛИКЛАРИНИ БИОЛОГИК НАЗОРАТ ҚИЛИШДА

РИЗОСФЕРА МИКРООРГАНИЗМЛАРИНИНГ РОЛИ

03.00.04 – Микробиология ва вирусология
(биология фанлари)

ДОКТОРЛИК ДИССЕРТАЦИЯСИ АВТОРЕФЕРАТИ

ТОШКЕНТ – 2016

Докторлик диссертацияси мавзуси Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамаси ҳузуридаги Олий аттестация комиссиясида 30.06.2015/B2015.2.B162 рақам билан рўйхатга олинган.

Докторлик диссертацияси Ўзбекистон Миллий университетида бажарилган.

Диссертация автореферати уч тилда (ўзбек, рус, инглиз) Илмий кенгаш веб-саҳифасининг ik-bio.nuu.uz ҳамда «ZiyoNet» ахборот-таълим портали www.ziyonet.uz манзилларига жойлаштирилган.

Илмий маслаҳатчи: Давранов Қахрамон Давранович
биология фанлари доктори, профессор

Расмий оппонентлар: Хасанов Батыр Ачилович
биология фанлари доктори, профессор

Ходжибаева Санабар Мирзаевна
биология фанлари доктори, профессор

Атабаева Халима Назаровна
қишлоқ-хўжалиги фанлари доктори, профессор

Етакчи ташкилот: Генетика ва ўсимликлар экспериментал биологияси институти

Диссертация ҳимояси Ўзбекистон Миллий университети ва Микробиология институти ҳузуридаги 16.07.2013. B.01.03 рақамли Илмий кенгашнинг 2016 йил «___» _____ куни, соат ____ даги мажлисида бўлиб ўтади. (Манзил: 100174, Тошкент ш., Олмазор тумани, Университет-4 кўч., Ўзбекистон Миллий университети, Биология-тупроқшунослик факультети

мажлислар зали (203-хона). Тел.:(+99871) 227-12-24, факс: (+99871) 246-53-21; (+99871) 246-02- 24, e-mail: nauka@nuu.uz).

Докторлик диссертацияси билан Ўзбекистон Миллий университетининг Ахборот-ресурс марказида танишиш мумкин (____рақам билан рўйхатга олинган). Манзил: 100174, Тошкент шаҳри, Университет кўчаси, 4-уй. ЎзМУ Маъмурий биноси, 2-қават, 4-хона. Тел.:(+99871) 236-46-55; факс: (+99871) 246-02-24.

Диссертация автореферати 2016 йил «___»_____куни тарқатилди.
(2016 йил «_____» _____даги ____ рақамли реестр баённомаси)

Г.И. Джуманиязова
Фан доктори илмий даражасини берувчи илмий кенгаш раиси, б.ф.д.

З.А. Маматова
Фан доктори илмий даражасини берувчи илмий кенгаш илмий котиби, б.ф.н.

Т.Г. Гулямова
Фан доктори илмий даражасини берувчи илмий кенгаш қошидаги илмий семинар раиси, б.ф.д., профессор

КИРИШ (Докторлик диссертацияси аннотацияси)

Диссертация мавзусининг долзарблиги ва зарурати. Оҳирги йилларда бутун дунёда тупроқни шўрланиши, қишлоқ хўжалигининг глобал муаммоларига айланиб бормоқда. Айниқса, бу муаммо қурғоқ ва яримқурғоқ иқлимга эга бўлган мамлакатларда катта ташвишга сабаб бўлмоқда. Дунёда тахминан 955 млн гектар ер ҳар хил даражада шўрланган бўлиб[1], уни 1/3 қисми Na^+ ионлари билан шўрланган.[2] Шўрланиш қишлоқ-хўжалик экинларини тезлик билан деградацияга учрашига олиб келади. Оқибатда, тупроқ таркибидаги микробиоценоз бузулади, ўсимликлар меъёрида ўсишдан тўхтайди, тупроқни ҳаётий зарур хусусиятлари чегаралаб қўйилади ва у яроқсиз холатга ўтади.

Ушбу муаммони ечишнинг самарали йўлларидан бири, шўрга чидамли ўсимлик-микроб симбиозини шакллантириш ва уни амалиётга тадбиқ этишдир. Бунинг учун энг самарали усуллардан бири, дуккакли ўсимликлардан, хусусан нўхатдан фойдаланиш усули хисобланади. Аммо нўхат, тупроқни шўрланишига ўта сезгир. Тупроқ таркибидаги тузларни миқдорига боғлиқ равишда, ўсимликни униб чиқиш сони пасайиб, ўсимлик паст бўйли ва илдиз системаси ривожланмасдан қолади, иммунитети пасаяди, бу эса, ўсимликни ҳар хил касалликларга дучор қилади, ҳатто нобуд бўлишига ҳам олиб келади. Тупроқни шўрланиши, дуккакли ўсимликлар

билан ризобийлар орасидаги ўзаро муносабатни бузилишига олиб келади. Оқибатда, тугунакларни ҳосил бўлиши, атмосфера ҳавоси таркибидаги азотни фиксацияси ва нитрогеназа фаоллиги пасаяди. Хусусан, шўрланиш тугунак бактерияларни кўплаб штаммларини нобуд бўлишига олиб келади ва шўрланган тупроқларда самарали симбиоз шаклланмайди. Булардан ташқари, нўхатда илдиз касалликларини чақирувчи фитопатоген замбуруғлар ҳам катта муаммога олиб келувчи омил ҳисобланади. Баъзи йилларда улар ҳосилдорликни ва уни сифатини пасайиб кетишига сабабчи бўладилар. Маълумки, баъзи микроорганизмлар ҳар хил гидролитик ферментлар, сидерофорлар, HCN ва бошқа моддалар синтез қилишлари туфайли, фитопатоген замбуруғларни ўсишини босиб қўйиш хусусиятига эга бўладилар. Шундай микроорганизмлардан энг самаралиси, *Pseudomonas* авлодига мансуб бўлган бактериялар бўлиб, улар ўсимликларда ҳар хил стрессларни пасайтиради ва атроф муҳитни ҳар хил биотик, ҳамда абиотик омиллари таъсирига чидамлилигини оширади. Аммо, бу бактерияларни ризобиал-тугунак симбиозидаги роли ҳозиргача аниқланмаган ва уларни шўрланган тупроқ шароитида нўхат ўсимлигини ўсиши ва ривожланишига таъсири яхши ўрганилмаган. Шу сабабли, шўрга чидамли ва самарадор бактерия штаммларини қидириб топиш, уларни шўрланиш шароитида нўхат ўсимлигига таъсирини ўрганиш ва улар асосида ўсимликларни ўсиши ва

[1]Szabolcs I. Soils and salinization// In: Handbook of Plant and Crop Stress. – Edited by Pessarakli M. – New York: Marcel Dekker, 1994. – pp. 3-11.

[2]Saxena N.P., Johansen. C, Saxena M.C., Silim S.N. Selection for drought and salinity tolerance in cool-season food legumes// In: Breeding for Tolerance in Cool Season Food Legumes. – Edited by Singh K.B. and Saxena M.C. – Chichester, UK: Wiley, 1993. – pp. 245-270.

ривожланишида фаол иштирок этувчи самарадор ва рақобатбардош биопрепаратлар яратиш, долзарб муаммолардан ҳисобланади. Ўзбекистон Республикаси Вазирлар Маҳкамасининг 2013 йил 27 майдаги 142-сон «2013-2017 йилларда Ўзбекистон Республикасининг атроф муҳитни муҳофаза қилиш ишлари дастури» қарори ҳамда мазкур фаолиятга тегишли бошқа меъёрий-ҳуқуқий ҳужжатларда белгиланган вазифаларни амалга оширишга ушбу диссертация тадқиқоти муайян даражада хизмат қилади.

Тадқиқотнинг республика фан ва технологиялари ривожланиши нинг устувор йўналишларига боғлиқлиги. Мазкур тадқиқот республика фан ва технологиялар ривожланишининг V. «Қишлоқ хўжалиги, биотехнология, экология ва атроф-муҳит муҳофазаси» устувор йўналишига мувофиқ бажарилган.

Диссертация мавзуси бўйича хорижий илмий-тадқиқотлар шарҳи. Нўхатни ҳосилдорлигини оширишга йўналтирилган илмий изланишлар жаҳоннинг етакчи илмий марказлари ва олий таълим муассасалари, жумладан, Indian Institute of Pulses Research (Ҳиндистон), International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (Ҳиндистон), Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture (Австралия), Australian Centre for International

Agricultural Research (Австралия), Agricultural Research Centre at the Washington State University (США), Crop Development Centre at the University of Saskatchewan (Канада), Ayub Agricultural Research Institute (Пакистан), Northwestern Center of Biological Research (Мексика), Pasteur Institute (Франция), International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (Ўзбекистон), Тошкент давлат аграр университети (Ўзбекистон) олиб борилмоқда.

Нўхатни ҳосилдорлигини оширишга оид жаҳонда олиб борилган тадқиқотлар натижасида қатор, жумладан, қуйидаги илмий натижалар олинган: ген муҳандислиги усуллари ёрдамида нўхатни хосилдорлигини ошириш, уруғ таркибидаги оқсил миқдорини кўтариш ва ўсимликни ҳар хил касалликларга чидамлилигини ошириш бўйича маълумотлар тизимлаштирилган (Indian Institute of Pulses Research); селекция усулларидан фойдаланиб, нўхатни қурғоқчиликка ва шўрланишга чидамли навлари яратилган, ҳамда нўхат ризосферасидан тугунак бактериялар ажратиб олинган ва уларни азотфиксация жараёнини кучайтириши аниқланган (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics); дуккакли ўсимликлари донининг сифатини кўтариш усуллари, уларни замбуруғ ва вирус касалликларидан, ҳамда нематодалар ва бошқа зараркунандалардан муҳофаза қилиш усуллари ишлаб чиқилган (Agricultural Research Centre at the Washington State University).

Дунёда нўхатни ҳосилдорлигини ошириш бўйича қатор, жумладан, қуйидаги устувор йўналишларда тадқиқотлар олиб борилмоқда: нўхатни ҳосилдор навларини яратиш; ҳосилдорлигини ва ҳар хил касалликларга чидамлилигини оширувчи самарадор микроб ҳамжамиятларини яратиш; тугунак бактериялар ёрдамида самарадор тугунаклар ҳосил қилиш;

шўрланиш шароитларида бактерияларни молекуляр азотни ўзлаштириш; дуккакли-ризобиал ва ассоциатив симбиоз холатидаги ўсимликларни шўрланишга бўлган мослашувини кучайтириш; нўхат уруғи сифатини кўтариш; ген инженерияси ва микробиологик методлар ёрдамида нўхатни биотик ва абиотик стресс омилларга чидамли бўлган линияларини яратиш; нўхатни турли хил касалликларга ва зараркунандаларга қарши курашишини таъминловчи самарадор методлар яратиш.

Муаммонинг ўрганилганлик даражаси. *Rhizobiaceae* оиласига кирувчи тугунак бактерияларни (Саимназаров, 2003; Sessitsch et al., 2002; Bouhmouch et al., 2005; Franzini et al., 2010; Assefa, 2012; Egamberdieva et al., 2013), ва *Pseudomonas* авлодига мансуб бактерияларни (Акимова, 2007; Weller, 2007; Лукаткин, 2009; Hassanein, 2009; Egamberdieva, 2012) баъзи-бир хусусиятлари ўрганиб чиқилган. *Pseudomonas* ни баъзи турларини антибиотик моддалар, сидерофорлар синтез қилиши ва эримайдиган фосфатларни ўсимликлар учун енгил ўзлаштирадиган шаклга ўтқазиб бера олиши аниқланган (Боронин, 1998). Шунингдек, ризобактериялар асосида биоўғитлар тайёрланган (Джуманиязова, 2004; Моргун, 2009; Соколова ва б.,

2009; Damir et al., 2011). Ушбу маълумотларга кўра, *Rhizobiaceae* оиласига кирувчи бактерияларни фаол штаммлари, дуккакли ўсимликлар билан барқарор ва фаол симбиозлар ҳосил қиладилар ва ўсимликларни етарли миқдорда енгил ўзлаштирувчан азот билан таъминлай оладилар. *Rhizobiaceae* оиласига мансуб кўплаб штаммлар асосида дуккакли ўсимликларни ҳар хил турлари учун бактериал ўғитлар («Нитрагин», «Ризобин», «Ризоторфин») яратилган, аммо бу ўғитлар, шўрланган тупроқларда ҳеч қандай фойда бермаслиги аниқланган. *Pseudomonas* авлодига кирувчи бактерияларни баъзи вакиллари (бодринг, буғдой, ғўза) ривожланишини кучайтириши, уларни шўрланишга чидамлилигини ошириши, минераллар билан таъминлай олиши, фитопатоген замбуруғларга нисбатан бионазоратлик хусусиятини намоён қилиши аниқланган. *Pseudomonas* ларни ўсимликларга нисбатан барқарорлаштирувчилик хусусиятлари, хилма-хил физиолого-биокимёвий механизмлар асосида намоён бўлиши (Боронин, 1998; Saharan, Nehra, 2011; Deshwal et al., 2013), бу механизмлар – фитогормонлар синтези, фосфатмобилизация, фитопатогенларни биологик назорат қилиши билан боғлик, хусусиятлар батафсил ўрганилган. Айнан мана шу хусусиятлар, *Pseudomonas* ларни баъзи штаммларини биоўғитлар ва биопрепаратлар таркибига киритиш учун асос бўлиб хизмат қилган.

Адабиётларда *Pseudomonas* билан *Rhizobium* бактерияларини аралаш культураларини нўхат ўсимлигида тугунаклар хосил бўлишини кучайтириши, ўсимликни шўрга чидамлилигини ва ҳосилдорлигини ошириши ҳақида маълумотлар йўқ. Ҳар хил микроорганизмларни фойдали хусусиятлари асосида, илмий асосланган микробиопрепаратлар яратиш, бир томондан улардан қишлоқ-хўжалик амалиётида фойдаланиш, нўхат ва бошқа дуккакли ўсимликлардан шўрланган тупроқларда ҳам юқори ва сифатли ҳосил олиш имкониятини берса, бошқа томондан, шўрланган тупроқларда нўхат ўстириш, улар билан симбиозда яшовчи ризобийларни азотфиксация

қилиш хусусиятларини ошириш ҳисобидан, тупроқда азотли бирикмалар тўплаш ва эрозиядан сақлаш имконияти яратилган бўлур эди. **Диссертация мавзусининг диссертация бажарилган олий таълим муассасасининг илмий-тадқиқот ишлари билан боғлиқлиги.** Диссертация тадқиқоти Ўзбекистон Миллий университетининг ва ҳалқаро илмий-тадқиқот ишлари режасининг «Identification of genetic variation and effective plant microbe association for salt tolerance in chickpea» Thalwitz Memorial Scholarship IFAR – World Bank grant (2011–2012 йй.); ИТД-9-01. «Янги, рақобатбардош ва ресурстежамкор микробиопрепаратдан қишлоқ-хўжалик амалиётида фойдаланиш агротехеикасини ишлаб-чиқиш» (2012–2014 йй.); И-2012-30. «Қорақалпоғистон Республикаси шароитида ўсимликларни ҳосилдорлигини ва тупроқ унумдорлигини ошириш мақсадида янги микробиологик препаратларни жорий қилиши» (2012–2014 йй.) мавзусидаги амалий лойиҳа доирасида бажарилган.

Тадқиқотнинг мақсади ўсимликларни ўстириш хусусиятига эга бўлган

ризосфера микроорганизмлари асосида шўрланиш шароитида нўхатни ҳосилдорлигини оширувчи самарадор биопрепарат яратишдан иборат.

Тадқиқотнинг вазифалари:

нўхат тугунаклари ва ризосферасидан шўрга чидамли ва ўстирувчанлик хусусиятига эга бўлган бактериялар қидириш, ажратиб олиш ва скрининг қилиш;

нўхатни ўсишини кучайтирувчи ризобактерияларни морфолого культурал ва физиолого-биокимёвий хусусиятларини ўрганиш, танлаб олинган штаммларни аниқлаш;

фаол штаммларни ўстиришни оптимал шароитини аниқлаш; шўрланган тупроқларда нўхатни ўсишини кучайтирувчи ризобактерияларни илдизда яшаб қолишини ўрганиш, уларни фитогормонал, нитрогеназа ва антифунгал фаоллигини аниқлаш;

ўстирувчи ризобактерияларни нўхатни фитопатогенларига нисбатан антифунгал хусусиятларини ўрганиш – гидролитик ферментлар, HCN ва сидерофорлар синтез қилишини тадқиқ қилиш;

ризобактерияларни нўхат билан ўзаро муносабатларини асосий омили сифатида, уларни илдиз экссудатларига хемотаксисини ўрганиш; нўхатни ўсишини ва ривожланишини кучайтирувчи ва уни тупроқни шўрланиш шароитида илдиз касалликлардан ҳимоя қилувчи, самарали штаммлар асосида биопрепаратни тайёрлаш.

янги биопрепарат олишни биотехнологиясини ва ишлатиш шароитларини аниқлаш, лаборатория регламенти, технологик чизмасини ишлаб чиқиш;

тупроқни шўрланиш шароитида янги яратилган биопрепаратни биологик ва иқтисодий самарадорлигини баҳолаш.

Тадқиқотнинг объекти сифатида Ўзбекистон Республикаси тупроқларида ўстирилган нўхат тугунакларидан ва ризосферасидан ажратиб олинган *Rhizobiaceae* ва *Pseudomonaceae* оилаларига кирувчи тугунак ва ризосфера бактериялари, ICRISAT, (Патанчеру, Хайдарабад, Хиндистон)

ходими, доктор Subramaniam Gopalakrishnan томонидан бизга ином қилинган *Rhizobium* sp.-IC53 штамми (бунинг учун биз унга ўзимизни чексиз ҳурматимиз ва миннатдорлигимизни билдирамиз); нўхатни 29 нави, улардан маҳаллий навлар: «*Jaxongir*», «*Xalima*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Zimistoni*», «*Muqtadir*», «*Hisor*-32», «*Miroz*», «*CIEW*-45», «*Sino*»; четдан келтирилган ва бизга Қурғоқ Районларда Қишлоқ-хўжалик Тадқиқотлари Олиб борувчи Ҳалқаро Марказ (ICARDA) ходими доктор Ram Sharma томонидан ином қилинган (бунинг учун биз унга ўзимизни чексиз ҳурматимиз ва миннатдорлигимизни билдирамиз) нўхат навлари: «*Flip* 1-01», «*Flip* 1-04», «*Flip* 1-05», «*Flip* 1-19», «*Flip* 1-21», «*Flip* 1-22», «*Flip* 1-29», «*Flip* 1-31», «*Flip* 1-33», «*Flip* 03-102c», «*Flip* 05-59c», «*Flip* 03-74», «*Flip* 06-102c», «*Flip* 06-66», «*Flip* 05-65», «*Flip* 06-124c», «*Flip* 06-80c», «*Flip* 03-27c», «*Flip* 06-155c».

Тадқиқотнинг предмети – нўхат ризосфера ва тугунаклардан бактерияларни ажратиш, скрининг қилиш, танлаб олинган штаммларни шўрланган тупроқларда нўхатни ўсиши ва ривожланишига таъсирини аниқлаш; нўхатни ўсиши, ривожланиши ва уни илдиз касалликларини биологик назорат қилувчи омилларини аниқлаш; танлаб олинган *Mesorhizobium* ва *Pseudomonas* авлодларига кирувчи, тузга чидамли штаммлар асосида нўхатни ўсиши, ривожланишини кучайтирувчи ва уни фитопатоген замбуруғлар таъсиридан ҳимоя қилувчи биопрепарат тайёрлаш регламентини яратиш ва ишлаб-чиқариш шароитида синовлардан ўтқазиш; биопрепаратдан фойдаланишни оптимал шароитларини аниқлаш.

Тадқиқотнинг усуллари. Тадқиқот жараёнида микробиологик, биотехнологик, биокимёвий, спектрофотометрик, молекуляр-биологик, хроматографик, агрокимёвий ва биометрик методлардан фойдаланилган.

Тадқиқотининг илмий янгилиги қуйидагилардан иборат: шўрланган тупроқда ўсган нўхатни тугунакларидан ва ризосферасидан *Pseudomonas* ва *Mesorhizobium* авлодларига кирувчи бактерияларни штаммлари ажратиб олинган ва уларни 16S рРНК сини нуклеотид кетма кетлиги асосида *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 эканлиги аниқланган;

бу бактерияларни рифампицинга барқарор штаммлари олинган ва уларни нўхат илдиз системасига колонияланиш хусусиятлари аниқланган; биринчи марта *Pseudomonas chlororaphis*-66 нўхатда фаол тугунаклар хосил бўлишига ёрдам бериши, ўсимликни иммунитетини, хосилдорлигини ва фитопатоген замбуруғларга нисбатан барқарорлигини ошириши аниқланган;

Mesorhizobium ciceri-4 ва *Pseudomonas chlororaphis*-66 штаммларини, нўхатни ўсиши ва ривожланишини кучайтирувчи, ҳамда ўсимликда илдиз касалликларини чақирувчи фитопатоген замбуруғларини биологик назорат қилишига жавоб берувчи омиллар аниқланган;

биринчи марта турли хил нўхат навлари ҳар хил табиатга эга бўлган экссудатлар синтез қилиши (шакарлар, кислоталар, аминокислоталар) ва уларни ўзларининг илдиз системалари орқали секреция қилиши аниқланган;

илдиз экссудатларини ионалмаштирувчи смола – Dowex сақлаган колонкада фракцияларга ажратиш орқали, 3 фракция: катионли (гистидин, аргинин, лизин, цистеин, серин, глицин, аспарагин кислота, лейцин, изолейцин ва аланин), анионли (глюкон, галактон ва маннурон кислоталари), нейтрал (глюкоза, галактоза, арабиноза, ксилоза ва рибоза) олинган;

алоҳида фракцияларни ўзига жалб қилиш хусусияти (аттракция зонаси (см): катионли фракция учун – 1,0; анионли – 0,6; нейтрал – 0,8), фракциялар йиғиндисига қараганда (аттракция зонаси – 2,8 см) паст эканлиги исботланган. Катионли ва нейтрал фракцияларни аралашмасининг ўзига жалб қилиш хусусияти, катионли ва анионли фракциялар аралашмасидан ҳамда анионли ва нейтрал фракциялар аралашмасининг шу хусусиятига нисбатан баландроқ эканлиги аниқланган;

биринчи марта танлаб олинган *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва

Mesorhizobium ciceri-4 штаммлар асосида янги «Псевдоризобин» биопрепарати яратилган.

Тадқиқотнинг амалий натижалари қуйидагилардан иборат: «Псевдоризобин» биопрепаратини ишлаб-чиқаришни лаборатория регламенти яратилган. Регламент, субстратни, бир вақтни ўзида икки: *Mesorhizobium ciceri*-4 ва *Pseudomonas chlororaphis*-66 бактерия штаммларини яхши ривожланишини таъминлай оладиган таркибини ўзига хослигига асосланган. Регламент ишлаб-чиқариш шароитларида (МЧЖ «Био ўғит» ва МЧЖ «Mangit mineral») синовлардан ўтқазилган ва 1000 кг миқдорда биопрепаратни тажриба нусҳаси олинган;

«Псевдоризобин биологик препаратини шўрланган тупроқларда нўхат экинига қўллаш самарадорлиги» тавсиянома яратилган.

Тадқиқот натижаларининг ишончлилиги. Ҳар бир тадқиқот тажрибалари энг камида 3 маротабадан ўтқазилганлиги, бу эса энг ишончли ва барқарор натижаларни ўртача қийматини ҳисоблаб чиқиш имконини берганлиги билан асосланган. Экспериментал маълумотларга статистик ишлов бериш, хато, ўртача, ишончлилик интерваллари, стандарт қочишларни ҳисоблаш STATISTICA 6.0 компьютер дастури ва стандарт методлар ёрдамида олиб борилган; математик анализни тўғри келадиган методларини танлашда, тегишли адабиётларда келтирилган йўриқномалардан фойдаланилган. Натижаларни статистик аҳамиятини аниқлаш учун, Стъюдентни Т-критерийсини ҳисоблаб чиқилган.

Тадқиқот натижаларининг илмий ва амалий аҳамияти. Тадқиқот натижаларининг илмий аҳамияти *Mesorhizobium* ва *Pseudomonas* авлодига кирувчи бактерияларни шўрланиш шароитида нўхатни ўсиши ва ривожланишини барқарорлаштириш, ва уни фитопатоген замбуруғлар чақирадиган илдиз касалликларидан ҳимоя қилишдаги роли батафсил ўрганиб чиқилганлиги билан белгиланган.

Тадқиқот натижаларининг амалий аҳамияти дала шароитида нўхатни (*Cicer arietinum* L) шўрланган тупроқларда чидамлилигини аниқлаш бўйича скрининг ишлари олиб борилган. Синалган нўхат навларини кўпчилиги, аввал Ўзбекистон шароитида ўрганилмаган. Амалга оширилган тадқиқотлар

ниҳоясида нўхатни шўрга чидамли бўлган навлари танлаб олинган ва улар Қорақалпоғистон Республикасининг табиий шўрланган тупроқ шароитларида «Псевдоризобин» биопрепаратини самарадорлигини аниқлаш бўйича ўтқазилган тажрибаларда ишлатилган. Нўхат учун ўсимликни ўсишини, ривожланишини, ҳосилдорлигини оширувчи ва уни фитопатоген замбуруғлар таъсиридан биологик назорат қила олувчи микробиологик препарати – «Псевдоризобин» яратилган. Бу биопрепаратни ишлаб-чиқариш учун махсус технология яратилган. «Псевдоризобин»ни шўрланган тупроқларда ҳам нўхатдан юқори ҳосил олиш имконини бериши аниқланган. Нўхатни шўрга чидамчи навлари ва «Псевдоризобин» биопрепаратидан яратилган йўриқномалар асосида фойдаланиш, қишлоқ-хўжалиги учун яроқсиз деб

топилган тупроқларда ҳам нўхат экиш, бу технологиядан бирнеча бор сурункасига фойдаланиш эса, тупроқ холатини қайта тиклаш имконини бериши аниқланган. «Псевдоризобин» ишлаб-чиқариш учун яратилган технологик чизма, қишлоқ хўжалиги учун янги микроб препаратлари яратишда модель сифатида ишлатилиши мумкин.

Тадқиқот натижаларининг жорий қилиниши. «Псевдоризобин» 7,7 млрд. хуж/мл (*Pseudomonas chlororaphis*-66 – 4 млрд. хуж/мл, *Mesorhizobium ciceri*-4 – 3,7 млрд. хуж/мл) ЎзР Давлат кимё комиссияси томонидан «Ўзбекистон Республикаси қишлоқ хўжалигида ишлатиш учун рухсат этилган пестицидлар ва агрохимикатлар Рўйхати» га киритилган (2016.09.02. 2-6/1-33). «Псевдоризобин» биопрепаратини нўхат ўсимлигининг фузариоз вилт касаллигига қарши кулланилганда самарадорлиги 83,3%ни ташкил қилиб, шўрланиш шароитида «Псевдоризобин» нўхат ўсимлигининг ҳосилдорлигини 22% га ошишига имконини берди.

Тадқиқот натижаларининг апробацияси. Тадқиқот натижалари: 10 илмий-амалий анжуманда, шу жумладан 6 ҳалқаро конференцияда, хусусан, PGPR «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture» 2 – Осиё конференциясида (Хитой, Пекин, 2011), VII Ҳалқаро илмий-амалий конференция «Аграрная наука – сельскому хозяйству» (Россия, Барнаул, 2012), «Яйловлардан оқилона фойдаланиш ва муҳофаза қилишнинг институционал масалалари» Республика илмий-амалий конференциясида (Тошкент, 2013), Атроф-муҳит мухофазаси Бутун-жаҳон кунига бағишланган «Ўзбекистонда атроф муҳитни мухофазаси: уни бугунги кундаги холати ва ривожлантириш йўллари» деб аталган илмий-амалий семинарда (Тошкент, 2013), «Ўзбекистон тупроқ ресурслари: ҳолати, муҳофазаси ва улардан самарали фойдаланиш истиқболлари» деб номланган Республика илмий-амалий конференцияда (Тошкент, 2013), Regional conference of young scientists «Recent trends in physical & biological sciences» (Хиндистон, Бангалор, 2014), студентлар, аспирантлар ва ёш олимларни «Ломоносов-2014» XXI Ҳалқаро илмий конференциясида (Россия, Москва, 2014), 20th World Congress of Soil Science (Корея, 2014), студентлар аспирантлар ва ёш олимларни «Ломоносов-2015» XXII Ҳалқаро илмий конференциясида (Россия, Москва, 2015), «Soils of Uzbekistan and resource saving technologies of improvement of their fertility» илмий-амалий семинарда

(Тошкент, 2015), «Атроф муҳитни ўзгариши шароитида ер ресурсларини муҳофаза қилиш ва улардан оқилона фойдаланиш масалалари» Республика илмий-амалий семинарда (Тошкент, 2016) апробациядан ўтган.

Тадқиқот натижаларининг эълон қилиниши. Диссертация мавзуси бўйича жами 29 та илмий ишлар чоп этилган, шулардан, Ўзбекистон Республикаси Олий аттестация комиссиясининг докторлик диссертациялари асосий илмий натижаларини чоп этиш тавсия этилган илмий нашрларда 16 мақола, жумладан 13 таси республика ва 3 таси хорижий журналларда нашр этилган.

Диссертациянинг тузилиши ва ҳажми. Диссертация таркиби кириш, тўртта боб, хулоса, фойдаланилган адабиётлар рўйхати ва иловалардан иборат. Диссертациянинг ҳажми 160 бетни ташкил этган.

ДИССЕРТАЦИЯНИНГ АСОСИЙ МАЗМУНИ

Кириш қисмида ўтказилган тадқиқотларнинг долзарблиги ва зарурати асосланган, тадқиқотнинг мақсади ва вазифалари, объект ва предметлари тавсифланган, республика фан ва технологиялари ривожланишининг устувор йўналишларига мослиги кўрсатилган, тадқиқотнинг илмий янгилиги ва амалий натижалари баён қилинган, олинган натижаларнинг илмий ва амалий аҳамияти очиб берилган, тадқиқот натижаларини амалиётга жорий қилиш, нашр этилган ишлар ва диссертация тузилиши бўйича маълумотлар келтирилган.

Диссертациянинг «**Шўрланишни олдини олиш бўйича ва нўхат ўсимлиги касалликларини даволашда ишлатиб кўрилган ризосфера ва тугунак *Pseudomonas* ва *Rhizobium* авлодларига кирувчи бактериялар ҳақида адабиёт маълумотлар шархи**» деб номланган биринчи бобида ўсимликларни биологик ҳимоя қилиш, қишлоқ-хўжалик экинларини ҳосилдорлигини ошириш, *Pseudomonas* ва *Rhizobium* авлодларига мансуб бўлган бактериялар орасидан ўсимликларни ўсишини кучайтирувчи биологик стимуляторлар, ҳамда фитопатоген микроорганизмларни биологик назорат қилувчи агент сифатида фойдаланиш, тупроқни шўрланиш муаммолари ва уни нўхат ўсимлигини ўсиши ва ривожланишига таъсири, ўсимликларда тузли стрессни юмшатиш мақсадида микроорганизмлардан фойдаланиш истиқболлари, ўсимликларни ўсишини барқарорловчи ризобактерияларни ўсишини кучайтириш, биологик назорат ўтқазиш ва тузли стрессни юмшатиш механизмлари ҳамда ҳайвон ва парранда чиқиндиларидан биоўғит олишда фойдалашнинг замонавий холати анализ қилинган.

Диссертациянинг «**Бактерияларининг ўсишини кучайтирувчанлик ва бионазоратлик хусусиятларини ўрганиш методлари**» деб номланган иккинчи бобида тадқиқот материаллари ва методлари келтирилган.

Нўхатни ҳар хил навларини тузга чидамлилиги бўйича скрининги, уруғни 50 ва 100 ммоль NaCl сақлаган қумли гнотобиотик системада, ва ўсимликни шўрланган тупроқ (0-40 см чуқурликдаги) билан тўлдирилган

тувакчаларда ўстириш орқали ўрганилган.

Нўхат илдизида рақобат колонизаторлари бўлган бактерияларни ажратиш учун Камилова ва бошқаларни (Kamilova et al., 2005) методларидан фойдаланилган. Бактерияларни 10 та штамми ажратиб олинган ва уларни морфолого-культурал ҳамда физиолого-биокимёвий таснифи ўрганиб чиқилган. Ўрганилган хусусиятларига мувофиқ 10 штаммни ҳаммаси *Pseudomonas* авлодига кириши аниқланган.

Тугунак бактерияларни штаммлари, нўхатни йирик, пушти рангли

тугунакларидан ажратилган (Звягинцев, 1991). Ажратилган штаммларни тозалигини аниқлаш учун, тугунак бактериялар учун характерли бўлган тест лакмус-сутда ўсиш методидан (Теппер ва б., 1991) фойдаланилган.

Ажратиб олинган *Rhizobium* ни ҳар хил штаммлари ва *Pseudomonas* sp.-66 нўхатни ўсиши ва ривожланишига таъсирини ўрганиш учун, 2012-2014 йй Тошкент давлат аграр университетининг тажриба станцияси шароитида дала тажрибалари ўтқазилган. Уруғга штаммларни суспензиялари билан ишлов бирилиб экилган (хужайра титри $1x10^8$ хуж/мл дан кам бўлмаган).

Танлаб олинган *Pseudomonas* sp.-66 ва *Rhizobium* sp.-4 штаммларини 16S рРНК сини нуклеотид кетма-кетлиги аниқланган. Полимераза-занжирли реакция (ПЗР) ёрдамида *Pseudomonas* sp.-66 учун тўғри 16SF: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ва тескари 16SR: 5'-GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' праймерлар ёрдамида 16S рРНК амплификация қилинган.

Бактерия штаммларини морфолого-культурал ва физиолого-биокимёвий таснифи стандарт методикалар (Герхардт, 1984; Нетрусов ва б., 2005; Смирнов, Киприанова, 1990; Vincent, 1970) ёрдамида аниқланган.

Pseudomonas sp.-66 ва *Rhizobium* sp.-4 штаммларини нўхат ўсимлигини ўсиши ва ривожланишининг кучайтирувчанлик хусусиятлари ўрганиб чиқилган. Индолил-3-сирқа кислота (ИСК) синтези Bano ва Musarrat (2003) методи асосида аниқланган.

Бактерия штаммларини ягона азот манбаи сифатида 1-аминоциклопропан-1-карбон кислота (АЦК) да ўсишини аниқлаш учун тегишли муҳитда (*Mesorhizobium* учун - YMA муҳити, аммо дрожжи экстракти қўшилмаган, *Pseudomonas* учун – пептонсиз агар) АЦК ва $(NH_4)_2SO_4$ (позитив назорат), ягона азот манбаи ёки азот манбаи қўшилмасдан (негатив назорат) ўстириб кўрилган.

Штаммларни эримайдиган фосфатларни эритиш хусусияти Г.С. Муромцев муҳитига эримайдиган фосфат сифатида $Ca_3(PO_4)_2$ ёки $FePO_4$, ёки $AlPO_4$ аралаштириб ўрганиб чиқилган.

Интакт дуккак-ризобиал системада нитрогеназа фаоллигини ацетилен методи билан аниқланган. Ҳосил бўлган этиленни Chrom-5 (Чехия) газ хроматографияда аниқланган (Теппер ва б., 1993).

Шўрланиш шароитида псевдомонадлар ва ризобийларни штаммларини биологик назорат қилиш хусусиятларини ўрганиш учун *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*,

Fusarium solani, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* замбуруғларидан фойдаланилган. Фитопатоген замбуруғларга нисбатан антагонистик таъсирни ўрганиш учун бактерияларни ЎзМУ нинг «Микробиология ва биотехнология» кафедраси, бактериялар музейида сақланадиган: KR 083, KR 076, 3612, Ep 14, Tivi 7, Rif ep 17, Rube 1326, BB-135, TSAU-20 ва нўхатни ризосферасидан ва тугунакларидан ажратилган *Mesorhizobium ciceri*-4, *Rhizobium* sp.-6, *Rhizobium* sp.-9, *Pseudomonas chlororaphis*-66 ҳамда ICRISAT

профессори Subramaniam Gopalakrishnan тақдим қилган *Rhizobium* sp. IC-53 штаммларидан фойдаланилган. Бактерияларни антагонистик фаоллиги агарли блоклар методи билан текширилган, ҳамда қўшимча нўхат уруғига $1x10^8$ КОЕ/мл титрга эга бўлган суспензиялар билан ишлов берилиб, уларни олдиндан замбуруғлар ($3,0x10^7$ спора/кг тупроқ) билан касаллантирилган тупроқларда, тувакчаларда тажрибалар олиб борилган.

Штаммларни HCN синтез қилиши, Castric (1975) методи ёрдамида аниқланган. Штаммларни хитинолитик фаоллиги, Moreal ва Relse (1969) методи ёрдамида, типаза фаоллиги Твин (Tween) сақлаган тест ёрдамида, протеаза фаоллиги Brown, Foster (1970) методи билан аниқланган.

Глюканаза фаоллиги лишайникларни глукан субстратларидан фойдаланиб, ўрганилган (Walsh, 1995). Тоза зонани ҳосил бўлиши, субстратни парчаланишини кўрсатган.

Целлюлаза фаоллиги Hankin, Anagnostakis (1977) методи ёрдамида КМЦ (карбоксиметилцеллюлоза) субстрат сифатида билан аниқланган.
Штаммларни сидерофорлар синтез қилиши, Schwyn ва Neilands (1987) методи билан аниқланган.

Mesorhizobium ciceri-4 штаммини, *Pseudomonas chlororaphis*-66 штаммига нисбатан нўхат илдизида колонизацияланишга рақобат қилиш хусусиятини текшириш ва баҳолаш учун *Pseudomonas chlororaphis* ни рифампицин-резистент штамми – 66R (рифампицин 200 мкг/мл) дан фойдаланилган.

Бактерияларни нўхатни илдиз экссудатларига хемотаксисини текшириш учун, экссудатлар ўстирилган махсус жихозланган эксикаторда дистилланган сувда нўхат ўсимтаси илдизидан еғиб олинган. Экссудатлар вакуумда концентрлаштирилиб, Dowex смоласи билан тўлдирилган колонкада 3 фракцияга (кислотали, ишқорли ва нейтрал) ажратиб олинган, ва хемотаксис учун Adler (1972) ни модификация қилинган методидан фойдаланилган.

«Псевдоризобин» биопрепаратини нўхат хосилдорлигига таъсирини ўрганиш учун Қорақалпоғистон Республикаси, Амударё туманининг шўрланган тупроқлари шароитида дала тажрибалари ўтқазилган. Тажриба майдони тупроғини электр ўтқазувчанлиги (ЭЎ) – 568 мСм/м (миллисименс/метр) га тенг бўлган. 400 мСм/м дан ЭЎ га тенг бўлган тупроқ шўрланган ҳисобланади (Райан ва б., 2002).

Диссертациянинг «***Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 бактерияларининг морфолого-культурал, физиолого биокимёвий, ўсимликларни ўсишини кучайтирувчанлик ва бионазоратлик хусусиятларини ўрганиш**» деб номланган учинчи бибида

P.chlororaphis-66 ва *M.ciceri*-4 штаммларини нўхат ўсимлигини ўсиши ва ривожланишини яхшилаш ва шўрланиш шароитида нўхатда илдиз касаллик қўзғатувчи замбуруғларга қарши курашишда фойдаланиш мумкин эканлиги исботланган.

Шўрланган тупроқларда нўхатни баъзи генотипларининг шўрга чидамлилигини скрининг қилиш

Нўхатни ҳар хил навлари (29 нав) уруғларини униб чиқишига тупроқ шўрланишини таъсири ўрганилган. Уруғни униш энергияси (экилгандан кейин 10-кунда), назорат вариантга қараганда, нўхатни «*Sino*», «*Flip* 1-01», «*Flip* 1-04», «*Flip* 1-05», «*Flip* 1-19», «*Flip* 03-27c», «*Flip* 06-155c» навларида 25% паст эканлиги аниқланган. Нўхатни «*Jahongir*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Zimistoni*», «*Flip* 1-22», «*Flip* 1-31», «*CIEW*-45» ва «*Flip* 06-80c» навларини униб чиқиши, тупроқдаги тузни миқдори 100 ммоль га тенг бўлганда ҳам бошқа навларга нисбатан яхшироқ (40-45%) эканлиги аниқланган. 29 навдан 7 таси, яъни: «*Jahongir*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Xalima*», «*Miroz*», «*Flip* 1-33» ва «*CIEW*-45» навлари шўрга чидамли эканлиги исботланган.

Тадқиқот натижалари, шўрланган шароитда энг юқори симбиотик самарадорликга эришиш учун, албатта ўсимликни навига эътибор бериш зарурлигини кўрсатган.

Нўхатни ўсиши ва ривожланиши кучайтирувчи бактерияларни скринингги

Pseudomonas авлодига кирувчи бактерияларини ажратиб олиш ва уларни скринингги

Бактериялар аралашмаси билан инокуляция қилинган уруғдан униб чиққан кўчатни қум сақлаган гнотобиотик системада ўстириш орқали, самарали колонизаторлар ажратиб олиш мумкин. Бу методни қайтарилиши, илдизда ушбу бактерияларни колонизацияланиш хусусиятини яхшилайди.

Ушбу тадқиқотларда нўхат илдизида колонияланувчи *Pseudomonas* авлодига кирувчи, шўрликга чидамли бактериялар ажратиш учун, тўйинтириш методи ишлатилган. Тўйинтиришни 3-доирасидан кейин, нўхат илдизида колонияланувчи 10 та штамм танлаб олинган ва уларни морфологик ва физиолого-биокимёвий хусусиятлари ўрганиб чиқилгандан сўнг *Pseudomonas* авлодига мансуб эканлиги аниқланган.

Улар орасидан, нўхатга нисбатан энг самарадор штамм сифатида *Pseudomonas* sp.-66 танлаб олинган.

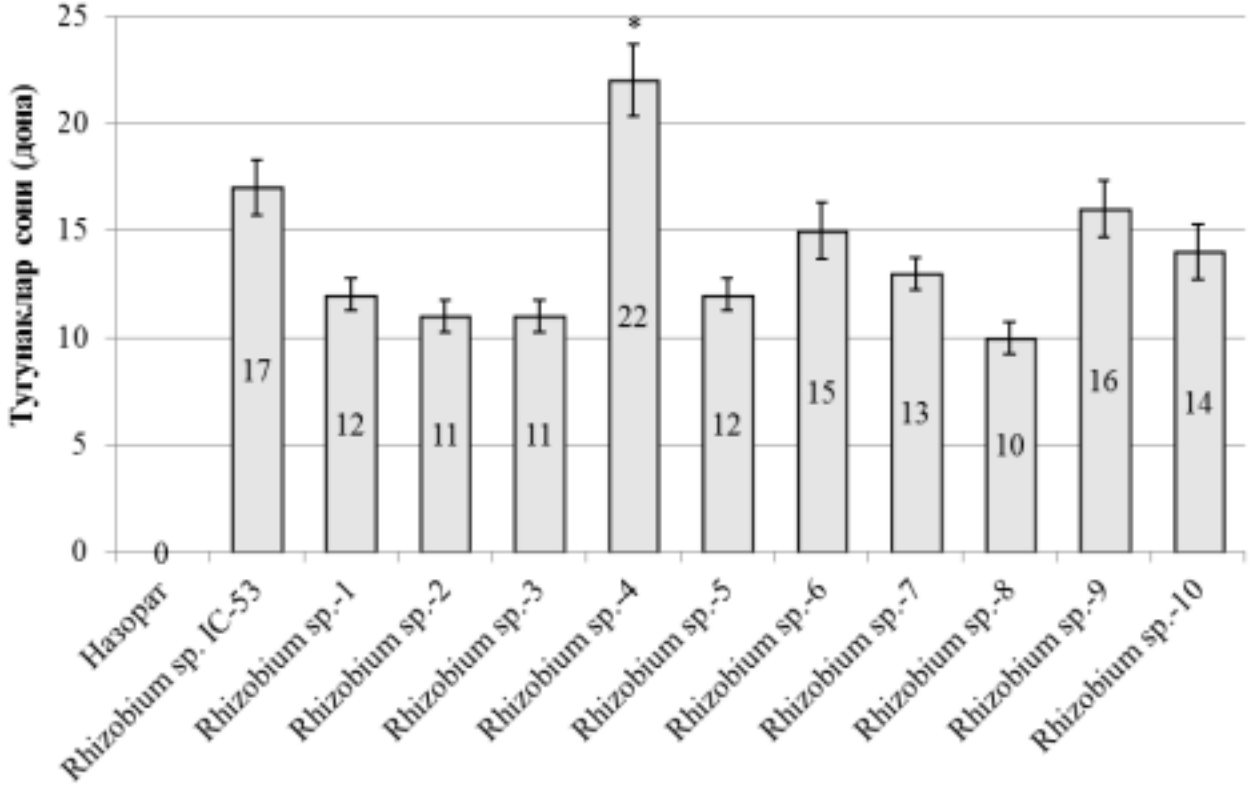
Rhizobium авлодига кирувчи бактерияларини ажратиб олиш ва уларни скринингги

Нўхат тугунакларидан 10 та тугунак бактерияларни штаммларини ажратиб олинган. Улардан ташқари 1 та штаммни - *Rhizobium* sp. IC-53 ICRISAT профессори, Subramaniam Gopalakrishnan тақдим этган. Бактериялар YMA муҳитида фаол ўсган ва 3-кунда рангсиз ва сут рангли –

оқиш, шилимшиқ ташқи кўринишидан тугунак бактерияларга ўхшаган колониялар, ҳосил қилганлар. Лакмус-сутда ўстирилганда, бактериялар, 10-

14 суткада муҳитни ишқорлаштириб, кўкиш рангга киритганлар ва тиниқ зардобсимон ҳалқа ҳосил қилганлар. Барча штаммлар, лакмус-сутда ўстирилганда ижобий натижа берганликлари учун уларни *Rhizobiaceae* оиласига мансуб, тугунак бактерияларга киритилган.

Штаммларни нўхат илдизида тугунаклар ҳосил қилиши ва нўхат уруғига экишдан олдин ишлов берилганда, ўсимликни ўсиши ва ривожланишига кўрсатадиган таъсири бўйича скрининг ўтқазилган (1-расм).



Эслатма: * p≤0,05 да статистик аҳамиятли

1-расм. Нўхатнинг «*Xalima*» нави илдизида ҳар хил тугунак бактериялари штаммлари таъсирида тугунакларни шаклланиши.

Скрининг натижасида, *Rhizobium* sp.-4, *Rhizobium* sp. IC-53, *Rhizobium* sp.-6 ва *Rhizobium* sp.-9 штаммлари, энг фаол ва вирулент штаммлар сифатида, кейинги тажрибалар учун танлаб олинган.

Танлаб олинган штаммларни дала шароитида нўхатни ўсиши ва ривожланишига таъсири

Қуйилган мақсад кесимида тадқиқотлар олиб бориш мақсадида 2012-2014 йилларда Тошкент давлат аграр университети экспериментал станциясида нўхатни ўсиши ва ривожланишига танланган штаммларни таъсирини ўрганиш бўйича дала тажрибалари олиб борилган (1-жадвал).

1-жадвал

***Rhizobium* ва *Pseudomonas* sp.-66 билан инокуляция қилинган нўхотни "*Jahongir*" нави уруғини ўсимликни ўсиши ва ривожланишига таъсири**

Инокулят типи	Тугунаклар сони (дона)	Поя узунлиги (см)	Илдиз узунлиги (см)	Ер устки қисмини намли оғирлиги (г)	Илдизни намли оғирлиги (г)	Ер устки қисмини қурук оғирлиги (г)	Илдизни қурук оғирлиги (г)	Башоклар сони (дона)	Хосилдорлик (ц/га)
Назорат	22±2,91	48±2,91	25±2,75	95,75±2,14	6,56±0,67	21,03±0,74	1,77±0,18	36±3,53	17,84±1,21
Rhizobium sp.-4	67±4,99	58±5,25*	28±2,91	112,89±5,75	8,57±1,40	21,47±1,52	1,96±0,38	41±3,77	20,45±1,37
Rhizobium sp.-6	38±2,91	55±4,37	26±2,75	113,83±5,80	8,04±1,57	21,47±1,61	1,94±0,28	39±3,53	19,61±1,31
Rhizobium sp.-9	43±4,22	56±3,53	31±3,20	98,9±3,95	7,09±0,90	20,64±1,57	1,77±0,14	39±2,91	19,56±1,30
Rhizobium sp- IC53	32±3,20	58±4,37	27±2,91	108,81±5,05	8,76±0,99	20,11±1,54	2,02±0,25	40±2,91	20,13±1,33
Rhizobium sp.-4 + *Pseudomonas* sp.-66	97±5,62*	62±4,99	35±3,77	123,67±6,55*	9,64±1,87*	21,63±2,32*	2,41±0,41*	45±5,62*	22,21±1,42*
Rhizobium sp.-6 + *Pseudomonas* sp.-66	54±3,53	59±4,37	32±3,77	118,17±5,29	9,25±1,51	21,53±1,49	2,36±0,24	43±4,99	21,57±1,36
Rhizobium sp.-9 + *Pseudomonas* sp.-66	63±4,99	60±4,37	34±3,77	109,9±4,75	9,38±0,90	20,13±1,44	2,38±0,21	40±3,53	20,14±1,34
Rhizobium sp.-IC53 + *Pseudomonas* sp.-66	41±3,77	61±4,37	35±2,91	121,38±5,28	10,65±1,32	21,49±1,52	2,63±0,25	44±4,99*	21,85±1,38*

Изоҳ: * - $p \leq 0,05$ да статистик аҳамиятли

Барча танланган штаммлар: *Rhizobium* sp.-4, *Rhizobium* sp.-6, *Rhizobium* sp.-9, *Rhizobium* sp.-IC53, нўхатни ривожланишига ва уни ҳосилдорлигига ижобий таъсир кўрсатган. Аммо нўхат уруғига *Rhizobium* ва *Pseudomonas* sp.-66 аралашмаси билан ишлов берилганда, алоҳида *Rhizobium* штаммлари билан ишлов берилганларга нисбатан, нўхат илдизида тугунаклар сони кўпайганлиги аниқланган.

Масалан, уруғга фақат *Rhizobium* sp.-4 билан ишлов берилганда, тугунаклар сони 67,2% ошган бўлса уруғга *Rhizobium* sp.-4 ва *Pseudomonas* sp.-66 аралашмаси билан ишлов берилганда, назоратга нисбатан – 77,4% га ошган. Нўхат уруғини икки штамм аралашмаси билан коинокуляция қилинганда, фақат битта штамм билан инокуляция қилинганга қараганда, пояни ва илдизни узунлиги кўпроқ бўлганлиги кузатилган.

Фақат *Rhizobium* sp.-4 штамми билан инокуляция қилинганда, нўхатни пояси ва илдизи, назоратга нисбатан мос равишда 17,3 ва 10,8% га ортган бўлса, *Rhizobium* sp.-4 ва *Pseudomonas* sp.-66 штаммларини аралашмаси билан коинокуляция қилинганда бу рақамлар 22,6 ва 28,6% ни ташкил қилган.

Шундай қилиб, *Rhizobium* sp.-4 ва *Pseudomonas* sp.-66 штаммларни аралашмаси нўхат уруғини коинокуляция қилишда бир мунча самарали ҳисобланиб, ўсимликнинг фаол ўсиши ва ривожланишига ижобий таъсир қилади ҳамда нўхат хосилдорлигини назоратга нисбатан 2,3-4,37 ц/га оширишни таъминлайди.

Танлаб олинган бактерия штаммларини идентификацияси

Идентификация қилиш учун энг фаол *Pseudomonas* sp.-66 штамми танлаб олинган ва уни 16S рРНК си анализ қилинган. Натижада, *Pseudomonas* sp.-66 штамми ДНК сини бир қисмининг нуклеотид кетма-кетлиги аниқланган ва бу қисм GenBan маълумотларига кўра, *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 (accession number AF094723) бактерия тури учун 99% ўхшаш бўлган. *Pseudomonas* sp.-66 штамми *Pseudomonas chlororaphis* 66 сифатида идентификация қилинган ҳамда GenBank да KX012005 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX012005?report=GenBank) рақами остида рўйхатга олинган.

Rhizobium бактериясининг штаммлари орасида энг фаолли *Rhizobium* sp.-4 деб топилган. Бу штаммни 16S рРНК сини нуклеотид кетма-кетлиги аниқланганда, у GenBan маълумотларига кўра, *Mesorhizobium ciceri* ca181 (accession number NZ_CM002796.1) бактерия тури учун 99% ўхшаш бўлган. *Rhizobium* sp.-4 штамми *Mesorhizobium ciceri*-4 сифатида идентификация қилинган ҳамда GenBank да KX012006 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX012006?report=GenBank) рақами остида рўйхатга олинган.

Танлаб олинган Pseudomonas chlororaphis-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 *бактерия штаммларини морфолого-культурал ва физиолого-биокимёвий хоссалари*

Pseudomonas chlororaphis-66 штамми колонияларини қаттиқ озуқа муҳитида ўсгандаги морфологияси:

1) МПА да (гўшт-пептонли агар) – колониялар доирасимон, чегаралари бир текис, озроқ бўртиб чиққан, тиниқ эмас, маркази яшил, четлари очроқ, шилимшиқ, диаметри 5-6 мм, сариқ-яшил, флуоресценцияланувчи, муҳитга чиқадиган пигмент ҳосил бўлиши кузатилади. Ёш колониялар оқроқ, культурани ёши ортган сари, яшил пигмент ҳосил бўлади.

2) 2% глицерин сақлаган МПА да - колониялар йириқ, рангланиши МПА га қараганда кучлироқ, муҳитга сариқ-яшил пигментни кучлироқ чиқаради.

3) Кинг Б – сариқ-яшил, флуоресценцияланувчи пигмент ҳосил қилади. Суюқ муҳитда ўстирилганда, *Pseudomonas chlororaphis*-66 юпқа, қатлам қатлам плёнка ҳосил қилади, қийшайган агарда (МПА) эса, кўплаб, бутун қирралари, бир текис штрихлар ҳосил қилади.

Pseudomonas chlororaphis-66 штамми хужайралари, ҳаракатчан, тўғри, майда, грамманфий, аэроб таёқчалар, размери: 1,6-1,7 х 0,6-0,8 мкм. Штамм флуоресценцияланувчи, муҳитда бир текис тарқаладиган пигмент синтез қилади. 42°С дан баланд ҳароратда ўсмайди. 4°С да жуда секин ривожланади. Каталаза ва оксидазага реакция ижобий. Денитрификация қилмайди. Аргининдегидролаза ҳосил қилади. Сахарозани леванга айлантира олади. Желатина, лицетин ва крахмални гидролиз қилади.

Ўзини ўсиши учун *Pseudomonas chlororaphis*-66 ҳар хил углерод манбаъларини ишлата олади: глюкоза, арабиноза, ксилоза, сахароза, мальтоза, раффиноза, фруктоза, рамноза, галактоза, глицерин, бутанол, гексанол, маннит, пропион кислота, антранил кислота, янтар кислота, α кетоглутар кислота, ацетат, пируват, лактат, цитрат, L-тирозин, D,L-лейцин, L-аргинин, D,L-аланин, D,L-валин, D,L-триптофан, L-пролин, D,L-лизин, D,L-серин, L-аспарагин, фенилаланин.

Глюкоза, ксилоза, арабиноза, сахароза, фруктоза ва галактозада ўстирилганда, кислота ҳосил қилади.

Pseudomonas chlororaphis-66 штаммида, *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммига нисбатан антагонистлик фаоллиги йўқ.

Mesorhizobium ciceri-4 ни 5-кунли культураси размери 1,4-1,6 х 0,3-0,5 мкм га тенг бўлган таёқчасимон шаклга эса. Штамм, спора ҳосил қилмайди, грамманфий, облигат аэроб. Агарли муҳитларда (нўхатли, горохли агар, YMA) хужайра колониялари, думалоқ, текис контурга эга, ялтироқ, оқроқ тиниқ, шишиб чиққан, шилимшиқли, 30°С да 2-3 кунда диаметри 2,0 – 2,5 мм га етади. 4°С да жуда секин ривожланади.

МПА да яхши ўсади, желатина ва крахмални гидролиз қилаолмайди, казеин сақлаган агарда амилаза ва оксидаза ҳосил қилмайди, денитрификация қилиш фаолиятига эга эмас, уреаза ва каталаза фаолиятига эга, ёғсизлантирилган стерил сутда ўстирилганда муҳитни нордонлаштиради, флуоресцент ва фенозин пигментларини синтез қилмайди. Штамм қуйидаги

углерод манбаъларини ишлата олади: сахароза, глюкоза, арабиноза, ксилоза, рамноза, мальтоза, лактоза, маннит, сорбит, дульцит. Азот манбаълари сифатида: аммонийли, нитратли ва амидли азотдан фойдалана олади. Штамм бромтимол кўк қўшилган ҮМА муҳитини сариқ рангга ўтқазади, бу эса кислота ҳосил бўлишини кўрсатади.

Mesorhizobium ciceri-4 штаммда *Pseudomonas chlororaphis*-66 штаммига нисбатан антагонистлик фаоллиги йўқ.

Pseudomonas chlororaphis-66 ва Mesorhizobium ciceri-4 штаммларни ўстиришни оптимал шароитлари

Pseudomonas chlororaphis-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммларини оптимал ўсиш шароитлари аниқланган. Хусусан, ҳар иккала штамм ҳам 4% гача NaCl қўшилган муҳитда яхши ўсиб ривожланиши аниқланган.

Pseudomonas chlororaphis-66 учун оптимал ўсиш ҳарорати - 34°С, *Mesorhizobium ciceri*-4 учун эса – 30°С.

Pseudomonas chlororaphis-66 ни ўсиши учун оптимал pH кўрсатгичи 6,2-7,5, *Mesorhizobium ciceri*-4 учун эса – 6,0-7,5.

Pseudomonas chlororaphis-66 ва Mesorhizobium ciceri-4 штаммларини ўсишни стимулловчи хусусиятлари

Штаммларни ИСҚ синтез қилишлари, АЦК-деаминаза фаоллиги, эримайдиган фосфатларни сўрилиши ҳамда азотфиксация активлиги хусусиятлари ўрганиб чиқилган.

Ҳар иккала штаммларни, триптофан сақлаган ҳамда триптофан сақламаган муҳитда ҳам фитогормон ИСҚ синтез қилиши аниқланган (2-расм).

а

б *Эслатма*: * $p \leq 0,05$ да статистик аҳамиятли

2-расм. Бактерия штаммларини ҳар хил концентрацияли NaCl иштирокида триптофан қўшиб ва қўшмасдан ўтқазилган тажрибаларда 7 кун культивация кейин ИСК синтез қилиши: а) *P. chlororaphis*-66, б) *M. ciceri*-4

Фитогормон синтези NaCl бўлмаган муҳитларда фаол кечган бўлсада, муҳит таркибида 4% гача NaCl бўлганда ҳам бу хусусият йўқотилмаганлиги аниқланган.

Pseudomonas chlororaphis-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммлари Г.С. Муромцевни қаттиқ муҳитида ҳам суюқ 1,5% NaCl сақлаган NBRIP муҳитда ҳам эримайдиган фосфат бирикмаларидан $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$ ва $AlPO_4$ эритиш

хусусиятига эгалар (2-жадвал).

2-жадвал

P. chlororaphis-66 ва _M. ciceri_-4 штаммлари иштирокида эримайдиган фосфатларни эриши

Штамм	$Ca_3(PO_4)_2$		$FePO_4$		$AlPO_4$	
	Қаттик муҳит*	Суюқ муҳит**	Қаттик муҳит	Суюқ муҳит	Қаттик муҳит	Суюқ муҳит
P. chlororaphis-66	156	2,19	143	1,47	0	1,29
M. ciceri-4	135	2,09	126	1,23	0	1,33

Эслатма: * Зонани оқариш методи билан баҳоланган, мм^2.
**Назоратдаги муҳитга нисбатан фосфатларни концентрациясининг ўртача кўтарилиши.

Тугунак бактерияларнинг бактероидлар шаклида азотфиксация қилиш хусусиятини аниқлаш мақсадида, ҳар хил нўхат навлари уруғларини *Mesorhizobium ciceri*-4, ҳамда *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 аралашмаси билан инокуляция қилингандан кейин ҳосил бўлган интакт дуккак-ризобиал системанинг нитрогеназа фаоллиги текшилганда, моно инокуляцияга нисбатан коинокуляция натижасида нитрогеназа фаоллиги баланд эканлиги аниқланган (3-жадвал).

Бу натижалар, *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммлари нўхат ўсимлиги билан самарали симбиоз ҳосил қилишини кўрсатади.

3-жадвал

Тугунак-ризобиал тизимда уруғни _M. ciceri_-4 штамми билан бир маротаба ҳамда _M. ciceri_-4 ва _P. chlororaphis_-66 штаммлари билан ҳамқорликда инокуляция қилинганда нитрогеназа фаоллигини ўзгариши

Нўхат нави	*M. ciceri*-4		*M. ciceri*-4 + *P. chlororaphis*-66	
	Ўсимлик илдизда тугунаклар сони, дона.	Нитрогеназа фаоллиги, мкг N_2/раст./час	Ўсимлик илдизда тугунаклар сони, дона.	Нитрогеназа фаоллиги, мкг N_2/раст./час
Xalima	49±3,90*	47±4,10*	72±4,98*	63±4,98*
Uzbekiston-32	18±2,37	26±3,22	31±3,22	41±3,58
Lazzat	45±3,22	42±3,90	59±4,10	58±4,73
Miroz	24±3,22	19±2,37	35±3,22	36±3,22
Jahongir	33±3,58	37±3,22	49±3,90	54±3,90

CIEW-45	48±3,90*	51±4,10*	63±4,98*	65±4,73
Flip 1-31	15±2,37	25±3,22	26±3,22	47±3,90

Эслатма: * p≤0,05 да статистик аҳамиятли

PGPR ёрдамида тупроқни шўрланиш шароитида, нўхатда илдиз касалликларини чақирувчи фитопатоген замбуруғларни ингибирланиши

Танлаб олинган бактерия штаммларини фитопатоген замбуруғларни ўсишини чегаралаб қўйиш хусусиятини текшириб кўрилган. Штаммлар, у ёки бу замбуруғларга нисбатан маълум даражада антагонистик фаолликга эга эканлиги кузатилган (4-жадвал).

4-жадвал

Фитопатоген замбуруғларни ўсишини бактериялар таъсирида ингибирланиши
(ингибирланиш зонасининг радиуси, мм)

Бактерия штаммлари	Фитопатоген замбуруғлар					
	Fusarium oxysporum f.sp. *ciceris*	*Fusarium verticillioides*	*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*	*Rhizoctonia solani*	*Fusarium solani*	*Alternaria alternata*
KR 083	-	20±1,79	18±0,89	32±2,68*	-	23±1,79
M. ciceri-4	28±1,55	30±2,37*	31±2,37*	16±1,79	29±3,22*	34±2,37*
3612	16±1,55	29±2,37*	32±2,37	-	31±2,37	30±2,37*
Ep 14	-	16±1,55	26±1,55	15±0,89	30±2,37	31±2,37*
Tivi 7	-	18±1,79	33±2,37*	35±2,37	-	25±1,55
KR 076	-	14±0,89	-	30±2,37	27±1,79	29±2,37*
Rhizobium sp.-6	-	23±2,37*	23±1,55	22±1,55	14±0,89	23±1,55
Rif ep17	16±1,79	-	22±1,79	22±1,79	25±1,55	-
Rhizobium sp.-9	25±1,55	15±0,89	35±2,37*	26±1,79	26±1,79	5±0,89
Rube 1326	18±1,55	-	20±1,55	24±1,55	22±1,55	17±1,79
P. chlororaphis-66	32±2,37*	23±1,55	34±2,37*	24±1,79	33±2,37	29±2,37*
BB-135	25±2,37*	-	22±1,55	19±1,55	16±1,79	22±1,55
TSAU-20	21±1,79	-	21±1,79	22±1,79	32±2,37	24±1,79
Rhizobium sp. IC-53	-	18±1,79	18±1,55	25±1,55	21±1,55	20±1,79

Эслатма: * p≤0,05 да статистик аҳамиятли

Айниқса, *Mesorhizobium ciceri*-4 ва *Pseudomonas chlororaphis*-66 штаммларининг текшириш учун олинган барча замбуруғларга нисбатан фаоллиги баланд эканлиги аниқланган. *Pseudomonas chlororaphis*-66 - *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* га қарши 32 мм ва *Fusarium solani* га қарши 33 мм лик зона ҳосил қилган бўлса, *Mesorhizobium ciceri*-4, *Fusarium verticillioides* (30 мм) ва *Alternaria alternata* (34 мм) га қарши кучли антагонист эканлиги кузатилган.

Фитопатоген замбуруғларни биологик назорат қилувчи бактериал омиллар
Pseudomonas chlororaphis-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммлари, кўплаб фитопатоген замбуруғларга нисбатан антифунгал фаолликга эга. Қуйида фитопатоген замбуруғларни биологик назоратини таъминловчи асосий омиллар келтирилган.

Pseudomonas chlororaphis-66 қуйидаги метаболитларни синтез қилади: гидролитик ферментлар (хитиназа, целлюлаза ва протеаза) ҳамда HCN (5-жадвал). Бу штамм азот манбаи сифатида АЦК дан фойдалана олади, бу эса,

ўсимликларда стресс шароитида этилен ҳосил бўлишини пасайтирувчи, АЦК-деаминаза ферменти синтез билан боғлиқ. *Mesorhizobium ciceri*-4 HCN, АЦК-деаминаза ферментни ва целлюлаза синтез қилаолмайди. Аммо, бу штамм, нўхат ризосферасида замбуруғларни фаоллигини босиб қуйувчи, глюканаза, липаза ва протеаза ферментларини синтез қилади.

5-жадвал

***Pseudomonas chlororaphis*-66 штаммини хитин гидролиз қилиши**

Ўстириш вақти, сут	Хитин гидролизининг самарадорлиги*
4	1,6
6	2,8
7	3,4
8	5,78

Эслатма: *- лойқа муҳитни (хитин сақловчи) колония атрофида оқариш диаметрини колония диаметрга нисбати, мм/мм

Pseudomonas chlororaphis-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммларни ХАС анализ ёрдамида сидерофорлар синтез қилиши ўрганилган ва *Rhizobium meliloti* нинг типовой штамми билан солиштирилган (6-жадвал). Натижада,

штаммларни фаол сидерофорлар синтез қилиш хусусияти ва шу сабабли замбуруғларни ўсиши учун керакли бўлган тупроқдаги темирни, замбуруғга етиб боришини чегараланганлиги кузатилган.

6-жадвал

Штаммларни сидерофорлар синтез қилишини ХАС анализи

Штамм	ХАС анализ (ҳаворанг агарда лимон ранг ҳалқа ҳосил бўлиши)	Ҳалқанинг диаметри (см)
P. chlororaphis-66	+	1,67±0,2
M. ciceri-4	+	1,53±0,4
R. meliloti	+	1,70±0,3

Эслатма: + ХАС анализ ижобий эканлигини кўрсатади.

PGPR *Pseudomonas* фақат ўсимликни ризосферасига колонизация бўлганидагина унга ижобий таъсир кўрсатаолади. Мана шу фикрни текшириб кўриш мақсадида, рифампицинга резистент *Pseudomonas chlororaphis*-66R штаммини нўхат ризосферасида типовой колонизатор штамм *Ps. fluorescens* WCS365 (Lugtenberg et al., 2001) билан рақобат қила олиши ўрганилган. Натижада, 1,5% NaCl сақлаган шароитда *Ps. chlororaphis* 66R (1 см иддизда $10,5x10^3$ КОЕ), нўхат илдизида типовой штаммдан (1 см иддизда $9,3x10^3$ КОЕ) яхшироқ колонизация бўлиши аниқланган. *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммини 1,5% NaCl шароитда, нўхат илдизида *Pseudomonas chlororaphis*-66R билан рақобат қилишини ўрганилганда, *M. ciceri*-4 КОЕ титри (1 см иддизда $8,9x10^3$ КОЕ), *Ps. chlororaphis*-66R (1 см иддизда $11,4x10^3$ КОЕ) га нисбатан бироз камроқ эканлиги аниқланган. Бу натижалар, ҳар иккала штамм ҳам нўхат илдизида фаол колонизация бўлишини, ҳамда ҳамкорликда яшаб, тупроқ микрофлораси билан рақобат қилаолиши кўрсатади.

Бактерияларни нўхат илдизи экссудатларига хемотаксиси

Ташқаридан киритилган бактерияларни илдизда колонияланиши, шу бактерияларни ўсимликга таъсирининг самарадорлигини кўрсатувчи асосий омилдир. Колонизацияни дастлабки босқичи, бактерияларни ўсимлик илдизи томон таксиси ҳисобланади. Хемотаксис фаоллиги илдиз экссудатларини таркиби ва миқдорига боғлиқ. Шунинг учун биз нўхатни икки: «*CIEW*-45» ва «*Hisor*-32» навининг илдиз экссудатларини таркиби ва уларни миқдорини аниқладик. Бу тажрибалардан олдин мана шу икки навни ҳосилдорлигига бактерияларни ҳар хил штаммлари билан инокуляция қилишни таъсири дала шароитида ўрганиб чиқилган эди. Натижада, ҳар икки навни ҳосилдорлиги ошган бўлсада, «*Hisor*-32» навини ҳосилдорлиги, «*CIEW*-45» навига

қараганда деярли 4 марта кам эканлиги аниқланган эди.

Тадқиқот натижалари, «*CIEW*-45» ва «*Hisor*-32» навлари бир-биридан секрецияланадиган илдиз экссудатларини миқдори бўйича фарқ қилишини, хусусан, «*Hisor*-32» навида бу хусусият «*CIEW*-45» навига қараганда паст, айниқса, экссудатларни катионли фракциясини миқдори, асосан гистидинни миқдори (деярли 2 марта кам) ҳисобидан кам эканлиги кузатилган.

Экссудатлар секрециясидаги бундай фарқ, бактерияларни нўхатни ҳар хил навлари илдизлари томон хемотаксис кучига таъсир этганлиги тадқиқотлар асосида аниқланган. Масалан, «*CIEW*-45» ва «*Hisor*-32» навлари экссудатларининг бир хил миқдорида, *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммларини «*CIEW*-45» нави устуворлик билан ўзига «чақиради». Бунга сабаб, бу навларни экссудатлари таркибидаги фракциялари орасидаги ўзаро нисбат бўлиши тахмин қилинган. Кейинги тадқиқотларда *Pseudomonas chlororaphis*-66 штамми нўхат экссудатларига, *Mesorhizobium ciceri*-4 хужайраларига қараганда тезроқ ҳаракат қилиши ва *Mesorhizobium ciceri*-4 концентрациясига тенг бўлган концентрацияга 15 минутда етиши, *Mesorhizobium ciceri*-4 эса бунга 30 мин вақт сарфлаши аниқлаган. *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммини максимал хемотаксиси учун, экссудатларни миқдори 3,88 мг/мл бўлса етарли бўлган бир вақтда, *Pseudomonas chlororaphis*-66 штамми учун бу рақам 7,75 мг/мл ни ташкил қилган ва экссудатларни миқдори оширилганда хемотаксис тезлиги деярли ўзгармаган. Илдиз экссудатларини 3 фракциясини аралашмаси, ҳар иккала штаммни хемотаксиси учун ҳар қандай 2 фракцияни аралашмасига қараганда устуворроқ бўлган. *Pseudomonas chlororaphis*-66 штамми учун 2 фракцияларни аралашмаси орасида катионли ва анионли фракцияларни аралашмаси устуворроқ бўлса, *Mesorhizobium ciceri*-4 штамми учун катионли ва нейтрал фракциялар аралашмаси устуворроқ бўлган.

Нўхатни 2 навининг илдиз экссудатлари ҳар хил нисбатда, ҳар хил компонентлар сақлайди. Балки, мана шу кимёвий моддаларни маълум пропорцияда иштироқ этиши, ҳар иккала навни илдизларида бактерияларни самарали колонизация бўлишида асосий роль ўйнаши мумкиндир. Нўхат илдизини *Pseudomonas chlororaphis*-66 штамми билан колонияланиши, нўхат билан тугунак бактерияларини самарали симбиозида ва ўсимликни фитопатоген замбуруғлардан ҳимоя қилишда муҳим роль ўйнайди. Шундай

қилиб, нўхатни ҳар хил навлари, ҳар хил миқдорда илдиз экссудатлари секреция қилиши ва экссудатлар таркибидаги компонентларни нисбати ҳар хил бўлганлиги, фойдали бактерияларни илдизга қараб хемотаксисини фаоллигини ҳар хил эканлигини белгилайди, бу эса, илдизни бактериялар билан ҳар хил даражада колонияланишини, оқибатда ўсимликни соғлом ривожланиб, сер хосил беришини асосий омили бўлиб ҳизмат қилади.

Диссертациянинг «**Псевдоризобин**» – **нўхат учун самарали микробиологик препарати**» деб номланган тўртинчи бобида шўрланган

шароитида «Псевдоризобин» биопрепаратини самарадорлигини текшириш бўйича олинган материалларни натижалари келтирилган.

Танлаб олинган штаммлар асосида, нўхат учун комплекс таъсирга эга бўлган, самарадор биопрепарат яратилган. Биопрепаратни комплекс таъсири, нўхатни ўсиши, ривожланишини кучайтириш ва уни илдизда касаллик қўзғатувчи фитопатоген замбуруғлардан ҳимоя қилиши билан боғлиқ эканлиги аниқланган.

Ушбу биопрепарат, нўхат уруғига экишдан олдин ишлов бериш – орқали ишлатилади ва шўрланган ҳамда шўрланмаган тупроқларда ҳам юқори ҳосил олиш имконини беради. Биопрепаратни «Псевдоризобин» («Pseudorhizobin») деган номи, унга асос бўлган 2 бактерия: «*Pseudomonas*» ва «*Rhizobium*» авлоди номларидан олинган. 3-расмда «Пседоризобин» биопрепарати тайёрлашни технологик чизмаси келтирилган.

«Псевдоризобин» биопрепаратининг самарадорлигини аниқлаш мақсадида, Қорақалпоғистон Республикаси, Амударё туманининг табиий шўрланган тупроқларида дала синови тажрибалари ўтқазилган (2015 й.).

«Псевдоризобин» нухатни «*Xalima*» ва «*Uzbekiston*-32» навларининг хосилдорлигини 21,9% га, «*CIEW*-45» навининг хосилдорлигини эса 22% га оширган. Худди шундай натижалар нўхатни бошқа навларида ҳам олинган.

Натижалар, тупроқ намлиги билан тўғридан-тўғри боғлиқ эканлигини кўрсатган. Тупроқ қуриб қолганда биопрепарат билан киритилган бактериялар сони камайиб кетган ва ўсимлик хосилдорлиги пасайган.

«Псевдоризобин» биопрепаратини иқтисодий самараси ҳисоб-китоб қилиб чиқилган. Энг баланд натижа «*CIEW*-45» навида олинган - 1602000 сўм, 2-ўринда нўхатни «*Xalima*» навида кузатилган - 1537000 сўм.

«Псевдоризобин» билан ишлов берилган нўхат уруғи таркибидаги асосий озуқа элементлари ўрганилганда, биопрепарат нўхатнинг озуқа бирлигини ошириши, оқсил миқдори 5% га; ёғ – 4% га; углеводлар – 2% га ошганлиги аниқланган.

Ўзбекистон Усимликларини Ҳимоя Қилиш Илмий Тадқиқот институти (ЎзУҲҚИТИ) ни тажриба участкасида «Псевдоризобин» ни *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* чақирадиган фузариоз вилт касаллигига қарши синовлардан ўтқазилган. 1 т нўхат уруғига 70 кг «Псевдоризобин» билан ишлов берилганда, биопрепаратни биологик самарадорлиги 83,3% ни ташкил қилган. Бу рақамни эталон препарат – кимёвий «Витавакс 200 ФФ 34% в.с.к.» да олинган рақамга (86,1%) яқин эканлиги аниқланган.

Mesorhizobium ciceri - 4 *Pseudomonas chlororaphis*-66 Йирик шоҳ. ҳайвон. чиқиндиси + қизил калиф. чуволчангини гибриди

«YMA» муҳити сақлаган косяклар

кўпайтириб ферментация қилиш (3 сут, 30°С да)

суюқлик КОЕ $8x10^7$

«Пептонли агар» мўҳити сақлаган косяклар

«Дуккаклилар қайнатмаси» муҳитида, ҳажмини

M. ciceri – 4 штамми сақлаган культурал

«Пептонли шўрва»

муҳитида, ҳажмини кўпайтириб ферментация қилиш (3 сут, 34°С да)

P.chlororaphis – 66 штамми сақлаган культурал суюқлик КОЕ $3,6x10^8$ ва чуволчангни Тошкент популяцияси (50/50) 1 $м^2$ га 10 минг чуволчанг

Биогумусни иссиқ ҳаво ёрдамида 55% намликгача қурутиш

Меласса – 3-5%, $CaCO_3$-3%, гумат калия-3%, $MgSO_4$-1%, K_2HPO_4-1%, $(NN_4)_6Mo_7O_{24}x4H_2O$-0,05%, $MnSO_4$-0,05%, $FeSO_4$-0,05%, КМЦ-2% қўшиб, биогумусни модификация қилиш

Субстратни культурал суюқлиги билан экиш 20 мл/кг ҳисобидан

M. ciceri-4 титри – $8x10^9$ КОЕ/г, *P. chlororaphis*-66 титри – $9x10^9$ КОЕ/г

30°С да, 2 ҳафта ўстириш

γ-нурлари таъсирида стерилизация 2,5 МРад

«Псевдоризобин»

3-расм. «Псевдоризобин» биопрепарати тайёрлашни технологик чизмаси

Шундай қилиб, «Псевдоризобин» ни юқори даражада биологик самарадорликга эга эканлиги, уни нўхатни фузариоз вилтига қарши истиқболли биопрепарат деб аташга асос бўлган.

ХУЛОСА

«Шўрланиш шароитида нўхатнинг ўсиши ва ривожланишини кучайтиришда ҳамда уларнинг илдиз касалликларини биологик назорат қилишда ризосфера микроорганизмларининг роли» мавзусидаги докторлик диссертацияси бўйича олиб борилган тадқиқотлар натижасида қуйидаги хулосалар тақдим этилди:

1. Скрининг методи ёрдамида нўхатнинг ризосфера ва тугунакларидан шўрланиш шароитида нўхатнинг ўсиши ва ривожланишини кучайтирувчи *Pseudomonas* ва *Mesorhizobium* авлодларига мансуб бўлган шўрга чидамли бактерия штаммлари ажратилган ва танлаб олинган.

2. Бактерияларнинг морфолого-культурал ва физиолого-биокимёвий хоссалари ўрганилган. 16S рРНК анализ ёрдамида танлаб олинган штаммлари *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 сифатида идентификация қилинган ва GenBank да KX012005 ва KX012006 рақамлари остида рўйҳатга олинган.

3. *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммларини

оптимал ўсиш шароитлари ва уларнинг NaCl нинг 4% концентрацияда ўсиш

қобилияти аниқланган. *Pseudomonas chlororaphis*-66 штаммни ўстириш учун оптимал ҳарорати 34°С, *Mesorhizobium ciceri*-4 учун эса – 30°С. *Pseudomonas chlororaphis*-66 ни ўсиши учун оптимал pH кўрсатгичи 6,2-7,5, *Mesorhizobium ciceri*-4 учун эса – 6,0-7,5.

4. *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммларини ИСК ва АЦК-деаминаза синтези, эримайдиган фосфат бирикмаларини эритиши, нитрогеназа фаоллиги, нўхат илдизида яшаб кетаолиши, шўрланишга чидамлилиги туфайли, шўрланиш шароитида нўхатни ўсиши ва ривожланишига ва ҳосилдорлилига ижобий таъсир қилиши аниқланган.

5. *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммларининг нўхат илдиз касалликлари чақирувчи *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *R. solani*, *F. solani*, *A. alternata* фитопатоген замбуруғларга нисбатан антифунгал хусусиятлари ўрганилган.

6. Нўхатни эрта ўсув даврида секреция бўладиган илдиз экссудатларини таркиби ва миқдорий анализи ўтқазилган. Нўхатни ҳар хил навларини илдиз экссудатларининг асосий компонентлари аминокислоталар (гистидин, аргинин, лизин, цистеин, серин, глицин, аспарагин кислотаси, лейцин, изолейцин ва аланин), шакар кислоталар (глюкон, галактон, маннурон ва 2 та аниқланмаган кислота Rf=0,56 ва 0,62) ва шакарлар (глюкоза, галактоза, арабиноза ксилоза, рибоза) эканлиги, уларни миқдори ва нисбати навга боғлиқ эканлиги аниқланган. Ташқаридан киритиладиган фойдали бактерияларни колонизацияланиши учун асосий омил бўлган экзометаболитлар (гистидин, глюкон кислота, глюкоза), ўсимликни стресс шароитларга (шўрланиш, касаллик) чидамлилигини белгилаши ва билвосита нўхатни ҳосилдорлигини ошишига сабаб бўлиши аниқланган.

7. Биринчи марта маҳаллий, шўрга чидамли бактериялар *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 асосида нўхат уруғига экишдан олдин ишлов беришга мўлжалланган самарадор микробиологик биопрепарат – «Псевдоризобин» яратилган. «Псевдоризобин» нўхатни ўсиши ва ривожланишини кучайтиради ҳамда уни ўрта даражада шўрланган тупроқда фитопатоген замбуруғлар чақирадиган илдиз касалликларидан ҳимоя қилади.

8. «Псевдоризобин» яратиш биотехнологияси, йирик-шоҳли ҳайвонлар ахлатидан калифорния қизил чуволчанглари гибриди ёрдамида биогумус олиш, уни меласса, калий гумати, минерал тузлар ва КМЦ билан аралаштириш, стерилизация қилиш ва унда *Pseudomonas chlororaphis*-66 ва *Mesorhizobium ciceri*-4 штаммларини маълум ҳарорат ва pH кўрсатгичида ўстириш босқичларини ўз ичига олади. Яратилган технологик регламент ООО «Био-ўғит» ва ООО «Mangit mineral» корхоналари шароитида синаб кўрилган ва тасдиқланган. «Псевдоризобин» биопрепаратини нўхат етиштиришда қўллаш бўйича амалий тавсиялар ишлаб чиқилган, тасдиқланган ва чоп этилган.

9. «Псевдоризобин» ни нўхатни хосилдорлигини оширишдаги самарадорлиги баҳоланган. Табиий шўрланган тупроқларида нўхатнинг

«*Xalima*» ва «*Uzbekiston*-32» навларини ҳосилдорлиги назоратга нисбатан 21,9% га, «*CIEW*-45» навида эса, 22% га ошгани кўрсатилган. «Псевдоризобин» ни фузариоз вилтга қарши биологик самарадорлиги баҳоланган ва у 83,3% ни ташкил эканлиги.

НАУЧНЫЙ СОВЕТ по ПРИСУЖДЕНИЮ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК 16.07.2013.В.01.03 ПРИ НАЦИОНАЛЬНОМ УНИВЕРСИТЕТЕ УЗБЕКИСТАНА и ИНСТИТУТЕ

МИКРОБИОЛОГИИ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ УЗБЕКИСТАНА

ШУРЫГИН ВЯЧЕСЛАВ ВЛАДИМИРОВИЧ

РОЛЬ РИЗОСФЕРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В СТИМУЛЯЦИИ РОСТА И РАЗВИТИЯ НУТА И БИОЛОГИЧЕСКОМ КОНТРОЛЕ ЕГО КОРНЕВЫХ БОЛЕЗНЕЙ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ

03.00.04 – Микробиология и вирусология
(биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ ДОКТОРСКОЙ ДИССЕРТАЦИИ

ТАШКЕНТ – 2016

Тема докторской диссертации зарегистрирована в Высшей аттестационной комиссии при Кабинете Министров Республики Узбекистан за № 30.06.2015/B2015.2.B162.

Докторская диссертация выполнена в Национальном университете Узбекистана.

Автореферат диссертации на трёх языках (узбекский, русский, английский) размещён на веб-странице по адресу www ik-bio.nuu.uz и на Информационно-образовательном портале «ZiyoNet» по адресу www.ziyonet.uz.

Научный консультант: Давранов Кахрамон
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Хасанов Батыр Ачилович
доктор биологических наук, профессор

Ходжибаева Санабар Мирзаевна
доктор биологических наук, профессор

Атабаева Халима Назаровна
доктор сельскохозяйственных наук, профессор

Ведущая организация: Институт генетики и экспериментальной биологии растений

Защита диссертации состоится «_» _____ 2016 г в «____» часов на заседании Научного совета 16.07.2013. В.01.03 при Национальном университете Узбекистана и Институте микробиологии (адрес: 100174, г.Ташкент, Алмазарский район, ул. Университетская-4, конференц-зал Биолого-почвенного факультета Национального университета Узбекистана (203-каб). Тел.: (+99871) 227-12-24, факс: (+99871) 246-53-21, (+99871) 246-02-24, e-mail: nauka@nuu.uz.).

С докторской диссертацией можно ознакомиться в Информационно-ресурсном центре Национального университета Узбекистана (зарегистрирована за №____). Адрес: 100174, г.Ташкент, Университетская улица, дом 4. Административное здание Национального университета Узбекистана, 2-й этаж, 4-й каб. Тел.: (+998 71) 236-46-55; факс: (+99871) 246-02-24.

Автореферат диссертации разослан «_» _____ 2016 года.
(протокол рассылки № ____ от « ____»_____2016 года).

Г.И. Джуманиязова
Председатель Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н.

З.А. Маматова
Ученый секретарь Научного совета по присуждению учёной степени доктора наук, к.б.н.

Т.Г. Гулямова
Председатель научного семинара при Научном совете по присуждению учёной степени доктора наук, д.б.н., профессор

ВВЕДЕНИЕ (аннотация докторской диссертации)

Актуальность и востребованность темы диссертации. В последние годы почвенное засоление стало одной из наиболее острых глобальных проблем сельского хозяйства во всём мире. Особенно это касается стран с засушливым и полузасушливым климатом. Так в мире примерно 955 млн гектар являются засоленными[1], из которых приблизительно третья часть считается засоленной ионами Na^+.[2] Засоление способствует быстрой деградации сельскохозяйственных угодий. Причиной этого является то, что многие сельскохозяйственные культуры не могут нормально расти в засоленных почвах, потому что нарушаются устоявшиеся микробиоценозы и почва становится практически безжизненной.

Одним из действенных подходов для решения данной проблемы является селекция и внедрение солеустойчивых растительно-микробных симбиозов на проблемных землях. Лучше всего для этого подходят бобовые культуры, в частности нут. Однако нут очень чувствителен к засолению почвы. В зависимости от концентрации солей в почве значительно снижается количество всходов, растения становятся низкорослыми со слабо развитой корневой системой, значительно снижается иммунитет, что в итоге приводит к заболеваниям и гибели растения. Засоление почвы практически нарушает симбиотические взаимоотношения между бобовыми культурами и ризобиями. В результате снижается образование клубеньков, фиксация атмосферного азота и нитрогеназная активность. В частности погибают многие штаммы клубеньковых бактерий, что мешает формированию эффективных симбиозов.

Кроме того, большую проблему представляют фитопатогенные грибы, вызывающие корневые болезни нута. В отдельные годы они приводят к значительным потерям урожая и к снижению его качества. Известно, что некоторые микроорганизмы способны подавлять рост фитопатогенных грибов за счёт таких свойств, как, продуцирование гидролитических ферментов, сидерофоров, HCN и др. Одними из самых эффективных в этом отношении микроорганизмов являются некоторые представители рода *Pseudomonas*, которые также способствуют снижению различных стрессов у растений, тем самым повышая их устойчивость к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Однако до сих пор не ясно, какую именно роль могут играть данные бактерии в ризобиально-бобовом симбиозе, а также не достаточно изучено их влияние на нут в условиях засоленных почв. В связи с этим поиск эффективных солеустойчивых штаммов клубеньковых бактерий и псевдомонад, изучение их влияния на нут в условиях засоления и создание на их основе конкурентоспособных биопрепаратов для улучшения роста и развития нута, а

[1]Szabolcs I. Soils and salinization// In: Handbook of Plant and Crop Stress. – Edited by Pessarakli M. – New York: Marcel Dekker, 1994. – pp. 3-11.

[2]Saxena N.P., Johansen. C, Saxena M.C., Silim S.N. Selection for drought and salinity tolerance in cool-season food legumes// In: Breeding for Tolerance in Cool Season Food Legumes. – Edited by Singh K.B. and Saxena M.C. – Chichester, UK: Wiley, 1993.

– pp. 245-270.

также борьбы с его корневыми болезнями в условиях засоленных почв является актуальной задачей.

Данное диссертационное исследование в определенной степени служит выполнению задач, предусмотренных в постановлении № 142 Кабинета Министров Республики Узбекистан от 27 мая 2013 года «О программе действий по охране окружающей среды Республики Узбекистан на 2013-2017 годы», а также в других нормативно-правовых документах, принятых в данной сфере.

Соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики. Данное исследование выполнено в соответствии с приоритетным направлением развития науки и технологий республики: V. «Сельское хозяйство, биотехнология, экология и охрана окружающей среды».

Обзор зарубежных научных исследований по теме диссертации. Научные исследования, направленные на повышение урожайности нута, осуществляются в ведущих научных центрах и высших образовательных учреждениях мира, в том числе в Indian Institute of Pulses Research (Индия), International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (Индия), Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture (Австралия), Australian Centre for International Agricultural Research (Австралия), Agricultural Research Centre at the Washington State University (США), Crop Development Centre at the University of Saskatchewan (Канада), Ayub Agricultural Research Institute (Пакистан), Northwestern Center of Biological Research (Мексика), Pasteur Institute (Франция), International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (Узбекистан), Ташкентском государственном аграрном университете (Узбекистан).

В результате исследований, проведенных в мире по повышению урожайности нута, получены ряд научных результатов, в том числе: систематизированы данные по генетическому улучшению нута для повышения урожайности и увеличения количества белка в зерне, а также по селекции сортов нута, устойчивых к различным болезням (Indian Institute of Pulses Research); методом селекции созданы устойчивые к засухе и засолению сорта нута, подобраны активные штаммы клубеньковых бактерий, благодаря которым в клубеньках нута повышена азотфиксирующая активность (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics); разработаны методы повышения качества зерна бобовых культур, методы борьбы с их грибными и вирусными болезнями, нематодами и другими вредителями (Agricultural Research Centre at the Washington State University).

В мире по повышению урожайности нута по ряду приоритетных направлений проводятся исследования, в том числе: получение высокоурожайных сортов нута; создание эффективных микробных сообществ, повышающих урожай нута; изучение азотфиксирующих свойств бактерий и усиление адаптации ассоциативных и бобово-ризобиальных

симбиозов в условиях засоления; повышение качества зерна нута; повышение устойчивости нута к биотическим и абиотическим стрессам, как

при помощи методов генетической инженерии, так и при помощи микробиологических методов; поиск эффективных методов борьбы с болезнями и вредителями нута.

Степень изученности проблемы. Ранее были изучены некоторые свойства клубеньковых бактерий семейства *Rhizobiaceae* (Саимназаров, 2003; Sessitsch et al., 2002; Bouhmouch et. al, 2005; Franzini et al., 2010; Jida, Assefa, 2012; Egamberdieva et al., 2013), а также свойства бактерий рода *Pseudomonas* (Акимова, 2007; Weller, 2007; Лукаткин, 2009; Hassanein, 2009; Egamberdieva, 2012). Установлено, что некоторые виды *Pseudomonas* способны выделять антибиотические вещества, сидерофоры и переводить нерастворимые фосфаты в усваиваемую растениями форму (Боронин, 1998). Ризобактерии изучены с целью использования их в составе биоудобрений (Джуманиязова, 2004; Моргун, 2009; Соколова и др., 2009; Damir et al., 2011). Согласно этим данным, активные штаммы бактерий семейства *Rhizobiaceae* способны образовывать устойчивые и очень активные симбиозы с бобовыми растениями, обеспечивающие растения легкодоступным азотом в достаточно больших количествах. На основе бактерий рода *Rhizobium* и других родов семейства *Rhizobiaceae* созданы удобрения («Нитрагин», «Ризобин», «Ризоторфин») для различных видов бобовых культур, но применение этих препаратов на засоленных почвах практически не приносит прибавки урожая, а в случае поражения растений фитопатогенными грибами не эффективно. В то же время некоторые представители бактерий рода *Pseudomonas* способны стимулировать развитие сельскохозяйственных культур (огурцы, пшеница, хлопчатник), увеличивая солеустойчивость, минеральное обеспечение растений, и благодаря биоконтролю фитопатогенных грибов. Стимуляция обеспечивается различными физиолого-биохимическими механизмами, которые описаны в многочисленных научных работах (Боронин, 1998; Saharan, Nehra, 2011; Deshwal et al., 2013). Эти механизмы включают синтез фитогормонов, фосфатмобилизацию и биологический контроль фитопатогенов. Именно эти ценные свойства являются причиной использования некоторых бактерий рода *Pseudomonas* в составе биоудобрений.

В научной литературе практически отсутствуют сведения о стимуляции образования клубеньков, повышении солеустойчивости растений нута и их урожайности смешанными культурами *Pseudomonas* и *Rhizobium*. Поэтому необходим поиск новых солеустойчивых ризосферных микроорганизмов, способных стимулировать рост и развитие нута, обладающих антагонистическими свойствами по отношению к фитопатогенным микроорганизмам, вызывающим корневые болезни, и создание на их основе биопрепаратов для нута, эффективных для применения на засоленных почвах. Объединение ценных свойств данных микроорганизмов при их

совместном использовании в составе микробиологических удобрений и их дальнейшее использование в сельскохозяйственной практике позволило бы получить гораздо более высокие урожаи бобовых, таких как нут, при выращивании в засоленных почвах. С другой стороны, выращивание нута в

засоленных почвах, позволяло бы накапливать азотные соединения и предохранять почвы от эрозии, благодаря высокой азотфиксирующей способности ризобий, живущих в симбиозе с растением.

Связь темы диссертации с научно-исследовательскими работами высшего образовательного учреждения, где выполнена диссертация. Диссертационное исследование выполнено в рамках плана научно исследовательских работ прикладных и международных проектов Национального университета Узбекистана: «Identification of genetic variation and effective plant-microbe association for salt tolerance in chickpea» Thalwitz Memorial Scholarship IFAR – World bank grant (2011-2012 гг.); ИДТ-9-01. «Разработка агротехники применения нового, конкурентоспособного и ресурсосберегающего микробиопрепарата в сельскохозяйственной практике» (2012-2014 гг.); И-2012-30. «Внедрение новых микробиологических препаратов для повышения урожайности растений и плодородия почв в условиях Республики Каракалпакстан» (2012-2014 гг.).

Целью исследования является создание эффективного биопрепарата на основе ростстимулирующих ризосферных микроорганизмов для повышения урожайности нута в условиях засоления.

Задачи исследования:

поиск и выделение бактерий из клубеньков и ризосферы нута, скрининг активных штаммов по солеустойчивости и ростстимулирующей способности;

изучить морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства ростстимулирующих ризобактерий нута, идентифицировать отобранные штаммы;

определить оптимальные условия культивирования активных штаммов;

изучить выживаемость ростстимулирующих ризобактерий на корнях нута в засоленных почвах, определить их фитогормональную, нитрогеназную и антифунгальную активность;

изучить антифунгальные свойства ростстимулирующих ризобактерий по отношению к фитопатогенам нута - продуцирование гидролитических ферментов, HCN и сидерофоров;

изучить хемотаксис ризобактерий к корневым экссудатам нута, как основопологающий фактор их взаимодействия;

разработать новый биопрепарат на основе эффективных штаммов солеустойчивых ростстимулирующих ризобактерий нута. Изучить влияние биопрепарата на рост, развитие, урожайность нута и его эффективность в борьбе с фузариозным вилтом нута в полевых условиях на засоленных почвах;

разработать биотехнологию получения и применения нового

биопрепарата - лабораторный регламент, технологическую схему на производство и практические рекомендации по использованию биопрепарата в сельском хозяйстве при выращивании нута;

определить биологическую и экономическую эффективность нового биопрепарата при возделывании нута на засоленных почвах. **Объектом исследования** служили представители бактерий семейства

Rhizobiaceae, выделенные из клубеньков нута, выращиваемого на территории Республики Узбекистан; штамм *Rhizobium* sp.-IC53 любезно предоставленный доктором Subramaniam Gopalakrishnan из Международного Института исследования сельскохозяйственных культур в полузасушливых тропиках (ICRISAT, Патанчеру, Хайдарабад, Индия), за что выражаем ему свою искреннюю благодарность; бактерии рода *Pseudomonas*, выделенные из ризосферы нута, выращенного в различных областях Республики Узбекистан, а также 29 сортов нута, из которых местные сорта: «*Jaxongir*», «*Xalima*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Zimistoni*», «*Muqtadir*», «*Hisor*-32», «*Miroz*», «*CIEW*-45», «*Sino*»; импортные сорта: «*Flip* 1-01», «*Flip* 1-04», «*Flip* 1-05», «*Flip* 1-19», «*Flip* 1-21», «*Flip* 1-22», «*Flip* 1-29», «*Flip* 1-31», «*Flip* 1- 33», «*Flip* 03-102c», «*Flip* 05-59c», «*Flip* 03-74», «*Flip* 06-102c», «*Flip* 06-66», «*Flip* 05-65», «*Flip* 06-124c», «*Flip* 06-80c», «*Flip* 03-27c», «*Flip* 06-155c», любезно предоставленные доктором Ram Sharma из Международного Центра сельскохозяйственных исследований в засушливых районах (ICARDA).

Предметом исследования являлось выделение бактерий из клубеньков и ризосферы нута, проведение скрининга, определение влияния отобранных штаммов микроорганизмов на рост и развитие нута в засоленных почвах; установление факторов, влияющих на стимуляцию роста и развития нута и биологический контроль его корневых болезней солеустойчивыми штаммами бактерий родов *Pseudomonas* и *Mesorhizobium*, используемых для создания биопрепарата; разработка лабораторного регламента получения биопрепарата и испытание его в производственных условиях; оптимизация условий применения биопрепарата, повышающего урожайность нута и защищающего его от корневых болезней в условиях почвенного засоления.

Методы исследования. При проведении исследований использовали микробиологические, биотехнологические, биохимические, спектрофото метрические, молекулярно-биологические, хроматографические, агрохими ческие и биометрические методы.

Научная новизна исследования заключается в следующем: из клубеньков и ризосферы нута, выращенного в засоленных почвах, выделены ростстимулирующие штаммы бактерий, относящиеся к родам *Pseudomonas* и *Mesorhizobium*, которые методом определения последовательности нуклеотидного состава 16S рРНК отнесены соответственно к *Pseudomonas chlororaphis* - 66 и *Mesorhizobium ciceri* - 4; получены рифампицин-резистентные штаммы этих бактерий, благодаря которым удалось определить их колонизирующие способности в корневой системе

нута;

впервые установлено, что *P. chlororaphis*-66 способствует активному клубенькообразованию у нута, а также повышает его иммунитет, продуктивность и устойчивость к фитопатогенным грибам;

изучены различные свойства штаммов *M. ciceri*-4 и *P. chlororaphis*-66, влияющие на рост и развитие нута, а также факторы, отвечающие за биологический контроль фитопатогенных грибов, вызывающих корневые болезни нута;

впервые установлено, что различные сорта нута синтезируют экссудаты различной природы (сахара, кислоты, аминокислоты) в различных количествах и секретируют их через корневую систему;

путём фракционирования корневых экссудатов на колонке с ионообменной смолой Dowex, получены 3 фракции: катионная (гистидин, аргинин, лизин, цистеин, серин, глицин, аспарагиновая кислота, лейцин, изолейцин и аланин), анионная (глюконовая, галактоновая и маннуроновая кислоты), нейтральная (глюкоза, галактоза, арабиноза, ксилоза и рибоза);

определено, что аттрагирующая способность отдельных фракций (зоны аттракции (см): катионная-1,0; анионная-0,6; нейтральная-0,8) ниже, чем суммарная (зона аттракции – 2,8 см). Смесь катионной и нейтральной фракций обладает более высокой аттрагирующей способностью, чем смесь катионной и анионной и смесь анионной и нейтральной фракций;

впервые на основе отобранных штаммов *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 разработан новый биопрепарат «Псевдоризобин».

Практические результаты исследования заключаются в следующем:

разработан лабораторный регламент получения биопрепарата «Псевдоризобин», который апробирован в производственных условиях ООО «Био-Ўғит» и ООО «Mangit mineral», выпущен опытный образец биопрепарата в количестве 1000 кг;

разработаны рекомендации «Применение биопрепарата Псевдоризобин при посеве нута в засоленных почвах».

Достоверность результатов исследования обосновывается тем, что каждый эксперимент исследования проведён не менее чем в 3 повторностях, что позволило найти средний наиболее достоверный и стабильный результат. Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью компьютерной программы STATISTICA 6.0 и стандартными методами расчета ошибок, средних, доверительных интервалов, стандартных отклонений. При выборе подходящего метода математического анализа, применённого к результатам конкретного эксперимента, руководствовались рекомендациями, приведенными в соответствующей литературе. Для определения статистической значимости результатов, вычисляли t-критерий Стьюдента.

Научная и практическая значимость результатов исследования. Научная значимость результатов исследования заключается в изучении роли

бактерий рода *Pseudomonas* и *Mesorhizobium* в стимуляции роста и развития, и защите нута от корневых болезней в условиях засоления.

Практическая значимость работы заключается в том, что в полевых условиях проведён скрининг различных сортов нута (*Cicer arietinum* L.) по устойчивости к засолению почвы. Многие из испытываемых сортов нута никогда ранее не выращивали в условиях Узбекистана. В результате отобраны наиболее солеустойчивые сорта нута, которые использовали для проверки эффективности биопрепарата «Псевдоризобин» в условиях естественного засоления на территории Республики Каракалпакстан. Созданный комплексный микробиологический препарат «Псевдоризобин»

для нута на основе ассоциации из солеустойчивых ризосферных микроорганизмов способствует росту, развитию и повышению урожайности нута, а также защищает его от фитопатогенных грибов, вызывающих корневые гнили в условиях засоления. Разработана специальная технология получения данного биопрепарата. Установлено, что использование биопрепарата «Псевдоризобин» позволяет выращивать нут на засоленных почвах и получать при этом высокие урожаи, особенно если использовать при этом рекомендованные в диссертации солеустойчивые сорта нута. Выращивание солеустойчивых сортов нута с применением биопрепарата «Псевдоризобин» позволяет использовать уже пришедшие в негодность засоленные почвы. Разработанная технологическая схема может быть использована как модель для создания новых микробных препаратов для сельского хозяйства.

Внедрение результатов исследования. Биопрепарат «Псевдоризобин» 7,7 млрд. кл/мл (*Pseudomonas chlororaphis*-66 – 4 млрд. кл/мл, *Mesorhizobium ciceri*-4 – 3,7 млрд. кл/мл) зарегистрирован на заседании Госхимкомиссии РУз и включён в «Список пестицидов и агрохимикатов, разрешённых для применения в сельском хозяйстве Республики Узбекистан» (2-6/1-33 от 09.03.2016). Эффективность биопрепарата «Псевдоризобин» против фузариозного вилта нута составила 83,3%. «Псевдоризобин» способствовал повышению урожайности нута в условиях засоления на 22%.

Апробация результатов исследования. Основные положения диссертации представлены на 2-й Азиатской конференции PGPR «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture» (Китай, Пекин, 2011), VII Международной научно-практической конференции «Аграрная наука - сельскому хозяйству» (Россия, Барнаул, 2012), Республиканской научно-практической конференции «Яйловлардан оқилона фойдаланиш ва муҳофаза қилишнинг институционал масалалари» (Ташкент, 2013), научно-практическом семинаре, посвящённом Всемирному Дню охраны окружающей среды «Охрана окружающей среды в Узбекистане: её состояние в настоящие дни и пути развития» (Ташкент, 2013), Республиканской научно-практической конференции «Почвенные ресурсы Узбекистана: состояние, охрана и перспективы их рационального

использования» (Ташкент, 2013), Regional conference of young scientists «Recent trends in physical & biological sciences» (Индия, Бангалор, 2014), XXI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов -2014» (Россия, Москва, 2014), 20th World Congress of Soil Science (Корея, 2014), XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2015» (Россия, Москва, 2015), научно-практическом семинаре «Soils of Uzbekistan and resource saving technologies of improvement of their fertility» (Ташкент, 2015), Республиканском научно-практическом семинаре «Атроф муҳитни ўзгариши шароитида ер ресурсларини муҳофаза қилиш ва улардан оқилона фойдаланиш масалалари» (Ташкент, 2016).

Опубликованность результатов исследования. По теме диссертации

опубликованы всего 29 научных работ. Из них 16 научных статей, в том числе 13 в республиканских и 3 в зарубежных журналах рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Республики Узбекистан для публикации основных научных результатов докторских диссертаций.

Структура и объём диссертации. Структура диссертации состоит из введения, четырех глав, заключения, списка использованной литературы, приложений. Объем диссертации составляет 160 страниц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во введении обосновывается актуальность и востребованность проведенного исследования, цель и задачи исследования, характеризуются объект и предмет, показано соответствие исследования приоритетным направлениям развития науки и технологий республики, излагаются научная новизна и практические результаты исследования, раскрываются научная и практическая значимость полученных результатов, внедрение в практику результатов исследования, сведения по опубликованным работам и структуре диссертации.

В первой главе диссертации «**Обзор литературных данных по преодолению солевого стресса и борьбе с заболеваниями нута при помощи ризосферных и клубеньковых бактерий родов *Pseudomonas* и *Rhizobium***» приведён анализ современного состояния исследований в области создания биопрепаратов для биологической защиты растений от болезней и повышения урожайности сельскохозяйственных культур, рассматриваются перспективы использования бактерий родов *Pseudomonas* и *Rhizobium* в качестве биологических стимуляторов роста растений, а также агентов биологического контроля фитопатогенных микроорганизмов, рассматривается проблема почвенного засоления и его влияние на рост и развитие нута, перспективы использования микроорганизмов для ослабления солевого стресса у растений, механизмы стимуляции роста, биологического контроля и ослабления солевого стресса растений ростстимулирующими

ризобактериями, а также современные биотехнологические подходы в переработке отходов животноводства и птицеводства в биоудобрение.

Во второй главе диссертации «**Методы изучения морфолого культуральных, физиолого-биохимических, ростстимулирующих и биоконтрольных свойств бактерий»** описаны материалы и методы исследования.

Скрининг различных сортов нута по солеустойчивости проводили проращиванием семян (с добавлением 50 и 100 ммоль NaCl), выращиванием растений в гнотобиотической системе с песком (с добавлением 50 и 100 ммоль NaCl) и выращиванием растений в горшках с засоленной почвой, взятой с глубины пашни (0-40 см) орошаемого сельскохозяйственного поля, подвергнутого засолению.

Для выделения бактерий, являющихся конкурентоспособными колонизаторами корней нута использовали метод обогащения (Kamilova et

al., 2005). В результате выделено 10 штаммов бактерий. Исследованы морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства штаммов. Согласно изученным свойствам, 10 штаммов отнесены к роду *Pseudomonas*.

Штаммы клубеньковых бактерий выделены из крупных розовых клубеньков нута, для чего их поверхностно стерилизовали, измельчали и делали посев полученной суспензии на питательную среду YMA. Штаммы расчищали методом предельных разведений (Звягинцев, 1991). Для проверки чистоты выделенной культуры использовали характерный тест для клубеньковых бактерий – рост на лакмус-молоке (Теппер и др., 1991).

Для проверки влияния различных отобранных штаммов *Rhizobium* и *Pseudomonas* sp.-66 на рост и развитие нута в 2012–2014 гг. проведены полевые эксперименты в условиях экспериментальной станции Ташкентского государственного аграрного университета. Семена инокулировали влажным (50%) биогумусом со смесью штаммов (титр клеток не менее $1x10^8$ кл/г) затем высевали в почву.

Для идентификации отобранных ростстимулирующих штаммов *Pseudomonas* sp.-66 и *Rhizobium* sp.-4 использовали 16S рРНК анализ. 16S рРНК амплифицирована при помощи полимеразно-цепной реакции (ПЦР) с использованием прямого 16SF: 5’-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’ и обратного 16SR: 5’-GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3’ праймеров.

Определение культуральных и физиолого-биохимических свойств штаммов бактерий проводили по стандартным методикам (Герхардт, 1984; Нетрусов и др., 2005; Смирнов, Киприанова, 1990; Vincent, 1970).

Исследованы свойства штаммов *Pseudomonas* sp.-66 и *Rhizobium* sp.-4, способствующие стимуляции роста и развития растений нута. Продуцирование индолил 3-уксусной кислоты (ИУК) изучали методом Bano и Musarrat (2003).

Для измерения роста на 1-аминоциклопропан-1-карбоновой кислоте (АЦК) в качестве единственного источника азота, бактериальные штаммы

инкубировали на соответствующих средах (для *Mesorhizobium* - YMA без добавления дрожжевого экстракта, для *Pseudomonas* – безпептонный агар), с добавлением в среду АЦК как единственного источника азота.

Способность штаммов к растворению нерастворимых фосфатов оценивали на среде Г.С. Муромцева с добавлением $Ca_3(PO_4)_2$, или $FePO_4$, или $AlPO_4$ в качестве нерастворимых фосфатов.

Для определения нитрогеназной активности интактной бобово ризобиальной системы применяли ацетиленовый метод. Количество образовавшегося этилена определяли при помощи пламенно-ионизационного детектора на газовом хроматографе Chrom-5 (Чехия) (Теппер и др., 1993).

При изучении у штаммов псевдомонад и ризобий способности к биологическому контролю фитопатогенных грибов, вызывающих корневые болезни нута в условиях засоления, использовали грибы *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*. Для проверки антагонистической активности по отношению к фитопатогенным грибам

использовали штаммы бактерий: KR 083, KR 076, 3612, Ep 14, Tivi 7, Rif ep 17, Rube 1326, BB-135, TSAU-20 из коллекции кафедры микробиологии и биотехнологии НУУз, и штаммы *Mesorhizobium ciceri*-4, *Rhizobium* sp.-6, *Rhizobium* sp.-9, *Pseudomonas chlororaphis*-66, выделенные из ризосферы нута, а также штамм *Rhizobium* sp. IC-53, предоставленный доктором Subramaniam Gopalakrishnan (ICRISAT, Индия). Антагонистическая активность бактерий по отношению к грибам проверена методом агаровых блоков. Поставлены лабораторные эксперименты, в которых семена инокулировали бактериальными штаммами (титр клеток $1x10^8$ КОЕ/мл) и засевали в заранее заражённую спорами грибов почву ($3,0x10^7$ спор/кг почвы).

Для проверки продуцирования HCN штаммами использовали метод Castric (1975). Для определения хитинолитической активности штаммов использовали метод Moreal и Relse (1969). Наличие липазной активности у бактериальных штаммов проверяли методом теста на индикаторе липазы Твина (Tween). Продуцирование протеазы определяли при культивировании штаммов на TCA/20 (одна двадцатая часть трипсинового соевого бульона с 1,5% агара) с добавлением снятого молока до конечной концентрации 5%. Кольцо, появляющееся вокруг колоний на первый-второй день культивирования, указывало на присутствие внеклеточной протеазы (Brown, Foster, 1970).

Глюканазная активность исследована при использовании лишайникового глуканового субстрата, образование чистых зон указывало на разрушение субстрата (Walsh, 1995).

Целлюлазная активность обнаружена при использовании в качестве субстрата КМЦ (карбоксиметил целлюлозы) (Hankin, Anagnostakis, 1977).

Для определения у штаммов способности продуцировать сидерофоры

использовали метод Schwyn и Neilands (1987).

Для проверки и оценки конкурентоспособности *Mesorhizobium ciceri-4* в колонизации корня нута против штамма *Pseudomonas chlororaphis-66*, использовали рифампицин-резистентный штамм *Pseudomonas chlororaphis* 66R (рифампицин 200 мкг/мл).

Для исследования хемотаксиса бактерий к корневым экссудатам нута собирали корневые экссудаты проростков нута путём выращивания их в эксикаторе с дистиллированной водой. Экссудаты концентрировали в вакууме, разделяли с использованием различных форм ионообменной смолы типа Dowex. Для хемотаксиса использовали модифицированный метод Adler (1972).

Для оценки влияния биопрепарата «Псевдоризобин» на урожайность нута, проведён полевой эксперимент в условиях засоленных почв Амударьинского района Республики Каракалпакстан. Почва на экспериментальном поле имела электрическую проводимость (ЭП) – 568 мСм/м (миллисименс/метр). Почвы, имеющие ЭП выше 400 мСм/м, считаются засоленными (Райан и др., 2002).

В третьей главе диссертации «**Изучение морфолого-культуральных, физиолого-биохимических, ростстимулирующих и биоконтрольных свойств бактерий *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4**» приведены результаты, показывающие возможность применения штаммов *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 для улучшения роста и развития нута, и борьбы с грибами, вызывающими корневые болезни нута в условиях засоления.

Скрининг некоторых генотипов нута по устойчивости к засолению

Исследовано влияние засоления на прорастание семян различных сортов нута. Установлено, что исследованные 29 сортов нута различаются по своей устойчивости к различным уровням засоления. Снижение энергии прорастания семян (на 10 день после посева), по сравнению с контрольным вариантом, было ниже 25% для «*Sino*», «*Flip* 1-01», «*Flip* 1-04», «*Flip* 1-05», «*Flip* 1-19», «*Flip* 03-27c», «*Flip* 06-155c». Семена нута сортов «*Jahongir*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Zimistoni*», «*Flip* 1-22», «*Flip* 1-31», «*CIEW*-45» и «*Flip* 06-80c» показали лучшую всхожесть (40-45%) при концентрации соли 100 ммоль, чем другие сорта. Исследованы рост и образование клубеньков у различных сортов нута в засоленной почве. Из 29 сортов нута, отобраны 7 («*Jahongir*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Xalima*», «*Miroz*», «*Flip* 1-33» и «*CIEW*-45»), как наиболее солеустойчивые.

Исходя из результатов исследования, следует, что для достижения наибольшей симбиотической эффективности в условиях засоления, обязательно следует учитывать сорта растения.

Скрининг бактерий, способных стимулировать рост и развитие нута

Выделение и скрининг бактерий рода Pseudomonas

Эффективные колонизаторы могут быть получены после инокуляции проростков смесью различных бактерий и выращивания проростков в гнотобиотической системе с песком. Повторение этого метода улучшает способность этих бактерий колонизировать корни.

В настоящем исследовании, мы использовали метод обогащения для отбора солеустойчивых бактерий рода *Pseudomonas*, колонизирующих корни нута. После третьего цикла обогащения, отобраны десять лучших колонизаторов корней нута. Изучены морфологические и физиолого биохимические свойства штаммов, которые позволили отнести выделенные штаммы к роду *Pseudomonas*.

Проведён скрининг данных штаммов по способности стимулировать рост и развитие нута. Штамм *Pseudomonas* sp.-66 обладал наиболее ярко выраженной ростстимулирующей активностью в отношении нута.

Выделение и скрининг бактерий рода Rhizobium

Нами выделено 10 штаммов бактерий из клубеньков нута. Один штамм - *Rhizobium* sp. IC-53 предоставлен доктором Subramaniam Gopalakrishnan (ICRISAT, Индия). Бактерии активно росли на среде YMA и образовывали на

3 день бесцветные и молочно-белые слизистые колонии, что соответствует внешнему виду колоний клубеньковых бактерий. Бактерии при росте на лакмус-молоке на 10-14-е сутки подщелачивали его, при этом оно слегка синело, и образовывали светлое кольцо – сывороточную зону. Все штаммы дали положительный результат при росте на лакмус-молоке и были отнесены к клубеньковым бактериям семейства *Rhizobiaceae*.

Проведён скрининг выделенных штаммов по их способности образовывать клубеньки на корнях и влиять на рост и развитие нута посредством предпосевной инокуляции семян (рис.1). В результате скрининга штаммы *Rhizobium* sp.-4, *Rhizobium* sp. IC-53, *Rhizobium* sp.-6 и *Rhizobium* sp.-9 отобраны для дальнейших экспериментов, как наиболее активные и вирулентные.

Примечание: *- статистически значимо при $p \leq 0,05$

Рис. 1. Образование клубеньков различными штаммами клубеньковых бактерий на корнях нута сорта «*Xalima*».

Влияние различных штаммов отобранных бактерий на рост и развитие нута в полевых условиях

Для проверки эффективности инокуляции семян нута отобранными штаммами бактерий на рост и развитие нута, в 2012-2014 гг. проведены полевые испытания на экспериментальной станции при Ташкентском государственном аграрном университете (табл. 1).

Все отобранные штаммы клубеньковых бактерий: *Rhizobium* sp.-4, *Rhizobium* sp.-6, *Rhizobium* sp.-9, *Rhizobium* sp.-IC53, способствовали улучшению роста и развития, а также повышению урожайности различных сортов нута, но после совместной инокуляции семян штаммами *Rhizobium* и

Pseudomonas sp.-66 количество клубеньков на корнях нута значительно возрастало по сравнению с одинарной инокуляцией. Так, например, после одиночной инокуляции семян штаммом *Rhizobium* sp.-4 количество клубеньков увеличилось на 67,2%, а после коинокуляции с *Rhizobium* sp.-4 и *Pseudomonas* sp.-66 – на 77,4% по сравнению с контролем. Коинокуляция семян нута двумя штаммами оказалась более эффективной, чем одиночная инокуляция и в увеличении длины стеблей и корней нута. Так, после инокуляции семян только штаммом *Rhizobium* sp.-4 высота стеблей и длина корней растений нута увеличилась на 17,3 и 10,8%, а после коинокуляции семян штаммами *Rhizobium* sp.-4 и *Pseudomonas* sp.-66 эти показатели увеличились на 22,6 и 28,6%, соответственно, по сравнению с контролем.

Таким образом, сочетание бактерий *Rhizobium* sp.-4 и *Pseudomonas* sp.-66 является наиболее эффективным при коинокуляции семян нута и способствует активному росту и развитию растений, а также повышает урожайность нута на 2,3 - 4,37 ц/га по сравнению с контролем.

Идентификация отобранных штаммов бактерий

Для идентификации выбран наиболее активный штамм *Pseudomonas* sp.-66, способный активно стимулировать рост и развитие нута, и идентифицирован при помощи анализа генов 16S рРНК. В результате анализа определена часть нуклеотидной последовательности ДНК штамма *Pseudomonas* sp.-66, которая оказалась на 99% идентичной виду бактерии *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 (accession number AF094723) по данным GenBank. Штамм *Pseudomonas* sp.-66 идентифицирован как *Pseudomonas chlororaphis*-66 и зарегистрирован в GenBank под номером KX012005 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX012005?report=GenBank). Как наиболее эффективный по отношению к росту и развитию нута, штамм клубеньковых бактерий *Rhizobium* sp.-4 идентифицирован при помощи 16S рРНК анализа. В результате анализа определена часть нуклеотидной последовательности ДНК штамма *Rhizobium* sp.-4, которая оказалась на 99% идентичной виду бактерии *Mesorhizobium ciceri* ca181 (accession number NZ_CM002796.1) по данным GenBank. Штамм *Rhizobium* sp.-4 идентифицирован как *Mesorhizobium ciceri*-4 и зарегистрирован в GenBank под номером KX012006 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX012006?report=GenBank).

Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства штаммов Pseudomonas chlororaphis-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4

Морфология колоний штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 при росте на плотной питательной среде: 1) на МПА - колонии округлые с ровными краями, гладкие, слабовыпуклые, непрозрачные, зелёные в центре с более светлой окантовкой, слизистой консистенции, диаметром 5-6 мм, наблюдается образование жёлто-зелёного, флуоресцирующего, диффундирующего в среду пигмента. Молодые колонии беловатые, зелёный пигмент появляется с увеличением возраста культуры. 2) на МПА с 2%

глицерина - колонии крупнее, интенсивнее окрашены, чем на МПА, более интенсивная диффузия в среду жёлто-зелёного пигмента; 3) на Кинг Б - образуется жёлто-зеленый, флуоресцирующий пигмент.

При росте в жидкой среде (МПБ) штамм *Pseudomonas chlororaphis*-66 образует тонкую, сплошную складчатую плёнку, а на скошенном агаре (МПА) штрих обильный, сплошной с ровным краем.

Клетки штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 представляют собой подвижные, прямые, мелкие, грамотрицательные, аэробные палочки, размером 1,6-1,7 х 0,6-0,8 мкм. Штамм продуцирует флуоресцирующий пигмент, диффундирующий в среду. При 42°С рост отсутствует. Рост при 4°С есть, но крайне медленный. Реакция на каталазу и оксидазу положительная. Способностью к денитрификации не обладает. Аргининдегидролазу образует. Леван из сахарозы образует. Желатину, лецитин и крахмал гидролизует.

Для своего роста штамм *Pseudomonas chlororaphis*-66 способен использовать различные источники углерода: глюкоза, арабиноза, ксилоза, сахароза, мальтоза, раффиноза, фруктоза, рамноза, галактоза, глицерин, бутанол, гексанол, маннит, пропионовая кислота, антраниловая кислота, янтарная кислота, α-кетоглутаровая кислота, ацетат, пируват, лактат, цитрат, L-тирозин, D,L-лейцин, L-аргинин, D,L-аланин, D,L-валин, D,L-триптофан, L-пролин, D,L-лизин, D,L-серин, L-аспарагин, фенилаланин. При росте на глюкозе, ксилозе, арабинозе, сахарозе, фруктозе и галактозе штамм образует кислоту.

Выявлено, что у штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 отсутствует антагонистическая активность по отношению к *Mesorhizobium ciceri*-4. Клетки пятидневной культуры *Mesorhizobium ciceri*-4 имеют палочковидную форму размером 1,4-1,6 х 0,3-0,5 мкм. Штамм грамотрицательный, облигатный аэроб. Колонии клеток на агаризованных средах (нутовый, гороховый агары, YMA) однотипные, круглые с ровным чётким контуром, блестящие, беловато-прозрачные, выпуклые, слизистые, до 2,0-2,5 мм в диаметре на 2-3 день при температуре инкубации 30°С. Рост при 4°С есть, но крайне медленный. Штамм способен расти на МПА, желатину не гидролизует, крахмал не гидролизует, на агаре с казеином не имеет амилазной и оксидазной активности, денитрификацией не обладает, обладает уреазной и каталазной активностью, подкисляет среду при выращивании на обезжиренном стерильном молоке, не продуцирует флуоресцентных и феназиновых пигментов. Штамм способен использовать следующие источники углерода: сахарозу, глюкозу, арабинозу, ксилозу, рамнозу, мальтозу, лактозу, маннит, сорбит, дульцит, а в качестве источников азота: аммонийный, нитратный, амидный азот. Штамм изменял цвет среды YMA с добавлением бромтимола синего в жёлтый, что указывает на то, что штамм вырабатывает кислоту.

У штамма *Mesorhizobium ciceri*-4 отсутствует антагонистическая активность по отношению к *Pseudomonas chlororaphis*-66.

Оптимальные условия культивирования штаммов

Проверены оптимальные условия культивирования штаммов *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4. В частности выявлено, что оба штамма способны расти при концентрации 4% NaCl.

Оптимальной температурой выращивания штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 является 34°С, а штамма *Mesorhizobium ciceri*-4 - 30°С. Оптимальное значение pH для роста штамма *Pseudomonas chlororaphis* 66 – 6,2-7,5, а для штамма *Mesorhizobium ciceri*-4 – 6,0-7,5.

Ростстимулирующие свойства штаммов Pseudomonas chlororaphis-66 и Mesorhizobium ciceri-4

Изучены следующие свойства штаммов: продуцирование ИУК, АЦК деаминазная активность, растворение нерастворимых фосфатов и азотфиксирующая активность.

В результате экспериментов обнаружено, что штаммы синтезируют фитогормон ИУК, как в присутствии триптофана, так и в его отсутствии. Наиболее активный синтез происходит в среде, не содержащей NaCl, однако ИУК продолжает продуцироваться и при концентрации NaCl 4% (рис. 2).

а б

Примечание: *- статистически значимо при $p \leq 0,05$

Рис. 2. Продуцирование ИУК штаммами бактерий с добавлением и без добавления триптофана в присутствии различных концентраций NaCl через 7 дней культивирования: а) *P. chlororaphis*-66, б) *M. ciceri*-4

Штаммы *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 способны растворять $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, $AlPO_4$, при культивировании, как на плотной питательной среде Муромцева, так и на жидкой питательной среде NBRIP в присутствии 1,5% NaCl (табл. 2).

Для проверки азотфиксирующей способности клубеньковых бактерий в форме бактероидов проверена нитрогеназная активность интактной бобово ризобиальной системы после инокуляции семян различных сортов штаммом *Mesorhizobium ciceri*-4, а также сочетанием штаммов *Mesorhizobium ciceri*-4 и *Pseudomonas chlororaphis*-66.

Таблица 2

Растворение нерастворимых фосфатов штаммами *P.chlororaphis*-66 и *M. ciceri*-4

Штамм	$Ca_3(PO_4)_2$		$FePO_4$		$AlPO_4$	
	Плотная среда*	Жидкая среда**	Плотная среда	Жидкая среда	Плотная среда	Жидкая среда
P. chlororaphis-66	156	2,19	143	1,47	0	1,29
M. ciceri-4	135	2,09	126	1,23	0	1,33

Примечания: * Оценка по методу зон просветления, мм^2.
**Средняя кратность превышения концентрации фосфатов в сравнении с контрольной средой.

При коинокуляции семян нута двумя штаммами, нитрогеназная активность интактной бобово-ризобиальной системы у всех сортов нута повысилась по сравнению с моноинокуляцией штаммом *Mesorhizobium ciceri*-4 (табл. 3).

Таблица 3

Нитрогеназная активность интактной бобово-ризобиальной системы при одиночной инокуляции семян штаммом *M. ciceri*-4 и при совместной инокуляции штаммами *M. ciceri*-4 и *P. chlororaphis*-66

Сорт нута	*M. ciceri*-4		*M. ciceri*-4 + *P. chlororaphis*-66	
	Число клубеньков на корнях растения, шт.	Нитрогеназная активность, мкг N_2/раст./час	Число клубеньков на корнях растения, шт.	Нитрогеназная активность, мкг N_2/раст./час
Xalima	49±3,90*	47±4,10*	72±4,98*	63±4,98*
Uzbekiston-32	18±2,37	26±3,22	31±3,22	41±3,58
Lazzat	45±3,22	42±3,90	59±4,10	58±4,73
Miroz	24±3,22	19±2,37	35±3,22	36±3,22
Jahongir	33±3,58	37±3,22	49±3,90	54±3,90
CIEW-45	48±3,90*	51±4,10*	63±4,98*	65±4,73
Flip 1-31	15±2,37	25±3,22	26±3,22	47±3,90

Примечание: *- статистически значимо при p≤0,05

Результаты исследований свидетельствуют о том, что штаммы *Mesorhizobium ciceri*-4 и *Pseudomonas chlororaphis*-66 образуют эффективный симбиоз с растениями нута.

Ингибирование роста фитопатогенных грибов, вызывающих корневые болезни нута, при помощи PGPR

Проверена способность исследуемых бактерий к ингибированию роста фитопатогенных грибов. Все исследуемые штаммы обладали более или менее выраженной антагонистической активностью по отношению к фитопатогенам, о чём свидетельствует образование зон ингибирования роста гриба вокруг бактериальной колонии (табл. 4).

Особо выделяются штаммы *Mesorhizobium ciceri*-4 и *Pseudomonas chlororaphis*-66, которые обладают повышенным антагонизмом ко всем исследуемым видам грибов.

Таблица 4

Ингибирование роста фитопатогенных грибов бактериями (радиус зоны ингибирования, мм)

Бактериальные штаммы	Фитопатогенные грибы					
	Fusarium oxysporum f.sp. *ciceris*	*Fusarium verticillioides*	*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*	*Rhizoctonia solani*	*Fusarium solani*	*Alternaria alternata*
KR 083	-	20±1,79	18±0,89	32±2,68*	-	23±1,79
M. ciceri-4	28±1,55	30±2,37*	31±2,37*	16±1,79	29±3,22*	34±2,37*
3612	16±1,55	29±2,37*	32±2,37	-	31±2,37	30±2,37*
Ep 14	-	16±1,55	26±1,55	15±0,89	30±2,37	31±2,37*
Tivi 7	-	18±1,79	33±2,37*	35±2,37	-	25±1,55
KR 076	-	14±0,89	-	30±2,37	27±1,79	29±2,37*
Rhizobium sp.-6	-	23±2,37*	23±1,55	22±1,55	14±0,89	23±1,55
Rif ep17	16±1,79	-	22±1,79	22±1,79	25±1,55	-
Rhizobium sp.-9	25±1,55	15±0,89	35±2,37*	26±1,79	26±1,79	5±0,89
Rube 1326	18±1,55	-	20±1,55	24±1,55	22±1,55	17±1,79
P. chlororaphis-66	32±2,37*	23±1,55	34±2,37*	24±1,79	33±2,37	29±2,37*
BB-135	25±2,37*	-	22±1,55	19±1,55	16±1,79	22±1,55

TSAU-20	21±1,79	-	21±1,79	22±1,79	32±2,37	24±1,79
Rhizobium sp. IC-53	-	18±1,79	18±1,55	25±1,55	21±1,55	20±1,79

Примечание: *- Статистически значимо при $p \leq 0,05$

Штамм *Pseudomonas chlororaphis*-66 является наилучшим из исследуемых бактерий антагонистом грибов *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (радиус зоны подавления роста гриба 32 мм) и *Fusarium solani* (33 мм). Штамм *Mesorhizobium ciceri*-4 показал самый сильный антагонизм против грибов *Fusarium verticillioides* (радиус зоны подавления роста гриба 30 мм) и *Alternaria alternata* (34 мм).

Свойства бактерий, осуществляющих биологический контроль фитопатогенных грибов

Штаммы *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 обладают высокой антифунгальной активностью к широкому спектру фитопатогенных грибов. Результаты изучения основных свойств штаммов, обеспечивающих биологический контроль фитопатогенных грибов, представлены ниже.

Штамм *Pseudomonas chlororaphis*-66 способен продуцировать следующие гидролитические ферменты (хитиназу, целлюлазу и протеазу), а также HCN (табл. 5).

Таблица 5

Гидролиз хитина штаммом *Pseudomonas chlororaphis*-66

Время культивирования, сут	Эффективность гидролиза хитина*
4	1,6
6	2,8
7	3,4
8	5,78

Примечание: *- отношение диаметра зоны просветления мутной среды (содержащей хитин) вокруг колонии к диаметру колонии, мм/мм

Штамм способен использовать АЦК в качестве источника азота, что указывает на присутствие АЦК-деаминазы, которая играет важную роль в понижении уровня этилена у растений в условиях стресса.

У штамма *Mesorhizobium ciceri*-4 отсутствовала способность продуцировать HCN, АЦК-деаминазу, хитиназу и целлюлазу. Однако штамм продуцирует глюканазу, липазу и протеазу, которые также способствуют подавлению грибной активности в ризосфере нута.

Штаммы *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 проверены на продуцирование сидерофоров при помощи анализа ХАС и сравнены с типовым штаммом *Rhizobium meliloti* (табл. 6). Обнаружено, что штаммы обладают способностью продуцировать сидерофоры, тем самым снижая в почве доступность железа, необходимого для роста грибов. Эта способность является ещё одним важным бактериальным фактором ингибирования роста фитопатогенных грибов в почве.

Таблица 6

ХАС анализ на продуцирование штаммами сидерофоров

Штамм	ХАС анализ (образование оранжевых колец на голубом агаре)	Диаметр колец (в см)
P. chlororaphis-66	+	1,67±0,2
M. ciceri-4	+	1,53±0,4
R. meliloti	+	1,70±0,3

Примечание: + означает, что ХАС анализ оказался положительным.

PGPR *Pseudomonas* могут оказывать положительное действие на растение только при успешной колонизации ими его ризосферы. Рифампицин резистентный штамм *Pseudomonas chlororaphis*-66R проверен на конкурентоспособность в колонизации корня нута против типового колонизатора корней *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (Lugtenberg et al., 2001). Оказалось, что в присутствии 1,5% NaCl штамм *Pseudomonas chlororaphis*-66R ($10,5x10^3$ КОЕ/см корня), колонизирует корни нута лучше типового штамма ($9,3x10^3$ КОЕ/см корня).

Штамм *Mesorhizobium ciceri*-4 проверен на наличие конкурентоспособности в колонизации корня нута против штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66R, у которого обнаружена способность активно колонизировать корни нута. В присутствии 1,5% NaCl штамм *Mesorhizobium ciceri*-4 способен конкурировать в колонизации корня нута, и при этом концентрация бактерий у этого штамма лишь немного ниже ($8,9x10^3$ КОЕ/см корня), чем у *Pseudomonas chlororaphis*-66R ($11,4x10^3$ КОЕ/см корня). Это свидетельствует о том, что оба штамма способны одновременно сосуществовать на корнях нута.

Хемотаксис бактерий к корневым экссудатам нута

Колонизация корней вносимыми извне бактериями является основным фактором, влияющим на эффективность их действия на растения. Первым этапом колонизации корней нута определёнными бактериями является их

таксис к корням растения. Активность хемотаксиса зависит от количества и состава корневых экссудатов. Поэтому нами исследовано количество и состав корневых экссудатов двух сортов нута – «*CIEW*-45» и «*Hisor*-32». Ранее мы проводили полевые испытания по инокуляции семян двух сортов различными штаммами бактерий. В результате урожайность обоих сортов повысилась, однако у сорта «*Hisor*-32» она оказалась почти в 4 раза ниже, чем у сорта «*CIEW*-45».

Результаты исследований показали, что сорта «*CIEW*-45» и «*Hisor*-32» различаются как по количеству секретируемых корневых экссудатов, так и по качеству, причём сорт «*Hisor*-32» уступает в этом сорту «*CIEW*-45», особенно по количеству катионной фракции в экссудатах и в основном за счёт гораздо более низкого содержания гистидина (почти в 2 раза меньше чем у сорта «*CIEW*-45»), который является наиболее предпочтительным источником питания для бактерий, среди остальных аминокислот, составляющих катионную фракцию. Такие различия в секреции экссудатов, влияют на силу хемотаксиса бактерий к корням различных сортов нута, что экспериментально подтверждено. Так, оба исследуемых нами штамма бактерий *Mesorhizobium ciceri*-4 и *Pseudomonas chlororaphis*-66, при одинаковом количестве экссудатов сортов нута «*CIEW*-45» и «*Hisor*-32», предпочитали экссудаты корней сорта «*CIEW*-45», благодаря разнице в соотношении фракций и их составляющих у двух разных сортов. Выявлено, что клетки штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 передвигаются к корневым экссудатам быстрее, чем *Mesorhizobium ciceri*-4 и достигают концентрации, равной концентрации *Mesorhizobium ciceri*-4 уже через 15 минут, тогда как клетки *Mesorhizobium ciceri*-4 затрачивают на это 30 минут. Концентрации экссудатов 3,88 мг/мл достаточно для максимального хемотаксиса штамма *Mesorhizobium ciceri*-4, а для штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 достаточной является концентрация 7,75 мг/мл, при дальнейшем увеличении концентрации экссудатов скорость хемотаксиса почти не изменяется. Смесь всех трёх фракций корневых экссудатов является наиболее предпочтительной, чем смесь каких-либо двух фракций для обоих штаммов. Выявлено, что из смеси двух фракций для штамма *Pseudomonas chlororaphis* 66 более предпочтительна смесь катионной и анионной, а для штамма *Mesorhizobium ciceri*-4 – смесь катионной и нейтральной.

Корневые экссудаты нута двух сортов содержали различные компоненты в различных пропорциях. По-видимому, присутствие этих химических веществ в определённых пропорциях является ключевым моментом для эффективной колонизации корней *Mesorhizobium ciceri*-4 и *Pseudomonas chlororaphis*-66, а также для установления эффективного симбиоза между бобовым растением и ризобиями. Колонизация корней штаммом *Pseudomonas chlororaphis*-66 является очень важной в повышении эффективности симбиоза нута и клубеньковых бактерий и защите нута от фитопатогенных грибов. Таким образом, из-за того, что разные сорта нута секретируют разное количество корневых экссудатов с разным соотношением их компонентов, активность хемотаксиса полезных бактерий к

корням различна, что в итоге влияет на степень колонизации корней и на урожайность того или иного сорта нута при инокуляции семян бактериями. В четвёртой главе диссертации **«Псевдоризобин» - эффективный микробиологический препарат для нута»** представлены результаты проверки эффективности биопрепарата «Псевдоризобин» в условиях засоления.

В результате проведённых исследований на основе отобранных штаммов нами разработан эффективный биопрепарат комплексного действия для нута. Биопрепарат назван «Псевдоризобин» («Pseudorhizobin»), как результат слияния латинских названий родов бактерий «*Pseudomonas*» и «*Rhizobium*»

Комплексное действие биопрепарата заключается в том, что он способен стимулировать рост и развитие нута, а также защищать его от корневых болезней, вызываемых фитопатогенными грибами. Данный биопрепарат предназначен для предпосевной обработки семян нута методом их инокуляции с целью получения повышенного урожая при выращивании нута на засоленных почвах. На рисунке 3 представлена технологическая схема производства биопрепарата «Псевдоризобин».

С целью проверки эффективности биопрепарата «Псевдоризобин» на рост и развитие нута проведены полевые испытания в условиях естественного почвенного засоления Амударьинского района Республики Каракалпакстан (2015 г).

После применения биопрепарата «Псевдоризобин» урожай нута сортов «*Xalima*» и «*Uzbekiston*-32» увеличился на 21,9%, у сорта «*CIEW*-45» - на 22%. Схожие результаты получены и с другими сортами.

При этом результативность в отношении роста, развития и урожайности напрямую зависит от влажности почвы, если земля пересыхает, то количество внесённых с биопрепаратом жизнеспособных бактерий снижается, что приводит к снижению их влияния на урожайность.

Подсчитана экономическая эффективность от применения биопрепарата «Псевдоризобин». Наибольшая прибыль получена после применения «Псевдоризобин» от сорта «*CIEW*-45» - 1602000 сум/га, сорта «*Xalima*» - 1537000 сум/га.

Биопрепарат «Псевдоризобин» улучшает пищевую ценность семян нута. Количество белка в среднем увеличилось на 5%, жиров – на 4%, углеводов – на 2%, по сравнению с контролем (без применения «Псевдоризобин»).

На экспериментальном участке Узбекского научно исследовательского института защиты растерий (УзНИИЗР) проверена эффективность биопрепарата «Псевдоризобин» против фузариозного вилта нута, вызываемого грибом *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Биологическая эффективность биопрепарата «Псевдоризобин» против фузариозного вилта на нуте при норме 70,0 кг/т семян в конце вегетации составила 83,3%. Этот показатель лишь немного ниже показателя (86,1%) эталона – химического препарата «Витавакс 200 ФФ 34% в.с.к.».

Mesorhizobium ciceri - 4 *Pseudomonas chlororaphis*-66 Навоз кр. рог. скота + смесь червей Гибрид красн. калиф.

Косяки со средой «YMA»

Ферментация на среде «пептонный бульон» с увеличением объёма (3 сут при 34°С)

потоке горячего воздуха до влажности 55%

Ферментация на среде «бобовый отвар» с увеличением объёма (3 сут при 30°С)

Бактериальная суспензия штамма *P.chlororaphis* - 66 КОЕ $3{,}6x10^8$

Модификация биогумуса добавлением солей: меласса – 3-5%, $CaCO_3$-3%, гумат калия-3%, $MgSO_4$-1%, K_2HPO_4-1%, $(NN_4)_6Mo_7O_{24}x4H_2O$-0,05%, $MnSO_4$-0,05%, $FeSO_4$-0,05%, КМЦ-2%

Бактериальная суспензия штамма *M. ciceri* - 4 КОЕ $8x10^7$

червя и Ташкентская популяция кольч. навозн. червей (50/50) 10 тыс червей/1 $м^2$

Косяки со средой «Пептонный агар»

Биогумус подсушивается в

Засев субстрата бактериальными суспензиями по 20 мл/кг

титр *M. ciceri*-4 – $8x10^9$ КОЕ/г, титр *P. chlororaphis*-66 – $9x10^9$ КОЕ/г

Культивирование при 30°С, 14 суток

Стерилизация γ-излучением, доза облучения 2,5 МРад

«Псевдоризобин»

Рис. 3. Технологическая схема производства биопрепарата «Псевдоризобин»

Таким образом, биопрепарат «Псевдоризобин» показал высокую биологическую эффективность, что позволяет назвать его перспективным в борьбе с фузариозным вилтом нута.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе проведённых исследований по докторской диссертации на тему «Роль ризосферных микроорганизмов в стимуляции роста и развития нута и биологическом контроле его корневых болезней в условиях засоления» представлены следующие выводы:

1. Из ризосферы и клубеньков нута выделены и отобраны методом скрининга солеустойчивые штаммы бактерий родов *Pseudomonas* и

Mesorhizobium, способные усиливать рост и развитие нута в условиях засоления.

2. Изучены морфолого-культуральные и физиолого-биохимические свойства бактерий. С помощью 16S рРНК анализа отобранные штаммы были идентифицированы как *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 и зарегистрированы в GenBank под номерами KX012005 и KX012006, соответственно.

3. Определены оптимальные условия культивирования выделенных штаммов *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 и их способность расти при концентрации NaCl 4%. Оптимальной температурой выращивания штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 является 34°C, для *Mesorhizobium ciceri*-4 - 30°C. Оптимальное значение pH для роста штамма *Pseudomonas chlororaphis*-66 – 6,2-7,5, для *Mesorhizobium ciceri*-4 – 6,0-7,5.

4. Установлено, что штаммы *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 благодаря синтезу ИУК и АЦК-деаминазы, растворению нерастворимых фосфатов, нитрогеназной активности, выживаемости бактерий на корнях нута, а также солеустойчивости, способствуют усилению роста, развития и повышению урожайности солеустойчивых сортов нута в условиях засоления.

5. Изучены антифунгальные свойства штаммов *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 по отношению к фитопатогенным грибам *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *R. solani*, *F. solani*, *A. alternata*, вызывающим корневые болезни нута.

6. Исследован количественный и качественный состав корневых экссудатов на ранних стадиях вегетации нута. Установлено, что основными компонентами корневых экссудатов различных сортов нута являются аминокислоты, сахарные кислоты и сахара, количество и соотношение которых имеет сортоспецифичный характер. Экзометаболиты (гистидин, глюконовая кислота и глюкоза) являются основным фактором, способствующим колонизации корней вносимыми полезными бактериями и определяют устойчивость растения к внешним стрессовым условиям (засоление, заболеваемость), а также косвенно способствуют повышению урожайности нута.

7. Впервые на основе местных солеустойчивых штаммов бактерий *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 создан эффективный микробиологический препарат «Псевдоризобин», предназначенный для предпосевной обработки семян нута. «Псевдоризобин» способствует значительному улучшению роста и развития нута, повышает его урожайность, а также защищает от фузариозного вилта в условиях почвенного засоления средней степени.

8. Разработана биотехнология получения биопрепарата

«Псевдоризобин», которая включает в себя получение биогумуса из навоза крупного рогатого скота при помощи смеси червей «Гибрид красного калифорнийского червя» и Ташкентской популяции кольчатых навозных червей (50/50), дальнейшую модификацию биогумуса добавлением мелассы, гумата калия, минеральных солей и КМЦ в качестве прилипателя, стерилизацию биогумуса и культивирование в нём штаммов *Pseudomonas chlororaphis*-66 и *Mesorhizobium ciceri*-4 при оптимальной температуре и pH для достижения максимального титра бактерий. Регламент апробирован в условиях ООО «Био-ўғит» и ООО «Mangit Mineral» с положительным эффектом. Разработаны, утверждены и выпущены практические

рекомендации по использованию биопрепарата «Псевдоризобин» при выращивании нута.

9. Проведена оценка эффективности биопрепарата «Псевдоризобин» в увеличении урожайности нута. Показано, что в условиях естественного почвенного засоления, после инокуляции семян нута биопрепаратом, урожай нута сортов «*Xalima*» и «*Uzbekiston*-32» увеличился на 21,9%, а у сорта «*CIEW*-45» - на 22%. Проведена оценка биологической эффективности биопрепарата «Псевдоризобин» против фузариозного вилта нута, которая составила 83,3%.

SCIENTIFIC COUNCIL No 16.07.2013.B.01.03 ON AWARD OF SCIENTIFIC DEGREE OF DOCTOR OF SCIENCES AT THE NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN AND INSTITUTE OF MICROBIOLOGY

NATIONAL UNIVERSITY OF UZBEKISTAN

SHURIGIN VYACHESLAV VLADIMIROVICH

THE ROLE OF RHIZOSPHERE MICROORGANISMS IN STIMULATION OF GROWTH AND DEVELOPMENT OF CHICKPEA AND BIOLOGICAL CONTROL OF ITS ROOT DISEASES IN SALINITY CONDITIONS

03.00.04 – Microbiology and virology
(Biological sciences)

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

TASHKENT – 2016

The theme of the doctoral dissertation is registered at the Supreme Attestation Commission of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan with number 30.06.2015/B2015.2.B162

The doctoral dissertation is carried out at the National University of Uzbekistan.

The abstract of the dissertation is posted in three (Uzbek, Russian, English) languages on the website of the Scientific Council www.ik-bio.nuu.uz and on the website of «ZiyoNet» information and educational portal (www.ziyonet.uz).

Scientific consultant: Davranov Kakhramon Davranovich doctor of sciences in biology, professor

Official opponents: Khasanov Batir Achilovich
doctor of sciences in biology, professor

Khodzhibaeva Sanabar Mirzaevna
doctor of sciences in biology, professor

Atabayeva Khalima Nazarovna
doctor of sciences in agriculture, professor

Leading organization: Institute of genetics and experimental biology of plants

The defence of the dissertation will take place on «___» _____ 2016 at ___ at the meeting of Scientific Council No 16.07.2013.B.01.03 at the National University of Uzbekistan and Institute of Microbiology (Address: 100174, Tashkent, University street-4, conference hall of Biology and soil science faculty of the National University of Uzbekistan (cab-203). Tel: (+99871) 227-12-24; fax: (+99871) 246-53-21, (+99871) 246-02-24; e-mail:nauka@nuu.uz.).

The doctoral dissertation has been registered at the Information Resource Centre of the National University of Uzbekistan with No____ (Address: 100174, 4 University street, Tashkent, Administrative Building of the National University of Uzbekistan. Tel.: (+998 71) 236-46-55; fax: (+99871) 246-02-24.

The abstract of the dissertation is distributed on «___» _____ 2016
(Registry record No _____dated «___» _____ 2016)

G.I. Djumaniyazova
Chairman of Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, Dr.S.B.

Z.A. Mamatova
Scientific secretary of Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, PhD

T.G. Gulyamova
Chairman of scientific seminar under Scientific council on award of scientific degree of doctor of sciences, Dr.S.B., professor

INTRODUCTION (annotation of the doctoral dissertation)

Topicality and demand of the theme of dissertation. Last years soil salinity

became one of the sharpest global problems of agriculture. Especially it concerns the countries with arid and semiarid climate. Thus in the world about 955 million hectare are saline[1] from which approximately one-third is considered saline with Na^+ ions.[2] Salinization promotes fast degradation of agricultural lands. The cause of it is that many crops cannot normally grow in saline soils because the established microbiocenoses get broken and soil becomes practically lifeless.

One of the effective approaches for the solving of this problem is selection and introduction of salt-tolerant plant-microbial symbioses on problem lands. The most suitable for this are legumes, particularly chickpea. However chickpea is very sensitive to soil salinization. Depending on concentration of salts in soil the quantity of seedlings considerably decreases, plants turn out undersized with poorly developed root system, immunity considerably declines, that as result leads to diseases and destruction of the plant. Soil salinization practically breaks symbiotic relations between legumes and rhizobia. Formation of nodules, atmospheric nitrogen fixation and nitrogenase activity as a result decreases. In particular many strains of nodule bacteria are lost, that prevent the formation of effective symbioses.

Besides the big problem are phytopathogenic fungi causing chickpea root diseases. In separate years they result in to significant losses of crop and to decrease in its quality. It is known, that some microorganisms are capable to inhibit the growth of phytopathogenic fungi, for the account of such properties as production of hydrolytic enzymes, siderophores, HCN etc. One of the most effective microorganisms in this respect are some representatives of genus *Pseudomonas,* which are also promote decrease in various stresses at plants, thereby raising their tolerance to unfavorable biotic and abiotic environmental factors. However till now is not clear what role can play these bacteria in rhizobial leguminous symbiose, and also their influence on a chickpea in the saline soils conditions is not studied enough. In this connection search of the effective salt tolerant strains of nodule bacteria and pseudomonades, study of their effect on a chickpea in salinization conditions and creation on their basis of the effective competitive biopreparations for a chickpea growth and development improvement and also for its root diseases control in the saline soils conditions is an actual goal.

This dissertation research to some extent serves to carry out the tasks provided in the Resolution of the Cabinet of Ministers of the Republic of Uzbekistan No142 «On the Program of measures for protection of the environment of the Republic of Uzbekistan for 2013 - 2017» of May 27, 2013, as well as in other legal documents adopted in this area.

[1]Szabolcs I. Soils and salinization// In: Handbook of Plant and Crop Stress. – Edited by Pessarakli M. – New York: Marcel Dekker, 1994. – pp. 3-11.

[2]Saxena N.P., Johansen. C, Saxena M.C., Silim S.N. Selection for drought and salinity tolerance in cool-season food legumes// In: Breeding for Tolerance in Cool Season Food Legumes. – Edited by Singh K.B. and Saxena M.C. – Chichester, UK: Wiley, 1993. – pp. 245-270.

Relevance of the research to priority directions of development of science and technologies of the republic. This research was carried out according to priority directions of science and technology development of the republic V. «Agriculture, biotechnology, ecology and environmental protection».

Review of international research on the topic of dissertation. The scientific researches directed to chickpea yield increase are carried out in the leading scientific centres and higher educational institutes of the world, including, Indian Institute of Pulses Research (India), International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics (India), Centre for Legumes in Mediterranean Agriculture (Australia), Australian Centre for International Agricultural Research (Australia), Agricultural Research Centre at the Washington State University (USA), Crop Development Centre at the University of Saskatchewan (Canada), Ayub Agricultural Research Institute (Pakistan), Northwestern Center of Biological Research (Mexico), Pasteur Institute (France), International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (Uzbekistan), Tashkent State Agrarian University (Uzbekistan) scientific researches on the yield increase of legumes, in particular of chickpea are carried out.

As a result of researches carried out in the world on a chickpea yield increase obtained a number of scientific results including: systematized data on genetic improvement of a chickpea for yield increase and augmentation of protein quantity in grain, and also on selection of chickpea breeds, resistant to various diseases (Indian Institute of Pulses Research); by the selection method created chickpea breeds tolerant to drought and salinization, selected the active strains of nodule bacteria thanks to which improved the nitrogen-fixing activity in chickpea nodules (International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics); by the methods of legumes grain quality enhancement, methods of struggle with their fungal and viral diseases, and also nematodes and other pests control are developed (Agricultural Research Centre at the Washington State University).

The study of a chickpea yield increase is being carried out in the world in a number of priority areas, including: reception of high-yielding chickpea breeds; creation of the effective microbial communities raising crop of chickpea; study of nitrogen-fixing properties of bacteria and improvement of adaptation of the associative and legume-rhizobial symbioses in salinity conditions; improvement of chickpea grain quality; increase of chickpea resistance to biotic and abiotic stresses, both by means of genetic engineering methods, and by means of microbiological methods; search of the effective methods of chickpea diseases and pests control.

The extent of study of the problem. Earlier some properties of nodule bacteria from family *Rhizobiaceae* (Saimnazarov, 2003; Sessitsch et al., 2002; Bouhmouch et. al, 2005; Franzini et al., 2010; Jida, Assefa, 2012; Egamberdieva et al., 2013) and also properties of bacteria from genus *Pseudomonas* (Akimova, 2007; Weller, 2007; Lukatkin, 2009; Hassanein, 2009; Egamberdieva, 2012) have been studied. It is established that some species of *Pseudomonas* are capable to secrete antibiotic substances, siderophors and convert unsolvable phosphates in the form acquired by plants (Boronin, 1998). Rhizobacteria were studied as an object

for the purpose of their use in composition of biofertilizers (Djumaniyazova, 2004; Morgun, 2009; Sokolova, et al., 2009; Damir et al., 2011). According to these data, the active bacterial strains of family *Rhizobiaceae* are capable to form stable and very active symbioses with legumes, providing plants readily available nitrogen in sufficiently considerable quantities. On the basis of *Rhizobium* genus bacteria and other genuses of family *Rhizobiaceae* fertilizers («Nitragin», «Rizobin», «Rizotorfin») for various species of legumes are created, but application of the present preparations in saline soils practically does not bring crop increase, and in case of affection by phytopathogenic fungi in general is not efficient. At the same time some representatives of *Pseudomonas* genus bacteria are capable to stimulate development of crops (cucumbers, wheat and cotton plant) increasing salt tolerance, mineral supply of plants, and owing to biocontrol of phytopathogenic fungi. Stimulation is provided with various physiologic-biochemical mechanisms which are described in numerous scientific works (Boronin, 1998; Saharan, Nehra, 2011; Deshwal et al., 2013). These mechanisms include synthesis of phytohormones, phosphate mobilization and biological control of phytopathogens. These valuable properties are the cause of use of some *Pseudomonas* genus bacteria as a part of biofertilizers.

There is practically no data on stimulation of nodules formation, increase of chickpea plants salt-tolerance and their productivity by mixed cultures of *Pseudomonas* and *Rhizobium* in scientific literature. Therefore it is necessary to search new salt-tolerant rhizosphere microorganisms, capable to stimulate growth and development of chickpea, possessing antagonistic properties to phytopathogenic microorganisms causing root diseases, and creation of biological preparations for chickpea, effective for application in saline soils on their basis. Unification of valuable properties of the given microorganisms at their sharing as a part of microbiological fertilizers and their further use in agricultural practice, would allow receiving much higher yields of legumes, such as chickpea, at cultivation in saline soils. On the other hand, chickpea cultivation in saline soils, would allow accumulating nitrogenous substances and protecting the soils from erosion owing to high nitrogen-fixing ability of rhizobia, living in symbiosis with plant.

Connection of the theme of thesis with the scientific-research works of higher educational institution, where the thesis is conducted. The dissertational research is carried out within the framework of the plan of scientific researches on applied and international projects of the National university of Uzbekistan:
«Identification of genetic variation and effective plant-microbe association for salt tolerance in chickpea» Thalwitz Memorial Scholarship IFAR - World Bank grant (2011-2012); IDT-9-01 «Working out of agrotechnics of application of the new, competitive and resource-saving microbiological preparation in agricultural practice» (2012-2014); IDT-2012-30 «Introduction of the new microbiological preparations for increase plants yield and soils fertility in the conditions of Republic of Karakalpakstan» (2012-2014).

The aim of the research is creation of the effective biopreparation on the basis of growth-promoting rhizosphere microorganisms for improvement of

chickpea productivity in the salinization conditions.

The objectives of the research:

search and isolation of bacteria from nodules and rhizosphere of a chickpea, screening of active strains on salt-tolerance and growth promoting ability; to study morphologically-cultural and physiologically-biochemical properties of a chickpea growth promoting rhizobacteria, identify selected strains; to define the optimal conditions of the active strains cultivation; to study the survival rate of growth promoting rhizobacteria on a chickpea roots in the saline soils, define their phytohormonal, nitrogenase and antifungal activity;

to study the antifungal properties of growth promoting rhizobacteria to chickpea phytopathogens – production of hydrolytic enzymes, HCN and siderophores;

to study the chemotaxis of rhizobacteria to chickpea root exudates as fundamental factor of their interaction;

to develop the new biopreparation on the basis of effective strains of salt tolerant growth promoting rhizobacteria of a chickpea. To study the influence of biopreparation on growth, development and yield of a chickpea and its efficiency in chickpea fusarial wilt control in the field conditions on saline soils;

to develop the biotechnology of reception and application of the new biopreparation - laboratory regulations, technological scheme of production and practical recommendations for application of the biopreparation in agriculture at chickpea growing;

to define the biological and economical efficiency of the new biopreparation at chickpea growing on saline soils.

The objects of the research were representatives of bacteria of family *Rhizobiaceae* isolated from chickpea nodules, cultivated in Republic of Uzbekistan; strain *Rhizobium* sp.-IC53 kindly given by doctor Subramaniam Gopalakrishnan from The International crops research Institute for the semi-arid tropics (ICRISAT, Patancheru, Hyderabad, India) for what we express him our sincere gratitude; bacteria of genus *Pseudomonas* isolated from rhizosphere of chickpea cultivated in various regions of the Republic of Uzbekistan, and also 29 chickpea breeds, from which aboriginal breeds: «*Jaxongir*», «*Xalima*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Zimistoni*», «*Muqtadir*», «*Hisor*-32», «*Miroz*», «*CIEW*-45», «*Sino*»; imported breeds: «*Flip* 1-01», «*Flip* 1-04», «*Flip* 1-05», «*Flip* 1-19», «*Flip* 1-21», «*Flip* 1-22», «*Flip* 1-29», «*Flip* 1-31», «*Flip* 1-33», «*Flip* 03-102c», «*Flip* 05-59c», «*Flip* 03-74», «*Flip* 06-102c», «*Flip* 06-66», «*Flip* 05-65», «*Flip* 06-124c», «*Flip* 06-80c», «*Flip* 03-27c», «*Flip* 06-155c», kindly given by doctor Ram Sharma from the International Center for agricultural research in the dry areas (ICARDA).

The subject of the research was the isolation of bacteria from chickpea nodules and rhizosphere, screening, definition of selected microorganisms strains

influence on chickpea growth and development in saline soils; establishment of factors effecting chickpea growth and development stimulation and biological control of its root diseases with salt-tolerant bacterial strains of genuses

Pseudomonas and *Mesorhizobium*, used for biopreparation creation; development of laboratory regulations of biopreparation reception and its test under production conditions; optimization of application conditions of the biopreparation increasing chickpea productivity and protecting it from root diseases in soil salinization conditions.

The methods of the research. In the course of researches microbiological, biotechnological, biochemical, spectrophotometric, molecular-biological, chromatographic, agrochemical and biometric methods were used. **Scientific novelty of research** consists in the following:

from nodules and rhizosphere of a chickpea cultivated on saline soils, isolated growth promoting bacterial strains, related to genuses *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* which were identified accordingly as *Pseudomonas chlororaphis* 66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 by means of method of 16S rRNA nucleotide content sequence definition;

received rifampicin-resistant strains of these bacteria thanks to which it was possible to define their colonizing abilities in chickpea root system; for the first time established that *Pseudononas chlororaphis*-66 promotes active nodule formation in chickpea, and also raises its immunity, productivity and resistance to phytopathogenic fungi;

studied various properties of strains *M. ciceri*-4 and *P. chlororaphis*-66, influencing chickpea growth and development, and also factors which are responsible for biological control of phytopathogenic fungi, causing chickpea root diseases;

for the first time established, that various chickpea breeds synthesize exudates of different nature (sugars, acids, amino acids) in different quantities and secrete them through the root system;

by fractionating of root exudates in the column with ion-exchange resin Dowex, 3 fractions: cationic (histidine, arginine, lysine, cysteine, serine, glycine, серин, глицин, asparaginic acid, leucine, isoleucine and alanine), anionic (gluconic, galactonic and mannuronic acids), neutral (glucose, galactose, arabinose, xylose and ribose) are received;

defined that attractive ability of separate fractions (attraction region (cm): cationic-1.0; anionic-0.6; neutral-0.8) is lower, than total (attraction region - 2.8 cm). The mixture of cationic and neutral fractions possesses higher attractive ability, than mixture of cationic and anionic and mixture of anionic and neutral fractions;

for the first time on the basis of selected strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 is developed the new biopreparation «Pseudorhizobin».

Practical results of the research are as follows: laboratory regulations of

biopreparation «Pseudorhizobin» reception are developed and approved under production conditions of LLC «Bio – Ugit» and LLC «Mangit mineral», biopreparation prototype in amount of 1000 kg is produced;

the guidelines «Application of Pseudorhizobin biological preparation at chickpea sowing in saline soils» is developed.

The reliability of the results is proved by that each experiment of research is conducted not less than in 3 replications that allowed finding average most reliable and stable result. The statistical analysis of experimental data is carried out with STATISTICA 6.0 computer program and standard methods of calculation of errors, average, confidence intervals and standard deviations. While choosing the suitable method of mathematical analysis, applicable to results of concrete experiment, we were guided by recommendations presented in appropriate literature. For definition of results statistical significance, calculated Student's t criterion.

Scientific and practical significance of research results. The scientific significance of the research results consists in study of bacteria *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* role in growth and development stimulation, and protection of chickpea against root diseases.

The practical significance of the research results consists, that in the field conditions the screening of various chickpea (*Cicer arietinum* L) breeds on soil salinity resistance is conducted. Many of tested chickpea breeds have never cultivated before in conditions of Uzbekistan. As a result selected the most salt tolerant chickpea breeds which were used for check of «Pseudorhizobin» biopreparation efficiency in the conditions of natural salinization in territory of Kara-Kalpak Republic. The created complex microbiological biopreparation «Pseudorhizobin» for chickpea on the basis of salt-tolerant rhizosphere microorganisms association, promote growth, development and productivity increase of chickpea and also protect it from phytopathogenic fungi causing root rots in salinization conditions. The special technology of reception of this biopreparation is developed. Established that the usage of «Pseudorhizobin» biopreparation allows cultivating chickpea even in saline soils and receiving heavy harvests, especially at use of salt-tolerant chickpea breeds recommended in dissertation. Cultivation of salt-tolerant chickpea breeds with application of «Pseudorhizobin» biopreparation allows to use already became unfit saline soils. The developed technological scheme can be used as model for creation of new microbial preparations for agriculture.

Implementation of the research results. Biopreparation «Pseudorhizobin» 7.7 billion c/ml (*Pseudomonas chlororaphis*-66 - 4 billion c/ml, *Mesorhizobium ciceri*-4 - 3.7 billion c/ml) is registered at session of the State Chemical Commission of RUz and included to the «List of pesticides and agrochemicals permitted for application in agriculture of Republic of Uzbekistan» (2-6/1-33 from 09.03.2016). The efficiency of biopreparation «Pseudorhizobin» against chickpea fusarium wilt was 83.3%. «Pseudorhizobin» promoted chickpea yield increase in

salinization conditions by 22%.

Approbation of the research results. The main provisions of dissertation are presented at the 2nd Asian conference «Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture» (China, Beijing, 2011), VII International scientifically-practical conference «Agrarian science - to agriculture» (Russia, Barnaul, 2012), Republican scientifically-practical conference «Yaylovlardan oqilona foydalanish va muxofaza qilishning institutsional masalalari» (Tashkent,

2013), scientifically-practical seminar devoted to the World day of environmental control «Environmental control in Uzbekistan: its state in the present days and development ways» (Tashkent, 2013), Republican scientifically-practical conference «The Soil Resources of Uzbekistan: status, protection and perspectives of their rational using» (Tashkent, 2013), Regional conference of young scientists «Recent trends in physical and biological sciences» (India, Bangalore, 2014), XXI International scientific conference of students, post-graduate students and young scientists «Lomonosov-2014» (Russia, Moscow, 2014), 20th World Congress of Soil Science (Korea, 2014), XXII International scientific conference of students, post-graduate students and young scientists «Lomonosov-2015» (Russia, Moscow, 2015), scientifically-practical seminar «Soils of Uzbekistan and resource saving technologies of improvement of their fertility» (Tashkent, 2015). Republican scientifically-practical seminar «Atrof muxitni o'zgarishi sharoitida yer resurslarini muxofaza qilish va ulardan oqilona foydalanish masalalari» (Tashkent, 2016).

Publication of the research results. On the theme of the dissertation a total of 29 scientific papers were published. 16 of them are the articles which were published in the journals recommended by the Supreme Attestation Commission of the Republic of Uzbekistan for publishing the main scientific results of doctoral dissertations, including 13 in republican and 3 in international journals.

The structure and volume of the dissertation. The dissertation consists of introduction, four chapters, conclusions, list of references and appendix. The size of the dissertation is 160 pages.

THE MAIN CONTENT OF THE DISSERTATION

In the introduction the topicality and demand of the conducted research is proved, the aim and objectives are formulated, the object and subject of the research are characterized, the conformity of the research to priority directions of development of science and technologies of the Republic of Uzbekistan is shown, the scientific novelty and practical results of the research are stated, the scientific and practical significance of the received results, implementation of the research results, data on published papers and dissertation structure are presented.

In the first chapter of dissertation titled «**The review of literary data on overcoming of salt stress and struggle with chickpea diseases by means of rhizosphere and nodule bacteria of genuses *Pseudomonas* and *Rhizobium***» the analysis of the current state of researches in the field of creation of biological

preparations for plants biological protection against diseases and increase of crops yield is conducted, prospects of use of *Pseudomonas* and *Rhizobium* genuses bacteria as biological growth stimulants of plants, and also agents of phytopathogenic microorganisms biological control are considered, the problem of soil salinization and its effect on chickpea growth and development, prospect of microorganisms usage for alleviation of salt stress in plants, mechanisms of growth stimulation, biological control and alleviation of salt stress in plants by growth promoting rhizobacteria, and also modern biotechnological approaches in livestock and aviculture wastes processing to biofertilizers are presented.

63

In the second chapter of dissertation titled «**Methods of study of morphologically-cultural and phisiologycally-biochemical, growth promoting and biocontrol properties of bacteria**» materials and methods of research are described.

Screening of various chickpea breeds on salt-tolerance is carried out with couching of seeds (with addition 50 and 100 mmol NaCl), plants cultivation in gnothobiotic system with sand (with addition 50 and 100 mmol NaCl) and plants cultivation in pots with saline soil taken from depth of tillage (0-40 cm) of irrigated agricultural field subjected to salinization.

For the isolation of bacteria which are competitive colonizers of chickpea roots used enrichment method (Kamilova et al., 2005). As a result 10 bacterial strains are isolated. Morphologically-cultural and phisiologycally-biochemical properties of strains are investigated. According to studied properties, 10 strains are put into genus *Pseudomonas*.

Nodule bacteria strains are isolated from chickpea large pink nodules for what them superficially sterilized, ground and final suspension inoculated on YMA nutrient medium. The strains were cleaned with the method of limited dilutions (Zvyagintsev, 1991). For check of isolated culture purity used special test for nodule bacteria - growth on lacmus-milk (Tepper et al., 1991).

For check of various selected *Rhizobium* and *Pseudomonas* sp.-66 strains influence on chickpea growth and development in 2012-2014 yy. the field experiments in conditions of the Tashkent state agrarian university experimental station are carried out. Seeds were inoculated with strains suspension (cells titer not less $1x10^8$ c/ml) and then sowed to soil.

For identification of selected growth promoting strains *Pseudomonas* sp.-66 and *Rhizobium* sp.-4 used 16S rRNA analysis. 16S rRNA amplified by means of polymerase-chain reaction (PCR) with use of forward 16SF: 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and reverse 16SR: 5'-GAAAGGAGGTGATCCAGCC-3' primers.

The definition of morphologically-cultural and physiologically-biochemical properties of bacterial strains conducted with standard procedures (Gerhardt, 1984; Netrusov et al., 2005; Smirnov, Kiprianova, 1990; Vincent, 1970).

The properties of *Pseudomonas* sp.-66 and *Rhizobium* sp.-4 strains, promoting chickpea growth and development stimulation are investigated.

Production of indole-3-acetic acid (IAA) studied with Bano and Musarrat method (2003).

For measurement of growth on 1-aminocyclopropane-1-carbon acid (ACC) as a single source of nitrogen, bacterial strains incubated on the suitable mediums (for *Mesorhizobium* - YMA without yeast extract addition, for *Pseudomonas* - peptoneless agar), with addition of ACC as a single source of nitrogen to medium.

The ability of strains to dissolve unsolvable phosphates is estimated on G.S.Muromtsev's medium with addition of $Ca_3(PO_4)_2$ either $FePO_4$, or $AlPO_4$. For definition of nitrogenase activity of the intact legume-rhizobial system the acetylene method was used. The quantity of formed ethilene defined by means of flame-ionization detector in gas chromatographe Chrom-5 (Czech Republic)

(Tepper et al., 1993).

To study pseudomonads and rhizobia strains abilities to biological control of phytopathogenic fungi causing chickpea root diseases in salinization conditions used fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*. For check of antagonistic activity to phytopathogenic fungi used bacterial strains: KR 083, KR 076, 3612, Ep 14, Tivi 7, Rif ep 17, Rube 1326, BB 135, TSAU-20 from collection of Microbiology and Biotechnology department of NUU, and strains *Mesorhizobium ciceri*-4, *Rhizobium* sp.-6, *Rhizobium* sp.-9, *Pseudomonas chlororaphis*-66 isolated from chickpea rhizosphere, and also strain *Rhizobium* sp. IC-53, given by doctor Subramaniam Gopalakrishnan (ICRISAT, India). Antagonistic activity of bacteria in relation to fungi is checked by agar blocks method. Laboratory experiments in which seeds inoculated with bacterial strains (cells titer $1x10^8$ CFU/ml) and sowed in advance infected with fungi spores soil ($3.0x10^7$ spore/kg soil) are conducted.

For check of HCN production by strains the Castric's method (1975) is used. For definition of chitinolytic activity of strains used Moreal and Relse's method (1969). The presence of lipase activity at bacterial strains is checked by test method with Tween lipase indicator. The protease production is defined at strains cultivation on TSB/20 (the one twentieth part of tripsine soybean broth with 1.5% of agar) with addition of skim milk to a final concentration of 5%. The ring appearing around colonies for the first-second day of cultivation, indicated on presence of extracellular protease (Brown, Foster, 1970).

Glucanase activity is studied at use of lichen glucanic substrate, formation of pure zones indicated on substrate destruction (Walsh, 1995). Cellulase activity is found at use CMC (carboxymethil cellulose) as substrate (Hankin, Anagnostakis, 1977).

For definition of the ability to produce siderophores at strains used Schwyn and Neilands's method (1987).

For check and assessment of *Mesorhizobium ciceri*-4 competitiveness in chickpea root colonization against strain *Pseudomonas chlororaphis*-66, used rifampicin-resistant strain *Pseudomonas chlororaphis*-66R (rifampicin 200 μg/ml).

For research of bacteria chemotaxis to chickpea root exudates, collected chickpea seedlings root exudates by their cultivation in exsiccator with the distilled water. Exudates concentrated in vacuum, divided with use of ion-exchange resin various forms of Dowex type. For chemotaxis used Adler modified method (1972).

For assessment of «Pseudorhizobin» biopreparation effect on chickpea productivity, the field experiment in saline soils conditions of Amu Darya district of Kara-Kalpak Republic is conducted. The soil of experimental field had electrical conductivity (EC) - 568 mSm/m (millisimens/meter). The soils with EC higher 400 mSm/m are considered saline (Rhian et al., 2002).

In the third chapter of dissertation titled «**Study of morphologically cultural, physiologically-biochemical, plant growth promoting and biocontrol properties of bacteria *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4**» the results showing possibility of *Pseudomonas chlororaphis*-66 and

Mesorhizobium ciceri-4 strains application for improvement of chickpea growth and development and struggle with the fungi causing chickpea root diseases in salinity conditions are presented.

Screening of some chickpea genotypes on salinization resistance The influence of salinization on different chickpea breeds germination is analyzed. It is established, that analyzed 29 chickpea breeds differ on their resistance to different levels of salinization. Decrease in seeds emergence rate (for 10 day after sowing), in comparison with control variant, was below 25% for «*Sino*», «*Flip* 1-01», «*Flip* 1-04», «*Flip* 1-05», «*Flip* 1-19», «*Flip* 03-27c», «*Flip* 06-155c». Seeds of a chickpea breeds «*Jahongir*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Zimistoni*», «*Flip* 1-22», «*Flip* 1-31», «*CIEW*-45» and «*Flip* 06-80c» showed the best germination (40-45%) at concentration of salt 100 mmol, than other breeds. The growth and nodules formation at various chickpea breeds in saline soil are studied. From 29 breeds 7 are selected («*Jahongir*», «*Uzbekiston*-32», «*Lazzat*», «*Xalima*», «*Miroz*», «*Flip* 1-33» and «*CIEW*-45») as most salt-tolerant. Proceeding from the research results follows, that for achievement of the greatest symbiotic efficiency in salinization conditions, it is necessary to consider plant breeds.

Screening of bacteria capable to stimulate chickpea growth and development
Isolation and screening of Pseudomonas genus bacteria

Effective colonizers can be received after seedlings inoculation with the mixture of various bacteria and seedlings cultivation in gnothobiotic system with sand. Repetition of this method improves the ability of bacteria to colonize roots.

In the present research, we used enrichment method for screening of salt tolerant bacteria of genus *Pseudomonas* colonizing chickpea roots. After third cycle of enrichment, ten best chickpea roots colonizers were selected. Morphological and phisiologycally-biochemical properties of strains which allowed to put selected strains into genus *Pseudomonas* are studied.

It is carried out the screening of selected strains on ability to stimulate

chickpea growth and development. Strain *Pseudomonas* sp.-66 possessed the most strongly pronounced growth stimulation activity concerning chickpea.

Isolation and screening of Rhizobium genus bacteria

10 bacterial strains were isolated from chickpea nodules. One strain - *Rhizobium* sp. IC-53 is given by Doctor Subramaniam Gopalakrishnan (ICRISAT, India). Bacteria actively grew on YMA medium and formed opaque and milky white mucous colonies for 3 day that corresponds to outward of nodule bacteria colonies. Bacteria at growth on lacmus-milk for 10-14 days alkalized it, thus it slightly became blue and formed the light ring - wheyish region. All strains showed positive result at growth on lacmus-milk and were attributed to nodule bacteria of family *Rhizobiaceae*.

Screening of isolated strains on their ability to form nodules on roots and influence chickpea growth and development by means of seeds presowing

inoculation (fig. 1). As a result of screening strains *Rhizobium* sp.-4, *Rhizobium* sp. IC-53, *Rhizobium* sp.-6 and *Rhizobium* sp.-9 are selected for further experiments, as the most active and virulent.

Note: *- statistically significant at $p \leq 0.05$.

Fig. 1. Nodules formation by different strains of nodule bacteria on chickpea roots of breed «*Xalima*».

The influence of various strains of selected bacteria on chickpea growth and development in the field conditions

For check of efficiency of chickpea seeds inoculation with selected bacterial strains on chickpea growth and development, in 2012-2014 yy. field tests at experimental station of Tashkent state agrarian university are conducted (table 1) All selected for field experiments strains of nodule bacteria: *Rhizobium* sp.-4,

Rhizobium sp.-6, *Rhizobium* sp.-9, *Rhizobium* sp.-IC53, promoted improvement of growth and development, and also increase yield of various chickpea breeds, but after joint inoculation of seeds with strains *Rhizobium* and *Pseudomonas* sp.-66 the nodules number on chickpea roots considerably increased in comparison with single inoculation. So, for example, after single seeds inoculation with strain *Rhizobium* sp.-4 the quantity of nodules increased by 67.2%, and after coinoculation with *Rhizobium* sp.-4 and *Pseudomonas* sp.-66 - by 77.4% in comparison with control. Coinoculation of chickpea seeds with two strains was more effective than single coinoculation in increase of chickpea shoots and roots length. So, after seeds inoculation with strain *Rhizobium* sp.-4 the length of chickpea shoots and roots increased by 17.3 and 10.8%, and after seeds coinoculation with strains *Rhizobium* sp.-4 and *Pseudomonas* sp.-66 these indexes increased by 22.6 and 28.6 % respectively in comparison with control.

Thus, the combination of bacteria *Rhizobium* sp.-4 and *Pseudomonas* sp.-66 is the most effective at chickpea seeds coinoculation and promotes active growth and development of plants, and also raises chickpea productivity by 2,3-4,37 c/ha as compared with control.

Identification of selected bacteria strains

For identification the most active strain *Pseudomonas* sp.-66 capable to stimulate chickpea growth and development is chosen and identified by means of 16S rRNA genes analysis. As a result of analysis the part of strain *Pseudomonas* sp.-66 DNA nucleotide sequence which appeared identical to bacterium *Pseudomonas chlororaphis* ATCC 9446 (accession number AF094723) on 99% according to GenBank is defined. Strain *Pseudomonas* sp.-66 is identified as *Pseudomonas chlororaphis*-66 and registered in GenBank under the number KX012005 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX012005?report=GenBank). As the most effective in relation to chickpea growth and development, the strain of nodule bacteria *Rhizobium* sp.-4 is identified by means of 16S rRNA genes analysis. As a result of analysis the part of strain *Rhizobium* sp.-4 DNA nucleotide sequence which appeared identical to bacterium *Mesorhizobium ciceri* ca181 (accession number NZ_CM002796.1) on 99% according to GenBank is defined. Strain *Rhizobium* sp.-4 is identified as *Mesorhizobium ciceri*-4 and registered in GenBank under the number KX012006 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX012006?report=GenBank).

Morphologically-cultural and physiologically-biochemical properties of selected bacterial strains Pseudomonas chlororaphis – 66 and *Mesorhizobium ciceri-4*

Morphology of *Pseudomonas chlororaphis*-66 strain colonies at growth on a solid nutrient medium: 1) on MPA - colonies are roundish with equal edges, smooth, weakly-prominent, not opaque, green in the centre with light border, with mucous consistence, diameter 5-6 mm, observed formation of yellow-green, fluorescing pigment diffusing into medium. Young colonies whitish, the green pigment appears with augmentation of culture age. 2) on MPA with 2% of glycerine - colonies are larger, more intensively colored, than on MPA, more intensive diffusion of yellow-green pigment into medium; 3) on King B - yellow green pigment is formed.

At growth in liquid medium (MPB) strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 forms thin, solid wrinkled film, and on oblique agar (MPA) the streak is abundant, solid with equal edge.

The cells of strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 represent motile, straight, small, gram-negative, aerobic rods with dimension 1.6-1.7 x 0.6-0.8 µm. The strain produces fluorescing pigment, diffusing into medium. At 42°C growth is absent. Growth at 4°C is present, but the slowest. Reaction to catalase and oxidase is positive. Ability to denitrification does not possess. Arginindehydrolase forms. Levan from sucrose doesn't forms. Gelatin, lecithin and starch hydrolyzes.

For its growth strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 is capable to use various

carbon sources: glucose, arabinose, xylose, sucrose, maltose, raffinose, fructose, rhamnose, galactose, glycerine, butanol, hexanol, mannitol, propionic acid, antranic acid, succinic acid, α-ketoglutaric acid, acetate, pyruvate, lactate, citrate, L-tyrosine, D,L-leucine, L-arginine, D,L-alanine, D,L-valine, D,L-tryptophan, L proline, D,L-lysine, D,L-serine, L-asparagine, phenylalanine.

At growth on glucose, xylose, arabinose, sucrose, fructose and galactose the strain produces acid.

It is revealed, that strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 does not have antagonistic activity to *Mesorhizobium ciceri*-4.

Cells of five-day culture *Mesorhizobium ciceri*-4 have a rod form with dimension 1.4-1.6 x 0.3-0.5 μm. The strain is gramme-negative obligate aerobe. Cell colonies on agar mediums (chickpea, pea agars, YMA) are same, circular with the equal accurate contour, shining, white-transparent, convex, mucous, to 2.0-2.5 mm in diameter on 2-3 day at incubation temperature 30°C. Growth at 4°C is take place, but the slowest. The strain is capable to grow on MPA medium, does not hydrolyze the gelatin, does not hydrolyze the starch, has no amilase and oxidase activity on agar with casein, not capable to denitrification, possesses urease and catalase activity, acidates medium at cultivation on fat-free sterile milk, does not produce fluorescent and phenazine pigments. The strain is capable to use the following carbon sources: sucrose, glucose, arabinose, xylose, rhamnose, maltose, lactose, mannitol, sorbitol, dulcite, and as nitrogen sources: ammonium, nitrate, amide nitrogen. The strain changed colour of YMA medium to yellow with addition of bromthymol blue, that indicate that the strain produces acid.

Strain *Mesorhizobium ciceri*-4 does not have antagonistic activity to *Pseudomonas chlororaphis*-66.

Optimal conditions for strains cultivation

Optimal conditions for strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 cultivation are checked. In particular it is revealed, that both strains are capable to grow at concentration of NaCl 4%.

Optimal temperature of strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 cultivation is 34^0C, and strain *Mesorhizobium ciceri*-4 - 30^0C.

Optimal pH value for growth of strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 is 6.2-7.5, and for strain *Mesorhizobium ciceri*-4 - 6.0 - 7.5.

Plant growth promoting properties of strains Pseudomonas chlororaphis-66 and Mesorhizobium ciceri-4

The following properties of strains are studied: IAA production, ACC deaminaze activity, dissolution of unsolvable phosphates and nitrogen-fixing activity.

As a result of experiments it is revealed, that strains synthesise IAA phytohormone, both at presence of tryptophan, and in its absence. The most active

synthesis is take place in the medium free of NaCl, however IAA continues to be produced and at 4% of NaCl (fig. 2).

a b

Note: *- statistically significant at $p \leq 0.05$.

Fig. 2. IAA production by bacteria strains with and without addition of tryptophane at presence of different concentrations of NaCl after 7 days of cultivation: a) *P. chlororaphis*-66, b) *M. ciceri*-4

Strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 are capable to dissolve the unsolvable phosphates $Ca_3(PO_4)_2$, $FePO_4$, $AlPO_4$, at cultivation, both on G.S. Muromtsev's solid nutrient medium, and on NBRIP liquid nutrient medium in the presence of 1.5% NaCl (table 2).

Table 2

Dissolution of the unsolvable phosphates by strains *P.chlororaphis*-66 and *M. ciceri*-4

Strain	$Ca_3(PO_4)_2$		$FePO_4$		$AlPO_4$	
	Solid midium*	Liquid medium**	Solid medium	Liquid medium	Solid medium	Liquid medium
P. chlororaphis-66	156	2.19	143	1.47	0	1.29
M. ciceri-4	135	2.09	126	1.23	0	1.33

Note: * Assessment by method of clarification zones, mm^2.
**Average multiplicity of phosphates concentration excess as compared with control medium.

To check the nitrogen-fixing ability of nodule bacteria in the form of bacteroids it is checked nitrogenase activity of the intact legume-rhizobial system after inoculation of various chickpea breeds seeds with strain *Mesorhizobium ciceri*-4, and also with combination of strains *Mesorhizobium ciceri-4* and *Pseudomonas chlororaphis*-66. At chickpea seeds coinoculation with strains *Mesorhizobium ciceri*-4 and *Pseudomonas chlororaphis*-66 the nitrogenase activity of the intact legume-rhizobial system at all chickpea breeds increased in comparison with single inoculation with strain *Mesorhizobium ciceri*-4 (table 3).

The results of research are indicate that strains *Mesorhizobium ciceri*-4 and *Pseudomonas chlororaphis*-66 form effective symbiosis with chickpea plants.

Table 3

Nitrogenase activity of the intact legume-rhizobial system at single inoculation of seeds with strain *M. ciceri*-4 and at dual inoculation with strains *M. ciceri*-4 and *P. chlororaphis*-66

Chickpea breed	*M. ciceri*-4		*M. ciceri*-4 + *P. chlororaphis*-66	
	Nodules number on a plant roots	Nitrogenase activity, μg N_2/plant/hour	Nodules number on a plant roots	Nitrogenase activity, μg N_2/plant/hour

Xalima	49±3,90*	47±4,10*	72±4,98*	63±4,98*
Uzbekiston-32	18±2,37	26±3,22	31±3,22	41±3,58
Lazzat	45±3,22	42±3,90	59±4,10	58±4,73
Miroz	24±3,22	19±2,37	35±3,22	36±3,22
Jahongir	33±3,58	37±3,22	49±3,90	54±3,90
CIEW-45	48±3,90*	51±4,10*	63±4,98*	65±4,73
Flip 1-31	15±2,37	25±3,22	26±3,22	47±3,90

Note: *- Statistically significant at $p \leq 0.05$

Biological control of phytopathogenic fungi causing chickpea root diseases by means of PGPR in the conditions of soil salinization

The ability of analyzed bacteria to inhibit growth of phytopathogenic fungi is checked (table 4).

Table 4

Phytopathogenic fungi growth inhibition by bacteria (radius of the inhibition zone, mm)

Bacterial strains	Phytopathogenic fungi					
	Fusarium oxysporum f.sp. *ciceris*	*Fusarium verticillioides*	*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*	*Rhizoctonia solani*	*Fusarium solani*	*Alternaria alternata*
KR 083	-	20±1.79	18±0.89	32±2.68*	-	23±1.79
M. ciceri-4	28±1.55	30±2.37*	31±2.37*	16±1.79	29±3.22*	34±2.37*
3612	16±1.55	29±2.37*	32±2.37	-	31±2.37	30±2.37*
Ep 14	-	16±1.55	26±1.55	15±0.89	30±2.37	31±2.37*
Tivi 7	-	18±1.79	33±2.37*	35±2.37	-	25±1.55
KR 076	-	14±0.89	-	30±2.37	27±1.79	29±2.37*
Rhizobium sp.-6	-	23±2.37*	23±1.55	22±1.55	14±0.89	23±1.55
Rif ep17	16±1.79	-	22±1.79	22±1.79	25±1.55	-
Rhizobium sp.-9	25±1.55	15±0.89	35±2.37*	26±1.79	26±1.79	5±0.89
Rube 1326	18±1.55	-	20±1.55	24±1.55	22±1.55	17±1.79
P. chlororaphis-66	32±2.37*	23±1.55	34±2.37*	24±1.79	33±2.37	29±2.37*

BB-135	25±2.37*	-	22±1.55	19±1.55	16±1.79	22±1.55
TSAU-20	21±1.79	-	21±1.79	22±1.79	32±2.37	24±1.79
Rhizobium sp. IC-53	-	18±1.79	18±1.55	25±1.55	21±1.55	20±1.79

Note: *- Statistically significant at $p \leq 0.05$

All investigated strains possessed more or less expressed antagonistic activity to phytopathogens on what indicates the formation of fungi growth inhibition zones around bacterial colony.

Strains *Mesorhizobium ciceri*-4 and *Pseudomonas chlororaphis*-66 are

especially stand out. The present strains possess heightened antagonism to all studied fungi species. Strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 is the best, of investigated bacteria, antagonist of fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (radius of fungi growth inhibition is 32 mm) and *Fusarium solani* (33 mm). Strain *Mesorhizobium ciceri*-4 showed the strongest antagonism against fungi *Fusarium verticillioides* (radius of fungi growth inhibition is 30 mm) and *Alternaria alternata* (34 mm).

Properties of bacteria realizing biological control of phytopathogenic fungi

Strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 possess high antifungal activity in relation to wide spectrum of phytopathogenic fungi. Results of study of the main factors realizing biological control of phytopathogenic fungi are presented below.

Strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 is capable to produce following hydrolytic enzymes (chitinase, cellulase and protease), and also HCN (table 5). This strain is capable to use ACC as a nitrogen source that indicate on presence of ACC-deaminase which plays an important role in ethylene level lowering at plants in stress conditions. Strain *Mesorhizobium ciceri*-4 did not have ability to produce HCN, ACC-deaminase, chitinase and cellulase. However the strain produces glucanase, lipase and protease which also promote inhibition of fungal activity in a chickpea rhizosphere.

Table 5

Chitin hydrolysis by strain *Pseudomonas chlororaphis*-66

Time of cultivation, days	Efficiency of chitin hydrolysis*
4	1.6
6	2.8
7	3.4

8	5.78

Note: *- ratio of the diameter of a turbid medium halo zone (containing chitin) around the colony to diameter of a colony, mm/mm

Strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 are checked on siderophore production by means of CAS analysis and compared to typical strain *Rhizobium meliloti* (table 6). It is revealed, that strains possess ability to produce siderophores, thereby reducing in soil availability of iron necessary for fungi growth. This ability is one more important bacterial factor of phytopathogenic fungi growth inhibition in soil.

PGPR Pseudomonas can influence positively on a plant only at successful colonization of its rhizosphere by them. Rifampicin resistant strain *Pseudomonas chlororaphis*-66R is checked on competitiveness in chickpea root colonization against the typical roots colonizer *Pseudomonas fluorescens* WCS365 (Lugtenberg et al., 2001). It is appeared, that in the presence of 1.5% NaCl strain *Pseudomonas chlororaphis*-66R ($10.5x10^3$ CFU/cm of root), colonizes chickpea roots better than typical strain ($9.3x10^3$ CFU/cm of root).

Strain *Mesorhizobium ciceri*-4 is checked on competitiveness in colonization of

chickpea root against strain *Pseudomonas chlororaphis*-66R in which the ability to active colonization of chickpea roots is found. In the presence of 1.5% NaCl strain

Table 6

CAS analysis for siderophores production by strains

Strain	CAS analysis (formation of orange rings on a blue agar)	Ring diameter (cm)
P. chlororaphis-66	+	1.67±0.2
M. ciceri-4	+	1.53±0.4
R. meliloti	+	1.70±0.3

Note: + means that CAS analysis was positive.

Mesorhizobium ciceri-4 is capable to compete in chickpea roots colonization, and thus concentration of this strain is only a little lower ($8.9x10^3$ CFU/cm of root), than of *Pseudomonas chlororaphis*-66R ($11.4x10^3$ CFU/cm of root). It means that both strains are competitive in chickpea root colonization; both strains are capable to live simultaneously on chickpea roots and compete to phytoedaphon.

Chemotaxis of bacteria to chickpea root exudates

Roots colonization by bacteria introduced from the outside is the main factor influencing efficiency of their action on plants. The first stage of chickpea roots colonization by certain bacteria is their taxis to plant roots. Chemotaxis activity depends on quantity and composition of root exudates. Therefore we studied quantity and composition of two chickpea breeds root exudates – «*CIEW*-45» and «*Hisor*-32». Earlier we carried out field experiments on two breeds' seeds inoculation with various bacteria strains. As a result productivity of both breeds raised, however at a breed «*Hisor*-32» it has appeared almost in 4 times lower, than at a breed «*CIEW*-45».

Research results showed, that breeds «*CIEW*-45» and «*Hisor*-32» differ both on quantity of secreted root exudates, and on quality, and the breed «*Hisor-32*» concedes in it to breed «*CIEW*-45», especially in quantity of cationic fraction in exudates and generally because of much lower content of histidine (almost in 2 times less than at a breed «*CIEW*-45») which is the most preferable nutrition source for bacteria among other amino acids amounting cationic fraction. Such distinctions in exudates secretion influence the power of bacteria chemotaxis to roots of various chickpea breeds that is experimentally confirmed. Thus both bacteria strains *Mesorhizobium ciceri*-4 and *Pseudomonas chlororaphis*-66 investigated by us, at same quantity of root exudates of chickpea breeds «*CIEW* 45» and «*Hisor*-32» prefered exudates of breed «*CIEW*-45», thanks to a difference in the ratio of fractions and their components at two breeds. It is revealed, that cells of strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 move to root exudates faster, than *Mesorhizobium ciceri*-4 and reach the concentration equal to concentration of *Mesorhizobium ciceri*-4 already in 15 minutes whereas cells of *Mesorhizobium ciceri*-4 spend 30 minutes for this. Concentration of exudates 3.88 mg/ml is enough for maximal chemotaxis of strain *Mesorhizobium ciceri*-4, and for strain

Pseudomonas chlororaphis-66 concentration 7.75 mg/ml is sufficient, at the further increase of exudates concentration the speed of chemotaxis almost does not change. The mixture of all three fractions of root exudates is the most preferable, than mixture of any two fractions for both strains. It is revealed, that from the mixture of two fractions for strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 cationic and anionic mixture is more preferable, and for strain *Mesorhizobium ciceri*-4 - the mixture of cationic and neutral.

Chickpea root exudates of two breeds contained various components in different proportions. Apparently, the presence of these chemicals at certain proportions is a key point for effective roots colonization by *Mesorhizobium ciceri*-4 and *Pseudomonas chlororaphis*-66, and also for establishment of effective symbiosis between pulse and rhizobia. Roots colonization by strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 is very important in increase of chickpea and nodule bacteria symbiosis efficiency and chickpea protection against phytopathogenic fungi. Thus, because different chickpea breeds secrete different quantity of root exudates with

different ratio of their components, the activity of beneficial bacteria chemotaxis to roots is different that as a result influences degree of roots colonization and on productivity of this or that chickpea breeds at seeds inoculation with bacteria.

In the fourth chapter of dissertation titled «**Pseudorhizobin**» **- the effective microbiological preparation for chickpea**» the results of check of «Pseudorhizobin» preparation efficiency in salinity conditions are presented.

As a result of conducted researches on the basis of selected strains we developed an effective biological preparation of complex action for chickpea. The biopreparation is named «Pseudorhizobin», as result of joining of bacteria genuses Latin names «*Pseudomonas*» and «*Rhizobium*».

In figure 3 the technological scheme of biological preparation «Pseudorhizobin» production is presented.

The complex actions of the biopreparation consist that it can stimulate chickpea growth and development, and also protect it from root diseases caused by phytopathogenic fungi. This biopreparation is designed for presowing treatment of chickpea seeds by method of their inoculation for the purpose of increased crop acquisition at chickpea cultivation in saline soils.

For the purpose of check of «Pseudorhizobin» biopreparation efficiency on chickpea growth and development the field test in the conditions of natural soil salinization of Amu Darya district of Kara-Kalpak Republic is carried out (2015).

After application of «Pseudorhizobin» biopreparation the yield of «*Xalima*» and «*Uzbekiston*-32» chickpea breeds increased by 21,9%, at breed «*CIEW*-45» - by 22%. Similar results are received with other breeds. Thus effectiveness in growth ratio, development and productivity directly depends on soil moisture, if the soil dries up the quantity of viable bacteria introduced with biopreparation goes down that result in decrease in their influence on productivity.

Economic efficiency from application of biopreparation «Pseudorhizobin» is counted up. The greatest profit is received after «Pseudorhizobin» application from the breed «*CIEW*-45» - 1602000 sum, on the second place the breed «*Xalima*» -

1537000 sum.

Mesorhizobium ciceri - 4	*Pseudomonas chlororaphis*-66	Livestock dung + worms mixture of red Californian worm hybrid and manure worms (50/50), 10 thous. worms/1 m^2
Slopes with «YMA» medium	medium	
Fermentation on «Legume broth» medium with the volume increase (3 days at 30°C)	Fermentation on «Peptone broth» medium with the volume increase (3 days at 34°C)	Biohumus predrying in hot air flow till 55% humidity
Bacterial suspension of strain *M. ciceri* - 4 CFU $8x10^7$ Slopes with «Peptone agar»	Bacterial suspension of strain *P. chlororaphis* - 66 CFU $3.6x10^8$ Tashkent population of annelid	Biohumus modification by addition of salts: molasses – 3-5%, $CaCO_3$- 3%, potassium humate-3%,

$MgSO_4$-1%, K_2HPO_4-1%, $(NN_4)_6Mo_7O_{24}x4H_2O$-0.05%, $MnSO_4$-0.05%, $FeSO_4$-0.05%,

Substrate inoculation with bacterial suspensions,
20 ml/kg

titer of *M. ciceri*-4 – $8x10^9$ CFU/g, titer of *P. chlororaphis*-66 – $9x10^9$
CMC-2%

Cultivation at 30°C, 14 days

Sterilization by γ-radiation, radiation dose is 2.5 MRad

«Pseudorhizobin»

Fig. 3. Technological scheme of biopreparation «Pseudorhizobin» production

Biopreparation «Pseudorhizobin» enriches nutritive value of chickpea seeds. The quantity of protein on the average increased by 5%, fat - by 4 %, carbohydrates - by 2% in comparison with control (without application of «Pseudorhizobin»).

On the experimental plot of Uzbek scientific research institute of plants protection (UzSRIPP) checked the efficiency of biopreparation «Pseudorhizobin» against fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Biological efficiency of biopreparation «Pseudorhizobin» against fusarium wilt of chickpea at norm 70.0 kg/t seeds in the end of vegetation was 83.3%. This result is just a little bit lower than result (86.1%) of etalon - chemical preparation «Vitavaks 200 FF 34% v.s.k.».

Thus, biological preparation «Pseudorhizobin» showed high biological efficiency that allows calling it perspective in chickpea fusarium wilt control.

CONCLUSION

As a result of the researches carried out on the theme of the doctoral dissertation «The role of rhizosphere microorganisms in stimulation of growth and

development of chickpea and biological control of its root diseases in salinity conditions» presented the following conclusions:

1. From the rhizosphere and nodules of chickpea by the screening method isolated and selected salt-tolerant strains of bacteria of genuses *Pseudomonas* and *Mesorhizobium* capable to enhance growth and development of a chickpea in salinity conditions.

2. Morphologically-cultural and physiologically-biochemical properties of the selected strains are studied. By means of 16S rRNA analysis the selected bacteria

strains are identified as *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 and registered in GenBank under the numbers KX012005 and KX012006 respectively.

3. The optimal conditions of the isotaled strains *Pseudomonas chlororaphis* 66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 cultivation and their ability to grow at NaCl concentration 4% are defined. The optimal temperature of strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 cultivation is 34^0C, for strain *Mesorhizobium ciceri*-4 - 30^0C. The optimal pH value for growth of strain *Pseudomonas chlororaphis*-66 is 6.2-7.5, for strain *Mesorhizobium ciceri*-4 – 6.0-7.5.

4. It is established that strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 due to IAA and ACC-deaminase synthesis, dissolution of unsolvable phosphates, nitrogenase activity, survival rate of bacteria on chickpea roots, and also salt-tolerance, promote growth and development improvement and productivity increase of salt-tolerant chickpea breeds in salinization conditions.

5. The antifungal properties of strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 in relation to phytopathogenic fungi *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *R. solani*, *F. solani*, *A. alternata* causing chickpea root diseases are studied.

6. It is studied the quantitative and qualitative composition of root exudates at early stages of chickpea vegetation. It is established, that the main components of root exudates of various chickpea breeds are amino acids, sugar acids and sugars which quantity and ratio has breed-specific nature. Exometabolites (histidine, gluconic acid, glucose) are the main factor promoting roots colonization by introduced beneficial bacteria and define plant resistance to external stressful conditions (salinization, morbidity), and also indirectly promote chickpea yield increase.

7. On the basis of aboriginal salt-tolerant bacterial strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 the effective microbiological preparation «Pseudorhizobin» designed for chickpea seeds presowing treatment is created. «Pseudorhizobin» promotes significant improvement of chickpea growth and development, increases its productivity and also protects from fusarial wilt in the conditions of middle-degree soil salinization.

8. The biotechnology of «Pseudorhizobin» biopreparation reception is worked-out and includes acquisition of biohumus from livestock dung by means of worms mixture «red Californian worm hybrid» and Tashkent population of annelid dung worms (50/50), further biohumus modification by addition of molasses, potassium humate, mineral salts and CMC as a sticker, biohumus sterilisation and

strains *Pseudomonas chlororaphis*-66 and *Mesorhizobium ciceri*-4 cultivation in it at optimal temperature and pH for achievement of maximal titer of bacteria. The regulations are tested in the conditions of LLC «Bio-ugit» and LLC «Mangit Mineral» with positive effect (certificates are attached). The laboratory regulations are approved in the conditions of LLC «Bio-Ugit» and LLC «Mangit Mineral» with positive effect. The practical recommendations on application of

«Pseudorhizobin» biopreparation at chickpea growing are developed, approved and published.

9. The assessment of «Pseudorhizobin» biopreparation efficiency in a chickpea crop increase is carried out. It is shown that in the natural soil salinization conditions, after chickpea seeds inoculation with the biopreparation, the yield of chickpea breeds «*Xalima*» and «*Uzbekiston*-32» increased by 21.9% and at breed «*CIEW-45*» - by 22%. The assessment of «Pseudorhizobin» biopreparation biological efficiency against chickpea fusarium wilt which was 83.3% is carried out.

ЭЪЛОН ҚИЛИНГАН ИШЛАР РЎЙХАТИ
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ
LIST of PUBLISHED WORKS

I бўлим (часть I; part I)

1. Шурыгин В.В., Лян Ю.В., Жаббарова Д.П., Буриев Т.Х., Эгамбердиева Д.Р., Давранов К. Банк ризосферных бактерий с антифунгальной активностью// УзМУ хабарлари, 2011. – №2. – С. 132-134.

2. Эгамбердиева Д., Жабборова Д., Шурыгин В., Эргашева У., Давранов К. Физиологическая характеристика ризосферных бактерий рода *Pseudomonas*, выделенных из засоленных почв Узбекистана// УзМУ хабарлари, 2011. – №2. – С. 128-131.

3. Egamberdieva D., Shurigin V., Davranov K. Colonisation of *Pseudomonas chlororaphis* TSAU13 and *Pseudomonas extremorientalis* TSAU20 in the rhizosphere of wheat under salt stress// Узбекский биологический журнал, 2011. – №4. – С. 26-29.

4. Шурыгин В.В., Нахалбаев Ж.Т., Давранов К. Влияние инокуляции семян нута бактериями *Rhizobium* и *Pseudomonas* на рост и развитие нута в условиях засоления// УзМУ хабарлари, 2012. – №4. – С. 35-40.

5. Лян Ю.В., Шурыгин В.В., Эгамбердиева Д.Р., Давранов К. Выделение и характеристика новых активных штаммов рода *Pseudomonas*// Доклады академии наук Республики Узбекистан, 2012. – №4. – С. 65-70.

6. Шурыгин В.В., Эгамбердиева Д.Р., Нахалбаев Ж.Т., Хаитов Б. Скрининг некоторых генотипов нута по устойчивости к засолению в засоленных, засушливых почвах Узбекистана// УзМУ хабарлари, 2012. – №4. – С. 38-39, 44-45.

7. Лян Ю.В., Шурыгин В.В., Ражабов У.Р., Давранов К. Микробиопрепараты на основе ризосферных бактерий и их использование в сельскохозяйственной практике// УзМУ хабарлари, 2012. – №4. – С. 49-52.

8. Шурыгин В.В., Давранов К. Выделение и очистка бактерий семейства *Rhizobiaceae*, а также отбор штаммов, способных к образованию эффективных симбиозов с нутом// Узбекский биологический журнал, 2013. – №2. – С. 17-22.

9. Шурыгин В.В., Давранов К. Физиологическая характеристика и изучение свойств штамма *Mesorhizobium ciceri*-4, способствующего росту и развитию нута в условиях засоления// УзМУ хабарлари, 2013. – №4 (2). – С. 244-250.

10. Шурыгин В.В. Бактерии рода *Pseudomonas*, стимулирующие рост и развитие нута (скрининг)// УзМУ хабарлари, 2013. – №4 (2). – С. 184-186. 11. Шурыгин В.В., Эгамбердиева Д.Р., Давранов К.Д. Азотфиксирующая активность почв прикорневой зоны нута (*Cicer arietinum* L.), хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.)// Доклады академии наук Республики Узбекистан, 2014. – №4. – С. 69-72.

12. Шурыгин В.В., Эгамбердиева Д.Р., Давранов К.Д. Механизмы

влияния *Pseudomonas chlororaphis*-66 на рост и развитие нута в условиях засоления// Узбекский биологический журнал, 2014. – №3. – С. 16-21. 13. Шурыгин В.В., Эгамбердиева Д.Р., Давранов К.Д. Сравнение микробной

активности в ризосфере нута (*Cicer arietinum* L.), хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) и пшеницы (*Triticum aestivum* L.)// Узбекский биологический журнал, 2014. – №4. – С. 14-19.

14. Egamberdieva D.R., Shurigin V.V., Gopalakrishnan S., Sharma R. Growth and symbiotic performance of chickpea (*Cicer arietinum*) cultivars under saline soil conditions// Journal of Biological and Chemical Research, 2014. – Vol. 31, No. 1. – P. 333-341. (№5. Global, IF=0,756)

15. Shurigin V.V. Technology of creation of complex microbiological «Pseudorhizobin» preparation improving chickpea growth and productivity in salinity conditions// International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 2014. – Vol. 5, No. 2. – P. 262-270. (03.00.00. №9)

16. Shurigin V.V., Davranov K. Abdiev A. Screening of salt tolerant rhizobia for improving growth and nodulation of chickpea (*Cicer arietinum*) under arid soil conditions of Uzbekistan// Journal of Biological and Chemical Research, 2015. – Vol. 32, No. 2. – P. 534-540. (№5. Global, IF=0,876)

II бўлим (часть II; part II)

17. Egamberdieva D., Jabborova D., Lyan Yu., Shurigin V., Davranov K. Colonisation of *Pseudomonas chlororaphis* TSAU13 and *Pseudomonas extermorientalis* TSAU20 in the rhizosphere of wheat under salt stress// Proceedings of the 2nd Asian PGPR Conference on Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) for sustainable agriculture. – Beijing (P.R. China), 2011. – P. 486.

18. Эгамбердиева Д.Р., Шурыгин В.В., Давранов К. Увеличение плодородия и продуктивности засоленных засушливых почв при использовании бактериальных удобрений// Аграрная наука - сельскому хозяйству: VII Международная научно-практическая конференция. – Барнаул (Россия), 2012. – Сборник статей, кн. 2. – С. 257-258.

19. Shurigin V.V. Improvement of growth and development of chickpea under arid saline soil conditions// «Охрана окружающей среды в Узбекистане: её состояние в настоящие дни и пути развития»: научно-практический семинар, посвящённый Всемирному Дню охраны окружающей среды. – Ташкент, 2013.

20. Шурыгин В.В., Давранов К. Выращивание нута, с применением препарата «Псевдоризобин» - одно из решений проблемы деградации почвы пастбищ// Яйловлардан оқилона фойдаланиш ва муҳофаза қилишнинг институционал масалалари: Республика илмий-амалий конференция. – Ташкент, 2013. – С. 174-178.

21. Shurigin V.V., Davranov K. The new bacterial preparation increasing potential of a chickpea in carbon sequestration and improving soil fertility// The soil resources of Uzbekistan: status, protection and the perspectives of their